

Risque chimique dans les laboratoires de biologie moléculaire

Risque chimique dans les laboratoires de biologie moléculaire

La biologie moléculaire est une science récente et en plein essor. Elle a, au cours des dernières décennies, apporté énormément à la connaissance du vivant. Mais, comme toute nouvelle discipline, elle engendre des risques nouveaux. Ceux-ci soulèvent un certain nombre de questions de la part des scientifiques directement concernés, mais aussi des différents intervenants dans le domaine de la prévention, en particulier des médecins chargés de la surveillance médicale des personnes exposées dans ces laboratoires.

Ce travail vise à faire le point des connaissances actuelles, de l'essor de ces techniques à l'apparition de risques nouveaux. Une évaluation du risque chimique est proposée sur la base d'une approche théorique et d'études de poste. L'étude des produits utilisés en fonction de l'activité du laboratoire et du mode opératoire spécifique à chaque technique de biologie moléculaire permet de proposer des adaptations de la prévention et de la surveillance médicale. L'analyse et la compréhension des techniques de biologie moléculaire est un préliminaire nécessaire aux études de postes et à cette évaluation du risque chimique dans les laboratoires.

Par définition, la biologie moléculaire est l'étude de la biologie à l'échelon de la molécule [1]. Sous cette dénomination sont regroupées les techniques et les découvertes qui ont permis l'analyse moléculaire des processus les plus intimes du vivant, de ceux qui en assurent la pérennité et la reproduction [2].

1. La biologie moléculaire

En terme de discipline, la biologie moléculaire est le fruit de la rencontre entre deux branches de la biologie développées au début du XX^e siècle, la génétique et la biochimie. La biologie moléculaire naît et se développe quand la question de la nature des gènes et de leur mécanisme d'action commence à se poser à certains généticiens et lorsque les biochimistes cherchent à comprendre comment les protéines et les enzymes sont fabriquées dans les cellules et quelle est l'intervention des gènes dans ce processus [2].

1.1. HISTORIQUE

Les précurseurs

La biochimie est l'application de la chimie à l'étude des phénomènes vitaux. L'expérience fondatrice de la

biochimie est réalisée par Büchner en 1897 : il réussit à reproduire *in vitro*, avec un extrait acellulaire de levure, la fermentation des sucres [2]. Dès 1945, l'essentiel des réactions biochimiques est connu ; néanmoins, des découvertes fondamentales se font toujours, notamment dans le domaine de l'enzymologie.

La génétique étudie la transmission des caractères héréditaires. Elle prend naissance en 1856 lorsque Mendel énonce les « lois de l'hérédité ». Oubliés pendant presque quarante ans [3], ses résultats sont redécouverts en 1900 par De Vries, Von Tschermak et Correns qui en mesurent la portée. Une génétique très complexe est créée, mais des questions fondamentales restent posées (structure cellulaire porteuse de l'information génétique, transmission à la cellule...). C'est ainsi que naît une science nouvelle, la biologie moléculaire [4].

La « révolution moléculaire »

La période pendant laquelle celle-ci s'est opérée est aisée à préciser ; c'est entre les années 1900 et 1940 que se développent les deux disciplines à l'origine de la biologie moléculaire et c'est en 1941 qu'a lieu la première découverte que l'on peut lui attribuer en propre : lorsque Beadle et Tatum montrent que les gènes contrôlent la synthèse des enzymes et que l'on peut mettre en évidence l'existence d'un gène différent pour chaque enzyme [4]. De nouveaux outils d'analyse sont forgés entre 1940 et 1965 ; la maîtrise opératoire qui

V. LEFEBVRE (*),
C. GIMENEZ (**),
P. BROCHARD (*)

(*) Consultation
de pathologie profession-
nelle, CHU, Bordeaux

(**) Médecin de
prévention, INSERM,
Bordeaux

(*) Consultation
de pathologie profession-
nelle, CHU, Bordeaux

INRS

Documents
pour le médecin
du travail
N° 85
1^{er} trimestre 2001

Glossaire

Aliquote : une solution aliquote est obtenue par séparation d'une solution en plusieurs parties de volumes égaux entre eux.

Amorce (primer) : séquence d'oligonucléotides de 20 à 25 bases s'hybridant parfaitement avec les extrémités de la portion de séquence d'ADN à amplifier et servant de point de départ de son copiage par une polymérase.

Carte de restriction : ordonnancement des sites de restriction présents sur un segment déterminé d'ADN.

Criblage : recherche du bon clone, contenant le recombiné désiré au sein d'une banque d'ADN.

Empaquetage : opération consistant à introduire un vecteur recombiné (phage ou cosmide) dans une capsid phagique reconstituée in vitro à partir de ses protéines.

Kilobase (kb) : pour l'ADN correspond à 1 000 paires de bases ; pour l'ARN, à 1 000 bases.

Sonde : séquence d'acide nucléique homologue à une séquence d'ADN ou d'ARN, avec laquelle elle s'hybride de façon stable et spécifique par réassociation entre bases complémentaires.

Stringence : désigne la plus ou moins grande exigence des conditions expérimentales d'hybridation (température et force ionique).

Melting temperature (Tm) : température de fusion d'un ADN bicaténaire.

Microsatellites : segments d'ADN contenant des répétitions en tandem de courts motifs di-, tri- ou tétranucléotidiques détectables par PCR.

Transcription illégitime, également appelée transcription ectopique : transcription ubiquitaire et à un très faible niveau (moins d'une copie par cellule) de gènes de cellules très différenciées.

Transfection : technique expérimentale consistant à faire pénétrer un fragment d'ADN dans une bactérie.

en découle est acquise entre les années 1972 et 1980 [2]. Aujourd'hui, cette science s'est étendue à tous les domaines de la biologie : études de la cellule, du développement de l'embryon, de la différenciation cellulaire, de l'évolution.

1.2. APPLICATIONS

La biologie moléculaire connaît de multiples applications tant dans le domaine médical (diagnostic prénatal génomique ; thérapie génique avec deux types d'application : maladies héréditaires et cancer [5, 6] ; synthèse de médicaments par des micro-organismes génétiquement modifiés...), que non médical (transfert de gènes pour l'élevage ou l'agriculture ; empreintes génétiques à visée judiciaire ; études de paléo-anthropologie et de génétique des populations) [2].

1.3. RISQUES POUR LA SANTÉ

Alors que cette discipline s'est développée, avec une multiplication des laboratoires mettant ces techniques en œuvre, les études épidémiologiques concernant les risques pour la santé du travail dans ces laboratoires manquent. Le recul pour étudier les risques pour la santé dans ce domaine n'est que de 10 à 15 ans, ce qui n'est pas suffisant pour déceler des pathologies à temps de latence élevé.

Plusieurs études retrouvent un risque accru d'avortements spontanés, de mortalité périnatale, de malformations congénitales [7, 8], ainsi que des excès d'anomalies chromosomiques parmi les personnels exposés dans les laboratoires [7]. Le risque de cancer pour les opérateurs dans les laboratoires est encore peu connu.

