

UNIVERSITE DE LILLE 2 – DROIT ET SANTE -

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

CONCOURS EXTERNE ET 3EME VOIE D'ASSISTANT INGENIEUR EN TECHNIQUES BIOLOGIQUES – B.A.P A

SESSION : 2007

EPREUVE ECRITE D'ADMISSIBILITE

Le Mardi 19 juin 2007 de 9 h à 12 h

Durée : 3 heures – Coefficient : 4

Ni document ni calculatrice ne sont autorisés

Vous disposez de 3 dossiers scientifiques numérotés de 1 à 3. (sujet n°1 : 4 pages, sujet n°2 : 3 pages, sujet n°3 : 2 pages) → **nombre total de pages : 10** (y compris celle-ci)

Vous voudrez bien répondre aux 3 sujets sur 3 copies différentes en précisant le n° du dossier (ex : dossier technique n°.....). Si vous utilisez plus d'une copie par sujet, veuillez reporter sur chacune d'entre elles le n° du dossier technique.

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.

SUJET 1 (20 points)

Après lecture du texte, suivez les consignes suivantes :

1. Faire un résumé de 10 lignes de texte et trouver 3 mots clefs
2. Définir le mot sérotype
3. La transmission de Salmonella par un aliment à faible teneur en eau est très rare. Quel est le véhicule de transmission le plus fréquent à l'heure actuelle ?
4. Un autre entéropathogène a causé une épidémie nosocomiale importante dans le nord de la France l'année dernière. Quel est son nom ?
- 5 Définir « infection nosocomiale »

Épidémie de salmonellose à *Salmonella enterica* sérotype Agona chez des nourrissons, liée à la consommation de poudres de lait

France, janvier-avril 2005

Point InVS de l'investigation au 3 mai 2005

L'Institut de veille sanitaire coordonne l'investigation d'une épidémie nationale de Salmonellose à *Salmonella enterica* sérotype Agona survenue chez des nourrissons depuis le début de l'année 2005. Cette investigation a montré que cette épidémie était liée à la consommation de poudres de lait infantile. A ce jour, 123 nourrissons, avec une salmonellose à *Salmonella* Agona, ont été identifiés par le Centre national de référence (CNR) des *Salmonella*. Les familles de 115 nourrissons ont été interrogées.

Cette épidémie s'est déroulée en deux phases successives (figure 1) : la première phase de fin décembre 2004 à mi-mars 2005 était liée à la consommation de poudres de lait de marque Picot et a concerné 44 cas. Un retrait et un rappel des produits infantiles de marque Picot a eu lieu le 4 mars. La seconde phase liée à la consommation de plusieurs lots de poudres de lait de marque Blédilait produits dans le même établissement que les poudres de lait Picot a commencé au cours de la 4ème semaine de mars et a concerné 69 cas. Un retrait et un rappel de ces lots a eu lieu le 7 avril.

Le déroulement des investigations est détaillé ci-dessous.

