

Séminaire des nouveaux formateurs 2RB

Les agents biologiques Quels dangers ?



C. POCHET F. RIVENET

Paris, 29 et 30 juin 2015

Plan de l'exposé

1. Éléments de contexte
2. Différents types d'agents biologiques
3. Lutte contre les agents biologiques
4. Ressources et références
5. Conclusion

- Art. R. 4421-1 à R. 4427-5 du Code du travail
 - définition des agents biologiques
 - classement des agents biologiques infectieux

- Arrêté du 18 juillet 1994 modifié en 1997 et 1998
 - liste des agents biologiques pathogènes classés d'après leur risque infectieux

Définition des agents biologiques

Art. R. 4421-2 du Code du travail

« Au sens du présent titre, on entend par :

1° Agents biologiques,

les **micro-organismes**, y compris les micro-organismes génétiquement modifiés,

les **cultures cellulaires**

et les **endoparasites** humains

susceptibles de provoquer une **infection**, une **allergie** ou une **intoxication** ;»

Micro-organisme, entité microbiologique, cellulaire ou non, capable de se reproduire ou de transférer du matériel génétique

■ **Bactéries**

■ **Virus et associés**

■ **Champignons**

■ **MGM**

Culture cellulaire, résultat de la croissance in vitro de cellules isolées d'organismes multicellulaires

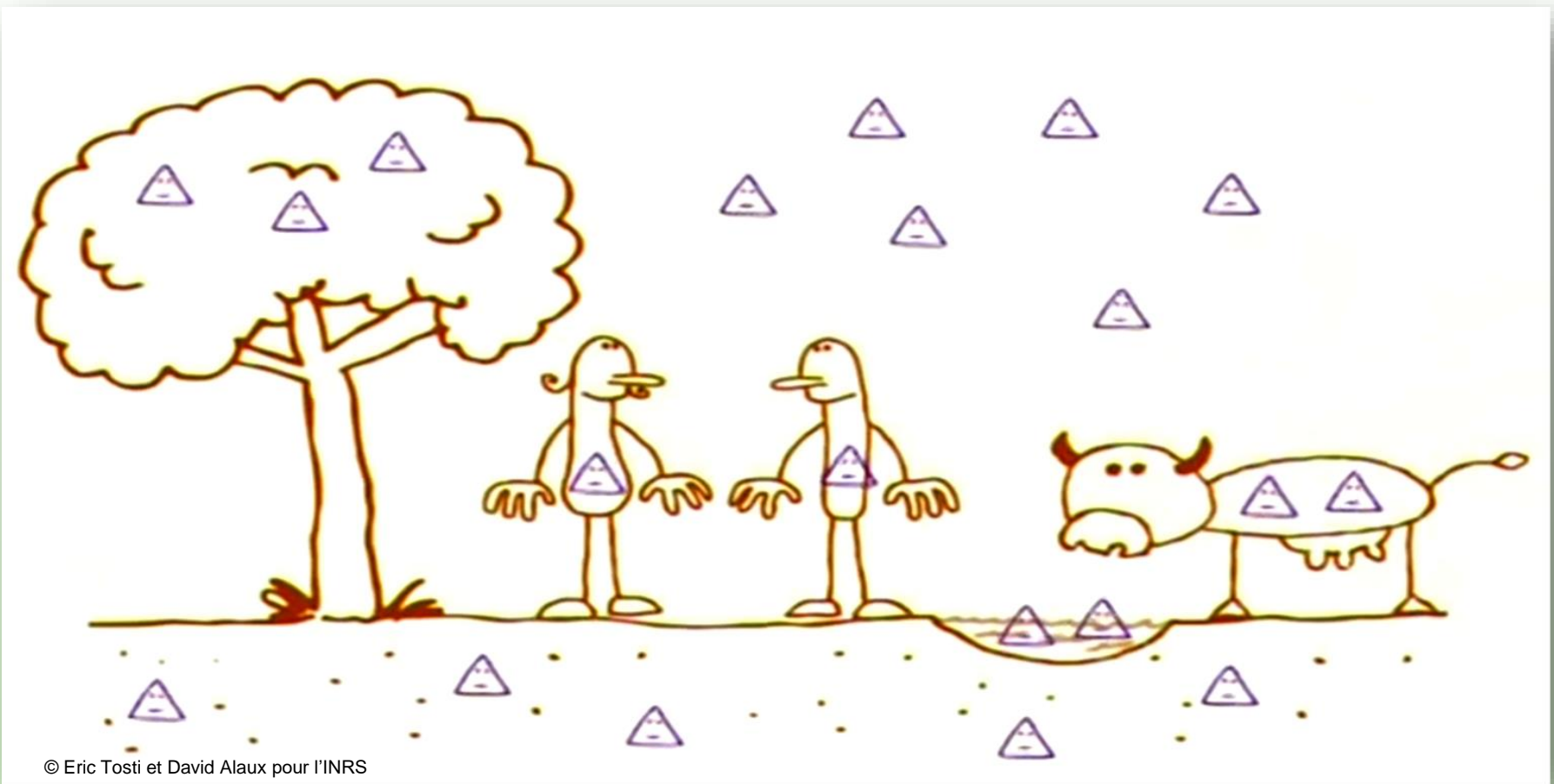
Endoparasites

Classement des agents biologiques

■ Art. R.4421-3 du code du travail : groupes de risques infectieux

	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4
Possibilité de provoquer une maladie chez l'homme	non	oui	grave	grave
Danger pour les travailleurs		oui	sérieux	sérieux
Propagation dans la collectivité		peu probable	possible	élevée
Existence d'une prophylaxie ou d'un traitement efficace		oui	oui	non
Exemples	Pas de liste réglementaire	<i>C. tetani</i> EBV <i>C. albicans</i> <i>T. saginata</i>	<i>M. tuberculosis</i> VHC <i>C. immitis</i> <i>P. falciparum</i>	virus Ebola virus de la variole

