

Formation en Sécurité de Laboratoire

Introduction & Biosécurité

Suzanne LORET, PhD
Responsable Biosécurité, SIPPT



Plan de la présentation

- 1- Les 3 questions fondamentales en prévention
- 2- La prévention du risque (mesures de protection)
 - 3.1. Mesures communes à tous les types de risques:
 - Les bonnes pratiques de laboratoire
 - La sélection d'équipements de protection adéquats
 - La protection personnelle
 - La gestion correcte des déchets « dangereux »
 - 3.2. Biosécurité

2- Les 3 questions fondamentales en prévention

- 1) Quels sont les dangers associés au travail ?
(décodage des messages de sécurité)
- 2) Suis-je exposé au danger ?
(analyse du risque)
- 3) Comment minimiser le risque jusqu'au seuil acceptable ?
(prévention du risque)

3- La prévention du risque (mesures de protection)

Principes de bases de la Prévention

1. Suppression des dangers (le risque en vaut-il la peine ?)

2. Mesures de prévention, incluant des dispositions

- ✓ **Organisationnelles** (accès réglementé, formation préalable, ...)
- ✓ **Techniques**, concernant
 - les laboratoires (locaux sécurisés, avec évacuation aisée, ...)
 - l'équipement de sécurité (enceintes de sécurité, autoclave, ...)
- ✓ **Méthodologiques** (bonnes pratiques de laboratoire ; « substitution » d'un produit dangereux par une alternative moins dangereuse, ...)
- ✓ **La protection personnelle** des travailleurs (évaluée par un suivi médical)

3.1. Mesures communes à tous les types de risques:

Les bonnes pratiques de laboratoire

1. **l'accès est limité** → visiteurs pour « raison légitime » uniquement
2. Activités régulées par **un règlement d'ordre intérieur (ROI)**, dont il faut prendre connaissance.
3. Prendre connaissance des **consignes générales de sécurité**

Consignes générales de sécurité (1)

Appel des secours: **5000** ou **112**

- **Il y est interdit :**
 - de manger et boire (et de fumer si besoin est de le rappeler !)
 - de pipeter à la bouche
 - de travailler seul lorsqu'il s'agit d'un laboratoire à **haut risque**
 - = « **règle des deux hommes** »
 - d'y travailler en dehors des heures habituelles de travail, sans autorisation préalable du chef de service

Consignes générales de sécurité (2)

- **vérifier l'état du matériel** (incluant les équipements de sécurité)
- **vérifier que les bonbonnes de gaz sont fixées avec une chaîne métallique**
- **vérifier la clarté du protocole expérimental.** En cas d'expérience à risque, faire approuver ce protocole par le responsable du laboratoire.
- **connaître la signification de tous les pictogrammes de risque, ainsi que la signification des phrases de risque des produits chimiques utilisés** Dans le cas des produits dangereux, connaître également les phrases « S » (ou « safety ») correspondant aux recommandations de sécurité.
- **Prévention des problèmes liés à la co-activité** (informer; interdire l'accès)

EVITER TOUT RISQUE D'INGESTION ET DE CONTACT

- On ne mange pas, on ne boit pas
- On ne stocke pas des aliments
- On ne s'applique pas de produits cosmétiques ou lentilles oculaires
- PIPETTAGE BUCCAL FORMELLEMENT INTERDIT



Ne pas utiliser son portable au laboratoire



EVITER la contamination de CONTACT (suite)

= en cours d'expérimentation, NE PAS :

- se gratter les cheveux
- se frotter le nez, les oreilles, ...
- redresser ses lunettes
- .../...

= protéger les blessures

= éviter les piercing dans un L3 où sont manipulés des pathogènes aérogènes

EVITER TOUT RISQUE D' INHALATION

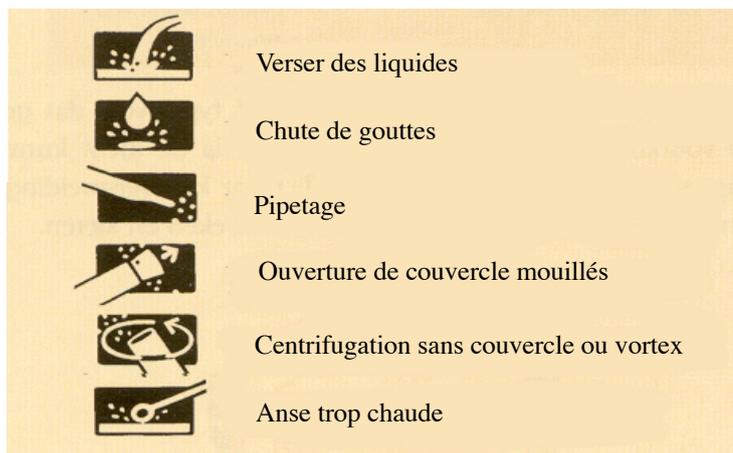
- Port du masque



- Eviter la génération d' aérosols



Procédures génératrices d'aérosols



EVITER L'INOCULATION ACCIDENTELLE :

**NE JAMAIS REMETTRE UNE AIGUILLE DE
SERINGUE DANS SON CAPUCHON PROTECTEUR**



Ne pas utiliser de matériel en verre

NE PAS SOUILLER Le local de travail et/ou les locaux voisins

- ✓ Ne pas quitter le local
 - avec les gants de travail
 - avec le tablier

- ✓ Appliquer la consigne « **main propre en zone propre** »: ne pas décrocher le téléphone ou toucher les poignées de portes avec gants souillés (désinfecter le cas échéant)

- ✓ **Nettoyer la zone de travail** en fin de manipulation

Consignes générales de sécurité (4)

- Avoir en permanence une attitude réfléchie et une conscience des risques potentiels (par exemple, se déplacer sans courir, etc..)

- Travailler sous hotte aspirante et avec les produits dangereux :
 - ✧ toxiques, nocifs, irritants et allergisants
 - ✧ extrêmement inflammables et maintenir ces derniers éloignés de toute source de chaleur

Corolaire important : Etre en mesure d'identifier une hotte de sécurité → VOIR PLUS LOIN

Consignes générales de sécurité (5)

- Suivre les consignes écrites concernant l'élimination des déchets
- **Ne pas déverser l'azote liquide résiduel dans l'évier** (risque de rupture des canalisations)
- Nettoyer la zone de travail
- laisser le tablier de laboratoire sur place et se laver les mains avant de quitter le local
- Rapporter tout incident et accident dans le carnet de bord du laboratoire
- Signaler toute situation dangereuse, tout incident et tout accident au chef de service et au SERP

3.1. Mesures communes à tous les types de risques:

La sélection d'équipements de protection adéquats

COMMENT CHOISIR UNE HOTTE ?