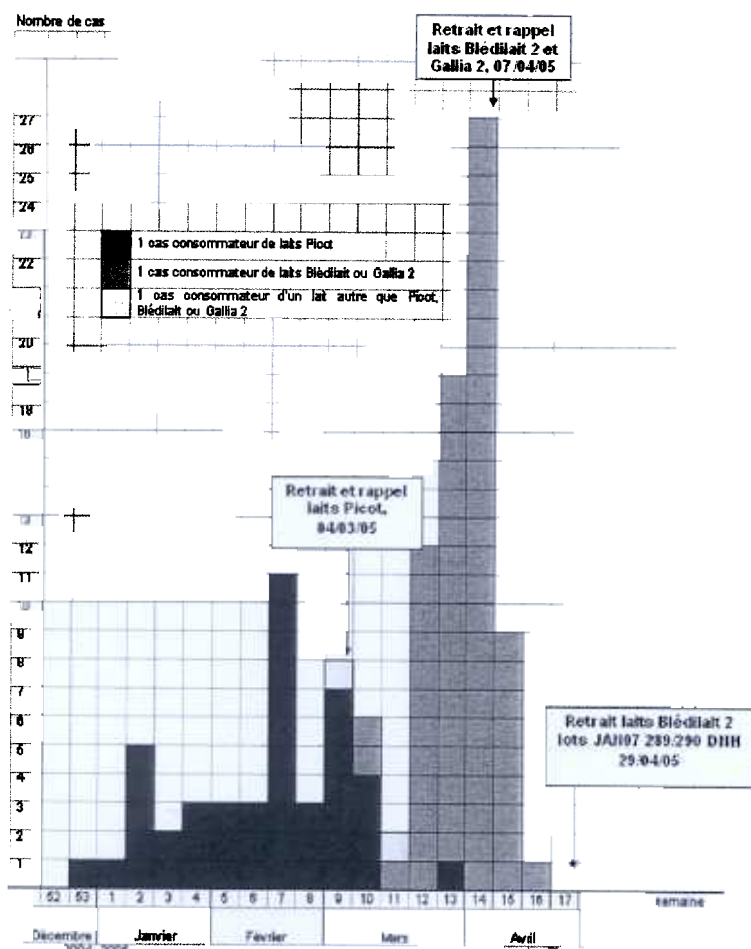


Figure 1 - Distribution hebdomadaire des 115 nourrissons (dont les parents ont été interrogés) avec une salmonellose à *Salmonella* Agona, selon la semaine de début des symptômes et selon le lait consommé dans les 3 jours précédant l'apparition des symptômes, France, janvier-avril 2005

Description des cas

A ce jour, 123 nourrissons âgés de 1 à 12 mois, avec une salmonellose à *Salmonella* Agona diagnostiquée entre janvier et avril 2005, ont été identifiés par le CNR des *Salmonella*. Les 115 nourrissons dont les familles ont été interrogées résident dans 47 départements différents (figure 2). Ils ont présenté des

symptômes de salmonellose entre le 28 décembre 2004 et le 21 avril 2005. Cent onze (97 %) enfants ont présenté de la diarrhée, 68 (59%) avec présence de sang dans les selles et 88 (77 %) de la fièvre. Quarante-deux (37 %) enfants ont été hospitalisés. L'évolution a été favorable pour tous.

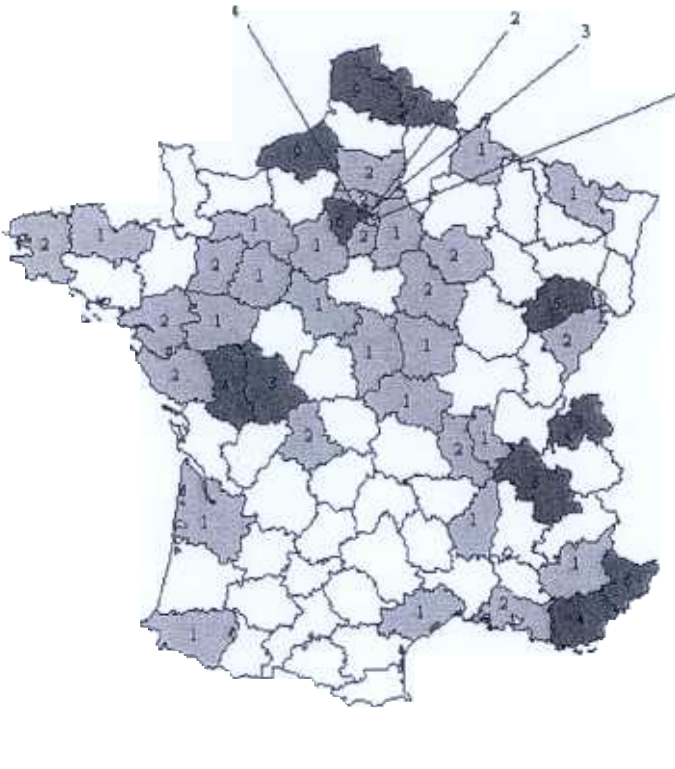


Figure 2 - Distribution géographique des 115 nourrissons (dont les parents ont été interrogés) avec une salmonellose à *Salmonella* Agona en fonction du département de résidence. France, janvier- avril 2005