L'observation de clusters au sein de plusieurs instituts dans le monde (dont celui de l'Institut Pasteur de Paris, en 1980, avec 5 cas de cancers rares, sarcomes et lymphomes [9 à 13]) est à l'origine d'une étude rétrospective de cohorte internationale qui a débuté en

Abréviations

ADN : acide désoxyribonucléotidique

ARN : acide ribonucléotidique

ARNm : ARN messager

BPL : bonnes pratiques de laboratoire

BET : bromure d'éthidium

dCTP : didésoxycytosinetriphosphate

DMF : N,N'-diméthylformamide

DMS : sulfate de diméthyle (dimethylsulfate)

DMSO : diméthylsulfoxyde

dNTP : désoxyribonucléotides triphosphates

DTT : dithiotréitol

EDTA : éthylène diamine tétra acétate

IC : intervalle de confiance

kb : kilobase

OR : odds ratio

PMSF : phényl méthyl sulfonyl fluoride

PEG : polyéthylène glycol

SDS : dodécyl sulfate de sodium
(sodium dodecyl sulfate)

SMR : Standardized Mortality Ratio

TBE (tampon TBE) : TRIS + acide borique + EDTA

TE (solution TE) : TRIS + EDTA

TEMED : N,N,N',N'-tétraméthyléthylène diamine

Tm : température de fusion (melting temperature)

TRIS : 1,1,1-trihydroxyméthylaminométhane

Différentes étapes et manipulations nécessaires aux principales techniques décrites

TABLEAU I

	Extraction	Précipitation	Tampon	Centrifugation	Electrophorèse	Révélation BET	Hybridation
Préparation ADN	X	X	X				
Préparation ARN		X	X	X			
PCR	X		X	X	X	X	X
Hybridation	X		X	X	X		
Clonage	X	X	X	X	X	X	X
Séquençage	X	X	X	X	X	X	X
Méthode de Southern			X		X	X	X
Northern blot			X		X	X	
Cartographie à la nucléase	X		X		X	X	X
Run off et run on	X	X	X				X
Footprinting	X	X	X		X	X	
Retardement sur gel		X	X		X	X	
Mutagenèse dirigée	X	X	X		X	X	
Transfection	X	X	X				

1986. Son objectif est d'estimer la mortalité globale et par cause spécifique (cancers) dans les laboratoires et d'appréhender les risques de mortalité en fonction des postes de travail et des expositions [9, 11, 13 à 15]. Les premiers résultats retrouvent des risques accrus pour certains cancers : cancers hématopoïétiques (leucémies, lymphomes malins hodgkiniens ou non), carcinomes du pancréas [7 à 9, 11, 12, 14, 15], cancers cérébraux [11, 12, 15], tumeurs osseuses [11, 12, 15], mélanomes malins [9, 11, 15], tumeurs de la thyroïde, du sein, de l'utérus. Mais les résultats sont souvent peu significatifs ou discordants et les biais, dus surtout à la multiplicité des expositions, ne permettent pas de conclure à un facteur de risque déterminé. Deux études [9, 11] ont voulu détailler plus spécifiquement le risque selon les activités de laboratoire et les produits manipulés dans les laboratoires de biologie moléculaire. L'une est une étude de cohorte [9] qui retrouve ces données mais souligne le manque de recul pour conclure sur les risques liés à la pratique de la biologie moléculaire. L'autre, une étude cas-témoin [11], retrouve des SMR (standardized mortality ratio) significatifs pour certaines localisations de cancers (cancers du pancréas chez la femme, cancers osseux chez l'homme, cancers hématologiques) et une plus grande proportion de cas dans les laboratoires de biologie moléculaire (OR = 7,1 ; IC = 1,5-33), avec une exposition significativement plus importante au bromure d'éthidium (OR = 5,4 ; IC = 1,1-26) et des taux non significatifs pour l'acrylamide, le formamide, le formaldéhyde, l'hydrazine, le phénol et le sulfate de diméthyle (diméthylsulfate, ou DMS).

L'ensemble des résultats ne montre pas pour l'instant de risque majeur. Toutes les études concluent à la nécessité de poursuivre les analyses surtout dans le nouveau domaine de la biologie moléculaire où le recul est insuffisant [11].

2. Les méthodes et techniques

L'analyse des techniques spécifiques mises en œuvre dans les laboratoires de biologie moléculaire et la mise en évidence des produits chimiques utilisés est une étape indispensable de l'évaluation du risque chimique dans ces laboratoires, tout en sachant qu'une telle analyse ne saurait être exhaustive compte tenu de la diversité et de l'évolutivité de ces techniques.

Les différentes étapes et manipulations nécessaires aux principales techniques décrites sont résumées dans le [tableau I](#). Les produits chimiques utilisés pour leur réalisation font l'objet du [tableau II](#).

2.1. PRÉPARATION DES ADN ET ARN

Toute étude de génétique moléculaire implique de disposer d'échantillons d'acides nucléiques. Les applications médicales actuelles se limitent le plus souvent à l'étude du génome lui-même, c'est-à-dire de l'acide désoxyribonucléotidique (ADN). Les quantités nécessaires sont infimes, moins de quelques µg peuvent suffire. Les études sont facilitées par le fait que toute cellule nucléée renferme dans l'ADN de son noyau toute l'information génétique de l'individu. Les techniques d'extraction d'acides nucléiques sont relativement simples, il convient seulement d'éviter les destructions enzymatiques ou mécaniques une fois la cellule lysée [1].

Préparation de l'ADN en routine

Ce sont les leucocytes sanguins qui représentent la source majeure d'ADN. Ils sont obtenus à partir du

TABLEAU II

Principaux produits chimiques utilisés selon les techniques

	Préparation de l'ADN en routine	Préparation des ARN totaux	Séparation et purification des fragments d'ADN	PCR	Hybridation	Hybridation in situ	Clonage	Séquençage chimique, méthode de Maxam et Gilbert	Séquençage chimique, méthode de Sanger	Analyse des séquences par blotting, méthode de Southern	Analyse de l'ARN par Northern blot	Cartographie à la nucléase S1	Run off et run on	Footprinting	Retardement sur gel	Interférence de méthylation	Mutagenèse dirigée	Transfection
Acétate de sodium		x					x	x									x	
Acide acétique		x							x			x						
Acide borique													x					
Acide chlorhydrique				x														
Acide formique								x									x	
Acrylamide			x					x	x		x		x	x	x		x	
Alcool isoamylique secondaire	x	x					x	x				x	x				x	x
Bromure d'éthidium (BET)			x				x		x	x				x			x	
Chloroforme	x	x		x	x	x	x	x			x	x	x		x		x	x
Chlorure de calcium							x					x						x
Chlorure de césium		x			x		x		x									x
Chlorure de magnésium				x	x		x					x		x				
Chlorure de potassium				x														
N,N'-diméthylformamide (DMF)							x											
Diméthylsulfoxyde (DMSO)				x														x
Dithiotréitol (DTT)						x												
Dodécyl sulfate de sodium (SDS)	x	x					x			x	x	x	x					
Ethanol	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ethylène diamine tétra acétate (EDTA)	x						x				x	x		x	x			
Formaldéhyde						x			x		x							
Formamide				x	x	x	x	x		x	x		x		x		x	
Hydrazine								x									x	
Hydroxyméthyle mercure										x								
Isobutanol	x			x	x	x	x	x			x	x	x		x		x	
Isopropanol	x	x					x	x				x	x				x	x
2-Mercaptoéthanol		x																
Méthanol	x	x					x	x			x	x					x	x
Persulfate d'ammonium			x					x	x						x	x		
Phénol	x	x		x	x	x	x	x			x	x	x	x	x	x		
Phényl méthyl sulfonyl fluoride (PMSF)							x											
Pipéridine								x								x		
Polyéthylène glycol (PEG)							x										x	
Silicone						x		x										
Soude							x		x	x	x							
Sulfate de diméthyle (DMS)								x										
Sulfate de dextran					x	x												x
N,N,N',N'-Tétraméthylène diamine (TEMED)			x					x	x						x	x		
Thiocyanate de guanidine		x																
1,1,1-Trihydroxyméthyl-aminométhane (TRIS)	x			x			x								x	x		