L'enceinte de sécurité est une « hotte aspirante » dans laquelle on peut manipuler des produits dangereux sans crainte de retour d'air « souillé » vers soi.

Deux types d'enceinte de sécurité :

- 1) La hotte chimique
- 2) L'enceinte de sécurité microbiologique (ESM)

AVERTISSEMENT

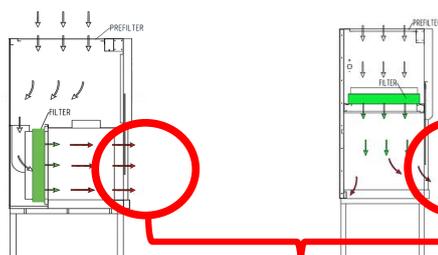
Ne pas confondre l'ENCEINTE DE SECURITE (ESM) avec un « CLEAN BENCH »

aussi appelé :

- « flux laminaire horizontal »
- « flux laminaire vertical », qui ressemble à une « ESM » (avec flux laminaire vertical aussi !)

Comment ne pas confondre ?

Le « clean bench » souffle de l'air sur l'opérateur



Mais convient pour la manipulation « d'échantillons Propres » qui doivent rester stériles (air stérilisé sur HEPA)

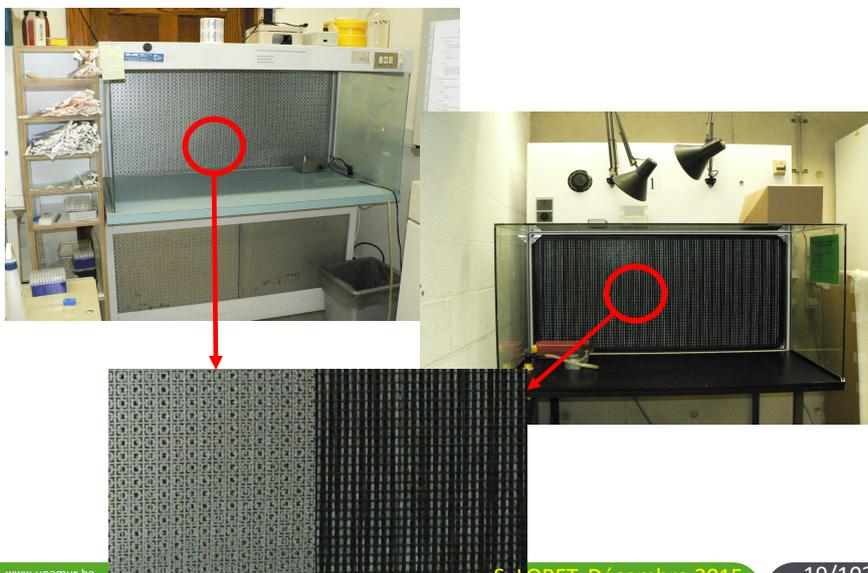
Perception d'un souffle vers soi

Si l'échantillon manipulé dégage des

- Vapeurs toxiques, nocives, irritantes, allergisantes
- Aérosols chargés d'agents pathogène

CET AIR SORTANT EST DANGEREUX !!

Exemples de « clean bench » (flux horizontal)



www.unamur.be

S. LORET, Décembre 2015

19/102

Hottes aspirantes (= enceintes de sécurité ou ES)

PAS DE stérilité du matériel manipulé

→ c'est l'air du laboratoire qui est aspiré sur l'échantillon. Deux situations :

- La hotte chimique
- L'enceinte microbiologique de type I (ESM type I)

Même aspect extérieur

MAIS à la sortie de l'ESM un filtre absolu (HEPA)
pour purifier l'air rejeté dans l'environnement

www.unamur.be

S. LORET, Décembre 2015

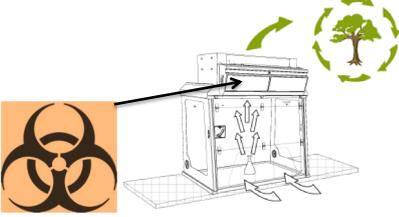
20/102



Hotte chimique
(dans tous les laboratoires)

≠

ESM de type I:
avec filtre HEPA en sortie

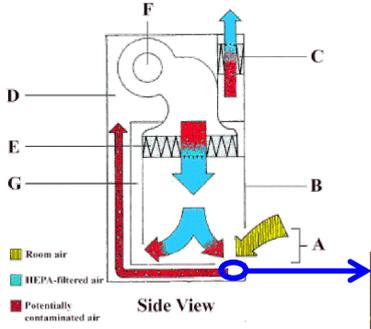


Sigle Biosécurité visible
(cet ESM est rare en labo de recherche; jugée peu intéressantes, car pas stériles)

www.unamur.be
S. LORET, Décembre 2015
21/102

ESM de type II

hotte aspirante **avec stérilité du travail**



Caractéristiques :

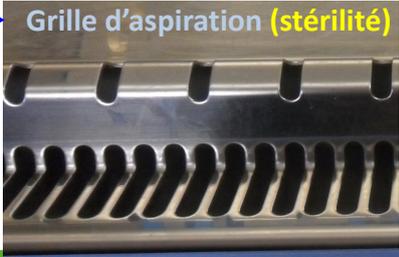
A: ouverture → **inspiration de l'air sous la surface de travail**

B: paroi vitrée

C et E: filtre HEPA

D: air souillé extrait = dépression (pas de risque de fuite)

Grille d'aspiration (stérilité)



www.unamur.be
S. LORET, Décembre 2015
22/102

ESM de type II hotte aspirante **avec stérilité du travail**

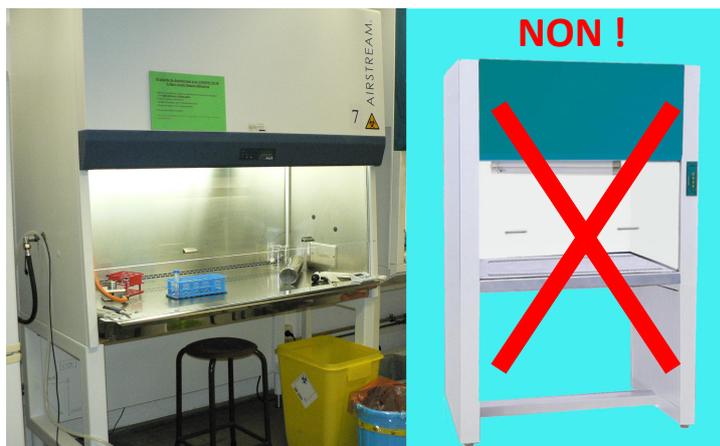


www.unamur.be

S. LORET, Décembre 2015

23/102

ESM de type II dans les deux cas ?

