

Faculté des Sciences
Département des sciences de la nature et de la vie
2 eme Année Licence
Intitulé de Licence : **Biotechnologies**



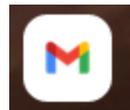
جامعة محمد بوضياف - المسيلة
Université Mohamed Boudiaf - M'sila

Introduction aux **Biotechnologies**



BIOTECHNOLOGIES

Prepared by:
DEHIMAT Abdelouahab, PhD



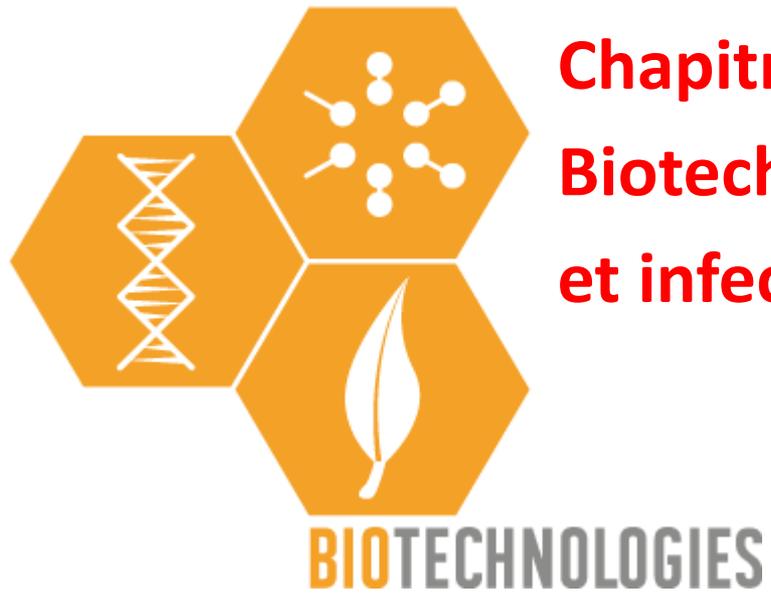
a-ouahab.dehimat@univ-msila.dz



<https://www.linkedin.com/in/abdelouahab-dehimat-320a7057/>



2021 - 2022



Chapitre V :
Biotechnologies microbiennes
et infectiologie

Chapitre V : Biotechnologies microbiennes et infectiologie

- Diagnostics
- Nouvelles voies thérapeutiques
- Lutte contre le dopage et l'utilisation de stupéfiants



Chapitre V : Biotechnologies microbiennes et infectiologie

Introduction

- L'ensemble des techniques qui visent à l'exploitation des micro-organismes, des cellules animales et végétales, et de leurs constituants, la biotechnologie, dont les origines se confondent avec l'origine de l'humanité, a trouvé ses premières applications dans le domaine de la santé avec les travaux de **Louis Pasteur** à la fin du siècle dernier.
- Accompagnant les progrès de la microbiologie et de l'immunologie, d'autres vaccins de maladies virales ou bactériennes ont été développés au cours de la première moitié du siècle :
 - vaccins préparés à partir de micro-organismes ou de leurs toxines inactivés et formulés en présence de substances adjuvants de l'immunité,
 - et vaccins préparés à partir de micro-organismes de pouvoir pathogène atténué ; ce développement des vaccins n'a été possible que grâce au développement concomitant des techniques de culture des tissus ou des cellules d'origine animale.



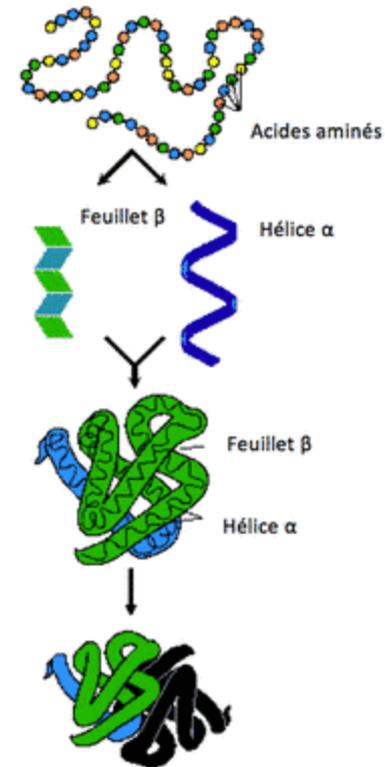
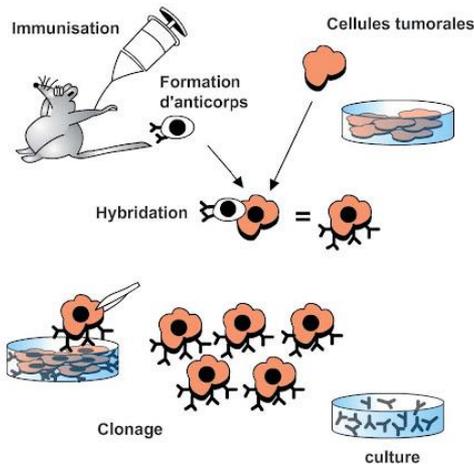
Chapitre V : Biotechnologies microbiennes et infectiologie

Introduction

Ce n'est toutefois que beaucoup plus récemment qu'un certain nombre de découvertes de caractère multidisciplinaire mais résultant principalement des progrès de la biochimie, de la biologie moléculaire et de l'immunologie, allaient **jouer un rôle décisif dans le diagnostic, la prévention et la lutte contre les principales maladies infectieuses ou parasitaires.**

Parmi ces découvertes, il convient de mentionner

- **la structure de l'acide désoxyribonucléique (ADN) support de l'hérédité,**
- **la structure et la synthèse des protéines, la recombinaison génétique de l'ADN**
- **et la fusion cellulaire à l'origine de l'obtention des anticorps monoclonaux.**



Chapitre V : Biotechnologies microbiennes et infectiologie

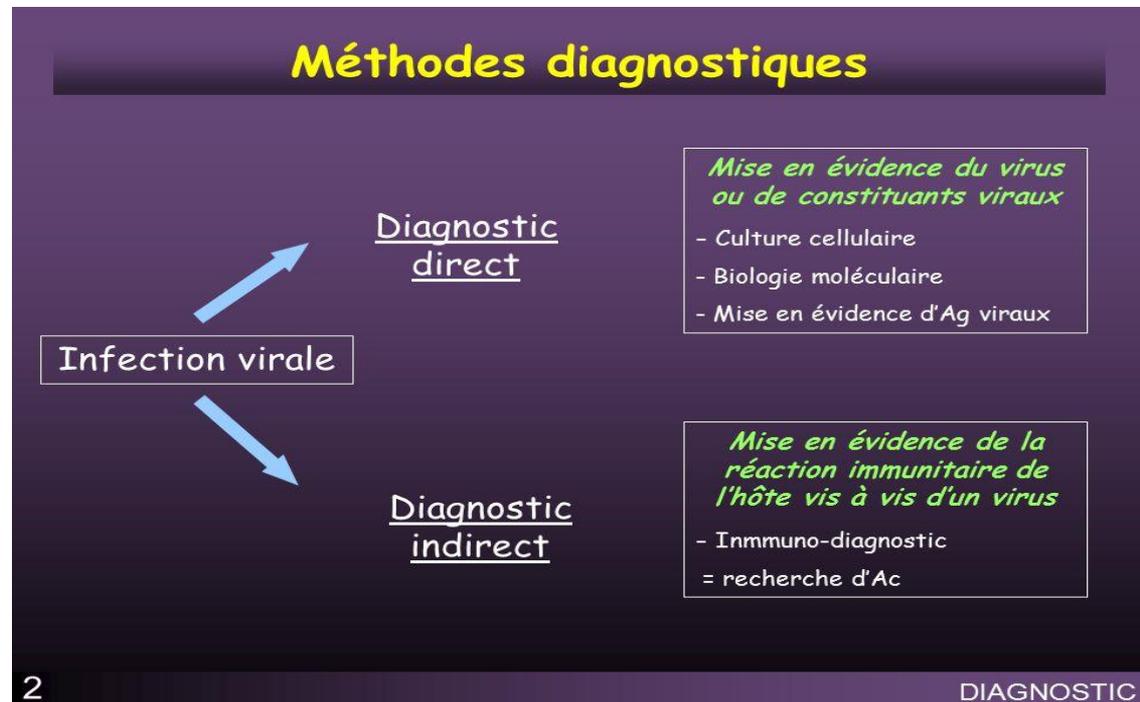
- Diagnostics
- Nouvelles voies thérapeutiques
- Lutte contre le dopage et l'utilisation de stupéfiants



diagnostics

V.1. Diagnostics

- Au plan général, le diagnostic des maladies infectieuses, virales ou bactériennes et des maladies parasitaires repose sur :
 - la mise en évidence de l'agent ou de certains de ses constituants (*diagnostic direct*)
 - ou sur la mise en évidence des éléments de la réponse immunitaire induite par les antigènes portés par cet agent (*diagnostic indirect*).

