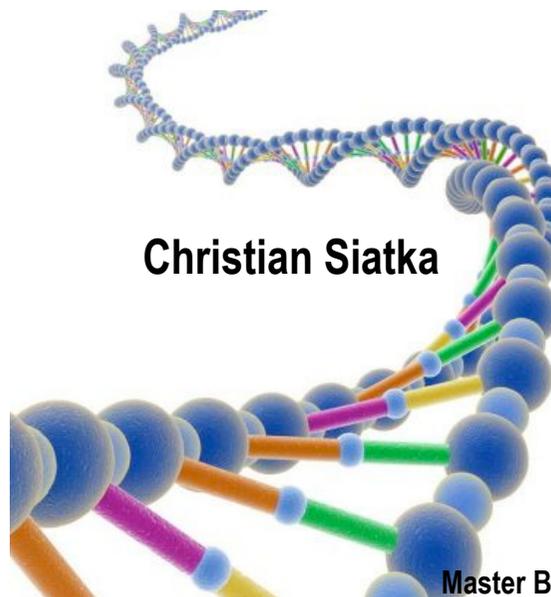


Travailler en toute sécurité dans un laboratoire de biologie moléculaire



Christian Siatka

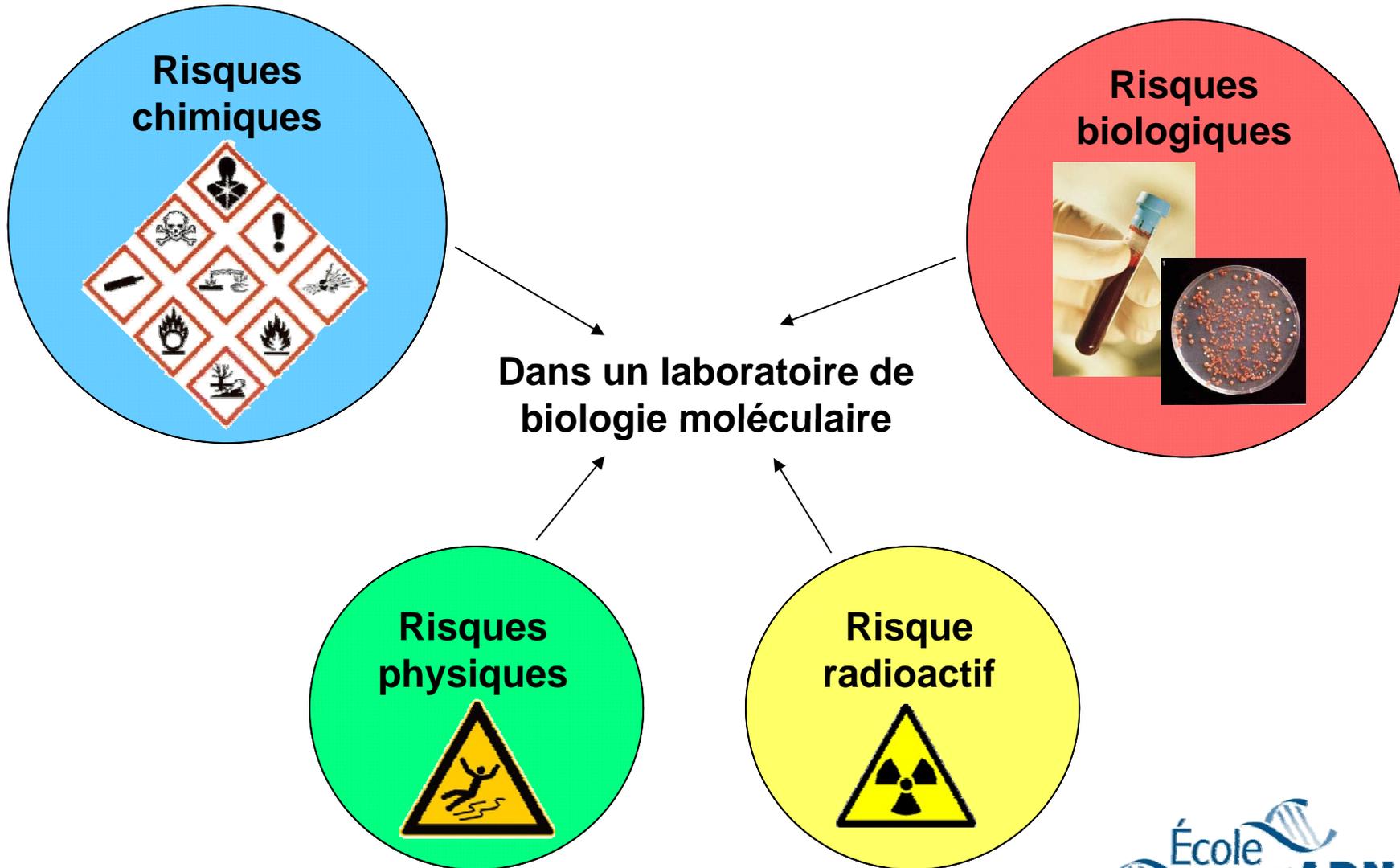


Directeur général

Consultant qualité réglementations européennes

Master BIOTIN Management de la qualité - Université de Nîmes

Les risques au laboratoire



Les risques chimiques



<http://www.inrs.fr>

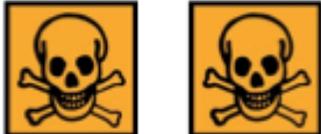
- **Sources de contaminations** : Tout produit chimique (solvants, gaz, etc.)
- **Mode de contamination** : voie cutanée / conjonctivale /aérienne (vapeurs / digestive
- **Effets possibles** : brûlure / intoxication / cancers / stérilité...
- **Prévention** :
 - Connaissance des produits
 - Lecture des étiquettes
 - Utilisation des EPI adéquats, travail sous hotte aspirante
 - Respect des modes opératoires
- **En cas de problème** : consignes affichées et se référer à la **Fiche de Données de Sécurité**
 - *Projections dans les yeux ou sur la peau* : lavage à grande eau + consulter un médecin
 - *Ingestion d'un produit toxique* : **Ne pas faire vomir**. Rincer la bouche. Appeler un médecin ou le centre anti-poison

<http://www.centres-antipoison.net/cdoc/index.html>

Les risques chimiques



L'étiquetage

Anciens pictogrammes	Nouveaux pictogrammes	
 <p>T+ - Très toxique T - Toxique</p>	 <p>GHS05</p>	Mortel en cas d'ingestion