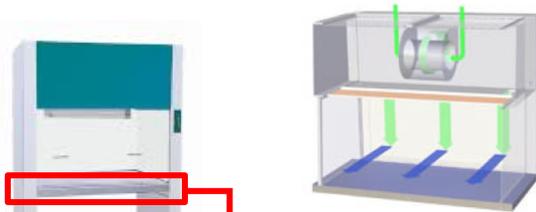


www.unamur.be

S. LORET, Décembre 2015

24/102

Comment ne pas confondre ce « clean bench vertical » avec une ES ?



- **Un flux sortant:** ce n'est pas une enceinte de sécurité (ES)

Si doute persistant :

- Pas de grille à la face avant de la surface de travail : ce n'est pas une ESM de type II
- **Pas de sigle** biosécurité

www.unamur.be

S. LORET, Décembre 2015

25/102

Noter aussi : ESM type II **déclassée**



Modèle ancien (même principe que modèles actuels) MAIS **Flux vertical FRAGILE** (car pas de vitre frontale)



Ne sont pas assurés efficacement :

- La protection de l'opérateur
- La stérilité du travail



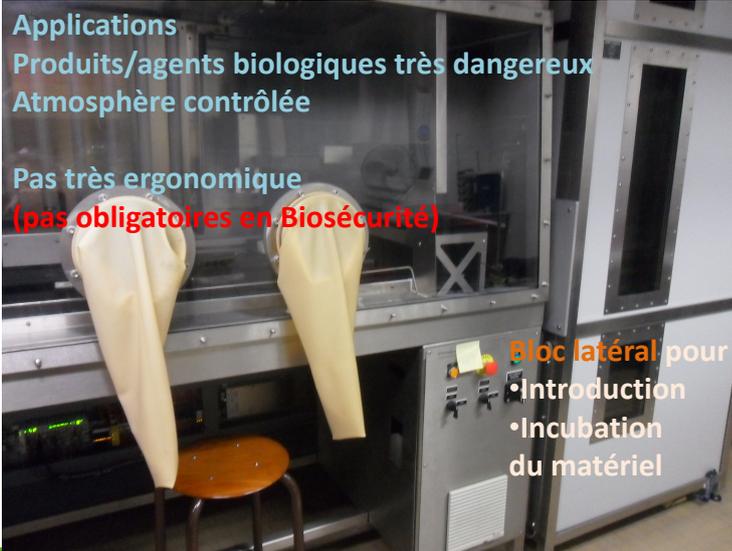
Se renseigner avant de travailler !

www.unamur.be

S. LORET, Décembre 2015

26/102

ESM de type III (« boîte à gants ») Protection totale



Applications

Produits/agents biologiques très dangereux
Atmosphère contrôlée

Pas très ergonomique

(pas obligatoires en Biosécurité)

Bloc latéral pour

- Introduction
- Incubation
- du matériel

www.unamur.be

S. LORET, Décembre 2015

27/102

Synthèse à propos des hottes

TYPE DE HOTTE	Critères d'identification			Type de Protection		
	Perception d'un souffle sortant	Surface de travail + GRILLE FRONTALE	Étiquette Biohazard 	Personnelle	Travail (stérilité garantie)	Environnement
Hotte chimique	-	-	-	+	-	-
ESM type I	-	-	+	++	-	+
ESM type II	-	+	+	+	+	+
ESM type III	-	SO	+	++	+	+
CB Horizontal	++	-	-	-	+	-
CB Vertical	+	-	-	-	+	-

SO = sans objet dans le cas d'une enceinte complètement fermée

www.unamur.be

S. LORET, Décembre 2015

28/102

Les bonnes pratiques de travail en ESM

1. ESM adapté à l'opération
2. Placer tout le matériel nécessaire à l'opération avant de commencer
2. Veiller à laisser les grilles d'aération libres et manipuler au centre de la zone de travail

EVITER DE

PERTURBER LE FLUX LAMINAIRE en :

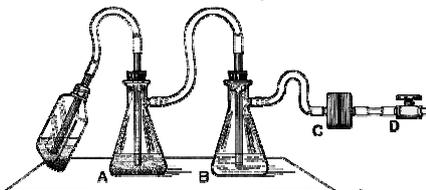
1. Obstruant les grilles d'aération avec papier (protocole) et autre matériel
2. Allumant un bec Bunsen
3. « montant » des palissades de boîtes et flasques de culture sur le fond de la hotte
4. Créant des courants d'air dans le local (fenêtres & portes closes)



Gestion des déchets des activités dans la hotte

- Ne pas sortir de l'enceinte des pipettes infectées par des OP de CR ≥ 3 avant de les avoir rincées dans une solution de désinfection
- Eliminer les gants souillés avant de toucher du matériel en dehors de l'enceinte

Neutralisation des efflux de culture :



A: flacon de neutralisation (+ Javel → 10% final)

B: flacon de sécurité (trop-plein + Javel)

C: filtre HEPA

D: conduit d'aspiration

en L2/L2+ élimination de A et B à l'évier

(en L3 pas de Javel, mais incindine, puis autoclave)

Traitement des milieux de culture

1. Récolte des milieux par aspiration vers un flacon PRE-REMPI de l'agent de neutralisation (Javel 10% fin.)
2. Le Flacon de stockage est vidangé chaque jour



3.1. Mesures communes à tous les types de risques:

La protection personnelle

- La tenue vestimentaire doit être **correcte** pour le travail en laboratoire (Les cheveux longs sont attachés et les objets ou bijoux pendant librement sont retirés, « couverture » suffisante, chaussures fermées)
- Porter un **tablier adapté et boutonné**.
- Porter des **gants** (variantes: protection cryogénique, si manipulation de l'azote liquide ; « anti-morsure », si manipulation d'animaux)
- Sans être interdits, les « **piercings** » (blessures ouvertes potentielles) sont **déconseillés**
- En fonction de la nature des activités du laboratoire, porter des **lunettes de protection et un masque facial** ; cette obligation s'accompagne de l'interdiction de porter des lentilles de contact lorsque l'activité conduit au dégagement de produits volatiles irritants ou allergènes

Port du tablier indispensable



UCLA Fined for Fatal Lab Explosion

Untrained young aide also lacked protective gear, OSHA finds

May 5, 2009 5:05 AM CDT

She was not wearing a coat or alternative PPE garment when the accident occurred. Now that **her professor must answer to felony charges** of “failing to correct unsafe work conditions in a timely manner, to require clothing appropriate for the work being done and to provide proper chemical safety training,”

EPP (équipement de protection personnelle)



www.unamur.be

S. LORET, Décembre 2015

37/102

3.1. Mesures communes à tous les types de risques:

La gestion correcte des déchets « dangereux »