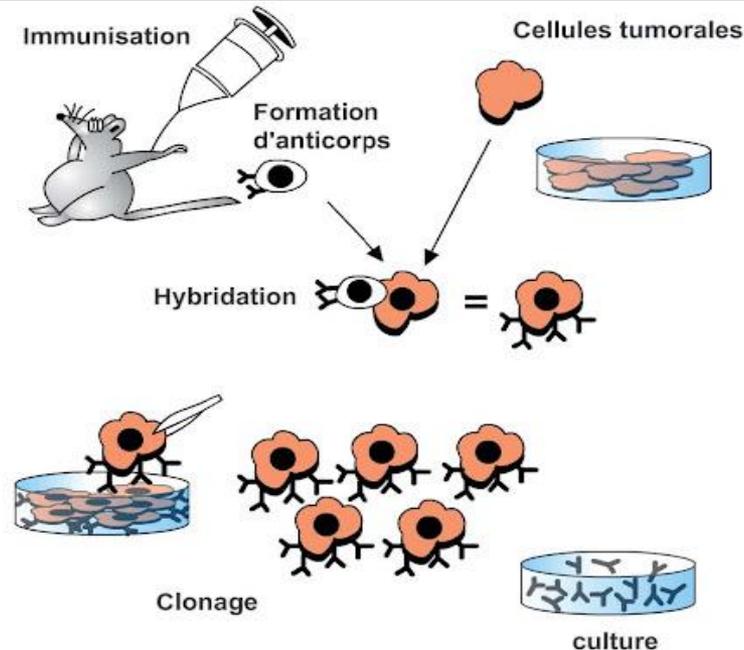
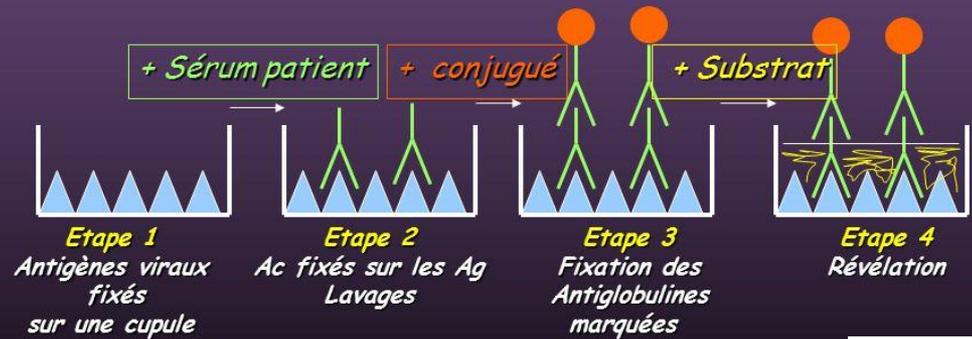


V.1.1. Diagnostic direct

- Pour le diagnostic direct, les techniques les plus classiquement utilisées (mise en évidence macroscopique ou microscopique directe de l'agent ou après coloration incluant l'utilisation de marqueurs fluorescents, culture, isolement, caractérisation, etc.) cèdent progressivement le pas à de nouvelles techniques plus spécifiques et plus sensibles.
- Parmi celles-ci figurent les techniques **immuno-enzymatiques**, qui reposent sur la mise en évidence des déterminants antigéniques portés par l'agent recherché au moyen d'anticorps spécifiques marqués par des enzymes destinées à révéler la formation des complexes antigènes-anticorps.
- Ces complexes sont révélés par l'activité enzymatique qu'ils portent, **l'action de l'enzyme sur un substrat approprié transformant ce dernier en un produit coloré, facilement visualisable.**
- **La spécificité et la sensibilité de ces techniques peuvent** se trouver considérablement accrues par l'utilisation d'anticorps monoclonaux obtenus par la fusion d'une cellule productrice d'un anticorps monospécifique (plasmocyte B) avec une cellule lui apportant l'immortalisation et la sécrétion (myélome).
- De même, la sensibilité de ces techniques peut se trouver augmenté e par l'utilisation d'un marqueur chimio luminescent en lieu et place d'un marqueur enzymatique.

Diagnostic indirect

- **Techniques immuno-enzymatiques**
ELISA: enzyme linked immunosorbent assay
⇒ **Technique très sensible et reproductible**



V.1.1. Diagnostic direct

Plus récemment, les progrès réalisés dans la connaissance des acides nucléiques ont permis d'envisager la mise au point de **techniques de diagnostic direct** basées non plus sur la recherche de **l'agent infectieux ou parasitaire** et de **ses constituants antigéniques**, mais sur la mise en évidence du matériel génétique, ADN ou acide ribonucléique (ARN), porté par ces agents.

- Un progrès décisif pour la mise en évidence des matériels génétiques portés par les agents est représenté par la technique dite d'«amplification en chaîne par polymérase», plus connue sous la dénomination anglaise de «**Polymerase Chain Reaction**» (**PCR**).
- D'une extrême sensibilité, cette technique peut être également d'une grande spécificité qui dépend notamment de la nature des amorces utilisées.
- Toutes ces techniques, dont certaines (**hybridation, amplification de gène**) relèvent encore du laboratoire spécialisé et du diagnostic individuel, sont désormais disponibles sous forme de trousse (kits) fournissant tous les éléments nécessaires à la réaction.
- Nul doute que, dans un proche avenir, leur utilisation au moyen d'automates les destina au diagnostic de masse en même temps que leur simplification les rendra accessibles au laboratoire non spécialisé ou au praticien.

V.1.1. Diagnostic direct

Diagnostic direct

* Diagnostic direct:

Détection du virus ou des composants viraux

Isolement du virus

↓
Sur animaux
Sur œuf embryonné
Sur cultures cellulaires
Effet cytopathique
immunocytodiagnostic

Microscopie
électronique

Détection d'Ag

↓
Immunocytodiagnostic
ELISA
Immunodiffusion (bandelettes)
Latex

Détection du génome

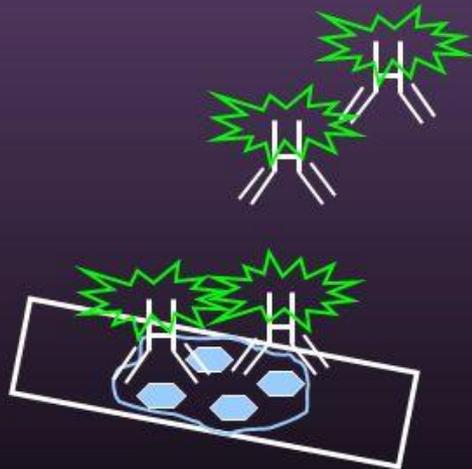
↓
bDNA
PCR

Techniques de diagnostic direct

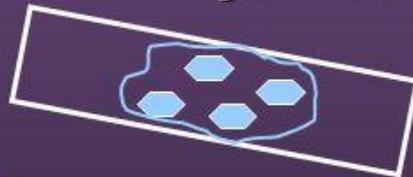
- *Méthodes de diagnostic rapide:*
 - *Immunofluorescence (IF directe ou indirecte)*

IFD

*Anticorps spécifiques
marqués à la fluoresceïne*

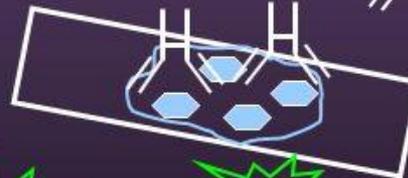
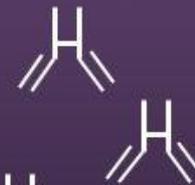