Déroulement des investigations

Le 3 mars 2005, le CNR des *Salmonella* a signalé à l'InVS un excès de souches de *Salmonella enterica* sérotype Agona pour la période de janvier-février 2005 : 22 souches de *S. Agona* ont été isolées en janvier-février 2005 contre 8 souches en moyenne pour la même période sur les cinq dernières années. Une investigation épidémiologique a été mise en œuvre par l'InVS afin de confirmer la nature épidémique du phénomène, d'en mesurer l'importance, de générer des hypothèses sur l'origine et la source de l'épidémie et de proposer des mesures de contrôle et de prévention adaptées.

Phase 1

Le 4 mars, les parents de 19 enfants malades ont été interrogés sur leur consommation alimentaire ; ils avaient tous consommé des laits de la marque Picot dans les 3 jours précédant la date de début des symptômes.

Au vu de ces premières investigations, l'établissement producteur, en lien avec la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) et la Direction générale de la santé (DGS), décidait, le 4 mars, l'arrêt de la production, le retrait de la commercialisation et le rappel de tous les laits de la marque Picot.

Une enquête cas-témoins a comparé la consommation alimentaire de 23 enfants malades (« cas ») à celle de 23 enfants non malades (« témoins ») du même âge, identifiés dans la clientèle des médecins traitants des cas et des laboratoires qui avaient isolé la salmonelle. Tous les enfants malades avaient consommé des laits Picot et aucun des enfants non malades n'en avaient consommé.

Une enquête réalisée par la DGCCRF dans l'établissement producteur a permis d'identifier le processus de fabrication des poudres de laits, les types de produits fabriqués sur la même chaîne de production et les zones de distribution. Des prélèvements environnementaux, de poudre de lait et de matières premières ont été réalisés. Sept souches de *Salmonella* Agona ont été isolées à partir de prélèvements environnementaux et de poudre de lait. Le profil moléculaire de ces souches était identique à celui des souches isolées chez des malades consommateurs de laits Picot.

Les résultats de ces différentes enquêtes ont permis de confirmer que les poudres de lait de la marque Picot étaient à l'origine des infections à *Salmonella* Agona survenues début 2005 chez des nourrissons en France.

Le retrait et le rappel de ces poudres de lait, le 4 mars, a permis d'éviter la survenue de nouveaux cas liés à la consommation de ces poudres de lait. En effet, quatre cas seulement dont les parents n'avaient pas été informés du rappel ont contracté l'infection après cette date. Aucun nouveau cas ayant consommé des poudres de cette marque n'a été identifié depuis le 18 avril 2005. Au total, 44 nourrissons ont été malades suite à la consommation de poudres de lait de marque Picot.

Phase 2

Au cours de la 4^{ème} semaine de mars, le CNR a observé une nouvelle augmentation du nombre de nourrissons infectés par *Salmonella* Agona. L'interrogatoire des parents de ces nourrissons a montré qu'ils avaient tous consommé, dans les 3 jours précédant la date de début des symptômes, des poudres de lait de la marque Blédilait / Gallia 2^{ème} âge.

Dans le même temps, l'enquête de la DGCCRF dans l'établissement producteur des laits infantiles Picot montrait que des lots de poudres de lait infantile 2^{ème} âge de marque Blédilait avaient été fabriqués sur la même chaîne de production que les poudres de laits de marque Picot. Les poudres de lait Blédilait consommées par les enfants malades appartenaient à ces mêmes lots (référencés ci-dessous). Le profil moléculaire des souches isolées chez les malades consommateurs de poudres de lait Blédilait était le même que celui des souches isolées chez les malades consommateurs des poudres de lait Picot.