sang total, après lyse des globules rouges par addition d'une solution faiblement concentrée en sel, centrifugation puis lavage. Ils sont traités par un mélange de dodécylsulfate de sodium (sodium dodecyl sulfate, SDS), utilisé comme dénaturant, et de protéinase K, ce qui libère l'ADN nucléaire et digère les protéines associées. L'ADN subit une série d'extractions, puis est précipité par l'alcool. Il précipite sous forme de filaments visibles à l'œil nu qui sont récupérés par enroulement sur une baguette de verre (ou par centrifugation). L'ADN est enfin repris par un tampon salin TE (1,1,1-trihydroxyméthylaminométhane, ou TRIS, et éthylène diamine tétra acétate, ou EDTA) [2]. Des appareils automatisés permettent d'extraire l'ADN à partir du sang total en quelques heures, mais tous les laboratoires n'en sont pas équipés [16]. Avec la même technique, l'ADN peut être extrait à partir de tissus ou de cellules en culture.

Préparation des ARN totaux

Le principe est comparable, mais les acides ribonucléotidiques (ARN) sont plus difficiles à étudier car ils sont très vulnérables vis-à-vis de la ribonucléase (ARNase) qui est ubiquitaire (sur les doigts, par exemple), très active et résistante à toutes les agressions. Tout travail sur les ARN doit être effectué le plus stérilement possible (autoclavage des milieux et matériels, traitement par l'acide iodoacétique puis rinçage à l'eau distillée autoclavée des pièces non autoclavables).

Les tissus ou cellules sont homogénéisés dans un tampon avec un détergent (SDS), un agent dissociant (chlorure ou thiocyanate de guanidine), une solution tampon (acétate de sodium dont le pH est ajusté par l'acide acétique) et un agent réducteur (2-mercaptoéthanol ou dithiotréitol, DTT). Cette solution tamponnée inhibe les ARNases endogènes, dénature les acides nucléiques et dissocie les protéines. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation [2, 17].

2.2. TECHNIQUES GÉNÉRALES UTILISÉES EN BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Extractions

La récupération des acides nucléiques comporte plusieurs étapes : visualisation des ADN, ARN ou protéines (selon les besoins) par précipitation, purification, concentration. Le principe est basé sur l'utilisation de la solubilité différentielle des molécules entre deux phases non miscibles. Les principales extractions sont :

- extraction phénolique : le phénol est un déprotéi-

nant puissant dans lequel les acides nucléiques ne sont pas solubles. La qualité du phénol est une donnée majeure, il doit être pur et non oxydé ; l'extraction phénolique est utilisée chaque fois que les ADN, ARN ou protéines doivent être séparés ;

- extraction au chloroforme qui complète toujours la première (élimination des traces de phénol) ;

- extraction à l'isobutanol qui permet de récupérer les molécules organiques comme le bromure d'éthidium (BET) et de concentrer une solution d'acides nucléiques.

La purification peut être améliorée en multipliant les extractions successives.

Une autre méthode utilise un système équivalent à la dialyse, avec passage de la solution à travers une membrane semi-perméable [2].

Précipitations

Elles ont pour but de visualiser les acides nucléiques, ce qui permet de les protéger et de les remettre en solution à la concentration souhaitée. Les principales techniques utilisent :

- l'éthanol (alcool éthylique) : la précipitation est effectuée à forte concentration saline avec de l'éthanol concentré ;

- l'isopropanol (alcool isopropylique) : le principe est le même mais le sel n'est pas nécessaire et les très petits fragments d'ADN ne sont pas précipités ce qui permet de les éliminer ;

- d'autres alcools : alcool isoamylique, méthanol (pour améliorer la qualité de la migration sur gel de silice).

Dans tous les cas, le précipité doit être lavé avec de l'éthanol à 70 %, pour le débarrasser des sels ou des traces d'isopropanol, et séché [2].

Mesure des acides nucléiques

Une simple estimation de la concentration est suffisante. Elle est effectuée par photométrie.

Séparation analytique et préparative de l'ADN

Electrophorèse

Son emploi est quotidien. Les acides peuvent migrer dans un champ électrique et leur vitesse de migration est fonction de leur masse moléculaire (nombre de bases ou de paires de bases) et de la concentration d'acrylamide/bis-acrylamide ou d'agarose du gel. Le choix de la nature et de la concentration du support de l'électrophorèse est fonction de la taille moyenne des fragments à séparer.

Le gel d'acrylamide/bis-acrylamide est utilisé pour

les électrophorèses verticales pour la purification des oligonucléotides de synthèse et l'élimination des nucléotides libres après marquage radioactif, la détermination des séquences d'ADN et la séparation des petits fragments d'ADN. Le gel d'agarose est le support le plus utilisé, dans une électrophorèse horizontale pour les grandes molécules d'ADN. L'électrophorèse en champ pulsé (dans un gel d'agarose à 1 %) permet de séparer les grandes molécules d'ADN que l'électrophorèse classique ne peut résoudre.

La visualisation des acides nucléiques sur les gels d'agarose se fait grâce au bromure d'éthidium (BET) qui, spontanément non fluorescent, présente une fluorescence rouge sous rayonnement ultra-violet (UV) quand il s'intercale entre les bases des acides nucléiques. Dans la pratique, il est introduit dans l'agarose avant que le gel ne soit coulé. Après migration, sous illumination par des UV courts, l'ADN est visualisé sous forme de bandes colorées qui peuvent être photographiées sur un film très sensible. Les bandes sont repérées et trois procédés de récupération sont alors possibles : découpage de la bande et récupération de l'ADN par diffusion dans un tampon, récupération à la pipette dans un puits de

migration (dans ces deux cas, le BET doit être éliminé par plusieurs extractions à l'alcool), fonte à 65 °C du fragment d'agarose découpé après repérage sous UV suivie d'extractions et de précipitations.