AUCUN RESIDU D'ACTIVITE DE LABORATOIRE NE PEUT

- Être déchargé dans l'environnement (rien à l'évier, sans traitement préalable)
- Être éliminé par les poubelles ménagères

3 catégories (majeures) de déchets dangereux :

- Déchets Biologiques
- Déchets contaminés de Radioisotopes
- Déchets Chimiques (Solides ou liquides)

www.unamur.be

S. LORET, Décembre 2015

38/102

Déchets biologiques

- Solides/liquides : CR1-2:
 - Liquides et Solides réutilisables: Autoclavage/Décontamination chimique
 - Non-réutilisables: Incinération (conditionnement en fût jaune avant enlèvement par firme spécialisée)
- Solides coupants/tranchants: “tirelires” (voir plus haut, dia 12)

Tous les déchets solides de CR3 sont autoclavés avant d'être incinérés (conditionnement en fût jaune avant enlèvement par firme spécialisée)

Inactivation chimique des OP

Décontaminant	Efficacités de certains décontaminants				
	Organismes Fongiques	Bactéries	Mycobactéries	Spores	Virus
Ethanol	-	++	++	-	+/-
Hypochlorite	+	++	+	+	+
Formaldéhyde	++	++	++	++	+
Peroxide	+	++	+	+	+
Combinaison (- hypochl., - étanol, + ammoniums quaternaires)*	++	++	++	++	++

Inactivation par autoclavage 121° C, 20 min

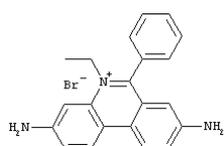
NB: pour Prion, NaOH 1M ou AUTOCLAVAGE 134° C 18 min

Déchets chimique cancérigène fréquent dans un laboratoire de recherche Bio/AgroTech:

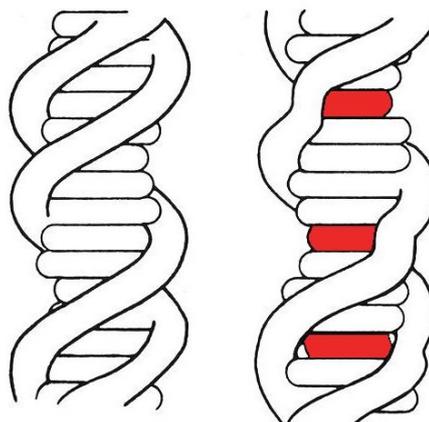
gel d'agarose et tampon d'électrophorèse contaminés par du **Bromure d'Ethidium (BrE)**

BrE = cancérigène

(Risque chimique par contact)



BrE = Agent mutagène
(intercalaire)



Détection en
fluorescence

Recommandations d'utilisation du BrE

1. Port de gants !
2. En « zone réservée »
3. Ne jamais injecter le BeE dans l'agarose « fumant »

➔ vapeur + BrE (risque d'inhalation)

Gestion des déchets BrE:

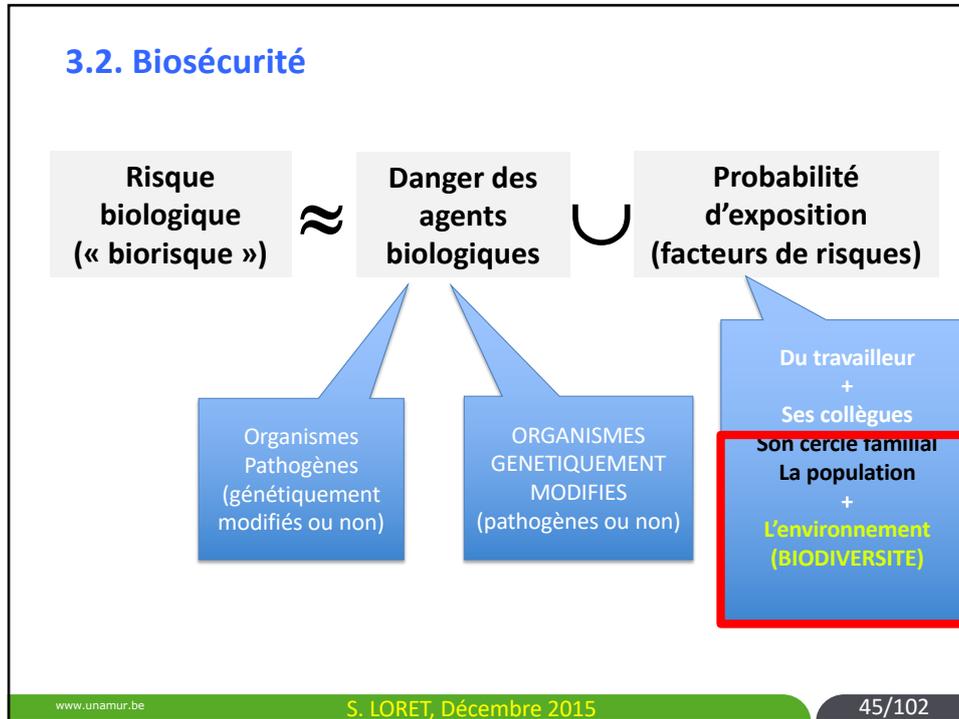
conteneurs spécifiques (ne jamais autoclaver)

1. Solides
2. Liquides (Tampons d'électrophorèse)

Autoclaves

En L1, L2: préparation de matériel stérile
(protection du matériel biologique)





Les accidents démontrent la nécessité de la biosécurité

Farmers sue for damages in Pirbright foot-and-mouth outbreak

Government and two laboratories face claim for £1.5m over alleged negligence in last year's outbreak

Angela Balakrishnan and agencies
guardian.co.uk, Friday 17 October 2008 12:55 BST

HEALTH

Researcher dead after handling a rare strain of meningitis bacteria at San Francisco Veterans Affairs medical center

Richard Din, 25, was helping to develop a vaccine for a meningitis strain resistant to vaccine

Comments (4)

THE ASSOCIATED PRESS
PUBLISHED: FRIDAY, MAY 4, 2012, 11:55 AM
UPDATED: FRIDAY, MAY 4, 2012, 12:38 PM

www.unamur.be S. LORET, Décembre 2015 46/102

Biosécurité:

Sécurité pour la santé humaine et pour l'environnement (et sa biodiversité)
lors de l'utilisation d'(micro-)**organismes**

- **génétiquement modifiés (OGM)**
- **pathogènes (OP)**

ORGANISME = **entité biologique**, y compris les les ATNC* **et les cellules en culture**, capable