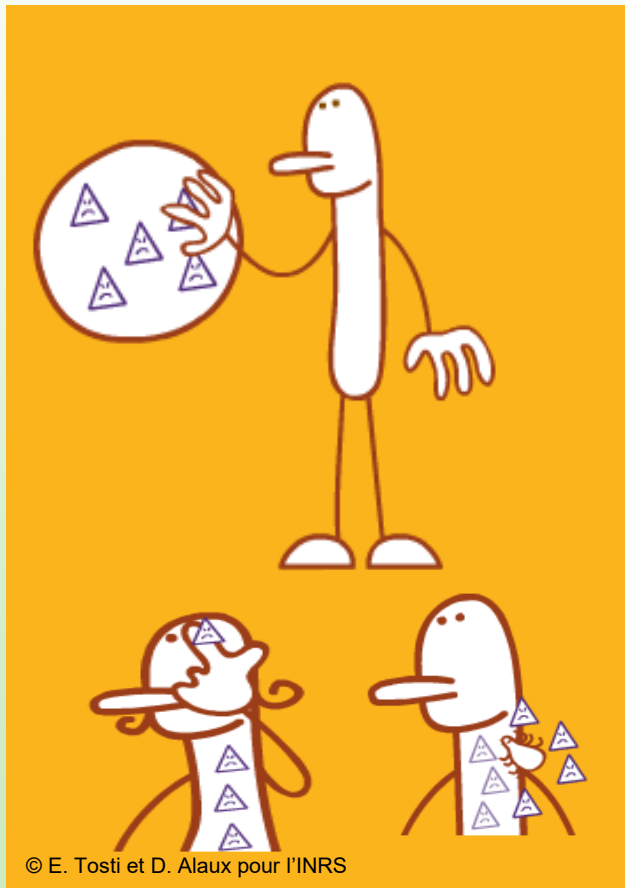
Localisation des agents biologiques -> ex. de réservoirs naturels



© Eric Tosti et David Alaux pour l'INRS

Expositions professionnelles aux agents biologiques

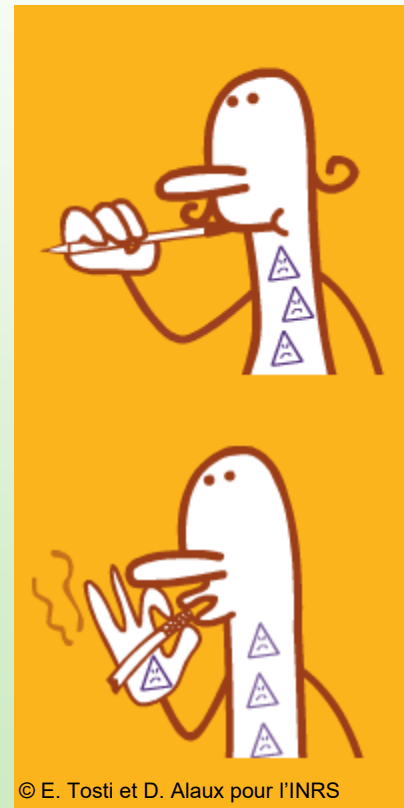
voie cutanéomuqueuse



voie respiratoire



voie digestive



Bases de données

BAOBAB - BAsE d'OBservation des Agents Biologiques



BAOBAB

Base d'observation des agents biologiques

Critères 

RECHERCHER

EFFACER



Type d'agent Bactérie Parasite ATNC (prions)
 Champignon Virus Indifférent

Nom de l'agent

Maladies

Groupe de risque infectieux 2 3+3* 3 3* 4 Indifférent

Autorisation ANSM oui non Indifférent

Tableaux de maladies professionnelles
Régime général 
Régime agricole 

Maladie à déclaration obligatoire oui non Indifférent

Voies de transmission peau muqueuses digestive
 respiratoire indifférent

Réservoirs 

Sources de contamination 

Mots libres

Tous les termes Au moins un des termes

Autres bases de données



ATCC (American Type Culture Collection)

- norme de référence de micro-organismes, de lignées cellulaires et d'autres matériaux pour la recherche dans les sciences de la vie.

CIP (Collection de l'Institut Pasteur)

- distribution de souches (propriétés, conservation, identification...)
- recherche sur l'identification, la taxonomie, la conservation des souches.



Relation avec les agents biologiques

▪ Cohabitation bonne, voire bénéfique

- à la base des chaînes alimentaires
- nécessaires à l'homme
 - flore digestive
 - biotechnologies

▪ Risque pour l'homme

Exemples :

Sur les dizaines de milliers d'espèces de bactéries connues



Seule une centaine d'espèces de bactéries pathogènes

Pathologies liées aux agents biologiques

- **Infection**

multiplication de l'agent biologique dans le corps

- **Allergie**

réponse immunitaire excessive (rhinite, asthme, pneumopathie d'hypersensibilité, allergie cutanée,...)