Ultracentrifugation

L'ultracentrifugation en gradient continu de chlorure de césium est une centrifugation en gradient de densité. Son utilisation principale est la préparation de plasmides et de phages (cf. infra). L'ultracentrifugation sur coussin (gradient discontinu) de chlorure de césium permet de séparer rapidement et facilement des acides nucléiques ou des mélanges d'acides nucléiques dont les densités sont différentes, homogènes et connues. Souvent plusieurs gradients (ou coussins) de densités croissantes sont superposés. Celle en gradient de saccharose correspond à la classique centrifugation de zone et est utilisée pour séparer grossièrement l'ensemble des fragments dont les tailles se répartissent sur quelques kilobases (kb) ⁽¹⁾ lors de la constitution des banques génomiques

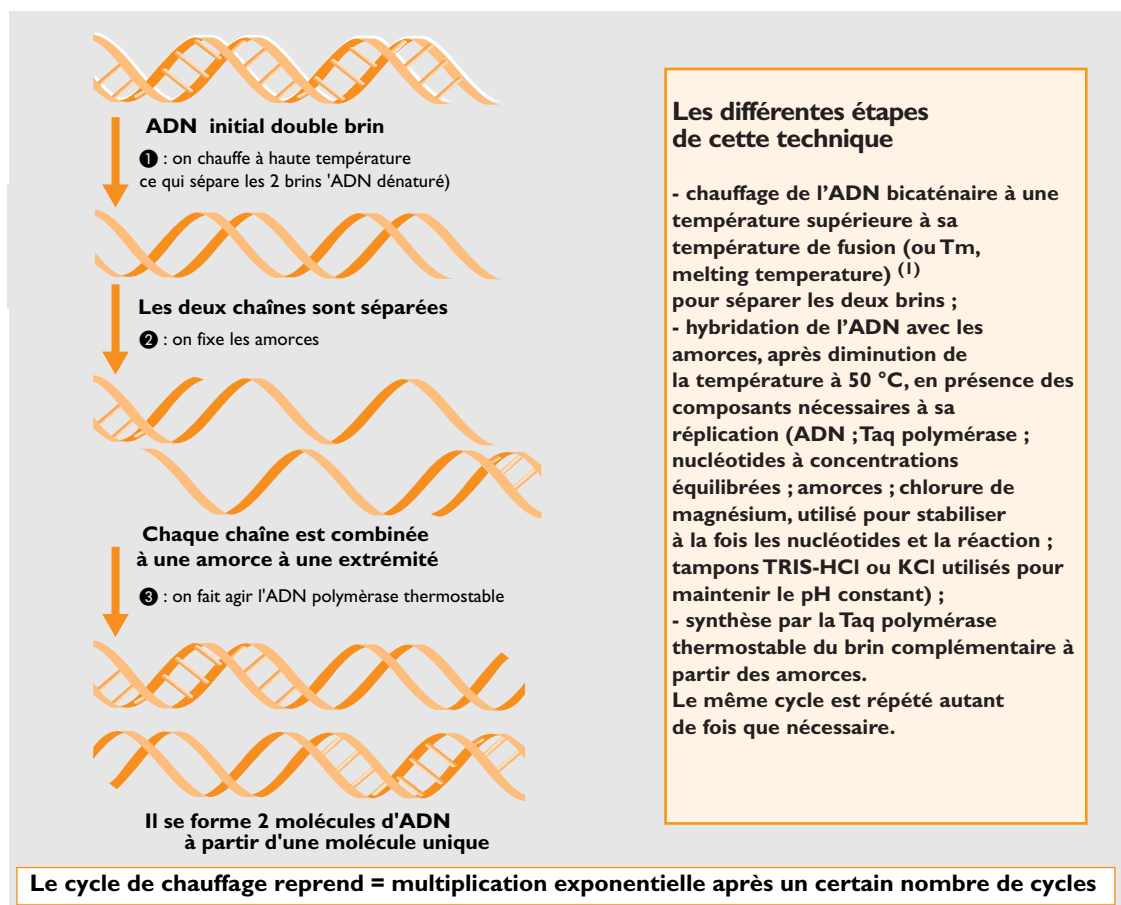
Chromatographie

Différents types de chromatographie sont utilisés :

(1) voir glossaire

Figure 1

TECHNIQUE PCR (d'après J. Kruh [1])



la chromatographie d'affinité pour purifier les ARN messagers (ARNm), la gel-filtration pour séparer les acides nucléiques des nucléotides libres, l'échange d'ions en micro-colonnes pour récupérer de très petites quantités d'ADN, la chromatographie en couche mince (gel de silice) pour les techniques de transfert de gènes et la chromatographie haute performance en phase liquide (HPLC) pour la purification d'oligonucléotides de synthèse, la préparation de plasmides et la séparation de fragments d'ADN.

2.3. TECHNIQUES D'AMPLIFICATION ÉLECTIVE IN VITRO

Ces techniques sont basées sur la répétition de réplifications in vitro de l'ADN à partir d'amorces spécifiques. La plus connue d'entre elles est l'amplification en chaîne par polymérase ou PCR (polymerase chain reaction) qui a complètement bouleversé les stratégies utilisées en biologie moléculaire. Les autres techniques restent d'utilisation limitée.

Amplification en chaîne par polymérase (PCR)

Mise au point en 1985 par Mullis, la PCR est utilisée dans tous les laboratoires de biologie moléculaire. Son utilisation impose une organisation particulière des laboratoires et une grande expérience. Chaque résultat doit être analysé avant d'être validé, le principal écueil étant la contamination par les produits des amplifications précédentes [1, 18].

Le principe consiste à répliquer de façon successive un brin d'ADN à partir d'une amorce ⁽¹⁾ avec l'aide d'ADN polymérases. Il faut pour cela choisir des amorces oligonucléotidiques synthétiques capables de s'hybrider aux bornes pour réaliser la réplification, ce qui nécessite d'avoir une connaissance préalable de la séquence que l'on veut amplifier. Le nombre de copies de la séquence est doublée à chaque réplification. La *figure 1* résume les différentes étapes de cette technique.

Le diméthylsulfoxyde (DMSO) est utilisé pour empêcher la formation de structures secondaires après refroidissement et l'addition de formamide à faible concentration diminue les amplifications parasites.

Les applications de la PCR sont nombreuses. Les plus courantes sont les recherches de délétions, la génération de sondes ⁽¹⁾, la préparation au sous-clonage, l'amplification des ARN et l'analyse de la transcription illégitime ⁽¹⁾. D'autres sont plus spécifiques telles que la recherche de mutations, le séquençage, la recherche de virus, de bactéries, de parasites, d'oncogènes ou de translocations [1, 2, 16].

