

Université d'Artois

**Concours externe assistant ingénieur BAP A
Expérimentation et instrumentation biologiques**

Session 2011

Epreuve d'admissibilité – Durée : 3 heures – Coef. 4

Mardi 3 mai 2011

Instructions :

Ce dossier comporte 11 pages (celle-ci incluse). Vous devez vérifier en début d'épreuve le nombre de pages. **Les réponses doivent être données sur la / les copie(s) jointe(s).**

Aucun document ou matériel n'est autorisé.

Cette épreuve comporte 3 parties. Le premier document est le support de travail des sujets 1 et 2. Le second document est celui du sujet 3.

Il vous est rappelé que votre identité ne doit figurer que dans la partie supérieure de la bande à en tête de la copie mise à disposition. Toute mention d'identité ou tout signe distinctif porté sur toute autre partie de la copie mènera à l'annulation de votre épreuve.

Document Sujet 1

Etude synthétique d'extrait publication en anglais :

CD4 and CD8 Enumeration for HIV Monitoring in Resource-Constrained Settings

Xiao Li,¹ Christian Breukers,¹ Aurel Ymeti,¹ Björn Lunter,¹
Leon W. M. M. Terstappen,^{1*} and Jan Grevel
¹University of Twente, Faculty of Science and Technology, Medical Cell Biophysics,
Drienerlolaan 5, 7500AE Enschede, The Netherlands

Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 76B:118–126 (2009)

RESUME :

Background: We developed a volumetric single platform image cytometer (SP ICM) that is dedicated to count CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes for HIV monitoring in resource-constrained settings. The instrument was designed to be low-cost, yet reliable, easy-to-use, and robust.

Methods: Whole blood is incubated with CD3-magnetic nanoparticles, CD4-phycoerythrin (PE), and CD8-peridinin-chlorophyll-protein complex (PerCP). The CD3 cells are immunomagnetically attracted to an analysis surface, where fluorescence images of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes are recorded and analyzed, respectively. We compared CD4, CD8 counts, and CD4/CD8 ratio obtained by the SP ICM with those from a SP flow cytometer (FCM) method on blood samples from 145 patients.

Results: Good correlations were obtained (R : 0.96–0.99) between the SP ICM and the SP FCM. There was 10% CD8 undercount in the SP ICM, which could be partly caused by CD8⁺ dim T lymphocytes that were not detected by the instrument or not counted by the image analysis due to the cross-talk from the CD4-PE signal in the CD8-PerCP image.

Conclusions: The SP ICM is a good candidate for HIV monitoring in point-of-care settings of resource constrained countries.

EXTRAITS DE LA PUBLICATION :

INTRODUCTION :

Since the official date for the beginning of the AIDS epidemic in 1981 in Los Angeles, HIV infection has become a global pandemic major health emergency. This epidemic has formed a serious, and in many countries, devastating, crisis. It is estimated that, in 2006, 39.5 million human beings were living with HIV, among them 95% were living in developing countries .

Immunophenotyping of T lymphocytes subsets provides important information of patients' immune system. T lymphocytes (CD3⁺ T lymphocytes) comprise two varieties: Helper T cells (CD4⁺ T lymphocytes) and cytotoxic T cells (CD8⁺ T lymphocytes)). HIV infects primarily CD4⁺ T lymphocytes and kills them.

HIV infection is associated with a progressive decrease of the CD4+ T lymphocytes count and an increase in viral load. CD8+ T lymphocytes count increase at the beginning of HIV infection and keep on increasing through the progression .

For HIV-infected patients, routine monitoring of CD4+ T lymphocytes count provides important information on their immune status. The CD4+ T lymphocytes counts are essential to decide when to start the antiretroviral therapy (<350 cells/ul), to monitor the effect of this treatment, and to decide when to stop opportunistic infection prophylaxis .

Currently, flow cytometry (FCM) is the most widely accepted method for CD4+ T and CD8+ T lymphocytes enumeration. However, FCM instruments are expensive (US\$20,000–125,000), and the price of an FCM assay (US\$ 5–50) is relatively high. Furthermore, the operation and maintenance of an FCM require well-trained technicians and stable electricity.

Affordable, simple, easy-to-use, and reliable systems for CD4+ and CD8+ T lymphocytes enumeration are therefore urgently needed.