Des échantillons de poudres de lait prélevés dans des boîtes qui avaient été consommées par des nourrissons malades ont été analysés : des souches de *Salmonella* Agona ont été isolées d'une boîte de Blédilait 2^{ème} âge du lot 1229/BL7 et d'une boîte de Blédilait 2^{ème} âge du lot 1231/BL9.

Les résultats de ces différentes enquêtes ont permis de confirmer que les lots de poudres de lait de la marque Blédilait produits sur la même chaîne de fabrication que les poudres de laits de marque Picot étaient à l'origine des cas de cette seconde phase.

Le 7 avril, la société Blédina mettait en oeuvre le retrait de la commercialisation et le rappel de ces lots:

- Gallia 2 : 450g - Dec 06 - Lot : 1210/BLJ
- Gallia 2 : 900g - Dec 06 - Lot 1211/BLK
- Blédilait 2 : 450g - Dec 06 - Lots : 1210/BLJ et 1229/BL7
- Blédilait 2 : 900g - Dec 06 - Lots : 1221/BLX, 1229/BL7 et 1231/BL9

Au total, 69 nourrissons malades après consommation de poudres de lait de marque Blédilait ont été identifiés à ce jour.

Ces enfants ont présenté des symptômes de salmonellose entre le 21 mars et le 21 avril 2005. Parmi eux, 3 enfants malades le 31 mars, le 10 avril et le 21 avril avaient consommé de la poudre de lait appartenant aux lots Blédilait 2, JAN07 290 DNH (2 cas) et JAN07 289 DNH (1 cas) qui n'avaient pas été produits dans l'établissement producteur des poudres de lait Picot.

Une enquête dans l'usine du groupe Blédina où ces lots avaient été fabriqués a montré qu'ils avaient été conditionnés dans cette usine, juste après les lots 1229/BL7 et 1231/BL9, fabriqués par l'établissement producteur des poudres de lait de marque Picot, sur la même chaîne de conditionnement.

Le 29 avril, la société Blédina a ainsi mis en oeuvre le retrait de la commercialisation de ces lots:

- Blédilait 2 : 900g – JAN07 - Lot : 289/DNH
- Blédilait 2 : 900g – JAN07 - Lot : 290/DNH

L'InVS, en collaboration avec le CNR des *Salmonella*, poursuit ses investigations afin de s'assurer de l'efficacité de ces dernières mesures.

Rappels sur les infections à *Salmonella*

Les infections à Salmonella surviennent dans les trois jours suivant l'ingestion d'un produit contaminé et provoquent un tableau de gastro-entérite avec des vomissements, une diarrhée parfois sanglante, et de la fièvre dans la majorité des cas. L'apparition de ces signes chez un nourrisson doit conduire les familles à consulter un médecin.

Salmonella Agona fait partie des quelques 2000 sérotypes de Salmonella pathogènes chez l'homme. De 2000 à 2004, le CNR des Salmonella a identifié environ une centaine de souches de Salmonella Agona d'origine humaine par an. Comme la plupart des autres sérotypes de Salmonella, le sérotype Agona est retrouvé en France dans divers réservoirs parmi lesquels les volailles, les bovins, les porcs et les aliments pour bétail [1].

Quatre épidémies de salmonellose à Salmonella Agona ont été rapportées auparavant dans d'autres pays, dont une attribuée à la consommation de lait en poudre [2]. Les 3 autres étaient dues à la consommation de tisanes à base de fenouil et d'anis [3], de goûters à la cacahuète [4], et de céréales à base d'avoine [3].