Autres techniques d'amplification

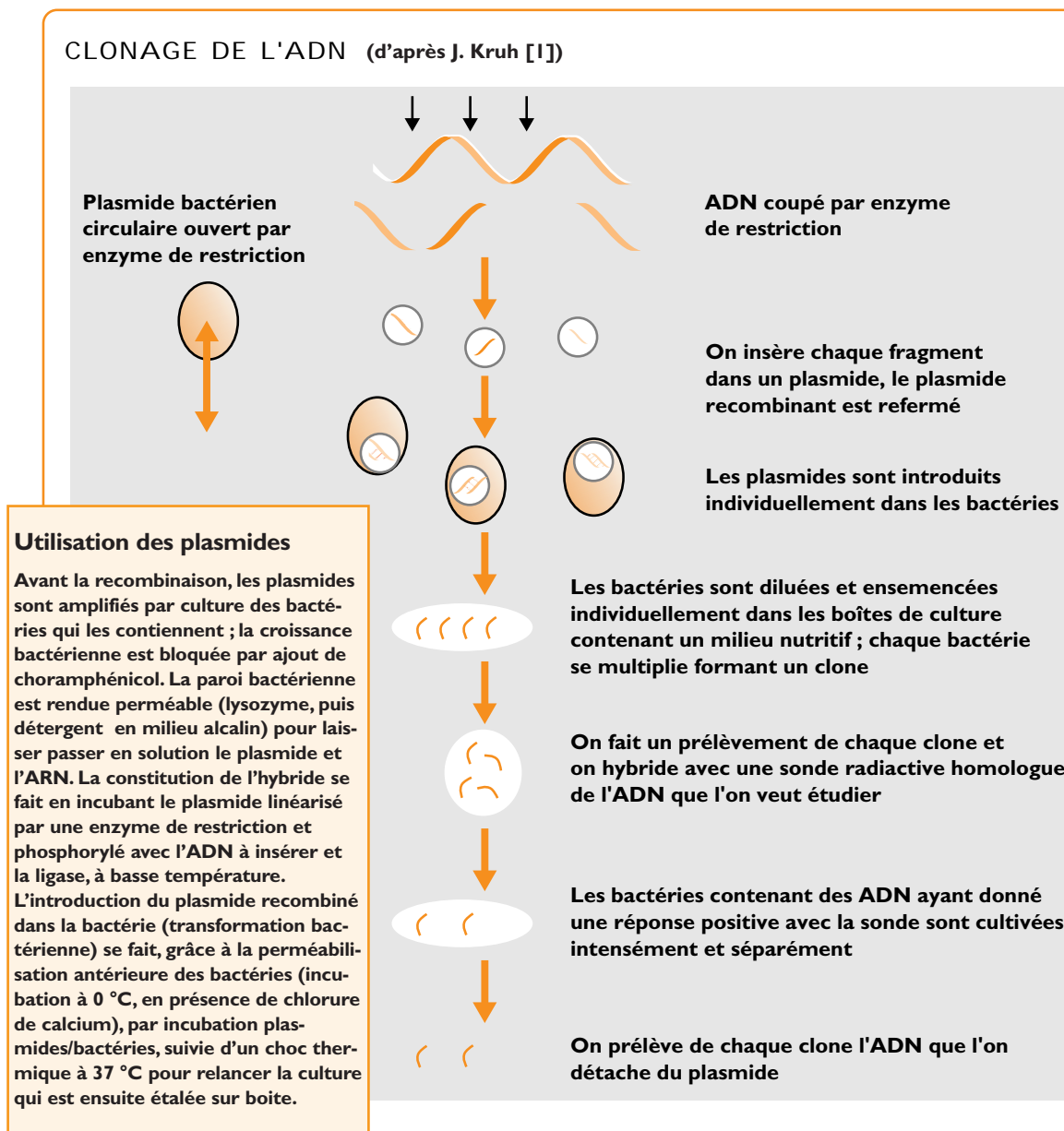
La technique NASBA (nucleic acid sequence based amplification) permet d'amplifier aussi bien des ADN que des ARN sans changement de la température (42 °C). Le recul reste trop faible pour estimer la valeur de cette technique. Celle utilisant la Q β réplase, une ARN polymérase ARN dépendante, permet d'amplifier d'un facteur 10^6 un ARN cible en une trentaine de minutes grâce à une sonde possédant les séquences reconnues. Cette technique reste difficile à manier et n'a pas réussi à concurrencer la PCR qui reste la technique d'amplification la plus utilisée.

2.4. HYBRIDATION MOLÉCULAIRE

Elle consiste en l'appariement de bases complémentaires, cytosine-guanine (C-G) et thymine-adénine (T-A) de deux séquences nucléotidiques. Elle est utilisée pour repérer une séquence donnée d'ADN ou d'ARN. Le principe est le suivant : lorsqu'un ADN bicaténaire est chauffé à une température supérieure à la T_m , les deux brins se séparent par rupture des liaisons hydrogènes et le refroidissement progressif permet une réassociation des brins qui ne s'effectue qu'entre deux séquences strictement complémentaires. Des couplages ADN/ADN ou ARN/ADN (plus stables) peuvent être obtenus. Divers facteurs influencent la T_m de l'ADN ; ils sont souvent mis à profit soit pour modifier les conditions d'hybridation, soit pour faciliter les études qualitatives et semi-quantitatives de séquences possédant des caractéristiques particulières [2].

L'hybridation en phase liquide permet la comparaison des tailles de génomes sans séquences répétitives, l'analyse globale des pourcentages d'homologie de séquences et l'analyse des séquences répétitives. L'hybridation sur support solide améliore la séparation des fractions hybridées et non hybridées et empêche la réassociation des brins d'ADN (mais la précision et le rendement sont plus faibles). Deux composés sont largement utilisés pour modifier ces hybridations : le formamide et le sulfate de dextran. Les supports utilisés pour immobiliser les acides nucléiques sont soit la nitrocellulose, soit des membranes synthétiques le plus souvent à base de nylon. L'hybridation in situ est utilisée pour repérer une séquence donnée d'ADN ou d'ARN au sein d'une cellule ou d'un tissu (localisation des gènes sur des chromosomes en métaphase et criblage de banques) ; elle nécessite l'utilisation de produits supplémentaires (DTT, formaldéhyde, éthanol et PBS - phosphate buffer saline – utilisé comme tampon).

Figure 2



2.5. CLONAGE

Le clonage moléculaire est la recombinaison in vitro d'un gène, et par extension d'un fragment d'ADN codant ou non, avec un vecteur se répliquant de manière autonome à l'intérieur d'une cellule hôte, dont la culture permet l'isolement de l'ADN inséré. Le but du clonage est d'obtenir un grand nombre de copies absolument pures d'une séquence donnée d'ADN par sélection d'un clone parmi un ensemble de clones bactériens recombinants qui porte le nom de banque. L'utilisation majeure de ce type de banque est d'une part le clonage des gènes (dans le but de déchiffrer l'information sur le génome), d'autre part le clonage des fragments d'ADN adjacents aux gènes (non transcrits mais jouant un rôle majeur dans la régulation de l'expression) [1, 2].

Le choix du vecteur dépend essentiellement de la taille des fragments à cloner.

Principe et réalisation pratique de l'utilisation des vecteurs. Création de banques

Utilisation des plasmides (figure 2)

Les plasmides sont des constructions artificielles d'ADN d'origine bactérienne dont la réplication est indépendante. La sélection des bactéries ayant incorporé le plasmide recombiné est obtenue par culture sur un milieu sélectif, la ou les propriété(s) apportée(s) par le plasmide étant utilisée(s) comme moyen de sélection (il s'agit presque toujours d'une résistance à un antibiotique). Plusieurs techniques de purification du

plasmide sont possibles selon le degré de pureté requis : la plus simple consiste à détruire les ARN avec de l'ARNase, puis à éliminer les enzymes et protéines par une extraction suivie d'une précipitation pour récupérer le plasmide. Il est possible d'utiliser des techniques de mini-préparations, vendues en kits, qui conduisent à des plasmides purs mais en quantité infimes [2, 17].