Antigènes viraux



IFI

Anticorps spécifiques



*Anticorps secondaires
marqués à la fluoresceïne*



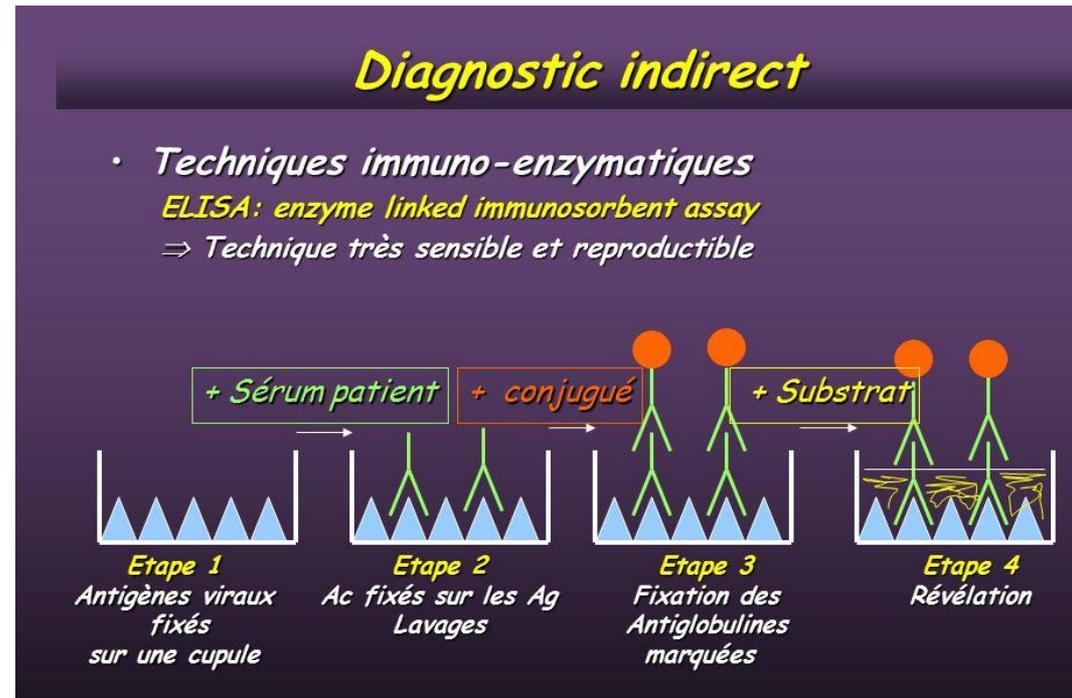
V.1.2. Diagnostic indirect

- Pour le diagnostic indirect, les techniques classiquement utilisées pour la mise en évidence des anticorps (*agglutination rapide, agglutination lente, fixation du complément, inhibition de l'hémagglutination, neutralisation*, etc.); bien qu'encore très largement utilisées y compris comme techniques de référence, cèdent progressivement le pas aux techniques **immuno-enzymatiques** souvent **plus spécifiques et surtout plus sensibles**.

- Les techniques de diagnostic indirect sont basées, comme les techniques de diagnostic direct, sur la mise en évidence de complexes **antigènes-anticorps (Ag-Ac)**.

- Dans le cas du diagnostic indirect, les complexes sont formés entre le ou les antigènes de spécificité connue, apportés dans la réaction (virus, bactéries, parasites, etc., ou leurs extraits) et les anticorps éventuellement présents dans l'échantillon soumis à l'analyse.

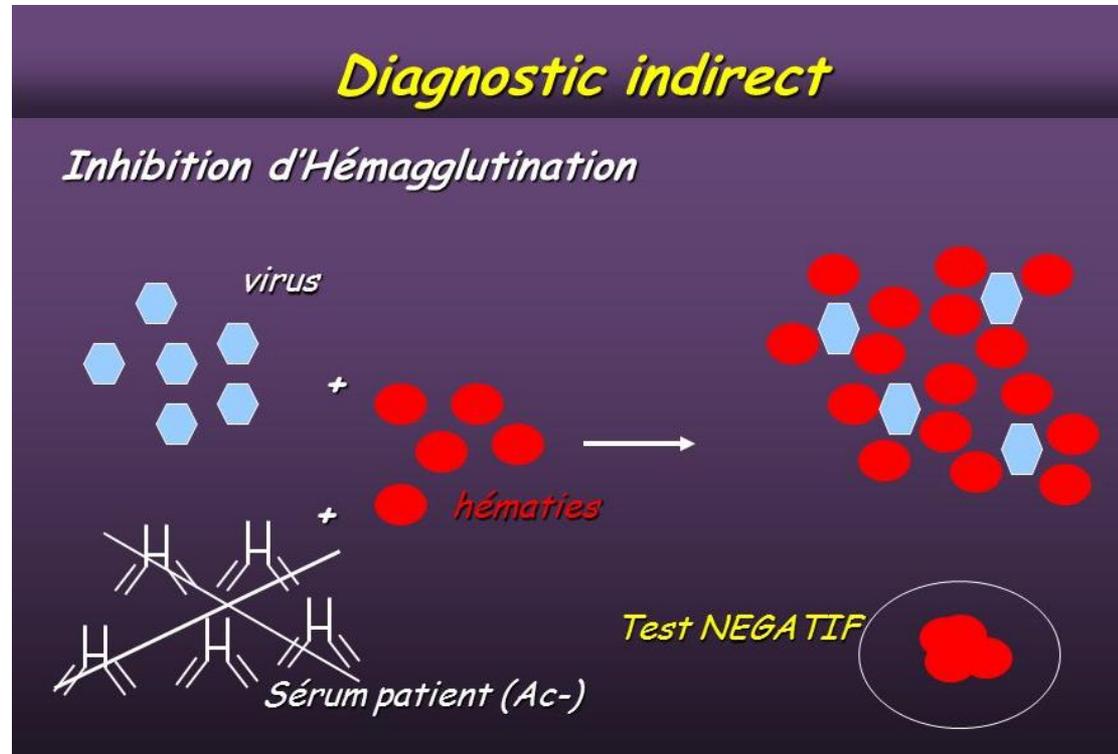
- Dans ce cas, les complexes **antigènes-anticorps** formés peuvent être révélés par différentes techniques, qui utilisent toutes des **marqueurs enzymatiques** engagés *secondairement* dans des réactions enzymes-substrats se traduisant par l'apparition de produits colorés.



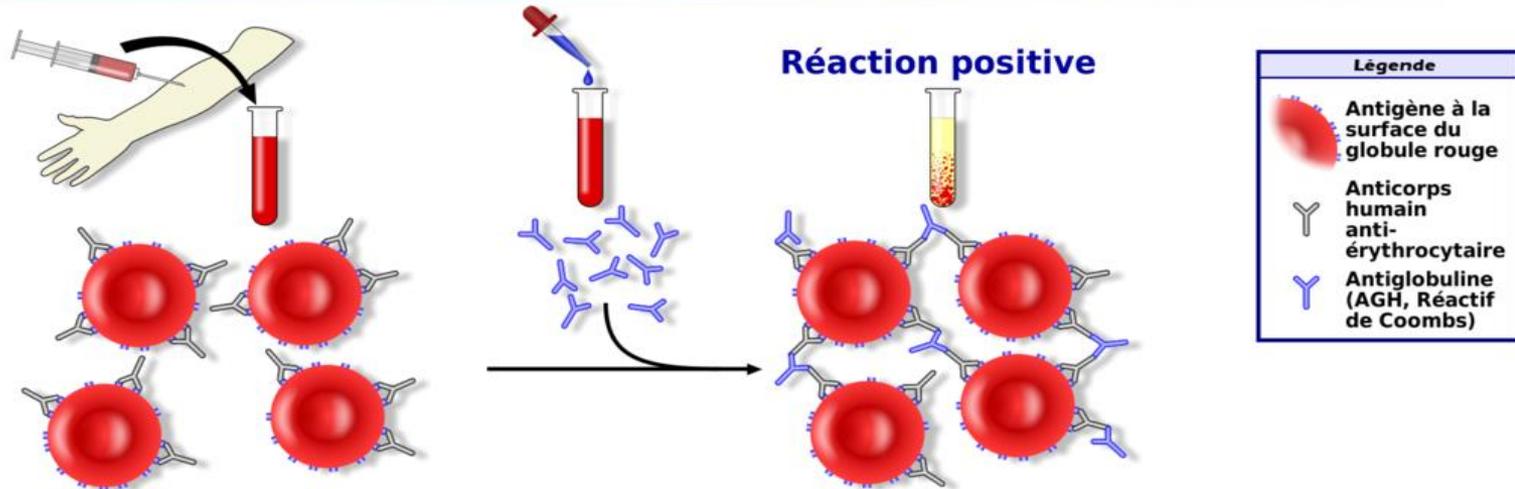
V.1.2. Diagnostic indirect

- L'apport de la biotechnologie au diagnostic indirect, reposant sur la mise en évidence des composantes cellulaires de la réponse immunitaire, doit être souligné, avec l'utilisation des *tests in vivo* qui recherchent un état d'hypersensibilité retardée (intradermoréactions) pour le diagnostic de nombreuses infections virales ou bactériennes et d'infestations parasitaires.