Références

1. Brisabois A, Frémy S, Gauchard F, et al. Inventaire des *Salmonella* 2002. Agence française de sécurité sanitaire des aliments, juin 2004
2. From the Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of *Salmonella* serotype Agona infections linked to toasted oats cereal—United States, April–May, 1998. JAMA. 1998;280(5):411
3. Koch J, Schrauder A, Werber D, Alpers K, Rabsch W, Prager R, Broll S, Frank C, Roggentin P, Tschäpe H, Ammon A and Stark K. A nation-wide outbreak of *Salmonella* Agona in infants due to aniseed in herbal tea, Germany, October 2002–July 2003. 5th World Congress, Foodborne Infections and Intoxications, 7–11 June 2004, Berlin, Germany
4. Killalea D, Ward LR, Roberts D, et al. International epidemiological and microbiological study of outbreak of *Salmonella* Agona infection from a ready to eat savoury snack – I: England and Wales and the United States. BMJ 1996;311:13

SUJET 2 (20 points)

Après lecture du texte, suivez les consignes suivantes :

- 1 Proposer un titre pour ce document
- 2 Faire un résumé de 10 lignes de texte et trouver 3 mots clefs

Les schémas inclus illustrent l'amplification et l'augmentation du signal d'émission de fluorescence.

- 3 Décrivez brièvement les principes utilisés et commenter les deux schémas

Extrait et recomposé à partir d'un article publié dans « *Reviews in Biology and Biotechnology* » 2002, 2, 2-11

Depuis son invention, la PCR est devenue la technique la plus utilisée pour la détection de l'ADN et de l'ARN. A partir d'une simple copie d'une séquence particulière d'acides nucléiques, cette séquence peut être spécifiquement amplifiée et détectée. Sa nature exponentielle rend cette technique attrayante pour les analyses quantitatives. Le développement de la PCR quantitative en temps réel a éliminé les variabilités traditionnelles associées à la PCR quantitative et permet la quantification du produit de la PCR de façon fiable et routinière.

Au début de la réaction PCR, les réactifs sont en excès mais en concentration assez faible afin d'éviter que la renaturation des amplicons n'entre en compétition avec l'hybridation des amorces (primers). L'amplification est alors réalisée de façon constante à un taux exponentiel à l'aide d'une ADN polymérase thermostable. Après la phase exponentielle la réaction d'amplification rentre dans une phase linéaire où le taux d'amplification devient extrêmement variable même au niveau de replica d'un même échantillon, à cause d'une compétition entre la renaturation des amplicons et l'hybridation des amorces. Suit ensuite une phase plateau où le taux d'amplification décroît à près de zéro générant très peu d'amplicons.

Afin de recueillir des données quantitatives avec précision, chacun des échantillons doit être analysé dans sa phase exponentielle d'amplification qui est la phase la plus reproductible de la réaction de PCR. La PCR en temps réel fait donc le suivi de la fluorescence émise pendant la réaction avec un indicateur de la production des amplicons durant chaque cycle à l'opposé de la PCR quantitative conventionnelle où les amplicons ne sont détectés qu'à la toute fin du processus.

La technologie de la PCR en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un « reporter » fluorescent. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR.

Tous les systèmes de PCR en temps réel reposent sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification et l'augmentation du signal d'émission fluorescente est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits pendant la réaction. Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons : les agents se lient à l'ADN double brin (ex. SYBR Green I) et les sondes fluorescentes.