- **Intoxication**

Dégât créé par des toxines synthétisées par l'agent biologique

- **Cancer**

Conséquence de la présence dans l'organisme d'agents biologiques et toxines classés par le CIRC*

* Centre International de Recherche contre le Cancer

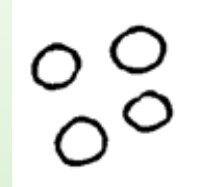
Plan de l'exposé

1. Éléments de contexte
2. Différents types d'agents biologiques
3. Lutte contre les agents biologiques
4. Ressources et références
5. Conclusion

Bactéries - Présentation

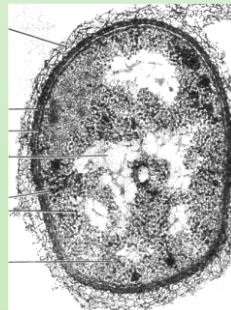


- Organismes unicellulaires procaryotes
- Apparition il y a quelques 3,6 milliards d'années
- Taille : quelques μm ($< 1 \mu\text{m}$ à $5 \mu\text{m}$)
- Forme : bacillaire, coccoïde, spiralée



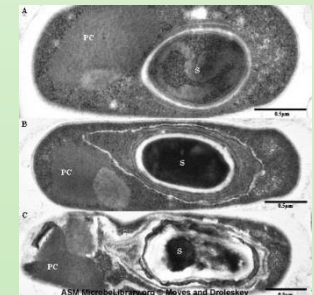
Constituants toujours présents

1. paroi,
2. membrane,
3. appareil nucléaire,
4. cytoplasme,
5. ribosomes.



Constituants variables

- flagelle,
- pilus,
- capsule,
- plasmide,
- spore.



Bactéries - Multiplication



- Division cellulaire par scissiparité
- Croissance en milieu liquide : apparition d'un trouble
- Croissance sur support solide : création de colonies (clones)
- Conditions variables selon les souches :

- **Nourriture** : matières organique ou minérale
- **Oxygène** : présence (aérobie) ou absence d'oxygène (anaérobie)
- **Température** : de -10°C à +110°C
- **Humidité** : saturation en eau de 75% à 100%
- **pH** : de 0,5 à 11,5
- **Salinité** : isolement d'*Halobacterium* de la Mer Morte (22-25% salinité)
- **Pression** : présence jusqu'à 10 500 m de profondeur
- **Radioactivité** : résistance à 1000 fois la dose radioactive mortelle pour l'homme de *Deinococcus radiodurans*

Bactéries – Classement Identification



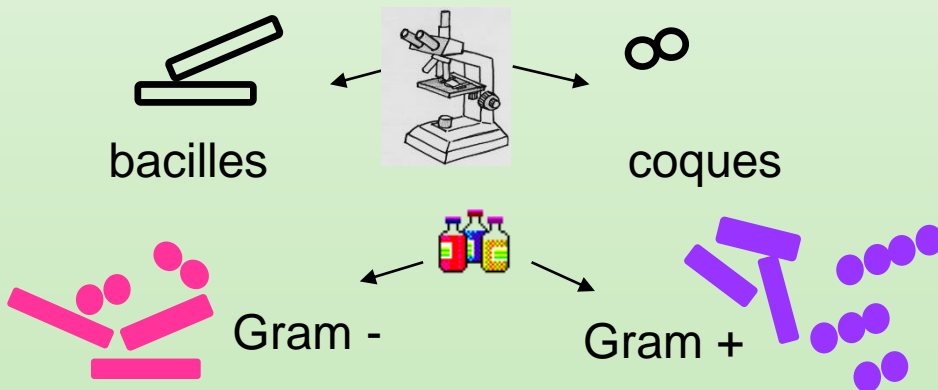
■ Phénotypique

- Caractères apparents
 - Aspects macroscopiques



une colonie (UFC unité formant colonie)
 = des milliards de bactéries identiques
 = un clone
 => une souche

- Aspects microscopiques



■ Génotypique

- Taille du génome
- Contenu en ADN (G+C)
- Séquence des acides nucléiques

- Caractères biochimiques



profil enzymatique

Bactéries – Pathologies



Dépendantes des espèces mais aussi des hôtes

Provoquées par une toxine

- Sécrétion de **protéines toxiques ou exotoxines**, surtout chez les bactéries Gram + comme *Clostridium botulinum*, *B cereus*
⇒ **intoxications**

Provoquées par la multiplication des bactéries pathogènes

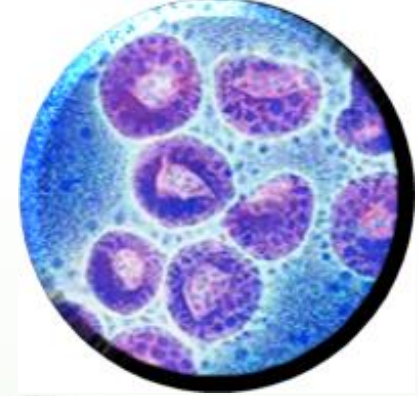
- Sécrétion d'**enzymes lytiques**
⇒ **destruction des tissus**
- Activation d'une **réaction inflammatoire**
- Présence d'**endotoxines après lyse bactérienne** (LPS des bactéries Gram – comme *E coli*, *Salmonella*)
⇒ **fièvre, nausée, diarrhée**
- Sécrétion de **toxines** diverses (*B pertussis*, *V cholerae*)

Bactéries – Pathologies

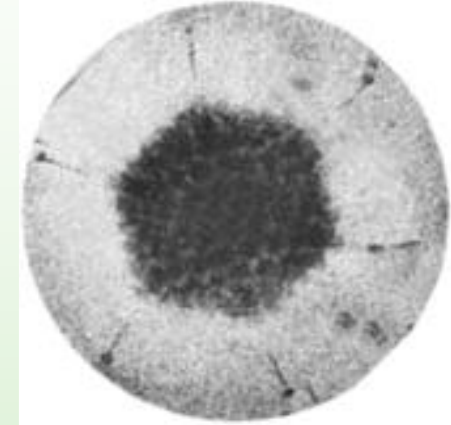
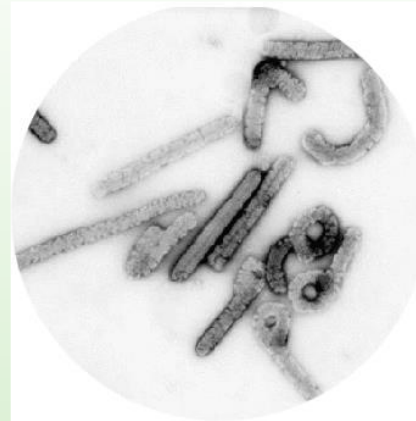