Previously, we developed a simple single platform image cytometer (SP ICM) to enumerate CD4+ T lymphocytes after immunomagnetic selection and immunofluorescent labeling .

The instrument is easy-to-use, compact, and yet reliable. It is computer-controlled and can operate on a 12-V rechargeable battery. Only one reagent's incubation step is needed for sample preparation, which makes training easy.

Further development of the SP ICM permitted the detection of both CD4+ T lymphocytes and CD8+ T lymphocytes as well as the Helper/Cytotoxic T lymphocytes ratio (CD4/CD8 ratio).

In this system, CD3 immunomagnetic selection is combined with CD4-phycoerythrin (PE) and CD8-peridinin-chlorophyll-protein complex (PerCP) labeling. First, CD3 cells in whole blood are immunomagnetically attracted to an analysis surface. Then, CD4+ T lymphocytes and CD8+ T lymphocytes can be counted in fluorescence images. With this information, the CD4/CD8 ratio can be determined.

In this work, we evaluated the system for its ability to count CD4+ T and CD8+ T lymphocytes and to determine the CD4/CD8 ratio on blood specimens of 145 patients. The results were compared with those obtained by the SP FCM method.

MATERIALS AND METHODS

Blood Collection

Blood samples from 95 randomly selected HIV2 patients and 50 HIV1 patients were supplied by MST Hospital, Enschede, The Netherlands. All blood samples were collected in sterile K3EDTA blood collection tubes and processed within 8 h after they are drawn.

CD4+ T and CD8+ T Lymphocytes Enumeration by Single Platform FCM

Samples were prepared according to the manufacturer's recommendation. For samples of infants younger than 2 years old, 25 ul of whole blood instead of 100 ul was used. The samples were analyzed on a Cytomics FC500 (Flow cytometer) and absolute CD3, CD4, and CD8 counts were obtained.

CD4+ T and CD8+ T Lymphocytes Enumeration by SP ICM

One-step immunolabeling : To 100 ul (25 ul was used for blood samples from children) EDTA-anticoagulated whole blood, 10 ul of reagents cocktail, which contains 3 ul of CD3-ferrofluid , 4 ul of CD4-PE and 3 ul of CD8-PerCP were added and mixed.

After 15-min incubation, the sample was diluted with system buffer to a final volume of 400 ul. Approximately 340 ul of the sample solution was transferred into the analysis chamber.

The chamber was plugged and placed into a magnet assembly. After 20-min magnetic separation, the sample was ready to be analyzed.

During the magnetic separation period, the CD3 immunomagnetically labeled cells are subjected to a homogeneous magnetic force pointing in the positive Z-direction of the magnetic chamber . The cells then move to the analysis surface at the upper glass surface of the chamber. For excitation of PE and PerCP, two 3-W light-emitting diodes (LEDs) are mounted symmetrically above the magnet.

The emission fluorescent signal is collected by a 103 objective and filtered by emission filters mounted on a filter slider. Two emission filters were used: the 595AF60 for PE fluorescence and the 695AF55 for PerCP fluorescence.

The filtered fluorescence is collected onto a CCD camera. The recorded images are transferred to a single board computer equipped with a touchscreen monitor.

The images are analyzed using dedicated image analysis algorithms to determine the number of CD4+ T and CD8+ T lymphocytes per microliter .

The CD4/ CD8 ratio is calculated from these data. For each test, three images from separate positions, each corresponding to 1.16 ul of whole blood, are recorded, and the counts are averaged.

The dimensions of the SP ICM instrument are 25 cm X 25 cm X 20 cm. The system operates on 125–240 V or on one 12-V rechargeable battery. With a fully charged 12-V, 7 Ah lead-acid battery, the SP ICM instrument can run for 2 h and analyze about 15 samples for both CD4 and CD8 enumeration. A small 30 Ah car battery is able to support the instrument for 8 h.

DISCUSSION

The SP ICM was tested by determinations of CD4+ T and CD8+ T lymphocytes counts and CD4/CD8 ratios. The system was evaluated by comparison with the SP FCM method on blood specimens of 145 patients.

The CD4 values measured agreed very well with the SP FCM data.

The CD8 counts and CD4/CD8 ratios did show good linear relations with the FCM data,.