Utilisation de phages

Les bactériophages ou phages sont les virus des bactéries, ils sont munis d'un système de pénétration dans la cellule et s'y multiplient rapidement et de façon autonome avec un rendement bien supérieur. La taille de l'ADN inséré est plus grande, mais le maniement des phages est plus complexe. Les recombinants ne s'objectivent pas par des colonies mais par des plages de lyse. La quantité de bactéries nécessaire est plus grande que lors de l'utilisation de plasmides. Elles sont cultivées dans un milieu contenant le phage à amplifier qui les infecte et se multiplie jusqu'à leur éclatement. Après addition de chloroforme et de chlorure de sodium, les débris bactériens sont éliminés par centrifugation, les phages sont précipités par le polyéthylène glycol (PEG) et purifiés par ultracentrifugation. Ils migrent en anneau et sont récupérés par ponction. Pour extraire l'ADN des phages, il faut détruire les protéines de la capsidie par une incubation soit avec une enzyme spécifique en présence d'EDTA, soit avec une protéinase K en présence de SDS, soit en présence de PMSF (phénylméthyl sulfonyl fluoride). Une autre méthode consiste à extraire l'ADN des lysats de phages par le N,N'-diméthylformamide (DMF). Le titrage des phages s'effectue de façon approximative en déterminant le nombre de plages de lyse dans chaque boîte.

Utilisation de cosmides

Ce sont des vecteurs artificiels constitués d'un plasmide classique auquel ont été ajoutés les séquences cos du phage λ (séquences permettant l'empaquetage d'un recombinant d'une cinquantaine de kb dans la tête du phage λ). L'intérêt des cosmides est de permettre le clonage de fragments très longs, d'environ 45 kb. La technique d'utilisation est hybride entre celle des plasmides et celle des phages. Une fois dans la bactérie, ce pseudo-phage se comporte comme un plasmide. Les cosmides sont utilisés exclusivement pour la confection de banques génomiques.

Utilisation de YAC

Les YAC (yeast artificial chromosomes) sont des minichromosomes artificiels de levure qui sont développés pour cloner de très grands fragments de 150 à plus de 1 000 kb. Il est impossible d'extraire l'ADN par les techniques classiques, il faut avoir recours à des cellules entières directement incluses dans des blocs ou

des billes d'agarose à bas point de fusion. Pour faire pénétrer l'ADN dans les levures, elles sont perméabilisées par un traitement enzymatique. Après mise en culture, le criblage ⁽¹⁾ de la banque peut se faire par hybridation avec une sonde radioactive (criblage direct), ou amplification in vitro avec des amorces choisies dans la région à cloner. L'analyse se fait par électrophorèse.

Principe et réalisation pratique de l'amplification des banques, criblage

Pour que la banque puisse servir à plusieurs clonages successifs, il convient de l'amplifier. Cette amplification n'est envisageable qu'avec des phages. Pour les cosmides, il est préférable de refaire à chaque fois une nouvelle banque [1]. Les banques d'ADN complémentaires (ADNc) sont spécifiques d'un type cellulaire. Les techniques de synthèse de l'ADNc commencent toutes par une étape faisant intervenir la transcriptase reverse qui permet la synthèse de l'ADN à partir de l'ARNm. La technique originelle est une incubation dans un mélange d'ARNm, de poly-dT courts (courts segments de locus comprenant la base thymique multipliés par clonage), de transcriptase reverse, de DTT et d'un cocktail de désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP). Une fois l'ADN synthétisé, l'ARN est détruit avec de la soude ou de l'ARNase. L'ADN est ensuite extrait au phénol et converti en double brin par l'ADN polymérase I. D'autres techniques existent : la technique « copie entière » et la technique de multi-amorçage au hasard qui utilise des hexanucléotides. La production d'une banque complète d'ADNc nécessite ensuite les étapes de ligature et de transfection dans des vecteurs phagiques ou plasmidiques, déjà décrites ci-dessus.

Le criblage est la recherche du bon clone, contenant le recombinant désiré, au sein de la banque. Deux techniques sont principalement utilisées : le criblage par anticorps (ne nécessitant pas de connaître auparavant les séquences nucléotidiques) qui utilise l'iode radioactif 125, et le criblage par oligonucléotides de synthèse, le plus utilisé, qui permet le clonage d'une protéine dont au moins une partie de la séquence est connue. Cette dernière technique consiste à faire pousser les bactéries recombinées antibiorésistantes sur boîtes, à les transférer sur un filtre de nitrocellulose jusqu'à confluence et à hybrider in situ avec la séquence désirée marquée au phosphore 32 (³²P) pour une révélation par autoradiographie [2].

2.6. DÉTERMINATION DE LA SÉQUENCE D'UN ACIDE NUCLÉIQUE

Le clonage permet d'obtenir la séquence à analyser en quantités illimitées, le séquençage devient alors plus

facile et rapide. Le principe général d'analyse consiste à utiliser des gels dénaturants de polyacrylamide dont la résolution est différente selon le gradient, la concentration de tampon ou l'épaisseur. Deux grands principes de séquençage sont utilisés : la méthode chimique et la méthode enzymatique.

Méthode chimique de Maxam et Gilbert

Mise au point en 1977, elle s'est perfectionnée depuis. La première étape consiste à cloner le fragment d'ADN à séquencer sur un site de clonage adéquat (préparé par centrifugation en chlorure de césium, visualisé au bromure d'éthidium, puis linéarisé et extrait par un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique). L'ADN est marqué à l'une de ses extrémités par le ^{32}P , précipité et séparé en quatre parties égales différentes qui subissent chacune un traitement chi-