Groupes de danger	2			3		
	Aéro portée	Oro digestive	Cutanéo muqueuse	Aéro portée	Oro digestive	Cutanéo muqueuse
Voies de transmission	Aéro portée	Oro digestive	Cutanéo muqueuse	Aéro portée	Oro digestive	Cutanéo muqueuse
Bactéries	<i>B. pertussis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>B. abortus</i>	<i>M. leprae</i>
Pathologies	coqueluche	listériose	furunculose	tuberculose	brucellose	lèpre

Virus – Présentation



- Organismes non cellulaires acaryotes
- Parasites cellulaires obligatoires
- Taille : quelques nm
- Symétrie
 - icosaédrique (cubique)
 - hélicoïdale
 - mixte (phages)

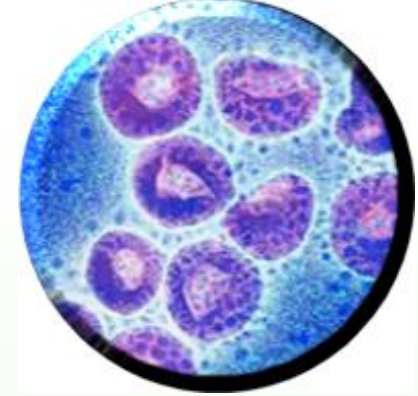


▪ Constituants toujours présents

1. Acide nucléique : ADN ou ARN simple ou double brin
2. Capside protéique

▪ Constituants variables enveloppe externe

Virus – Multiplication



- Particule libre = virion
- Fixation à une cellule cible
- Pénétration

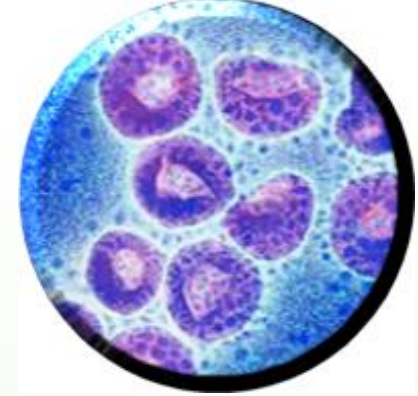
Infection productive

- Détournement de la machinerie cellulaire au profit du virus
- Multiplication des éléments viraux enzymatiques et de structure
- Assemblage puis libération par la cellule de nouveaux virions (avec ou sans éclatement)

Infection avec transformation

- Persistance voire intégration du génome viral dans l'ADN cellulaire
- Modification de l'expression des gènes de la cellule hôte (oncogènes)

Virus – Classement Identification



- **Classement selon**
 - critères structuraux
 - nature de l'acide nucléique
 - type de symétrie capsidiale
 - présence ou non d'une enveloppe
 - organismes hôtes
 - animaux
 - (végétaux)
 - (microorganismes)

▪ Identification



Microscopie électronique

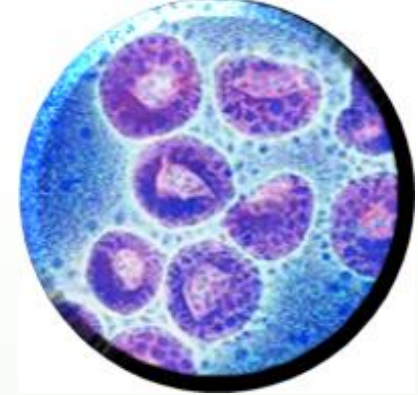
Immunologie



Biologie moléculaire

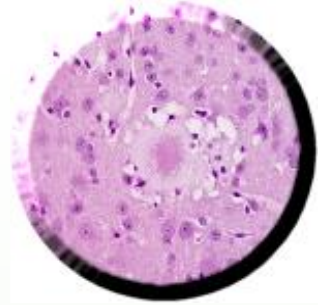


Virus – Pathologies

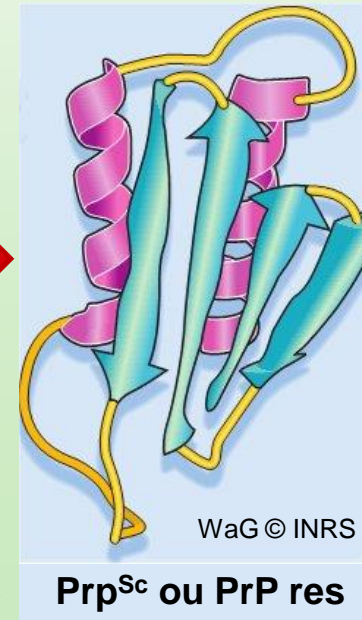
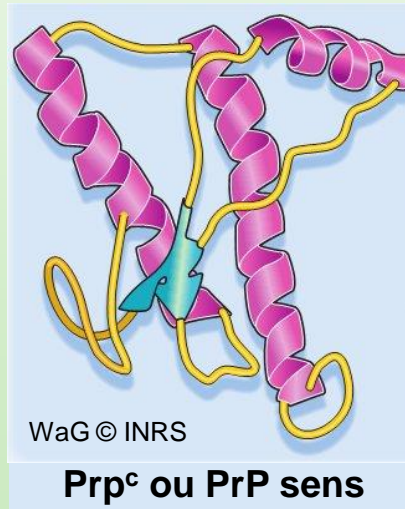