Our portable, battery-operated, and computer-controlled automated instrument is low-cost (components cost: US\$3,000; assay cost: US\$3 for CD4 and CD8), yet reliable, and robust. No alignment or calibration is needed.

The immunolabeling method and the instrument are easy-to-use even for less-trained operators.

In conclusion, our system is a good candidate for HIV monitoring in point-of-care settings of resource-constrained countries.

In addition, a great application of this CD4/CD8 ratio determination system is to establish a presumptive diagnosis of HIV infection in HIV-1 exposed infants under the age of 18 months in resource-constrained countries where PCR or RT-PCR methods are not available

EPREUVE ASI
« Expérimentation et instrumentation biologiques »
BAP A
UNIVERSITE D'ARTOIS
2011

SUJET 1 :
"CD4 and CD8 Enumeration for HIV Monitoring
in Resource-Constrained Settings"

Questions :

Vous devrez montrer vos capacités à lire rapidement une publication (résumé, matériel et méthodes, conclusion principalement) afin de :

- Comprendre le but du travail publié
- Synthétiser brièvement les moyens mis en œuvre et les comparer
- Résumer brièvement la conclusion de l'étude

Questions (réponses brèves et synthétiques):

1- But de l'étude (3 lignes maximum).

Dans quel contexte géo économique le problème du suivi des patients VIV + est-il posé ?

2- Quelles sont les deux techniques utilisées ? quelle est la technique de référence ? quelle est la nouvelle technique et en quoi consiste t-elle ? Quel paramètre biologique est important pour le suivi de ces patients ?

3- Conclusions principales de la publication (5 lignes maximum)

Dans les pays à ressources restreintes, quels critères permettent de choisir une méthode de suivi des patients VIH+ ? Enumérer les critères de choix d'une telle technique.

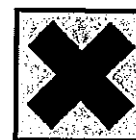
EPREUVE ASI
« Expérimentation et instrumentation biologiques »
BAP A
UNIVERSITE D'ARTOIS-2011

Sujet 2
Hygiène et Sécurité

1- A la lecture du document du sujet 1, quel est en situation de travail le danger majeur auquel vous êtes confrontés?

2- Quel est ici l'origine de ce danger? Décrivez-le.

3- Parmi ces pictogrammes, quel est celui que vous choisissez pour signaler ce danger spécifique?



4- Quelle est sa signification exacte de pictogramme : en particulier, pour quels niveaux de confinement ce pictogramme doit-il être apposé à l'entrée du laboratoire?

A votre avis, dans la situation envisagée dans cette publication, à quel niveau de confinement pourriez-vous vous situer ?

5- Qu'est-ce qu'un Equipement de Protection Collective?

Quel type d'EPC pourriez-vous être amené à utiliser spécifiquement dans la situation présente.

6- Quels sont les équipements de protection individuels que vous utiliseriez, citez en au moins trois?

7- Quelle méthode de stérilisation mettriez-vous en œuvre afin de détruire les échantillons analysés ?

8- Citez la filière spécifique que doivent suivre les déchets générés toujours dans cette même situation ?

Les fards protégeaient les yeux des Égyptiens

Le maquillage noir qui ornait les paupières des Égyptiens de l'Antiquité stimulait efficacement leur système immunitaire. Et l'agent principal de cette stimulation était un élément considéré comme toxique : le plomb.

PAR Franck Daninos, journaliste.

Lorsque les Égyptiens antiques fardaient leurs cils et leurs paupières d'un onguent de couleur noir, ils ne le faisaient pas uniquement pour des raisons esthétiques. Ils pensaient que cet onguent était une émanation directe des dieux Ra et Horus, qui, par ce truchement, les protégeaient de toutes sortes de maladies. Dans l'ancienne Égypte, l'ensemble de la population utilisait ainsi cet onguent – hommes, femmes et enfants, sans distinction d'âge, ni de classe.

Défenses stimulées. Cette croyance n'était pas dénuée de tout fondement. La protection conférée par ces fards ne relevait pas seulement de pouvoirs magiques, mais aussi de la composition chimique des produits avec lesquels les Égyptiens se maquillaient les yeux. Telle est la conclusion d'une série de travaux réalisés depuis une quinzaine d'années par des chimistes français. Ils ont en effet découvert que ces fards contenaient des traces de chlorure de plomb. À très faible dose, ces composés n'étaient pas toxiques pour la peau : ils stimulaient, au contraire, les défenses immunitaires, et protégeaient ainsi les Égyptiens de maladies de l'œil.