 <p>C - Corrosif Xi - Irritant</p>	 <p>GHS05</p>	Provoque des lésions oculaires graves
 <p>Xn - Nocif</p>	 <p>GHS07</p>	Nocif par contact cutané
 <p>T+ - Très toxique T - Toxique Xn - Nocif Xi - Irritant</p>	 <p>GHS08</p>	Peut provoquer le cancer Toxique pour la reproduction / mutagène

Les risques chimiques



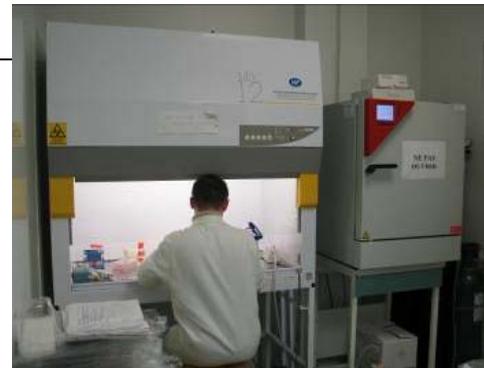
L'étiquetage

Anciens pictogrammes	Nouveaux pictogrammes	
 E - Explosif	 SGH03	Peut exploser sous l'effet de la chaleur
 #+ - Extrêmement inflammable	 # - Facilement inflammable	Peut s'enflammer au contact de l'air
 O - Comburant		Comburant, peut aggraver un incendie
 E - Explosif	 F - Facilement inflammable	 SGH04



Les risques biologiques

- **Sources de contaminations** : microorganismes pathogènes / cultures cellulaires / échantillons biologiques / OGM...
- **Mode de contamination** : voie aérienne (aérosols microbiens) / digestive / cutanée / conjonctivale
- **Effets possibles** : infection / allergie / implantation d'une tumeur
- **Prévention** :
 - Bonne conception des locaux (surface, ventilation, dépression, sas en surpression...)
 - **Poste de Sécurité Microbiologique** : PSM de type I, II (dépression) ou III (dépression + manchons), norme NF
 - Bonnes pratiques de manipulation : gestuelle / décontamination / formation / suivi médical
- **En cas de problème** : consignes affichées