Groupes de danger	2			3			4		
	Voies de transmission	Virus	Pathologies	Voies de transmission	Virus	Pathologies	Voies de transmission	Virus	Pathologies
Voies de transmission	Aéro portée	Oro digestive	Cutanéo muqueuse	Aéro portée	Oro digestive	Cutanéo muqueuse	Aéro portée	Oro digestive	Cutanéo muqueuse
Virus	<i>Influenza</i> type A	VHA	HHV-1 HHV-2	LCMV	VHE	Virus fièvre jaune	Junin	Lassa	Ebola
Pathologies	grippe	hépatite	herpès	méningite	hépatite	fièvre ictère	fièvres hémorragiques		

Agents Transmissibles Non Conventionnels (ATNC)



- **Protéine prion PrP^c ou PrP^{sens}** présente normalement dans le SNC, le système immunitaire et d'autres tissus
- **Présence et accumulation** dans le cerveau d'une **forme anormale PrP^{Sc} ou PrP^{res}** (structure modifiée) de la protéine prion PrP^c
- **Aspect histologique** : vacuolisation des structures nerveuses impactées

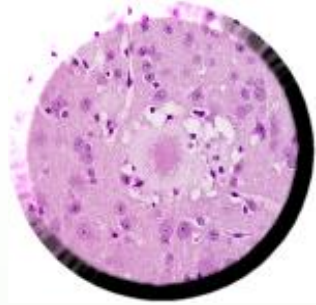


Hélice alpha

Feuillet bêta

c = cellulaire
 sens = sensible aux enzymes
 res = résistante aux enzymes
 Sc = scrapie = maladie du mouton

Agents Transmissibles Non Conventionnels (ATNC)



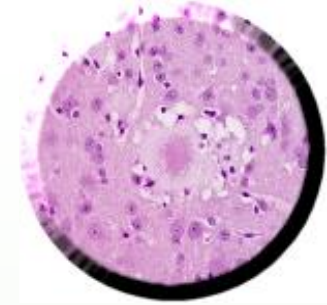
Dépistage ante mortem

- Test sanguin avec amplification de la PRPres (PMCA) puis mise en évidence par techniques biochimiques

Dépistage post mortem

- Histologie des tissus nerveux
- Mise en évidence de la PRPres dans les tissus à risque par des techniques immuno-biochimiques (Western Blot)

ATNC - Pathologie



Infections particulières : les EST (Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles) caractérisées par :

- une incubation longue (généralement)
- une dégénérescence cérébrale (→ mort)
- pas de réaction inflammatoire – ni réponse immunitaire

Groupes de danger	3		
Voies de transmission	Aéro-portée	Oro-digestive	Cutanéomuqueuse
Exemple d'ATNC	normalement aucun	Agents de la variante de MCJ Agents de l'ESB ou des EST animales Agent du Kuru	... Agent du syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker
Pathologies	/	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Détérioration mentale avec signes neurologiques (secousses musculaires, troubles visuels ou de la coordination...) ▪ Évolution irréversible, en plusieurs mois ou années vers la mort 	

***Fungi* (champignons)**

Présentation



1,5 millions d'espèces dont 80 000 décrites
2 types de mycètes

Champignons filamenteux

- Organismes pluricellulaires eucaryotes
- Mycélium, enchevêtrement d'hyphes servant de support et montrant la croissance
- Appareil sporifère portant les éléments reproducteurs : les spores

Levures

- Organismes unicellulaires eucaryotes
- Cellules ovalaires

Fungi (champignons) Multiplication

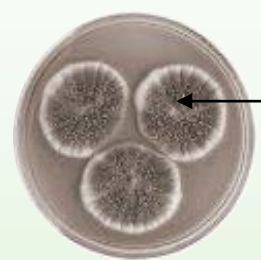


- **Croissance hyphale** ou par **bourgeonnement**
- Utilisation de **substances organiques** transformées des supports comme apport de nutriments
- **Reproduction asexuée ou sexuée**
- **Dissémination** des champignons filamenteux par :
 - Dispersion facile des spores dans l'environnement
 - Adhésion au corps des insectes et des animaux

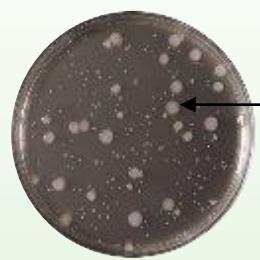
Fungi (Champignons) Identification



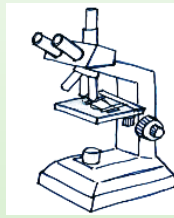
▪ Aspects macroscopiques



Couleur,
Aspect du mycélium



Aspect des colonies



▪ Aspects microscopiques

Hyphes

Spores

▪ Caractères biochimiques



Fungi (Champignons) Pathologies



- Sécrétion de **mycotoxines** à action
 - hépatique,
 - rénale,
 - nerveuse,
 - cutanée....