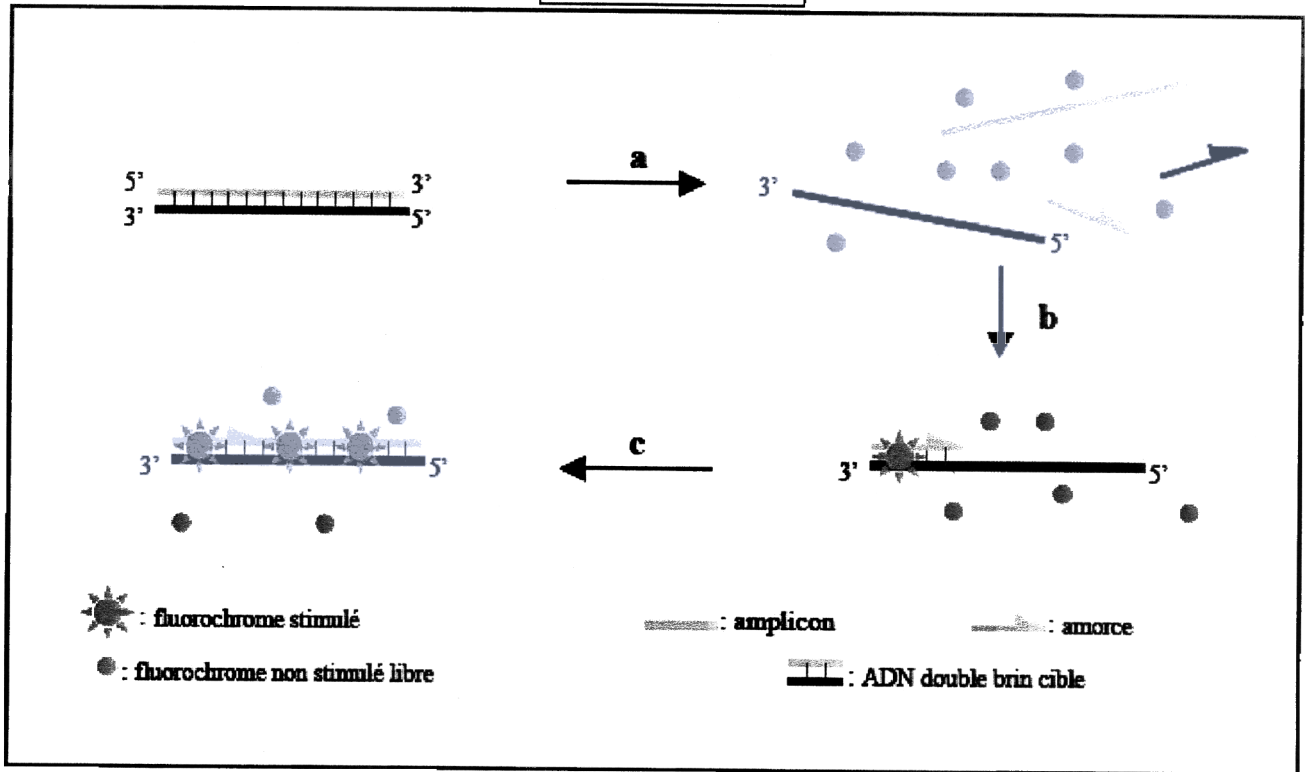
SYBRGreen

Le principe d'émission de fluorescence du SYBRGreen est proche de celui utilisé pour visualiser l'ADN/ARN par le BET en électrophorèse.