A ces tests, il convient maintenant d'ajouter les *tests in vitro* qui s'adressent aux différents éléments cellulaires de la réponse immunitaire en révélant leur niveau de sensibilisation à des antigènes spécifiques (test de cytotoxicité lymphocytaire par exemple).



Test de Coombs direct / Test direct à l'antiglobuline

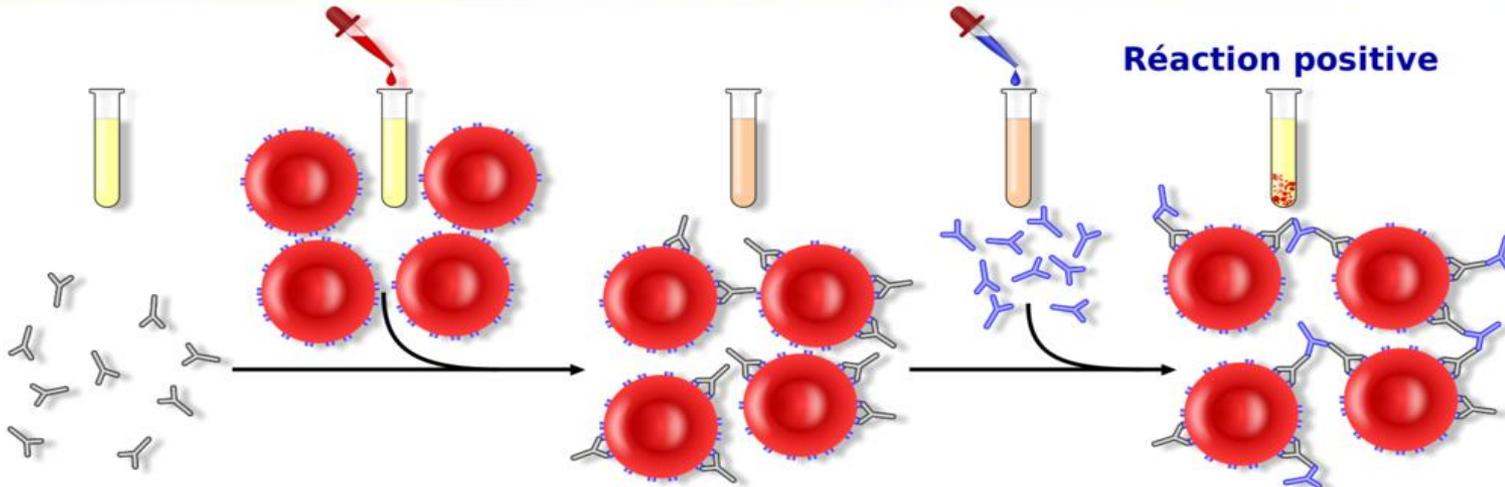


Globules rouges sensibilisés (GRS), chez un patient ayant une anémie hémolytique immunologique. Anticorps humains fixés aux antigènes des globules.

Ajout de l'antiglobuline aux GRS lavés.

Agglutination : Ponts formés par l'antiglobuline fixée aux anticorps humains.

Test de Coombs indirect / Test indirect à l'antiglobuline



Anticorps d'un sérum humain reconnaissant un antigène érythrocytaire.

Incubation des globules dans le sérum humain.

Complexes antigène-anticorps à la surface des globules (GRS)

Ajout de l'AGH après lavage des GRS.

Agglutination car les globules rouges sont sensibilisés.



Chapitre V : Biotechnologies microbiennes et infectiologie

- Diagnostics
- **Nouvelles voies thérapeutiques**
- Lutte contre le dopage et l'utilisation de stupéfiants

Thérapie génique

Thérapie protéique

Transplantation cœur-poumon

V.2. Nouvelles voies thérapeutiques

- Tout d'abord, les biotechnologies ont permis de produire des médicaments que **les méthodes industrielles** classiques (extraction à partir d'organismes vivants, souvent des animaux, problèmes de purification, risque de contamination notamment virale) ne permettaient pas ou plus d'obtenir.
- C'est le cas par exemple de **l'hormone de croissance (GH)** ou des **interférons**, dont la production est devenue possible grâce :
 - **au clonage par génie génétique**
 - et à la synthèse de **protéines à usage thérapeutique**,
 - ou encore des **anticorps monoclonaux**, spécifiquement générés pour bloquer l'action de certains agents ou récepteurs.