- Production d'**allergènes**

- Production d'**enzymes lytiques**

Fungi (Champignons) Pathologies



Groupes de danger	2			3		
	Aéro portée	Oro digestive	Cutanéo muqueuse	Aéro portée	Oro digestive	Cutanéo muqueuse
Voies de transmission	Aéro portée	Oro digestive	Cutanéo muqueuse	Aéro portée	Oro digestive	Cutanéo muqueuse
Champignons	<i>A. fumigatus</i>		<i>C. albicans</i>	<i>C. immitis</i>		<i>H. capsulatum</i> <i>var. duboisii</i>
Pathologies	aspergillose		candidose	coccidioïdo mycose		histoplasmose

Endoparasites Présentation



- Seuls parasites cités dans le Code du travail
- 2 types

Protozoaires

- Organismes unicellulaires eucaryotes
- Taille : quelques μm à $70 \mu\text{m}$
- Forme : arrondie, ovale, en arc, ...
- Éléments de mobilité : flagelles, cils, pseudopodes

Métazoaires (vers)

- Organismes pluricellulaires eucaryotes
- Taille (adulte) : quelques mm à 10 m
- Forme des vers :
 - ronds (némathelminthes)
 - plats (plathelminthes)
- Éléments de fixation : crochets, ventouses, ...

Endoparasites Multiplication



Notion de cycle



- Utilisation par le parasite d'hôtes intermédiaires et/ou définitifs

Protozoaires

- Reproduction asexuée par mitose
- Reproduction sexuée pour certains comme les *Apicomplexa* (sporozoaires)

Métazoaires (vers)

- Reproduction sexuée avec émission d'œufs fécondés voire d'embryons, agents de dissémination

Endoparasites Identification



Observation à l'œil nu ou au microscope

- Techniques préparatoires à l'observation
 - Examen direct ou après concentration,
 - À l'état frais ou après coloration.
- Repérage
 - Adultes à l'œil nu ou après grossissement,
 - Autres stades dans les produits pathologiques après grossissement
 - Œufs ou larves des métazoaires,
 - Formes végétatives et/ou kystiques des protozoaires.

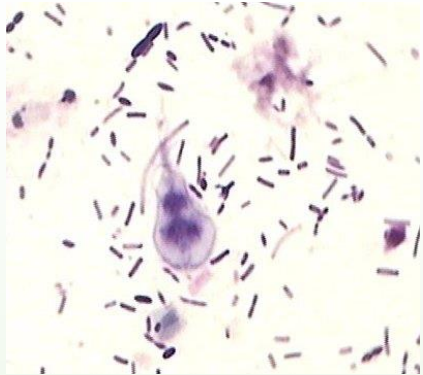


Techniques immunologiques

- Immunohémagglutination
- Immunoprécipitation
- Immunofluorescence
- Immunoenzymologie

Techniques de biologie moléculaire

Endoparasites Pathologies



Parasitoses intestinales (*Giardia*, *Entamoeba*, *Taenia*, *Ascaris*, *Enterobius*, *Echinococcus*...) atteintes intestinales et/ou hépatiques

Parasitoses sanguines (*Plasmodium*)

Autres parasitoses sanguines et tissulaires :

- protozoaires (*Toxoplasma*, *Leishmania*, *Trypanosoma*)
- nématodes tropicaux (**microfilaires** (embryons de filaires) et filaires)

signes variables selon les parasitoses : **asthénie, nausées, vomissements, diarrhées, pâleur ou ictère, troubles neurologiques...**



Parasitoses pulmonaires

- localisation systématique (*Paragonimus*)
 - localisation accessoire (*Echinococcus*, *Entamoeba*),
 - transit (*Ascaris*, filaires...)
- nodules, infiltrats transitoires ou chroniques, œdème ou atteinte pleurale...**



Endoparasites Pathologies



Groupes de danger	2			3		
	Aéroportée	Orodigestive	Cutanéo muqueuse	Aéroportée	Orodigestive	Cutanéo muqueuse
Voies de transmission	Aéroportée	Orodigestive	Cutanéo muqueuse	Aéroportée	Orodigestive	Cutanéo muqueuse
Parasites	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	<i>Taenia saginata</i>	<i>Plasmodium</i> spp	<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Taenia solium</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
Pathologies	encéphalite (immuno déprimés)	teniasis	paludisme	méningo-encéphalite	cysticercose	paludisme

Cultures cellulaires

Présentation



Origine : Sang, tissus ou organes humains ou animaux

Différents types de cultures cellulaires :

- **cultures primaires** : (durée de vie restreinte : 10 passages)
=> *cardiomyocytes et fibroblastes de cœur d'embryon de poulet*
- **souches de cellules diploïdes** : extraits de tissus embryonnaires (plus de 100 passages) => *MRC5*
- **lignées cellulaires continues** : (théoriquement passages infinis)
 - variants « immortels » spontanés de cellules tumorales => *cellules KB, Hela*
 - cellules « immortalisées » expérimentalement à l'aide de virus ou d'un produit chimique => *cellules Vero*

Pourquoi un danger ?