- de se reproduire
et/ou
- de transférer du matériel génétique

*PRIONS

www.unamur.be S. LORET, Décembre 2015 47/102

Les organismes visés par des mesures de biosécurité

- **Les organismes pathogènes OP** (pour l'homme, l'animal ou le végétal sain)
DONT LES CULTURES CELLULAIRES
- **Les organismes génétiquement modifiés OGM**
DONT LES MICRO-ORGANISMES (bactéries et levures de laboratoire)

Sont caractérisés par une classe de risques (1 à 4), en fonction de leur effet néfaste et de leur facilité de transmission

www.unamur.be S. LORET, Décembre 2015 48/102

4 classes de risques pour l'expérimentateur, l'animal et/ou la plante: de CR1 à CR4

(CR1, signifie « sans risque »*)

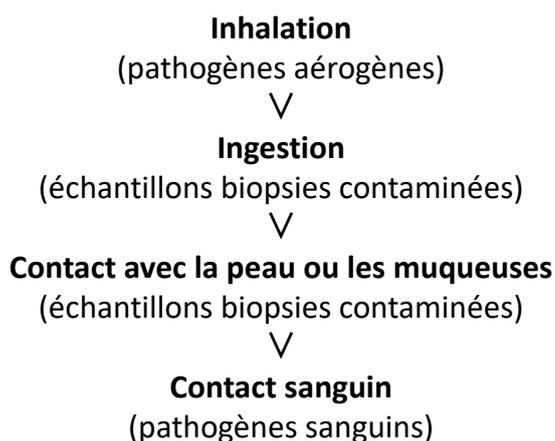
Les CR font référence à

- des expérimentateurs/animaux immunocompétents
- des plantes saines

Un organisme sans risque = **CR1** pour l'expérimentateur représente un **risque pour l'environnement***

⇒ Mesures de protection de l'environnement

Contagion = f (voie d'infection)



Prévention
confinement &
Méthodes

Voies d'infection

Contact cutané	Champignon
Via air ou aérosols	Virus de la rougeole & grippe Bactérie BRUCELLA
Piqûres d'insectes	Parasite de la malaria Virus de la fièvre jaune
Contact sanguin	HIV Virus de l'hépatite B
Via blessures	Bactéries staphylocoques
Via matériel fécal	Bactérie du typhus Poliovirus

CR et niveau de risque des OP

Classe de Risque (CR)	Critère de Classification du risque			Niveau de risque
	Maladie	Propagation	Thérapie/ Prophylaxie	
1	non	/	/	nul
2	oui	improbable	oui	faible
3	grave	oui	oui	modéré
4	grave	élevée	non	élevé

Listes officielles des OP et de leur CR, sur le site
« Biosafety.be »

Listes officielles des CR des OP disponibles sur le site du SBB

<https://www.biosafety.be/node/286>

Bactéries : https://www.biosafety.be/sites/default/files/h_a_bacteries.pdf

Champignons : https://www.biosafety.be/sites/default/files/h_a_fungi.pdf

Parasites : https://www.biosafety.be/sites/default/files/h_a_parasites.pdf

Virus et ATNC : https://www.biosafety.be/sites/default/files/h_a_virus.pdf

Exemples d'organismes de CR1 pour l'homme

Virus de la "langue bleue"
(BTV, bétail)



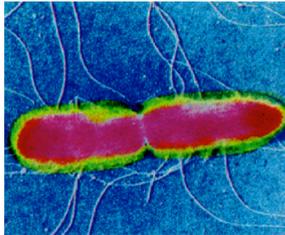
"Virus de la peste porcine"
(porc/sanglier)



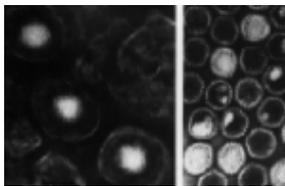
"*Agrobacterium tumefaciens*"
(bactérie responsable de tumeurs végétales)



CR2

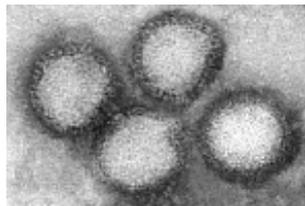


Salmonella

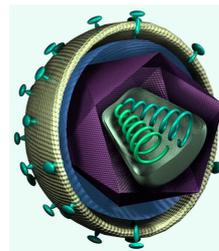


Herpes simplex virus

CR3



Rift valley fever virus



HIV



Mycobacterium tuberculosis

Brucella spp.

CR4



virus Ebola

La biosécurité dicte des mesures de CONFINEMENT

Le confinement est un laboratoire dont les spécifications techniques et les équipements permettent de contenir l'agent pathogène qui est y est manipulé, afin de protéger

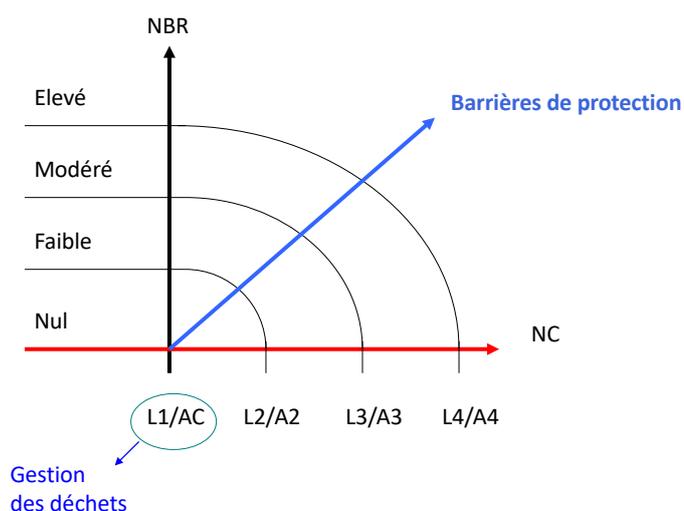
- l'expérimentateur
- Ses collègues
- Sa communauté (famille, voisins)
- Son environnement au sens large

Les différents types de confinement

- Laboratoires de recherche (L1 à L4), **pas de L4 en BE**
- Animaleries (A1 à A4)
- Serres (Green Houses; GH1 à GH3)
- Laboratoires de productions à grande échelle (« Large scale »: LS1 à LS4)
- Laboratoire clinique (« hospital rooms »: HR1 à HR4)

Dans chaque série, **possibilité de quarantaine pour le niveau 2** (L2Q, A2Q, GH2Q, ...), lorsque le pathogène n'est pas connu

Relation entre le niveau de « biorisque » (NBR) & le niveau confinement (NC)



Critères du choix d'un niveau de confinement

Classe de Risque (CR)	Critère de Classification du risque			Niveau de Risque	Niveau de Confinement	
	Maladie	Propagation	Thérapie/ Prophylaxie			
1	non	/	/	nul	L1	
2	oui	improbable	oui	faible	L2	
3	grave	oui	oui	modéré	R&D L3	Diagnostic L2+ Eradicat° L4
4	grave	élevée	non	élevé	L4	