Des chimistes s'étaient déjà penché sur la composition des fards égyptien au début du XX^e siècle. Ils avaient alors constaté que ces fards contenaient de la galène, minéral de couleur noire constitué de sulfure de plomb – sans identifier d'autres composés, ni tirer de quelques conclusions. En 1996, Philippe Walter et ses collègues du Centre de recherche et de restauration des Musées de France (C2RMF) ont voulu aller plus loin. Leur objectif : caractériser aussi précisément que possible la composition des fards égyptiens dans le but de connaître puis de reproduire leur secrets de fabrication.

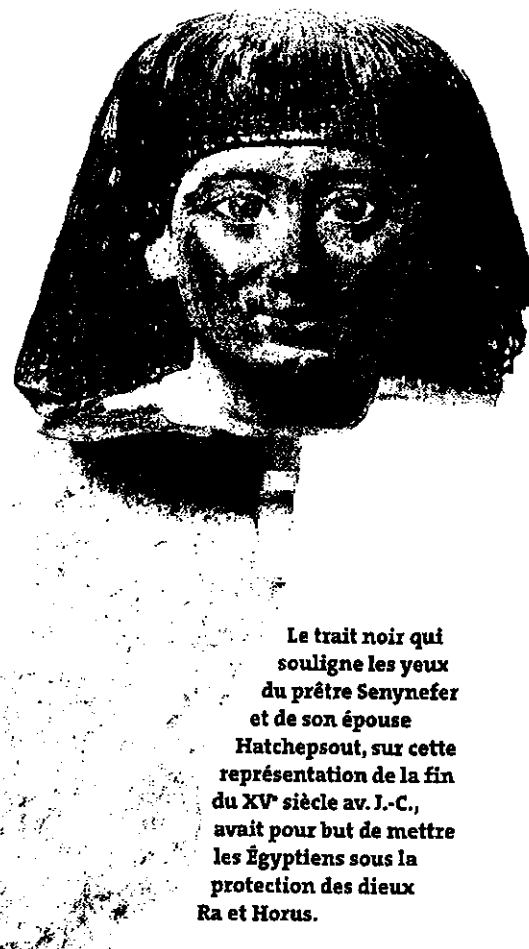
Composition. Pour cela, une cinquantaine de flacons ayant servi à conserver ces produits, et dont le musée du Louvre avait la charge, ont été passés au crible des techniques de microscopie électronique et de diffraction des rayons X. Elles ont montré que ces fards étaient effectivement constitués de galène, mais pas seulement. On y trouvait des traces de cérusite, autre minéral naturel composé de plomb et d'ions carbonates ainsi que deux types de chlorure de plomb : la laurionite et la phosgénite. La laurionite pouvait être fabriquée, en laboratoire, en mélangeant de l'oxyde de plomb, de l'eau



Cet étui à fard et son bâtonnet datent du Nouvel Empire (entre 1550 et 1069 av. J.-C.). La composition de son contenu a été déterminée par microscopie électronique et diffraction des rayons X.

L'essentiel

- > **TOUS LES MEMBRES** de la société égyptienne utilisaient du fard à paupières noir.
- > **DES ANALYSES CHIMIQUES** ont révélé que ces cosmétiques contenaient plusieurs composés à base de plomb, dont certains n'intervenaient pas dans la coloration.
- > **DISSOUS** à très faible concentration dans les larmes, les ions plomb n'étaient pas toxiques, mais stimulaient au contraire les défenses immunitaires.



Le trait noir qui souligne les yeux du prêtre Sennefer et de son épouse Hatchinghotep, sur cette représentation de la fin du XV^e siècle av. J.-C., avait pour but de mettre les Égyptiens sous la protection des dieux Ra et Horus.

et du chlorure de sodium ; et la phosgénite en ajoutant du carbonate de soude à ces ingrédients [1].