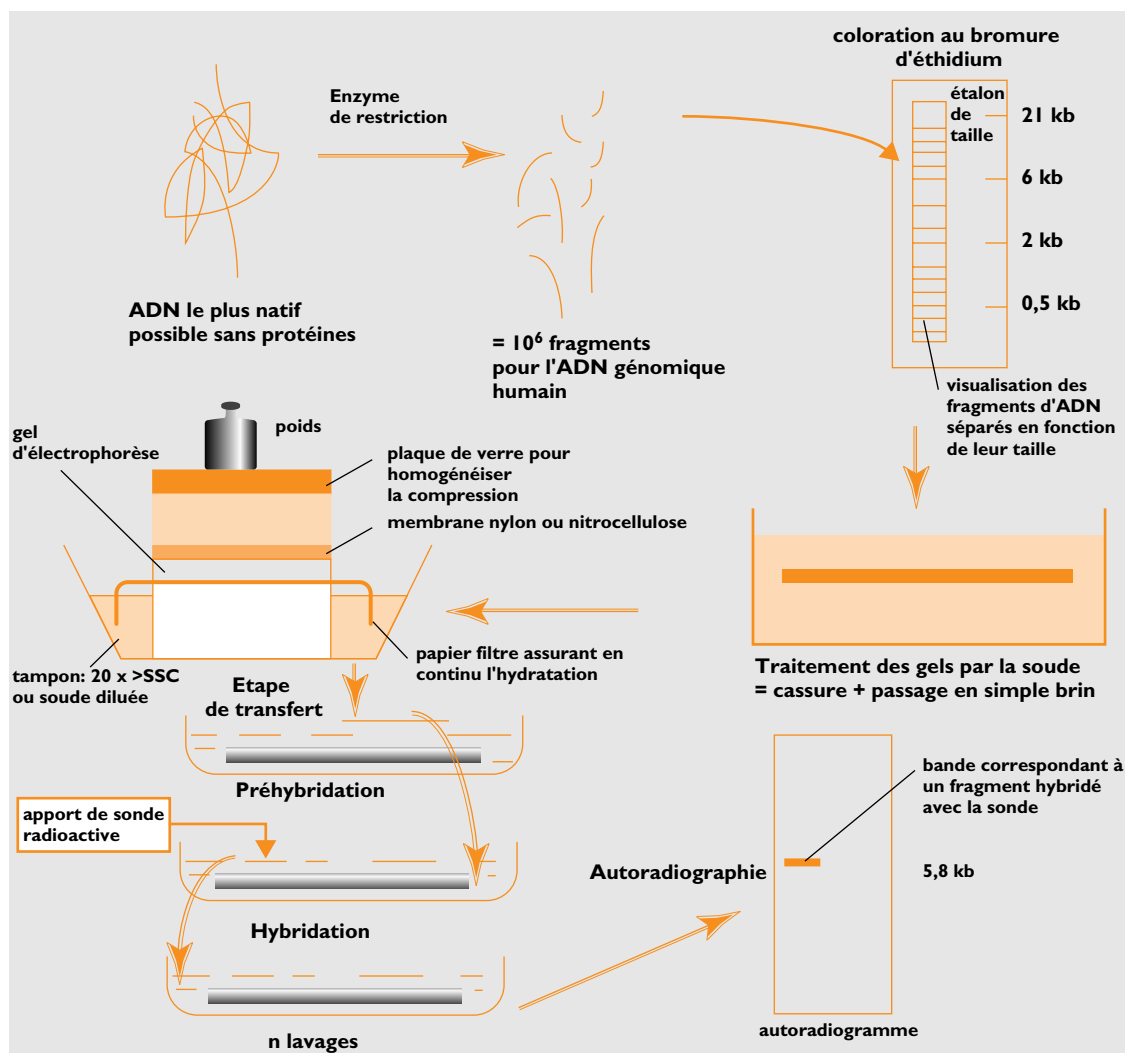
mique particulier qui coupe l'ADN en un endroit spécifique d'un type de base donné. Est ajouté une solution de DMS et d'acide formique (dans les tubes contenant G et G-A) et d'hydrazine (dans les tubes contenant T-C et C). A la fin de la réaction, les précipités sont suspendus dans une solution de pipéridine et subissent une migration sur gel d'acrylamide (avec du formamide). Le séquençage comporte l'utilisation de tampon TEMED (N,N,N',N'-tétraméthyléthylène diamine) et de persulfate d'ammonium. A la fin de l'électrophorèse, la révélation se fait par autoradiographie [2, 16, 18].

Méthode enzymatique par les di-désoxynucléotides de Sanger

L'ADN à séquencer doit être sous-cloné dans un vecteur simple brin type phage et être inséré après une

Figure 3

RÉALISATION DE LA TECHNIQUE DE SOUTHERN (d'après J.C. Kaplan et M. Delpech [2])



séquence particulière. Il est ensuite préparé par centrifugation avec visualisation et extraction. Le recombinant est hybridé avec une amorce synthétique complémentaire pour la synthèse du second brin par une ADN polymérase effectuée en présence des quatre désoxyribonucléotides dont un au moins doit être radioactif (utilisation du ^{35}S plus stable, en présence d'urée). La méthode consiste à mener parallèlement quatre réactions, chacune contenant l'une des quatre bases sous forme de di-désoxyribonucléoside triphosphate en très petite quantité. La synthèse s'arrête dès qu'un di-désoxynucléotide est incorporé. Les solutions sont alors soumises à l'électrophorèse.

Autres méthodes

Une technique non radioactive est utilisée dans l'appareil automatique de séquençage dont le principe est le même que la méthode des désoxyribonucléotides en les marquant chacun par un fluorochrome de couleur différente, déterminée par un photomètre à laser. Sa principale application est la mise en évidence rapide de la nature d'une mutation ponctuelle [2].

2.7. ANALYSE DU GÉNOME ET DE SES MODIFICATIONS

Visualisation d'une portion du génome : méthode de Southern

Compte tenu de la taille du génome humain, il n'est pas possible d'isoler chez chaque sujet la portion d'ADN à étudier. C'est pourquoi Southern a inventé en 1975 une technique qui permet de visualiser n'importe quelle fraction du génome, avec une sonde s'hybridant spécifiquement avec la séquence à analyser. Le principe utilise de l'ADN pur de n'importe quelle origine, coupé complètement par une ou plusieurs enzymes de restriction pour donner 10^6 fragments qui sont ensuite séparés en fonction de leur taille par électrophorèse. Le fragment d'intérêt est ensuite révélé par une sonde marquée. L'idée originale de Southern a été de transférer par capillarité les fragments d'ADN sur un support solide (blotting). Pour que la fixation devienne irréversible, la membrane subit une cuisson sous vide à 80°C si c'est de la nitrocellulose ou une irradiation par des UV courts (254 nm) s'il s'agit de nylon [2, 16, 18]. Les étapes successives sont résumées dans la *figure 3*. L'ensemble de ces opérations permet de récupérer la totalité du génome séparé en fragments de taille parfaitement définie et reproductible. Une préhybridation par de l'ADN hétérologue (ADN de sperme de saumon ou de hareng) est nécessaire pour saturer les sites de fixation potentiels de la membrane. Le lavage de la membrane est une étape critique car la stabilité des hybrides dépend fortement de la composition

saline du milieu qui conditionne la stringence ⁽¹⁾. Pour visualiser une autre partie du génome, la même membrane de nylon est réutilisable une dizaine de fois après déshybridation par la soude. Les applications de la méthode de Southern sont multiples : traçage d'une carte de restriction ⁽¹⁾, mise en évidence de pseudo-gènes et de gènes apparentés, détection de polymorphismes, de délétions et de certaines mutations ponctuelles.

Mise en évidence de mutations ponctuelles

Recherche de mutations ponctuelles inconnues

Il est maintenant techniquement possible de mettre en évidence ces mutations dès lors que le gène responsable est cloné. Plusieurs techniques sont envisageables :

- utilisation de l'ARNase A qui ne détruit pas l'ARN lorsqu'il est hybridé ;
- analyse du polymorphisme de conformation de l'ADN simple brin, SSCP (single strand conformation polymorphism), quand la mutation modifie la structure secondaire d'un fragment d'ADN ;
- électrophorèse en présence d'un gradient dénaturant, DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis), quand la mutation ponctuelle entraîne une modification de la T_m ;
- clivage chimique spécifique : les mésappariements, qui impliquent soit un C, soit un T, peuvent être mis en évidence respectivement par le tétraoxyde d'osmium et l'hydroxylamine qui les clivent spécifiquement et par la pipéridine qui coupe l'ADN à l'endroit où une base a été altérée.

Mise en évidence de mutations ponctuelles connues

Ces techniques sont utilisées pour le diagnostic direct des maladies héréditaires car elles permettent de savoir quelle est la nature des mutations :

- quand les mutations abolissent ou créent un site de coupure pour une enzyme de restriction (technique de Southern ou amplification/clivage) ;
- par hybridation avec des oligosondes synthétiques (allele specific oligoprobe, ASO) : synthèse de deux oligonucléotides marqués par un isotope radioactif, l'un correspondant à la séquence normale et l'autre à la séquence mutée ;
- par ligation répétitive d'oligonucléotides : deux oligonucléotides sont synthétisés qui s'hybrident avec la séquence mutée, l'un se termine immédiatement avant la base qui peut être mutée et la première base du second nucléotide correspond à la base où la mutation est recherchée.