L2+= L2 + BPM L3
Pas de L4 en Belgique

Exemples à l'UNamur

- 1) Etudes portant sur *Brucella spp.* (wt): en L3
- 2) TP de Microbiologie: en L2
- 3) Cultures de virus pathogènes animaux: en L2
- 4) Cultures de virus et bactéries pathogènes humains: en L2

OP
CR2+

NB: L2-Q = L2 pour organismes de quarantaine

Un organisme pathogène peut présenter une CR ≠, suivant :

- sa localisation géographique
(proximité de l'espèce cible)
- sa situation épidémiologique
 - pathogènes envoi d'éradication (exemple du poliovirus: CR2⇒CR3)
 - organisme de quarantaine (CR2⇒CR2Q)
- nature de l'activité (diagnostic >< culture)
Ex. : VIH, VHH (CR2 ne diagnostic >< CR3 en culture)

Exemples de niveaux de confinement variable, en fonction de l'activité (diagnostic < culture)

OP	Confinement requis	
	Diagnostic	Culture Inoculation
<i>Virus Epstein-Barr (CR2)</i>	L2	
<i>Neisseria meningitidis (CR2)</i>	L2	L3
<i>Virus de l'hépatite (B, C & V), HIV-1 & HIV-2 (CR3)</i>	L2	L3
<i>Mycobacterium tuberculosis (CR3)</i>	L2	L3
<i>Brucella spp. (CR3)</i>	L2	L3

Exemples de confinements « inattendus » :

- Phytopathogènes: *X. oryzae*
Organismes de quarantaines
CR1 pour l'expérimentateur
CR4 pour l'espèce cible comestible (riz)
obligation (**AFSCA**) de L2Q ---> L3
- Zoopathogènes: BTV
CR1 pour l'expérimentateur
CR4 pour l'animal
obligation de L2+ (prévention de la libération accidentelle dans l'environnement)

Classe de risque des Cultures cellulaires et des OGM

- **Les cultures cellulaires sont soumises aux règles de biosécurité** car peuvent être contaminées (isolées à partir d'un organisme pathogène ou contamination secondaire au laboratoire)
- **Les OGM sont soumis aux règles de biosécurité, car**
 - Pourraient menacer la biodiversité en cas de libération accidentelle
 - Pourraient être expérimentalement contaminés

1. CR des cultures cellulaires

CULTURES PRIMAIRES

En théorie:

- o sont théoriquement considérées comme étant CR1, quand
 - ne sont ni d'origine humaine, ni d'origine primate,
 - sont « prouvées » saines (« pathogen free », ce qui est pratiquement impossible !)
- o **sont considérées comme CR2, quand ne sont pas encore standardisées** (proviennent de prélèvements ou d'explants)

En pratique:

CR2 dans tous les cas, par principe de précaution

LES CULTURES DE LIGNEES Sont considérées comme CR1

Sauf :

- Lorsque le fournisseur précise qu'elles ont porteur d'un agent pathogène (CR2) (exemple lignée HeLa)
- Si elles dérivent d'une culture primaire par immortalisation induite expérimentalement (CR2)
- Si elles ont été transfectées avec un insert, et/ou infectées avec un OP, « à risque »
 - ⇒ sont alors de CR2, CR2+ et CR3, selon:
 - o La CR de l'OP infectieux
 - o La nocivité, toxicité ou « l'allergénicité » des produits qu'elle déverse dans le milieu de culture

Exemple de lignées cellulaires commerciales « infectées »

- Macrophages murins RAW 264.7 (ATCC, catalogue : TIB-71, CR2 car exprime le MuLV infectieux)
- Les cellules HeLa (ATCC Number CCL-2, CR2 par infectées par le papillomavirus)

CR spécifiée par le distributeur

exemple pour HeLa:

<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL-2&Template=cellBiology>

Influence des condition de culture sur le « biorisque » lié aux cultures

- **Matériel utilisé :**



la culture en plaques multipuits est plus risquée (moins bonne étanchéité)

En flasque, le « bouchon-filtre » est plus sécurisé



- **Concentration et échelle (R&D >< LS) :**

la grande échelle nécessite des dispositifs de rétentions spécifiques (cuves) et une protection accrue du technicien



S. LORET, Décembre 2015

69/102

2.les OGM

OGM (MGM)

= Organismes (micro-organismes) - pouvant être pathogènes - dont le matériel génétique a été modifié d'une manière qui ne se produit pas naturellement.

L' être humain, même sous thérapie génique, n'est jamais considéré comme un OGM !

www.unamur.be

S. LORET, Décembre 2015

70/102

Définition « technique » des OGM (MGM)

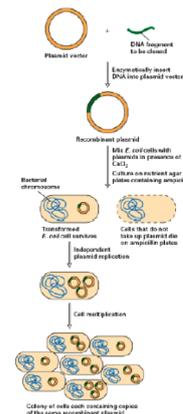
1. Techniques conduisant à la production d' OGM (MGM)

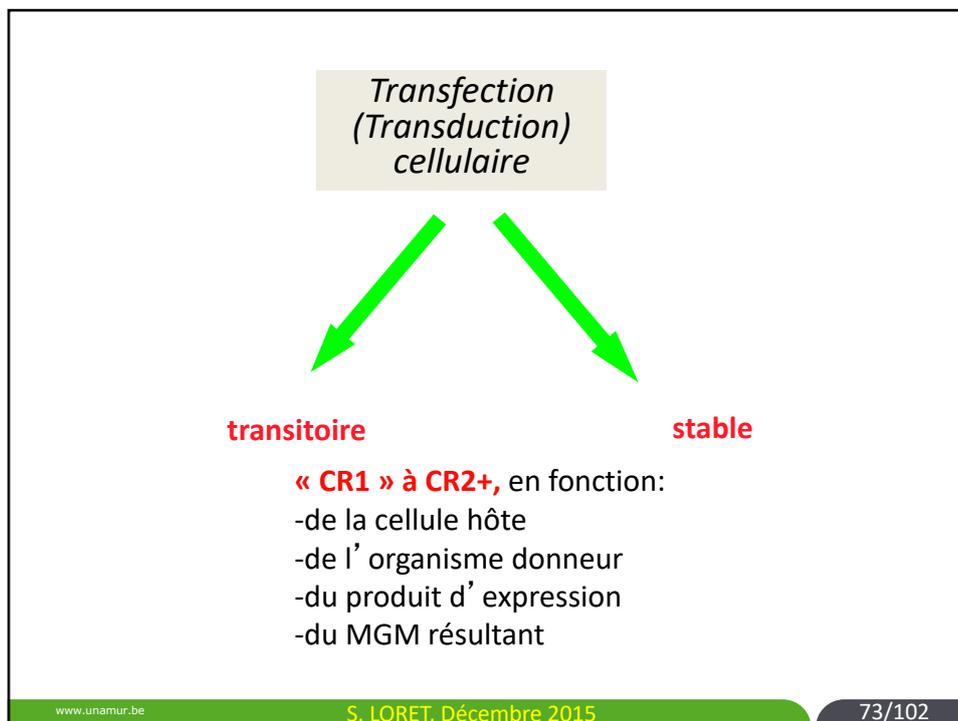
- 1.1. Techniques de « l'ADN recombinant »
(transformation bactérienne, transfection/transduction de cellules eucaryotes, organismes transgéniques)
- 1.2. Techniques « mécaniques » d'introduction d'ADN « nu »
- 1.3. Fusion cellulaire/hybridation non spontanée