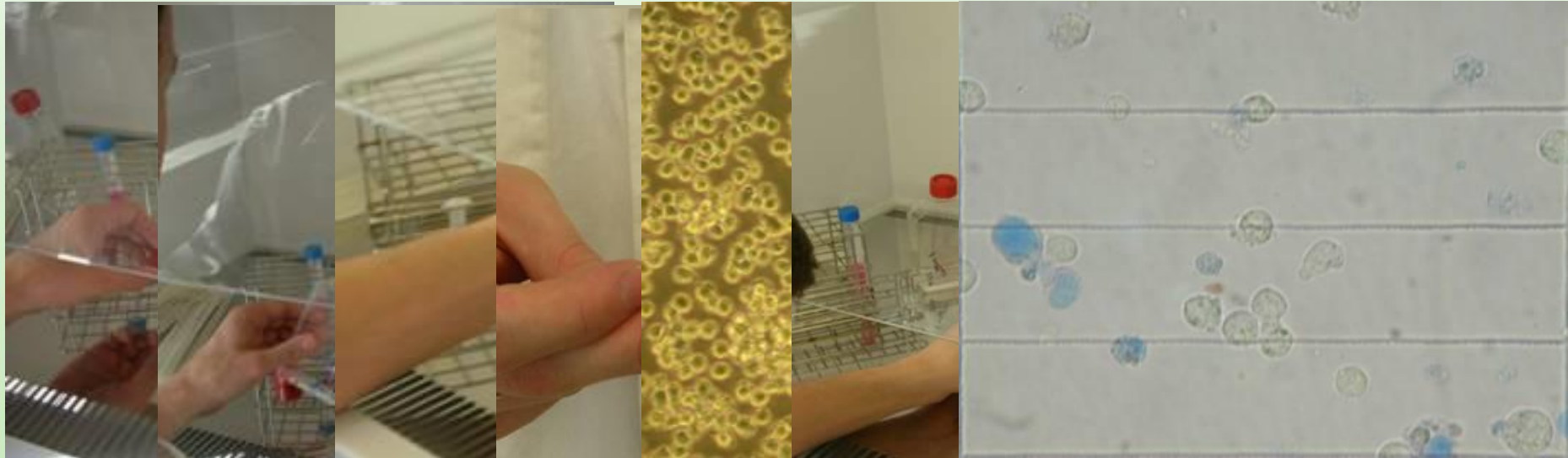
Présence potentielle d'agents biologiques

- dans les cellules étudiées
- dans les cellules, support de culture virale
- dans les suppléments de culture (SVF)

Cultures cellulaires Technique



- Préparation de la culture mère
 - élimination du milieu,
 - rinçage,
 - trypsination,
 - neutralisation de la trypsine,
 - dénombrement.
- Ensemencement d'un milieu neuf



Cultures cellulaires



Utilisation très fréquente :

- En laboratoire de recherche
- En laboratoire de diagnostic
- En industrie pharmaceutique (production)

Choix des cellules

- Garanti par traçabilité
- Appuyé sur la consultation de bases (ATCC, Pasteur)
- Adapté à l'utilisation
- Le plus éloigné possible de l'espèce humaine

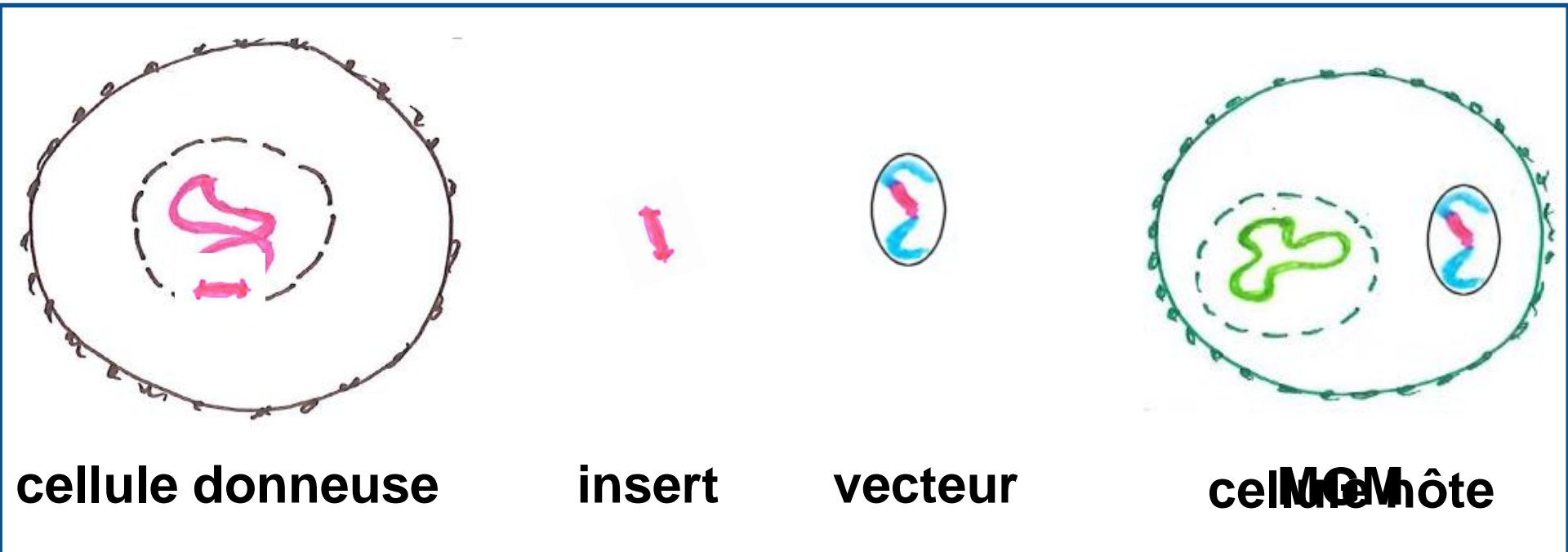
Microorganismes Génétiquement Modifiés (MGM) Présentation



Éléments nécessaires à la production

- **insert** : fragment de d'ADN d'intérêt d'une **cellule donneuse**
- **vecteur** servant à introduire l'insert dans la cellule hôte
- **cellule hôte** recevant le fragment d'ADN

Construction d'un microorganisme génétiquement modifié (MGM)



Obtention de l'ADN d'intérêt

Insertion de l'ADN d'intérêt dans un insert = manipulation génétique

Introduction du vecteur dans la cellule cible devenant ainsi un MGM

Microorganismes Génétiquement Modifiés (MGM) Présentation



«Tout organisme dont le matériel génétique a été modifié autrement que par la multiplication ou recombinaison naturelles»