PSM de type II

➔ 4 niveaux de confinement



Les risques biologiques

Niveaux de confinement

Niveau de confinement	Microorganismes manipulés	Locaux	Equipements spécifiques	Bonnes pratiques
L1	Classe 1 (non pathogènes)	Local isolé Paillasse, murs, sols lisses et lavables	Autoclave sur le site	Vêtements de protection Paillasse propre et rangée Boîtes à aiguilles Inactivation du matériel contaminé et des déchets
L2	Classe 2 (faiblement pathogènes)	Accès réglementé Ventilation mécanique	PSM type II Autoclave dans le bâtiment (Centrifugeuse)	
L3	Classe 3 (fortement pathogènes)	Sas Filtration de l'air sortant par filtre HEPA Local en dépression	PSM type II Autoclave dans le laboratoire ou à proximité	+ Surbottes + surblouses
L4	Classe 4 (risque majeur)	Ventilation de secours et interphone Filtration de l'air entrant et sortant (double filtre HEPA) Douche obligatoire	PSM type III Autoclave à double entrée	+ Scaphandre 

Les risques physiques



- **Types de risques** : incendie / explosion / électrocution
- **Causes** : installations défectueuses ou mal-entretenu / court-circuits / mauvaise manipulation des solvants / erreurs de stockage / accumulation de vapeurs de solvants dans les hottes
- **Prévention** :
 - Conformité des installations électriques et de gaz / maintenance
 - Respecte des la capacité des appareils électriques
 - Prise de précaution lors des manipulations (électrophorèse, ...)
 - Extincteurs / couverture en laine / formation du personnel
 - Protéger les bouteilles de gaz comprimé
 - Manipulation de l'autoclave par les seules personnes habilités
- **En cas de problème** : Protéger / Alerter / Secourir

Les bonnes pratiques de laboratoire

Règles générales

- Respect des règles de manipulation et EPI
- Stockage et conservation des produits adaptés (Température)
- Identifier le contenu des tubes + toxicité éventuelle
- Méthode des aliquots
- Tri des déchets selon les filières d'élimination
- Lavage des mains

Traçabilité

- Le cahier de laboratoire

Spécificités de la biologie moléculaire

- Port des gants et utilisation de plastiques traités (DNAse, RNAse free)
- Principe de la « marche en avant » pour la PCR

➤ Etude d'un cas pratique de laboratoire

Extraction
d'acides
nucléiques



Amplification d'acides
nucléiques par la
technique de PCR



Visualisation de
fragments d'ADN par
électrophorèse

1- Extraction d'acides nucléiques

Echantillons biologiques

Risques biologiques :

Les organismes génétiquement modifiés (*bactéries, cellules eucaryotes, animaux et végétaux transgéniques y compris KO*)
agrément attribué par le Haut Conseil de Biotechnologies

Les cultures cellulaires (*lignées humaines, tumorales, immortalisées*)

Les échantillons biologiques humains (risques infectieux)

Les animaux (risques infectieux)

Les végétaux (risques allergènes, environnementaux)

Sources de risques

Broyage des échantillons

Pipetages

Prévention

Travail sous PSM adapté

Respect du niveau de confinement (L1 à L4)

Équipement de protection individuelle

Extraction d'acides nucléiques

Echantillons biologiques



Lyse cellulaire

Risques chimiques :

Détergents : SDS



Détergents : triton, CTAB



Protéinase K



Prévention :

- travail sous hôte aspirante
- utilisation de la blouse, gants appropriés
- élimination des déchets

Extraction d'acides nucléiques

Echantillons biologiques



Lyse cellulaire



Précipitation/purification

Risques chimiques :

Isopropanol			Ethanol		
Phénol			Chloroforme		

Prévention :

- travail sous hôte aspirante
- utilisation de la blouse, gants appropriés
- élimination des déchets