Transformation Bactérienne (introduction d'un plasmide)

Séquençage
« CR1 »

Expression
« CR1 » à CR4





- 2. Techniques ne conduisant PAS à la production d' OGM (MGM)**
- 2.1. *Fécondation in vitro*
 - 2.2. *Processus naturels
(conjugaison, translocation,
transformation)*
 - 2.3. *Induction polyploïde*
- www.unamur.be S. LORET, Décembre 2015 74/102

3. Technique produisant des OGM (MGM) « exempts »

3.1. *Mutagenèse chimique ou par UV*

3.2. *Fusion de cellules eucaryotes (hybridomes pour product° d'Ac monocl.)*

3.3. *Autoclonage*

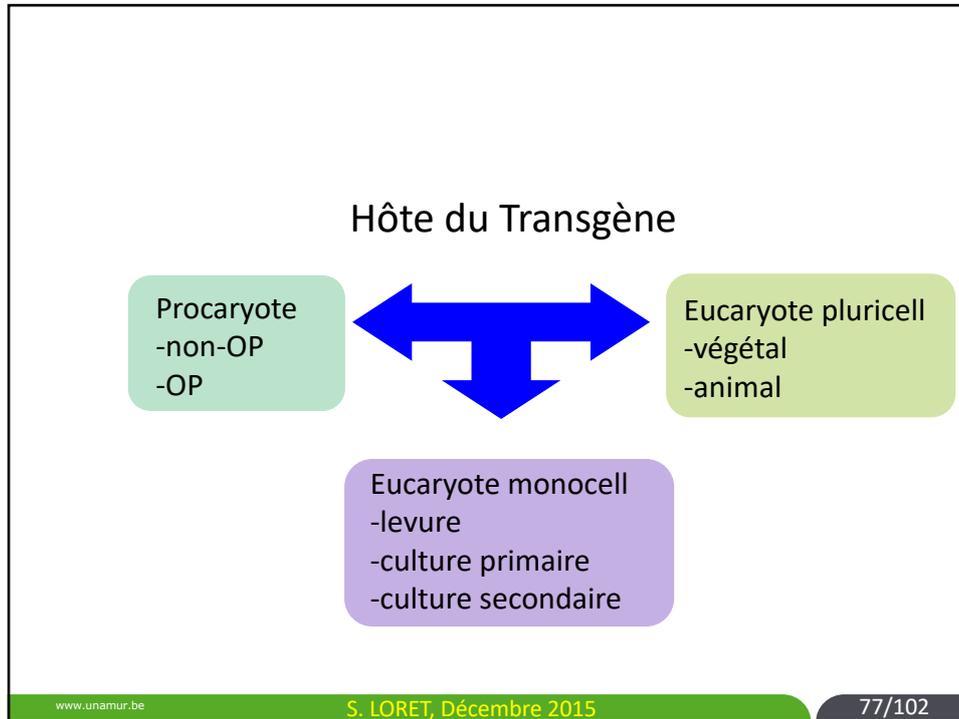
Classe de risque des OGM

Pas de liste possible

(nombre infini de possibilités de constructions génétiques).

L'évaluation du « biorisque » tient compte:

- de la CR de l'hôte
- de la CR de l'organisme donneur du gène
- du risque ajouté par le gène introduit
- du risque lié au vecteur (préférer: vecteur « non-propagatifs » et spécifiques de la cible)



Transformation de E. Coli K12 avec le gène de la RT de HIV

Critère analysé	Identité	Évaluation du risque	CR pour l'homme
Hôte	<i>E coli BL21 (K12)</i>	Souche Commercialisée, à l'innocuité avérée: pas de risque	1
Donneur	HIV	Pathologie fatale, mais risque de transmission improbable (absence du virus complet au laboratoire)	3
Vecteur	PUMVC1 (pUC19)	Plasmide R&D : pas de risque	1
Insert 1	Gènes HIV de la RT	Potentialisation du risque ? Non	1
MGM	<i>E. coli</i> + gènes HIV	Pas de risque accru (par rapport à non GM)	1

www.unamur.be S. LORET, Décembre 2015 78/102

Transformation de E. Coli K12 avec le génome muté de HIV (rendu défectif pour la réplication Rep--)

Critère analysé	Identité	Évaluation du risque	CR pour l'homme
Hôte	<i>E coli</i> <i>BL21</i> (K12)	Souche Commercialisée, à l'innocuité avérée: pas de risque	1
Donneur	HIV	Pathologie fatale, mais risque de transmission improbable (absence du virus complet au laboratoire)	3
Vecteur	PUMVC1 (pUC19)	Plasmide R&D : pas de risque	1
Insert 2	Génome HIV muté (Rep--)	Potentialisation du risque ? Oui, mais modéré	2
MGM	<i>E. coli</i> + géno HIV	Risque accru (par rapport à non GM)	2

Transformation de E. Coli O157:H7 (bactérie du Hamburger, responsable du SUH) avec le gène de la RT de HIV

Critère analysé	Identité	Évaluation du risque	CR pour l'homme
Hôte	<i>E coli</i> <i>O157:H7</i>	Souche pathogène naturelle: "syndrome du hamburger" (parfois fatal)	3
Donneur	HIV	Pathologie fatale, mais risque de transmission improbable (absence du virus complet au laboratoire)	3
Vecteur	PUMVC1 (pUC19)	Plasmide R&D : pas de risque	1
Insert	Gènes HIV de la RT	Potentialisation du risque ? Non	1
MGM	<i>E. coli</i> O157:H7 + gène RT	Potentialisation du risque ? Non	3

Production d'enzyme en fermenteur (Ind. Agro-alimentaire)