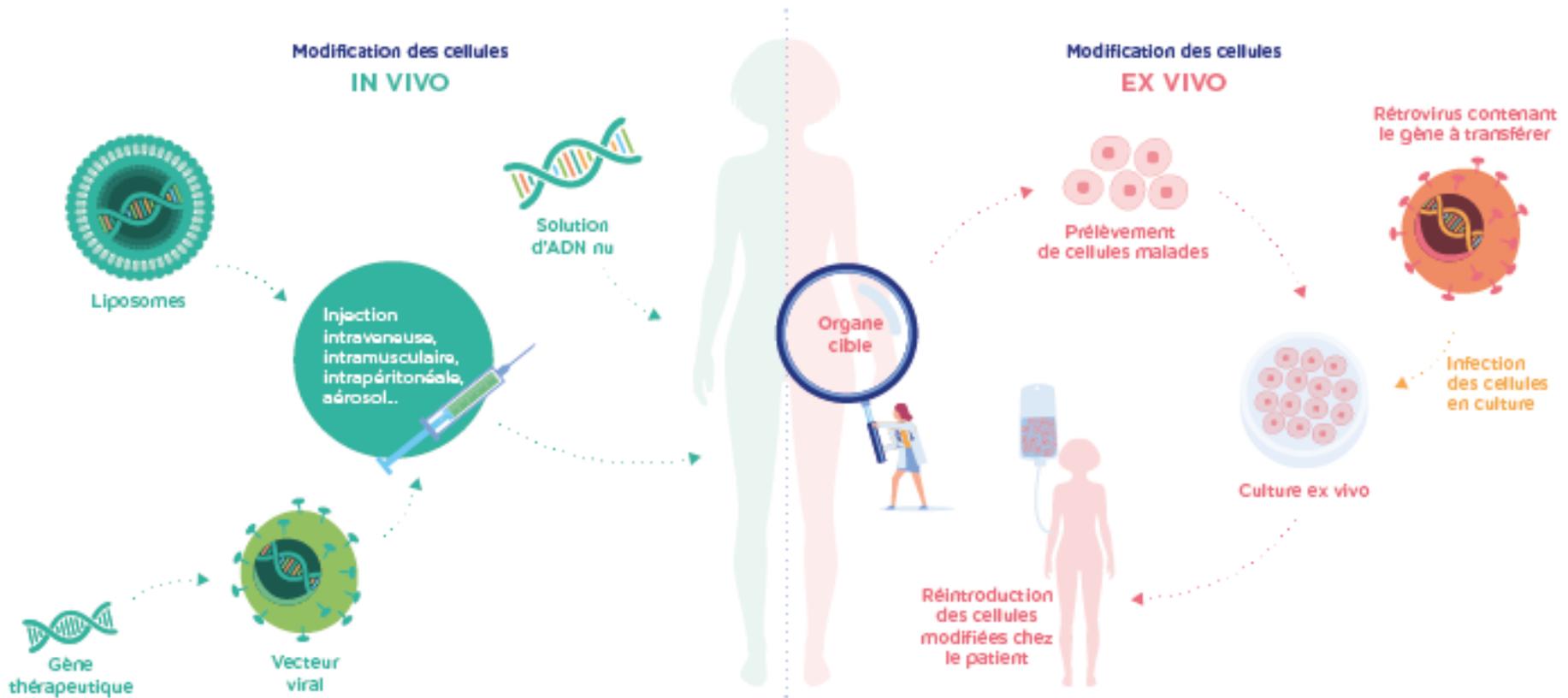
V.2. Nouvelles voies thérapeutiques

- Par ailleurs, la disponibilité de protéines pures, en grande quantité, a permis le développement de très **nombreux kits de diagnostic**, alliant simplicité de très nombreuses affections d'utilisation, sensibilité et spécificité..
- Ensuite, avec le **séquençage du génome** de nombreux organismes vivants et notamment celui de l'homme, **l'identification de nouveaux gènes, l'étude de leurs polymorphismes facilitée** par l'utilisation de **bio-puces** de plus en plus performantes, la découverte de nouveaux mécanismes moléculaires ont facilité la recherche de médicaments entièrement nouveaux.

Ex: Thérapie Génique

LES DEUX VOIES DE LA THÉRAPIE GÉNIQUE

LES DEUX VOIES DE LA THÉRAPIE GÉNIQUE



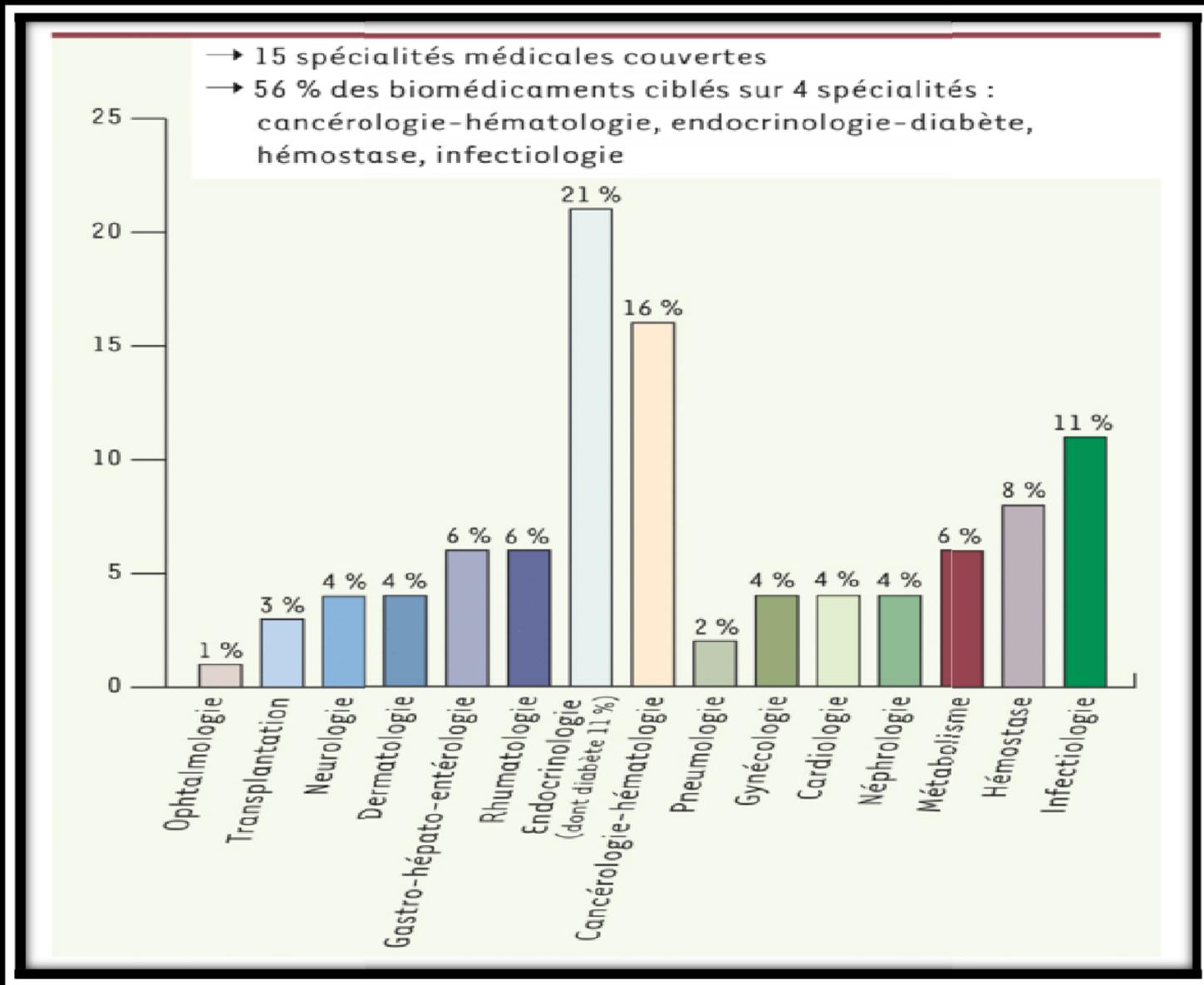


Figure : Classification pharmacologique des biomédicaments recombinants commercialisés.

Au-delà du médicament, de nouvelles perspectives thérapeutiques

- Testée dès le début des années 1990 avec de nombreux essais tant chez l'animal que chez l'homme, la thérapie génique a donné naissance au concept de « l'ADN médicament », validé par les premiers succès chez l'homme en 2000, avec le traitement « d'enfants bulles » atteints du syndrome d'immunodéficience combinée sévère lié au chromosome X, par le Pr Alain Fischer et son équipe à l'hôpital Necker à Paris.
- Malgré les difficultés de cette thérapie génique *ex vivo* (avec réintroduction du gène normal par un rétrovirus dans les cellules de la moelle sanguine) et le potentiel par suite de l'insertion du transgène à proximité d'un oncogène, d'autres essais réussis sur trois autres pathologies voisines ont confirmé le potentiel de cette méthode. Des techniques dites de chirurgie du gène ou de saut d'exons, avec délétion de l'exon porteur d'une mutation et rétablissement du cadre de lecture du gène ont été testées avec succès chez l'animal (souris, chien) sur la dystrophine (maladies de Duchenne de Boulogne et de Becker) et sont en cours d'étude chez l'homme.
- Les thérapies cellulaires bénéficient du développement très rapide des études sur les cellules souches qui peuvent se multiplier indéfiniment, donc à grande échelle et se différencier. Elles ouvrent la voie à une médecine régénératrice capable, par le remplacement de cellules détruites, de rétablir le fonctionnement d'un organe. La démonstration du concept en clinique reste à faire.
- La médecine prédictive devrait permettre de prévenir, voire de guérir certaines maladies grâce à une détection précoce de gènes de prédisposition, en cours d'identification grâce à l'analyse à grande échelle de milliers de génotypes sur de larges collections de patients, atteints par exemple de différentes formes de cancer.

Ex: Exploitation des données de localisation génomique (Bio-puces à ADN)



1-Définition: Puce à ADN Est un ensemble de molécules d'ADN fixés sur une surface qui peut être du verre, du silicium ou du plastique.

Cette biotechnologie récente, permet de visualiser les gènes exprimés (transcrits dans une cellule d'un tissu donné).