« La présence de chlorures de plomb constitua une réelle surprise, se souvient Philippe Walter. Contrairement à la galène, en effet, ces composés étaient de couleur blanche. Ils n'étaient donc pas utilisés comme pigments. Par ailleurs, on ne les trouvait pas à l'état naturel, du moins pas en Égypte et dans les régions voisines. Les chlorures de plomb avaient donc été fabriqués de manière intentionnelle, avant d'être ajoutés aux autres ingrédients qui constituaient la recette des fards égyptiens. Pour fabriquer la laurionite, les Égyptiens écrasaient probablement une livre de sel avec une quantité égale d'écume d'argent (un oxyde de plomb) dans une eau continuellement décantée. »

Pour quelle raison procédaient-ils ainsi ? Plusieurs textes anciens suggé-

raient une explication médicale. Des papyrus égyptiens, tout d'abord, tel le papyrus « Ebers », découvert à Louxor, en 1862, et datant du XVI^e siècle av. J.-C. Héritiers de la médecine et de l'ophtalmologie égyptiennes, les Grecs et les Romains avaient souligné, eux aussi, les vertus thérapeutiques de ces produits cosmétiques. Selon le médecin grec Dioscoride, par exemple, ces produits « constituaient de bons remèdes à mettre dans les yeux, mais aussi pour soigner les cicatrices ainsi que les rides et les boutons sur le visage ».

Saturnisme. Des produits cosmétiques à base de plomb furent également utilisés en Europe jusque vers le milieu du XIX^e siècle. C'est à ce moment-là que l'on découvrit que le plomb, lorsqu'il était ingéré ou inhalé, causait des troubles graves du système nerveux – une maladie dénommée « saturnisme ». Le

plomb fut, dès lors, identifié comme un composé toxique qu'il fallait proscrire. Cette découverte entraînait en contradiction avec une pratique et un savoir que les Égyptiens, les Grecs et les Européens avaient pourtant perpétué durant des millénaires.

De nouvelles études menées par l'équipe de Philippe Walter sur des cellules de la peau d'oreille de cochon montrèrent toutefois que le plomb contenu dans les fards égyptiens ne traversait pas ces cellules. La raison en est simple : les sulfures, les carbonates et les chlorures de plomb sont très peu solubles au contact des cellules de la peau. Ils ne peuvent donc pas libérer des atomes de plomb, et ne risquent donc pas d'altérer le système nerveux.

Les chimistes du C2RMF ont fait une autre découverte importante : la laurionite se dissout et libère des ions plomb dans le liquide lacrymal, >>>

Chimie

Les fards protégeaient les yeux des Égyptiens

» en raison de la présence de chlore et d'une acidité bien spécifique. « Cette découverte est d'autant plus intéressante que l'on sait que les Égyptiens ne déposaient pas ces fards sur leurs cils, mais sur l'épaisseur de la bordure de la paupière, précise Philippe Walter. Leurs yeux étaient donc balayés par l'onguent, après chaque clignement. La laurionite pouvait alors se dissoudre au contact du liquide lacrymal et libérer de petites quantités d'ions plomb. »

Plomb bénéfique. Du plomb les médecins et les physiologistes des décennies passées n'avaient retenu que sa toxicité. Se pourrait-il, néanmoins, que le plomb contenu dans les fards égyptiens ait un effet bénéfique lorsqu'il est dissous, à très faible dose, à l'intérieur des yeux? Et si oui, lequel?

La réponse a émergé à la suite d'une discussion entre Philippe Walter et Christian Amatore, de l'école normale

* LA SOLVATATION correspond à la dissolution d'un composé chimique dans un solvant - de l'eau, par exemple -, qui entoure alors chaque composé de manière spécifique.

supérieure (ENS). Ce dernier travaille sur les réactions des cellules à différents types de stress. « Puisque les composés à base de plomb sont quasiment insolubles, explique Christian Amatore, les organismes biologiques ont rarement été en contact direct avec eux. Pour se protéger de leur toxicité, ces organismes n'ont donc pas eu besoin de développer des mécanismes de différenciation avec d'autres composés chimiques. Or l'ion plomb présente de nombreuses similitudes avec l'ion calcium, connu pour stimuler le système immunitaire. Ils possèdent la même charge électrique, le même rayon atomique, et leur solvation* se produit de la même manière. Je me suis alors demandé si ces deux ions avaient des effets physiologiques similaires. »