Critère analysé	Identité	Évaluation du risque	CR pour l'homme
Hôte	<i>B. subtilis</i>	Bactérie du foin : sans risque pour l'homme	1
Donneur	<i>C. Piscicola</i>	bactérie pathogène du saumon (pas de risque connu pour l'homme)	2
Vecteur	PBR322	Plasmide commercialisé: pas de risque	1
Insert	Glycosyl Hydrolase (GH)	Potentialisation du risque ? Non (β -galactosidase utilisée pour la panification)	1
MGM	<i>B.subtilis</i> + GH	Potentialisation du risque ? Non	1

NIVEAU **LS1** Mesures de sécurité additionnelles pour contenir une fuite du fermenteur

OGM particulier : la cellule d'emballage

Lignées cellulaires dont le génome a été modifié dans le but de produire un titre élevé de vecteurs viraux exploitables pour la transduction transitoire ou stable

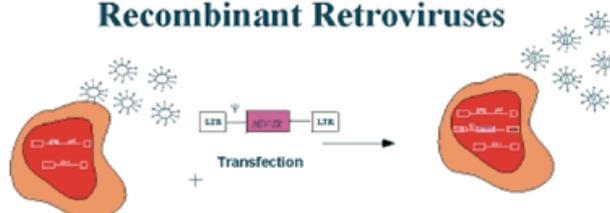
- *in vitro* (immortalisation, lignée transgéniques, ...)
- *in vivo* (thérapie génique)

Principe d'empaquetage

- « génome » viral fragmenté en plusieurs plasmides
- les gènes impliqués dans la réplication du virus sont incorporés dans le génome de la cellule d'empaquetage (PC)
- Les particules virales produites par les PCs sont défectives pour la réplication (**confinement biologique**), mais possèdent la capacité
 - d'infecter les cellules (dont celles de l'expérimentateur)
 - d'intégration d'ADNc dans le génome de la cellule cible (dans le cas de vecteurs rétroviraux)

« Packaging cells » (PC) → sont assimilables « OP de CR2+ »

Packaging Cells Producing Recombinant Retroviruses



Virus « infectieux vides »

- incapable de se multiplier hors PC (**défectif** pour la réplication)
- **capables d'infecter (CR1), mais sans effet sur la cellule transduite**

Virus « infectieux + transgène »

- **défectif** pour réplication, mais
- capable de transduction (transfection stable)
- **ONCOGENE (CR2+)**

Description des Confinements

Laboratoires (série L)

Animaleries (série A)

(détails :« formation Biotechnicien »)

L1

- Espace confiné (limité)
- Facultatif: ESM I et/ou « clean bench »
- Inactivation chimique des déchets biologiques (cultures de *Coli* K-12/*S. Cerevisiae*)
- Un autoclave doit être accessible sur le site
- Co-existence de plusieurs types d'activités

L1



www.unamur.be

S. LORET, Décembre 2015

87/102

L2

- doit posséder une EMS de type I ou II
- le sigle « biorisque » doit être affiché sur les portes d'accès
- Le tablier de laboratoire ne quitte pas le local
- Les portes doivent être équipées d'un système de fermeture automatique et doivent pouvoir être verrouillées en dehors des périodes d'utilisation
- une affiche apposée sur les portes d'accès doit mentionner; les coordonnées du responsable des opérations
- on réalise les centrifugations dans la zone confinée
- un autoclave doit être disponible dans le bâtiment

www.unamur.be

S. LORET, Décembre 2015

88/102

L2+ diagnostic d'OP de CR3; cultures de virus transformants

- Accès contrôlé
- Port de gants obligatoire
- Pipettes désinfectées avant de quitter l'ESM
- Centrifugations en godets fermés; ouverture des godets sous hotte
- « Rien ne sort », sauf sous forme de déchets

Recommandé aussi:

- ✓ Évier à commande NON manuelle
- ✓ Contrôle strict des animaux potentiellement vecteurs des OP
- ✓ SAS; dépression
- ✓ Un autoclave dans le local

L2



Affichage porte



Centrifugation
« aerosol free »

L3 - Caractéristiques Générales:

- Local en dépression (tout l'air passe par un filtre HEPA avant extraction); 2 SAS d'accès; vitres de surveillance
- Autonomie électrique (10 h)
- Autonomie technique (centri, spectro, PC, Fax, ...)
- Éviers à commande NON manuelle; ne sont pas raccordés aux égouts
- Un autoclave à double-entrée dans le local
- Local qui peut-être rendu étanche, en cas de nécessité (désinfection par vapeur de formol ou de peroxyde d'hydrogène ou VPH)

L3 - Mesures de sécurité spécifiques:

- Rien ne sort du L3 sans inactivation/désinfection préalable
- Accès contrôlé (clé)
- Formation des utilisateurs
- Pas de vêtements de ville exposés (port d'une combinaison)

L3 - Mesures spécifiques:



- Port de charlotte, gants (2), masque et lunettes de protection OBLIGATOIRE
- Procédures d'entrée/sortie (conduites standardisées lors du passage dans les SAS)
- Mesure de sécurité en cas de malaise: « Règle des deux hommes »
- Contrôle médical obligatoire régulier

L3



Gants en « manchon »

L3 à l'UNamur (URBM)

Entrée:
2 SAS en
enfilade



www.unamur.be

S. LORET, Décembre 2015

95/102

SAS 1
Dépôt des
Vêtements de ville



www.unamur.be

S. LORET, Décembre 2015

96/102

SAS 2
matériel
de protection
individuelle



Consignes d'entrée/sortie ; système « Safe lock »



Salle commune du L3



www.unamur.be

S. LORET, Décembre 2015

99/102

Cabinets de travail et « A3 »

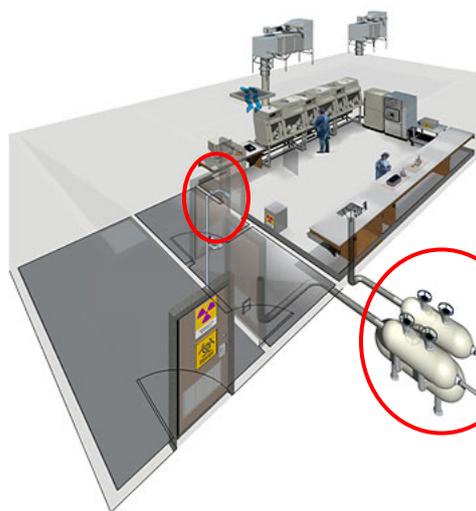


www.unamur.be

S. LORET, Décembre 2015

100/102

L3 - LS (production)



Douche et
cuves de
rétention
obligatoires

L4

Mesures L3, +

- Limitations d'accès étendues au bâtiment
- Port d'un scaphandre pourvu d'un respirateur
- Recommandé: ESM de type III





www.unamur.be

S. LORET, Décembre 2015

103/102