Extraction d'acides nucléiques

Echantillons biologiques



Lyse cellulaire



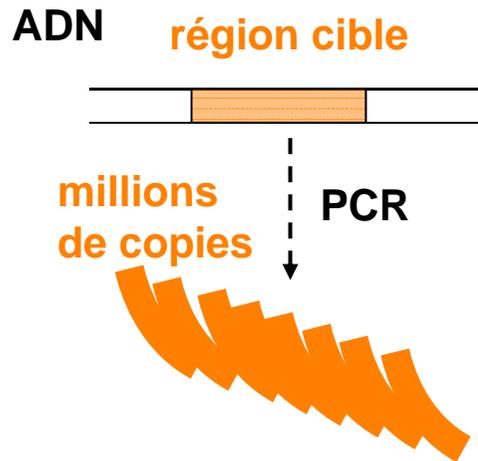
Précipitation/purification



Solubilisation et conservation

	T°C ambiante	2/8°C	- 20°C	-80°C
ADN	A éviter	Stable 6 mois	> 1 an	> 7 ans
ARN		A éviter	A éviter Stockage dans l'éthanol	Stable indéfiniment Meilleure conservation dans l'éthanol
Protéine			> 2 semaines	> 2 ans

2- Amplification d'ADN par PCR



La **PCR**, technique de copie de l'ADN présente un **double intérêt** :

- **étudier** une ou plusieurs **régions choisies** de l'ADN
- à partir de traces, **obtenir la quantité d'ADN requise pour l'analyse**

Risques de contamination :

- ✓ technique de la « marche en avant »

Zone « propre »	Préparation des tubes de PCR, préparation des mix PCR
Zone de pré amplification	Extraction d'ADN Addition de l'ADN et témoin dans tubes de PCR
Zone post-amplification	Amplification PCR Séparation et visualisation des produits de PCR

RECOMMANDATIONS

- ✓ Pièce particulière ou hotte à flux laminaire dans la zone de pré-PCR
- ✓ Gants et blouses obligatoires et différents des zones de pré et post PCR
- ✓ Matériel unique, notamment les micropipettes, utilisation de cônes à filtre
- ✓ Décontamination : Autoclave et UV



3- Visualisation des produits PCR

Utilisation de la technique d'électrophorèse sur gel d'agarose

Préparation du gel d'agarose

Risques chimiques

Acide borique (TBE)



Recommandation : remplacer par
acide acétique (TAE)



Risque physique

Brûlure

Recommandation : blouse,
gants chaleur

3- Visualisation des produits PCR

Utilisation de la technique d'électrophorèse sur gel d'agarose

Préparation du gel
d'agarose



Electrophorèse

Risque chimique

Tampon de charge
(loading buffer)



3- Visualisation des produits PCR

Utilisation de la technique d'électrophorèse sur gel d'agarose

Préparation du gel
d'agarose



Electrophorèse



Coloration/ visualisation
des fragments d'ADN

Risques chimiques

Bromure d'éthidium (BET)

Mutagène, cancérigène, tératogène



Recommandations :

- ✓ gants nitriles, blouse, lunettes de sécurité
- ✓ espace ventilé
- ✓ limitation de l'exposition
- ✓ gestion des déchets
- ✓ produit de substitution : gel red, sybr safe

Risques physiques

Brûlure(UV)

Recommandations : blouse, gants, casque anti-UV

La gestion des déchets

Déchets non biologiques



Tout déchet solide **non biologiques**
(gants, pipettes, tubes...)



Verrerie souillée chimiquement ou
non et contenants plastiques vides

La gestion des déchets

Déchets chimiques



Orange = Solvants halogénés

Rouge = Solvants non halogénés $6 < \text{pH} < 8$

Jaune = Solvants Acides $\text{pH} < 6$

Bleu = Solvants Basiques $\text{pH} > 8$



Réactifs chimiques non utilisés liquides ou solides dans leur contenant



Déchets mutagènes, cancérogènes, reprotoxiques et oxydants forts

La gestion des déchets

Déchets biologiques



CLINIBOX

Tout déchet **non piquant contaminé** par des cellules, des bactéries ou des champignons (gants, boîte de Pétri, tubes...)



SEPTOBOX

Tout déchet **piquant ou liquide contaminé** par des cellules, des bactéries ou des champignons (cônes, milieux de cultures, pipettes)



VWR Tour 2012

Merci de votre attention

www.ecole-adn.fr

**Christian Siatka
04 66 67 82 29
siatka@ecole-adn.fr**





www.ecole-adn.fr



FÉDÉRATION
FRANCOPHONE
DES ÉCOLES DE L'ADN



Enseignement



Formation



Ingénierie



Conseil