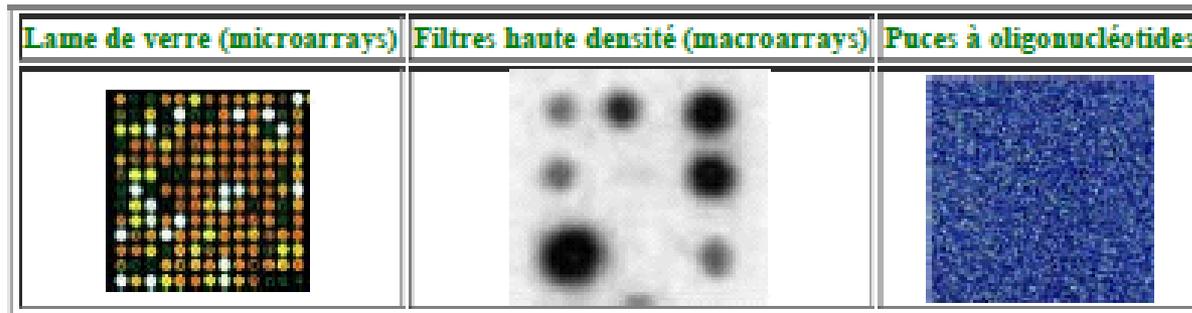


fig1: Les différentes sortes de puces ; extrait de DNA microarray principale

2-Les méthodes de puces à ADN reposent sur les techniques d'hybridations simultanées sur un support de taille réduite (quelques cm²), utilisant de l'ARN comme substrat.

Bien que partant d'un principe de base commun, certains *puces à ADN* se distinguent sur trois (3) points essentiels :

- **la nature du support** le support peut être en verre ou en nylon.
- **le système de détection** : Radioactivité, colorimétrie, fluorescence.
- **Le choix des sondes et la technique d'hybridation:** L'utilisation des fragments de ADNc ou des oligonucléotides et le choix du système de détection, contribuent à connaître les différents microarrays.

3-Fabrication d'une puce à ADN



- des fragments d'ADN amplifiés par la technique PCR, déposés sur une lame de microscope recouverte de polylysine (so
- la polylysine assure la fixation de l'ADN
- l'ADN est dénaturé avant l'hybridation, pour qu'il se trouve sous la forme simple brin sur la puce.
- l'accrochage est effectué au brin complémentaire contenu dans la cible
- NB/ il existe d'autres tubes de puces que celles sur lames de verre :
 - filtres haute densité (macroarrays)
 - lames de verre (microarrays)
 - puces à aligonucléotides
- les molécules d'ADN fixés sur la lame sont appelées des sondes
- des milliers de sondes peuvent être fixés sur une même puce.

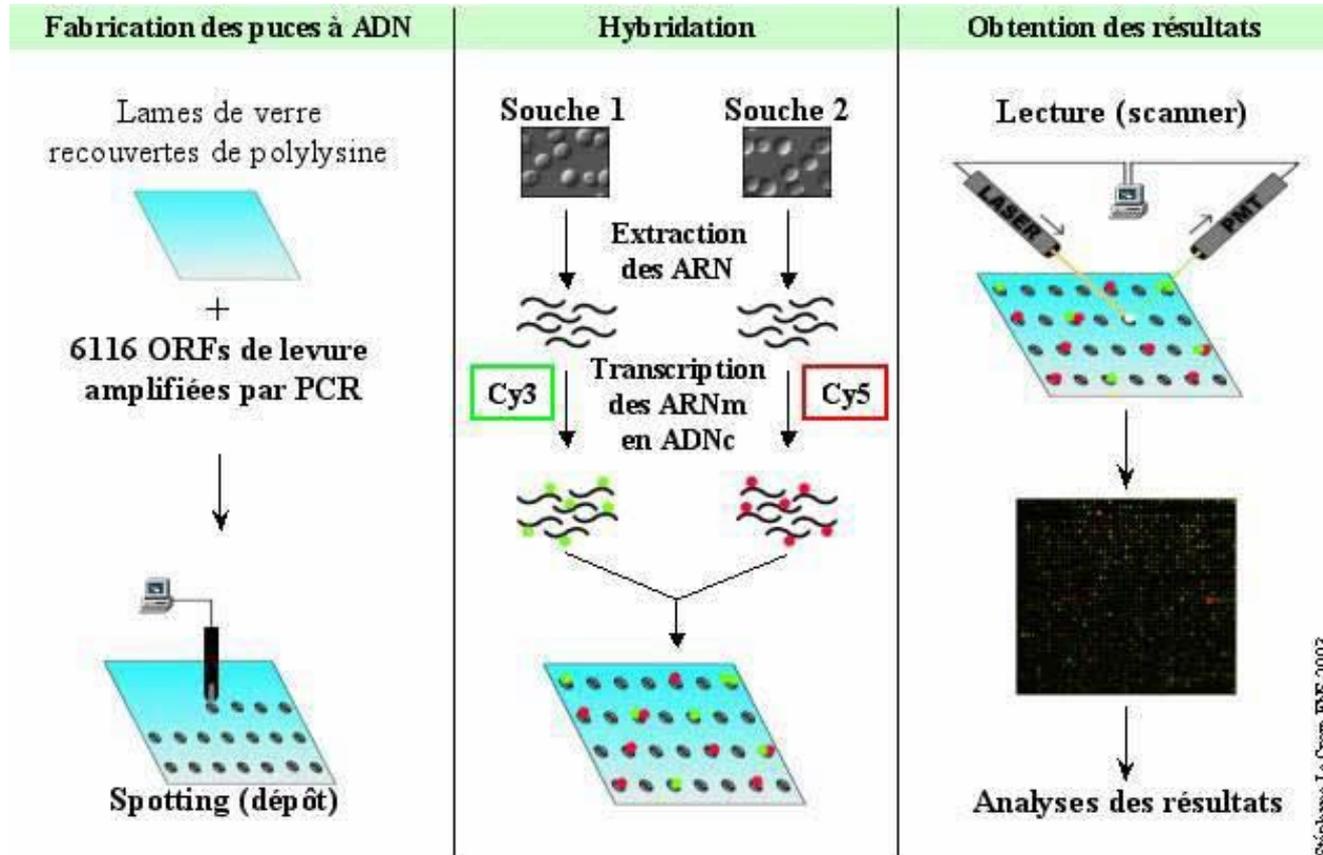


Fig2: Les étapes de fabrication de puces à ADN; Extrait du doc. de Stéphane le Crom et Philippe Marc



3.1. Hybridation

- les ADN (vert) et les ADN (rouges) sont mélangés (cibles) et placés sur la matrice simple brin déposés (sonde)
- la puce est inculpée une nuit à 60o
- à cette température, un brin d'ADN qui rencontre son complémentaire s'apparie pour donner de l'ADN double brin
- les ADN fluorescents vont s'hybrider sur les gènes déposés

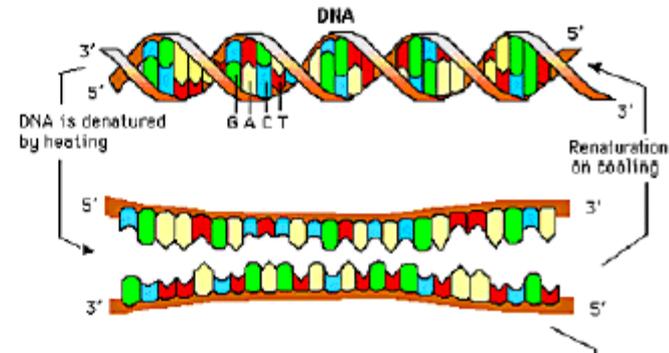


fig3: Hybridation ADN ; Extrait du doc. de Stéphane le Crom et Philippe Marc

Un lien vers une animation:

<http://www.Cea.fr/UserFiles/File/Animations/aLaLoupe/biopuce/puceAdn.htm>

4. Les domaines d'application des puces à ADN

Les domaines d'applications des puces à ADN sont très vastes et touchent un large marché tel que :

- la recherche biologique (génomique fonctionnelle)
- la recherche pharmaceutique
- le génotypage
- le diagnostic des maladies
- les contrôle agroalimentaires et industriels
- l'environnement
- identification et expertise médico-légale

Chapitre V : Biotechnologies microbiennes et infectiologie

- Diagnostics
- Nouvelles voies thérapeutiques
- Lutte contre le dopage et l'utilisation de stupéfiants