En 2007, une équipe conjointe de l'ENS et du C2RMF a donc entrepris de tester l'influence des ions plomb sur le système immunitaire. Un objectif difficile à réaliser, au regard des quantités infimes de molécules qu'il fallait détecter. On savait en effet que l'ion calcium stimule les défenses immunitaires des cellules en les forçant à libérer des molécules de monoxyde d'azote. Ces molécules induisent à leur tour plusieurs réactions, comme la dilatation des vaisseaux sanguins et le transport des cellules du système immunitaire qui s'attaquent aux bactéries en dégradant leur paroi. Le monoxyde d'azote n'est cependant libéré qu'en de

très faibles quantités : quelques milliers de molécules, tout au plus, que les instruments classiques sont incapables de mesurer.

C'est pourquoi les chimistes ont eu recours à des « ultramicroélectrodes » extrêmement sensibles, fabriquées tout spécialement à l'ENS. Une faible quantité d'ions plomb (correspondant à celle qui devait être libérée par la laurionite) a d'abord été ajoutée à un liquide baignant des cellules de la peau humaine. Une ultramicroélectrode a ensuite été placée à proximité de ces cellules.

Système immunitaire. Cette électrode est constituée d'un fil de carbone de dix millièmes de mètre de diamètre. Elle a été calibrée pour réagir spécifiquement avec les molécules de monoxyde d'azote. Si ces molécules entrent en contact avec l'extrémité du fil de carbone, elles échangeraient alors des électrons avec l'électrode pour produire un courant électrique de très faible intensité - un millième de millième d'ampère environ (fig. 1). Or ce courant a bien été détecté. Il indique la présence d'une quantité de monoxyde d'azote deux fois et demie supérieure à la normale [2]. Le rôle des ions plomb sur l'activation du système immunitaire a ainsi été démontré.

Loir de menacer la santé des Égyptiens, comme le laissait supposer la toxicologie moderne, leurs fards jouaient donc le rôle de bactéricides ! Il les protégeait des infections oculaires susceptibles de proliférer dans l'environnement chaud et humide qu'ils habitaient. Certes, les Égyptiens ne pouvaient soupçonner le rôle spécifique du plomb - ses aspects bénéfiques sur le système immunitaire comme sa toxicité lorsque les doses deviennent trop importantes. Le bon dosage, la bonne recette, a dû s'établir de façon empirique, au fil du temps, pour conduire à un remède efficace. ■

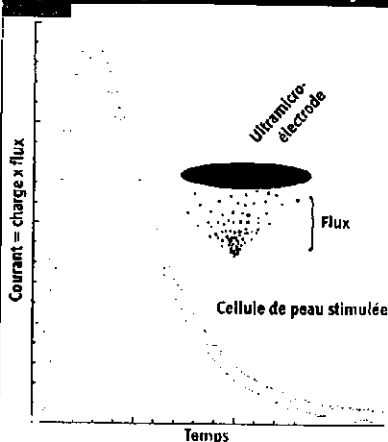
[1] P. Walter et al., *Nature*, 397, 433, 1999.

[2] I. Tapsoba et al., *Anal. Chem.*, 82, 457, 2010.

Pour en savoir plus

► C. Amatore et P. Walter, in *Chimie et art*, coll. « L'Actualité chimique livres », EDP Sciences, à paraître.

Fig.1 Analyse électrochimique



UNE ULTRAMICROÉLECTRODE, de 10 micromètres de diamètre, oxyde au fur et à mesure de leur arrivée les molécules de monoxyde d'azote (en vert) émises par une seule cellule de peau. Les variations du courant sont une mesure en temps réel de leur flux.

EPREUVE ASI
« Expérimentation et instrumentation biologiques »
BAP A
UNIVERSITE D'ARTOIS-2011

SUJET 3:
« Les Fards Protégeaient les yeux des Égyptiens »

Questions (réponses brèves et synthétiques):

- 1- Quel est le sujet et les principales conclusions de l'article ? (3 lignes maximum).**
- 2- Décrivez brièvement la technique utilisée pour mesurer l'émission d'oxyde d'azote par les cellules.**
- 3- L'ion plomb présent dans les fards des égyptiens semble avoir, de manière surprenante, un effet positif ; comment peut-on expliquer ce phénomène ?**