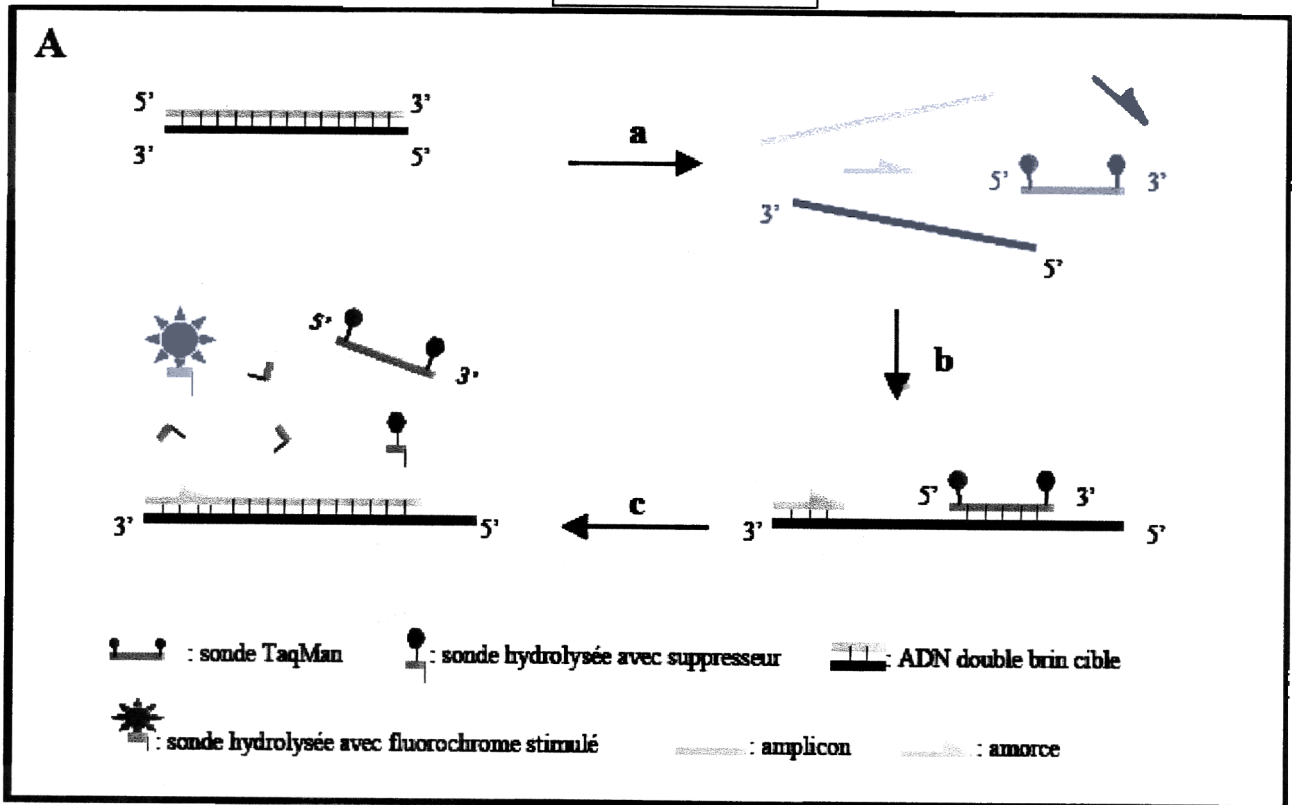
Sondes fluorescentes

Lors de la réaction de PCR en temps réel, outre les amorces, une sonde complémentaire d'un fragment interne du segment à amplifier est ajoutée au milieu réactionnel. A l'extrémité 5' de la sonde se trouve un fluorophore et à son extrémité 3' un « quencher ». Lorsque le fluorophore et le « quencher » sont proches, la fluorescence émise par le fluorophore est absorbée par le quencher. Durant l'étape d'élongation, l'activité exonucléasique de la polymérase dégrade la sonde provoquant la séparation physique du fluorophore et du « quencher », la fluorescence émise par le fluorophore est mesurée. Elle est directement proportionnelle à la quantité d'ADN amplifié au cours de la réaction de PCR.

SYBR Green



Sonde Taqman



SUJET 3 (10 points)

Traduire le texte technique

2. Faire un schéma légendé d'une réaction antigène-anticorps

Immunoblotting Procedure

All washes are performed at room temperature (RT) on a shaker.

1. The membrane is briefly washed in TBS-Tween (10mM Tris, 150mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20, pH7.5; wash buffer).
2. Non-specific sites are blocked in 5% non-fat dried milk in TBS-Tween (0.5% (v/v) Tween 20, pH7.5; blocking buffer) for 45 minutes at RT or overnight at 4°C.
3. The primary antibody is diluted in blocking buffer and the membrane is incubated for 1 hour at RT.
4. The membrane is washed for 4 x 5 minutes with large volumes of wash buffer.
5. The secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP, Dako) is diluted 3000 fold in 5ml blocking buffer and the membrane is incubated for 1 hour at RT.
6. The membrane is washed as after incubation with the primary antibody (see step 4).
7. Excess wash buffer is drained from the membrane, which is subsequently placed in detection reagent (SuperSignal West Dura Extended duration Substrate, Pierce) and incubated for 5 minutes at RT.
8. Excess detection reagent is drained off and a CCD-camera is used for detection and to capture a digital image.

Antibody dilution interval: 1:250 – 1:500