V.3. Lutte contre le dopage et l'utilisation de stupéfiants

Introduction

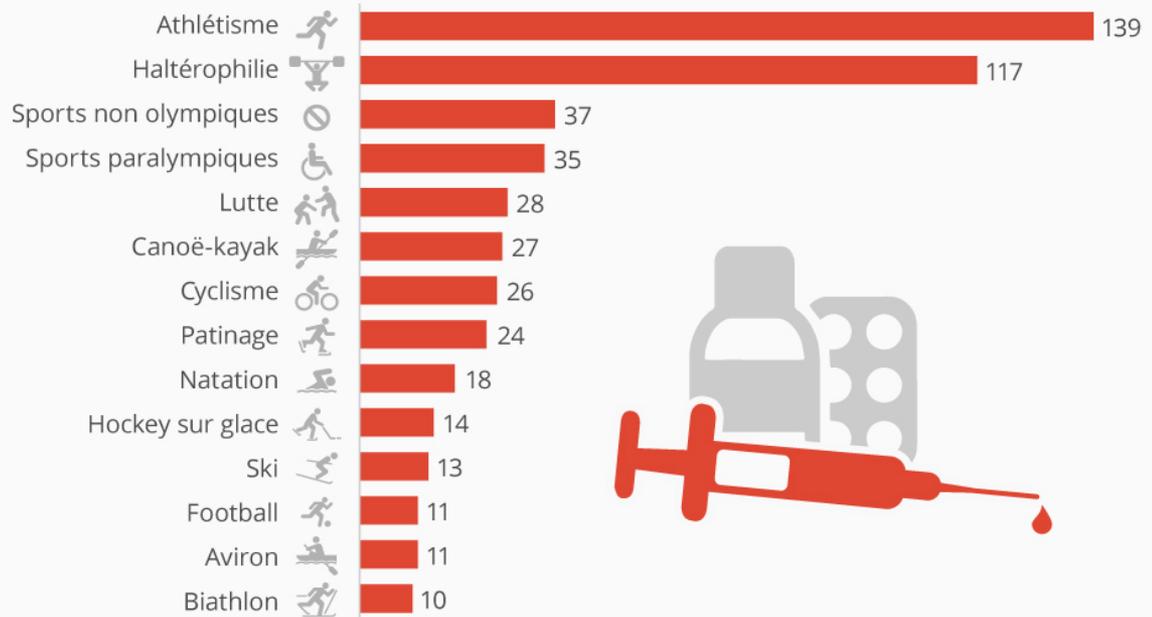
- L'utilisation de **substances dopantes** fait partie de l'histoire du sport ; l'escalade de leur utilisation a conduit dans les années 60 à instaurer un contrôle de leur utilisation et à mettre en œuvre un arsenal répressif.
 - Actuellement la surveillance de l'évolution des cas positifs par type de sport permet d'avoir une estimation de l'ampleur de leur usage par type de sport.
 - **Trois grandes classes de produits** se partagent la majorité des cas positifs il s'agit des anabolisants :
 - Substance favorisant l'assimilation des protéines chez les êtres vivants qui entraîne un accroissement du système musculaire),
 - des stimulants
 - et des stupéfiants.
- Il est possible de prédire leur utilisation en fonction des buts recherchés.

Quelles molécules dopantes

- Le dopage par les anabolisants se rencontre essentiellement dans **les sports de force, les stimulants dans les sports de vitesse, les sports d'endurance** sont la cible de produits qui améliorent le transport de l'oxygène.
- Dans la plupart des conditions d'utilisation l'efficacité du dopage sur **la performance** n'est pas prouvée, ceci n'empêche pas leur usage au prix de risques réels.

Russie : le scandale d'un dopage d'Etat

Nombre de résultats falsifiés des athlètes russes de 2011 à 2015



© StatistaCharts Source : McClaren WADA investigation report

Les molécules de dopage

- Les molécules qui l'érythropoïétine EPO améliorent l'oxygénation, comme le

Salbutamol

ou (c'est une hormone naturelle qui stimule la production de globules rouges et favorise l'oxygénation des muscles. Ces dopants rendent le sang plus visqueux ce qui augmente le risque d'accident cardiaque ou cérébral et peut même entraîner la mort).

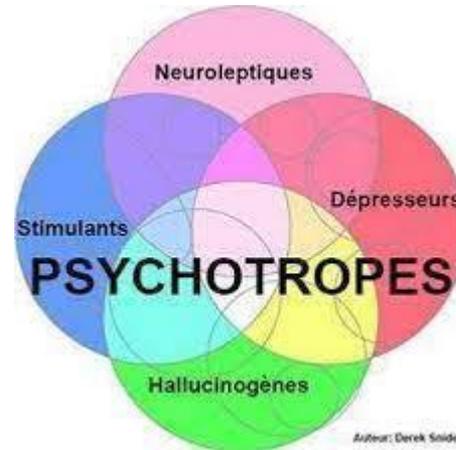


- Les molécules pour « **se sentir invincible** » et pousser ses performances aux limites comme les

Amphétamines

(ce sont des substances psychotropes qui agissent sur nos désirs, imaginations et réactions mentales.

- Ce sont aussi des **substances psychostimulantes** qui accroissent l'activité mentale, retarde le besoin de sommeil, par ailleurs, elles diminuent l'appétit).



- **Les drogues récréatives**, aussi appelées **stupéfiants** appartiennent à cette catégorie : l'héroïne, la morphine, la méthadone, les euphorisants (cocaïne, caféine, cannabis). Elles agissent sur la chimie du cerveau et du système nerveux et les stimulent.



Les molécules de dopage

Les molécules qui augmentent la puissance musculaire :

- **Stéroïdes anabolisants** (souvent des molécules dérivées de la testostérone, comme la **nandrolone**) ;
- **les hormones de croissance** qui sont une autre catégorie de molécules qui accroissent la force corporelle.

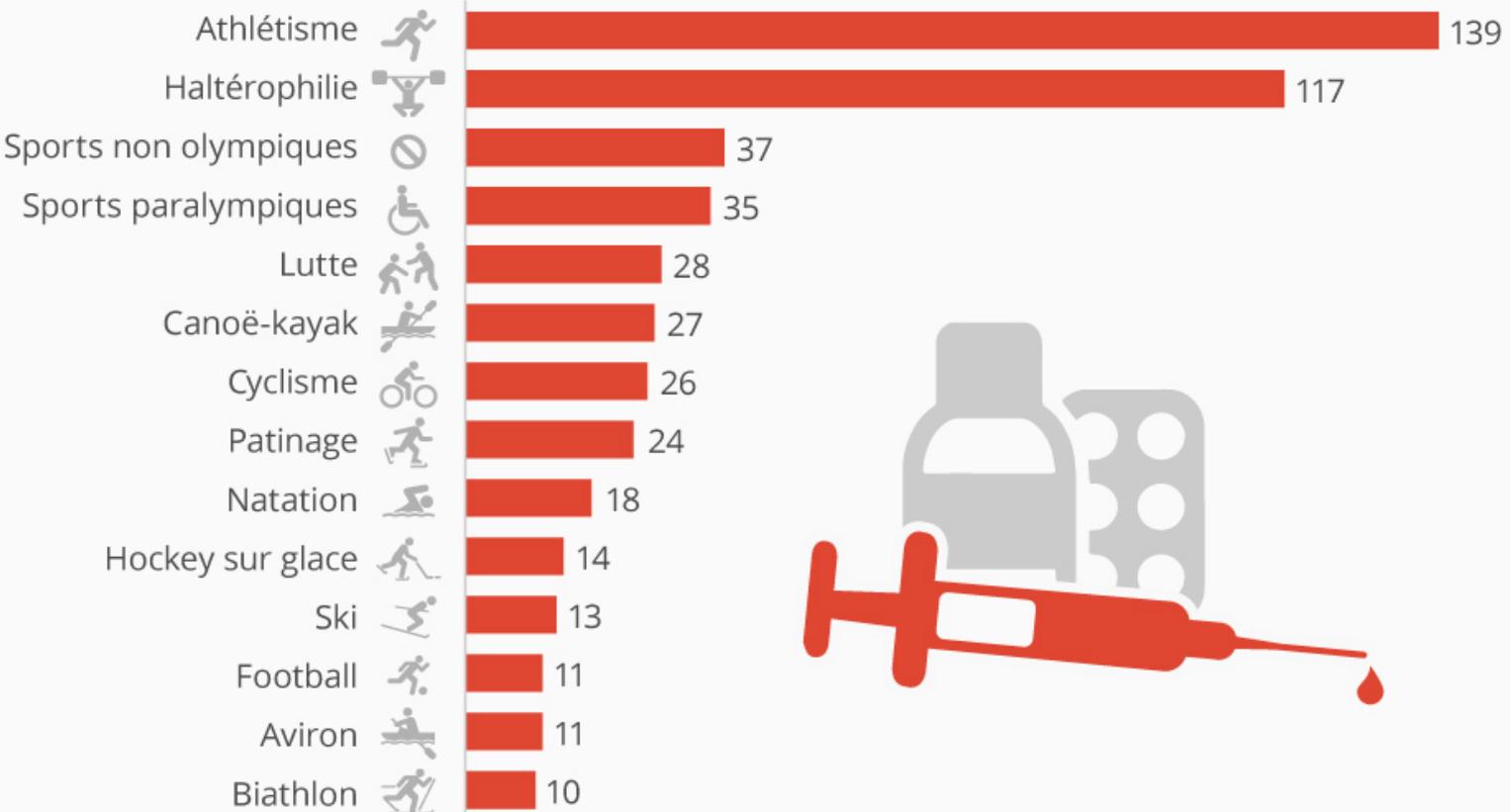
Substances	Effets	Risques
Hormones de croissance	Modification de la morphologie	Croissance anormale des organes, hypertension, insuffisance cardiaque, etc.
Stéroïdes	Augmentation de la puissance musculaire	Infertilité, lésion de la prostate, cancer du foie, etc.
Diurétiques	Perte de poids	Déshydratation, problèmes rénaux, troubles du rythme cardiaque, etc.
Amphétamines	Concentration, diminution de la sensation de fatigue	Hypertension artérielle, modification du psychisme, état de grande excitation, etc.
Héroïne, morphine, méthadone	Suppression des sensations de douleur	Dépendance physique et psychologique, diminution du rythme cardiaque, etc.
Cocaïne	Suppression de la fatigue	Troubles de la mémoire, problèmes vasculaires, dépendance, etc.