Références

- Directive européenne actualisée 2001/18/CE
- Loi du 25 juin 2008
- Haut Conseil des Biotechnologies (HCB)



Microorganismes Génétiquement Modifiés (MGM) Classement



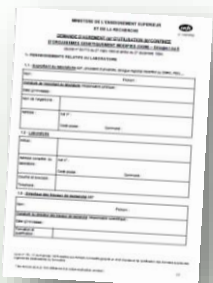
■ Art. D532-2 du code de l'environnement

	Groupe I	Groupe II	Groupe III	Groupe IV
Organisme récepteur ou parental, vecteur, insert, OGM non susceptibles d'entraîner une maladie chez l'homme, l'animal, les végétaux, ni de causer des effets négatifs sur l'environnement	oui			
Agent biologique pouvant provoquer une maladie chez l'homme, causer des effets négatifs sur l'environnement		oui	grave	grave
Agent biologique constituant un danger pour les travailleurs		oui	sérieux	sérieux
Propagation dans la collectivité		peu probable	possible	élevée
Existence d'une prophylaxie ou d'un traitement efficace		oui	oui	non

Microorganismes Génétiquement Modifiés (MGM) Utilisation confinée



- **Déclaration d'utilisation ou demande d'agrément d'utilisation d'OGM par l'unité de recherche**



	Groupe I	Groupe II	Groupe III	Groupe IV
Déclaration	oui	oui si installation déjà agréé pour groupes II, III ou IV		
Agrément		oui	oui	oui

- **Avis donné par le HCB** sur les risques et les niveaux de classement de l'OGM
- **Agréments délivrés** aux unités de recherche par le ministère en charge de la recherche

Les AB dans une autre classification : classement de cancérogénicité du CIRC

Groupes de cancérogénicité	1	2A	2B	3	4
Définition	<i>cancérogène pour l'Homme</i>	<i>probablement cancérogène pour l'Homme</i>	<i>peut-être cancérogène pour l'Homme</i>	<i>inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'Homme</i>	<i>probablement pas cancérogène pour l'Homme</i>
Nombre	116	73	287	503	1
Exemples viraux	VHC, VHB, VIH 1, EBV, HTLV1 HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 5	HPV type 6	VIH 2, HTLV 2 HPV types 5 et 8, 26, 53, 66, 67, 70, 73, 82, 30, 34, 69, 85, 97	VHD HPV 6 et 11 HTLV 2 SV 40	
Exemples fongiques	Aflatoxines fongiques		Aflatoxin M Fumonisin B1, Fumosin B2 Fusarin C Ochratoxin A	Zearalenone, Deoxynivalenol, Nivalenol et Fusarenone X (toxines de <i>Fusarium</i>)	
Exemples parasitaires	Infection à <i>Schistosoma haematobium</i>	Infection à <i>Plasmodium falciparum</i>	Infection à <i>Schistosoma japonicum</i>	Infection à <i>Opisthorchis felineus</i>	
Autre exemple	Formaldéhyde	Acrylamide	Trypan blue	Naphtyl-1-amine	Ciclosporin 45

Plan de l'exposé

1. Eléments de contexte
2. Différents types d'agents biologiques
3. Lutte contre les agents biologiques
4. Ressources et références
5. Conclusion

Une grande variété d'agents

=> Une grande diversité de traitements

antibactériens

- antiseptiques appliqués lors de lésions
- antibiotiques

antifongiques

- de surface
- systémiques

antiviraux

- perturbation chimique du cycle de réplication (pénétration, réplication, assemblage)
- stimulation du système immunitaire

antiparasitaires

- antipaludiques
- antihelminthiques
- antiamibiens
- autres antiparasitaires systémiques

Cas de la lutte antiprion

Traitement

- Aucun actuellement

Méthodes de désinfection poussées (non conventionnelles)

- **Inactivation non totale** : stérilisation par autoclave à vapeur d'eau à 134°C pendant 18 minutes
- **Inactivation totale**
 - Immersion dans l'hypochlorite de sodium à la concentration de 2 % de chlore actif pendant 60 minutes à température ambiante
 - Immersion dans la soude molaire pendant 60 minutes à température ambiante
- **Disparition complète de l'infectiosité** : incinération à une température supérieure à 800°C

Une grande variété d'agents

=> Des mêmes mesures prophylactiques

Mesures d'hygiène des personnes

Vaccinations

Plan de l'exposé

1. Eléments de contexte
2. Différents types d'agents biologiques
3. Lutte contre les agents biologiques
4. Ressources et références
5. Conclusion

Textes juridiques

- Agents biologiques :
 - Articles R. 4421-1 à R. 4427-5 du Code du travail
 - Arrêté du 18 juillet 1994 modifié en 1997 et 1998
- Microorganismes génétiquement modifiés :
 - Directive européenne actualisée 2001/18/CE
 - Loi du 25 juin 2008

Publications

- Manuel du HCB pour l'utilisation confinée d'OGM (publication du HCB 30/11/2014)
- ED 117 : fiche pratique de sécurité « les agents biologiques » (INRS)
- ED 6131 : les risques biologiques liés aux techniques de génie génétique en laboratoire (INRS)

Ressources numériques

- Site 3RB
- BAOBAB : BAse de d'OBservation des Agents Biologiques (INRS)
- Film Agent BIO07 (INRS)

Plan de l'exposé

1. Eléments de contexte
2. Différents types d'agents biologiques
3. Lutte contre les agents biologiques
4. Ressources et références
5. Conclusion

Conclusion

Identifier le danger biologique

- Type d'agent biologique
- Niveau de dangerosité (textes)
- Mode de contamination (chaîne de transmission)
- Pathologies causées