(Source: <http://list.wada-ama.org/fr/>)

Les sports les plus fréquentés par le dopage

Russie : le scandale d'un dopage d'Etat

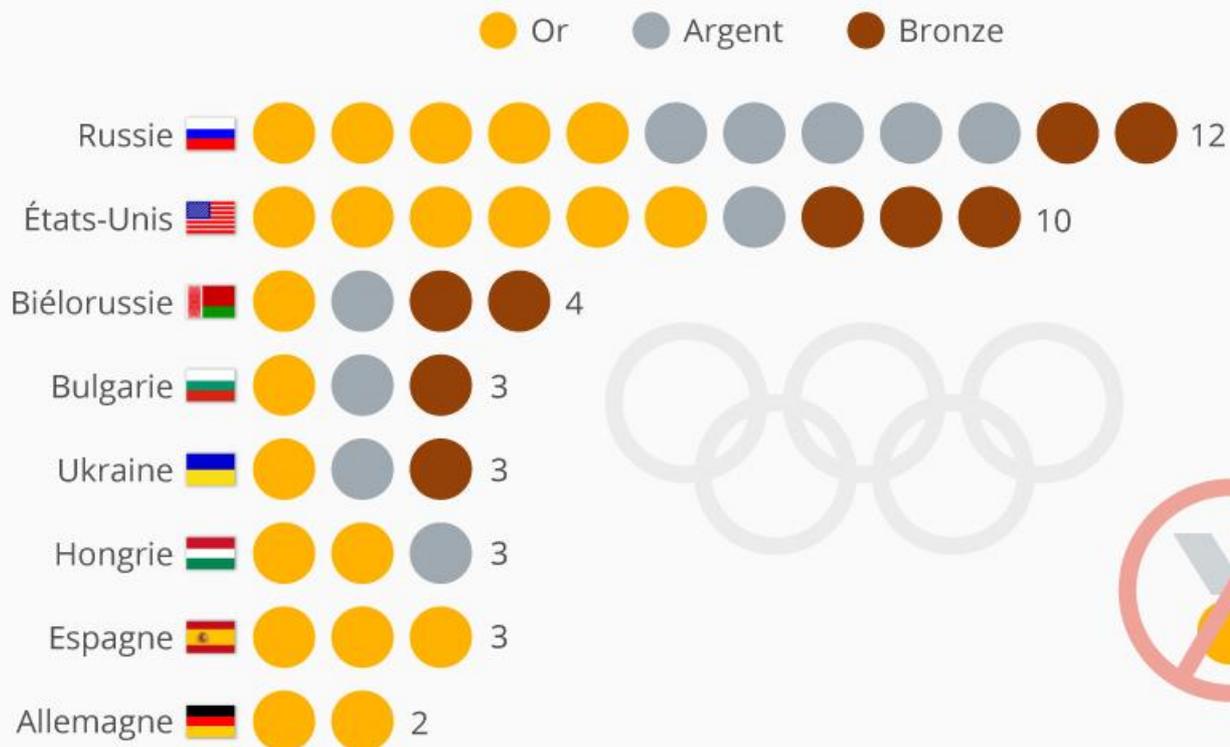
Nombre de résultats falsifiés des athlètes russes de 2011 à 2015



Les champions de dopage

La Russie, championne du dopage

Nombre de médailles retirées pour dopage aux Jeux Olympiques de 2000 à 2016



@Statista_FR

Source : Le Monde

statista

Quels moyens pour lutter contre le dopage?

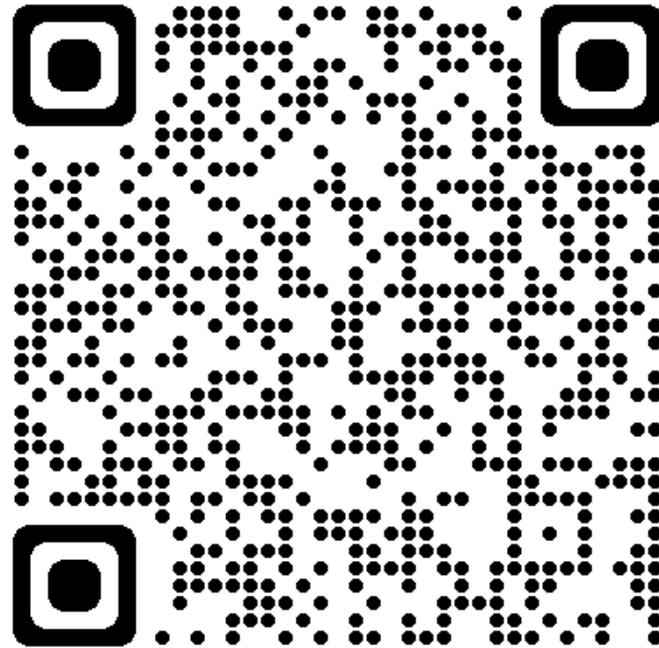
- Pour lutter contre le dopage, il faut pouvoir détecter, dans le sang, des éventuelles molécules dopantes au milieu de nombreuses autres molécules présentes dans l'organisme des champions.
- Des techniques toujours plus performantes pour ce faire ont été développées. C'est très difficile surtout qu'elles peuvent n'être qu'en très faibles concentrations, parfois pas plus d'un nano-gramme (ng = un milliardième de gramme) par millilitre – (ng/ml).

Imaginez :détecter un morceau de sucre dans une piscine olympique?!

- Pour les petites molécules, une des techniques les plus utilisées dans les laboratoires d'analyse s'appelle la **chromatographie**, aujourd'hui très performante pour **traiter le sang ou les urines**.
- La rapidité des analyses est aussi très importante, car on a besoin de **diagnostics « en direct »** pendant les compétitions sportives « **immuno-enzymatique** ».
- Pour les grosses molécules dopantes également (comme l'EPO ou l'hormone de croissance), des techniques très performantes sont disponibles.



Projet Personnel



Doit être envoyer avant:

le 12 janvier 2021

Examen !!

Problématique 8pts	Cours 5pts	Projet Personnel 3pts	Perspectives 2pts	Idée originale 2pts
Article scientifique ➤ Objectif ➤ Résultats ➤ Méthodes ➤ Citations	IBT 1 IBT 2 IBT3 IBT 4 IBT5 Questions ou exemples !!	Question sur le projet personnel !!	Des travaux	Une idée ou Projet que vous voudrez entreprendre ou lancer dans n'importe domaines « Entrepreneurial »