Mise en évidence et caractérisation simultanée d'une mutation ponctuelle connue ou non par amplification/séquençage

Cette technique est encore lourde mais pourrait

tendre à remplacer les précédentes. Elle consiste à amplifier la région de l'ADN où la mutation est recherchée puis à séquencer le produit d'amplification. Elle permet d'étudier aussi bien les mutations que les polymorphismes [16].

2.8. ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GÈNES

Les méthodes d'investigation sont nombreuses et parfois complexes. Seules celles qui sont le plus couramment utilisées sont envisagées ici.

Analyse qualitative des transcrits

Northern blot

Transposition à l'ARN de la technique de Southern, cette technique permet une analyse qualitative et semi-quantitative des ARN. Une électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer les ARN totaux ou les ARN messagers en fonction de leur taille et leur poids. Les résultats peuvent être améliorés par le formaldéhyde ou l'hydroxyméthyle mercure. Les étapes de transfert et de révélation par sonde marquée sont identiques à celles décrites dans la méthode de Southern.

Cartographie à la nucléase S1

La nucléase S1 ne détruit que les acides nucléiques sous forme simple brin. Cette méthode permet après hybridation entre l'ADN génomique et l'ARNm (qui protège vis à vis de la digestion) de déterminer le site d'initiation de la transcription. Ainsi toutes les parties non codantes de l'ADN génomique sont détruites et la technique de Maxam et Gilbert peut être appliquée si l'on veut déterminer la séquence de l'ADN protégé.

Analyse quantitative des ARN par la technique du Dot-blot

Cette technique est utilisée pour quantifier un ARN donné au sein d'une population hétérogène d'ARN, sans séparation préalable, avec une sonde connue. Elle nécessite la préparation d'une série d'un ARN étalon dont le titre est connu et qui est déposé en ligne sur une membrane (nitrocellulose ou nylon). Sur une rangée parallèle, sont déposées les dilutions de la solution d'ARN contenant l'ARN à doser. Les ARN sont immobilisés et hybridés avec une sonde radioactive. L'analyse se fait par comparaison de l'intensité entre les deux.

Cette technique est également utilisable pour l'ADN.

Analyse de la transcription in vitro

Une première approche consiste à reconstituer in vitro un système de transcription qui contient : la séquence d'ADN à étudier, des composés chimiques (dont nucléotides, ions magnésium), de l'ARN polymérase II et un extrait contenant les protéines nucléaires. Cette technique porte le nom de *run off*. L'autre possibilité est d'analyser in vitro sur noyaux isolés, en présence de ribonucléotides marqués, l'élongation de la transcription déjà initiée in vivo. Cette technique est beaucoup plus utilisée, et porte le nom de *run on* [2, 18]. Les étapes de ces techniques sont les suivantes : isolement des noyaux et de l'ARN, transcription par ajout d'un tampon de réaction radioactif et hybridation sur des bandes de nitrocellulose. Les ribonucléotides sont incorporés dans les ARN synthétisés par les ARN polymérases (déjà engagées dans la transcription au moment où les noyaux sont extraits pour le *run on*, et qui démarrent la transcription pour le *run off*), l'intensité des taches après révélation est proportionnelle à la quantité d'ARN (néo)synthétisés, donc au taux de transcription.

Analyse des mécanismes de régulation des gènes

Plusieurs techniques sont possibles :

- analyse de la sensibilité d'un gène actif vis-à-vis de l'ADNase I et mise en évidence des sites hypersensibles par incubation de noyaux en présence de faibles doses d'ADNase I, suivi dans le temps de la digestion et comparaison avec des témoins selon la méthode de Southern ;

- mise en évidence de l'interaction des protéines avec l'ADN qui peut être démontrée par 3 types d'expérience (footprinting, retardement sur gel, interférence de méthylation).

Footprinting (empreinte)

Cette technique permet de déterminer le siège de l'interaction entre facteurs protéiques et ADN, sachant que cette interaction protège la séquence d'ADN vis-à-vis de l'ADNase I : l'ADN est précipité, incubé avec du ^{32}P et les 4 dNTP, puis avec un extrait de protéines où se trouvent les protéines censées interagir, et est ensuite digéré par l'ADNase I. En parallèle, une incubation sans extrait protéique est effectuée pour servir de témoin. Les produits de digestion sont analysés par électrophorèse et une autoradiographie est pratiquée. Cette technique peut se pratiquer in vivo en traitant les cellules par du DMS [2, 17].

Retardement sur gel (electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

Cette technique permet d'objectiver la présence et la spécificité d'une interaction entre une protéine et une séquence définie d'ADN. En pratique, une séquence d'ADN est marquée au ^{32}P et incubée avec des dNTP, du tampon et des extraits protéiques. Après précipitation de l'ADN, les échantillons sont soumis à une électrophorèse. L'interaction de la protéine avec la séquence d'ADN va augmenter sa masse moléculaire apparente donc retarder sa migration dans le gel [2, 17].

Technique d'interférence de méthylation

Elle vient en complément des deux précédentes et permet d'affiner l'étude de l'interaction en identifiant les guanines et les adénines impliquées dans la liaison. L'ADN marqué susceptible d'interagir avec une protéine est partiellement méthylé sur ses guanines avec du DMS. Si la méthylation s'effectue sur une guanine impliquée dans une interaction, celle-ci ne peut plus se contracter. Il est alors pratiqué une expérience de retardement sur gel. Une détermination de la séquence, limitée aux seules guanines, est ensuite effectuée par la technique de Maxam et Gilbert.

2.9. TECHNIQUES DE MODIFICATION DU MATÉRIEL GÉNÉTIQUE

Ces techniques sont la clé de la compréhension des mécanismes de régulation de l'expression génétique chez les eucaryotes et de la thérapeutique curative. Il est maintenant possible d'une part de modifier ce qui existe (mutagenèse dirigée) et d'autre part d'apporter quelque chose de nouveau (animaux transgéniques). La séquence à étudier est éventuellement modifiée et couplée à des séquences qui serviront soit de marqueur, soit de reporter, soit d'effecteur. Le recombinant est introduit soit *ex vivo* dans les cellules en culture (transfection), soit *in vivo* dans des œufs fécondés (animaux transgéniques). Les effets de la séquence peuvent alors être observés dans un contexte qui intègre les effets de tous les paramètres naturels.

Modification d'une portion de séquence

Pour évaluer le rôle d'une séquence, il suffit de la supprimer et d'analyser les modifications physiologiques qui en découlent. La stratégie est de créer une délétion étendue par excision de fragments de restriction et de réaliser des délétions de plus en plus courtes afin de circonscrire les régions stratégiques et, enfin, une série de mutations ponctuelles, parfaitement définies, permet de préciser le rôle de chacune des bases de

ces régions dans les mécanismes régulateurs [2, 16].

La technique de mutagenèse insertionnelle aléatoire permet de mettre en évidence et de cloner des gènes inconnus par introduction dans une cellule embryonnaire d'une séquence d'ADN repérable qui s'intègre au hasard dans le génome et crée une mutation et une perte de fonction d'une protéine. Les mutants sont sélectionnés par leur phénotype et un clonage génomique est pratiqué.

La technique de mutagenèse dirigée par des oligonucléotides de synthèse permet d'introduire une mutation ponctuelle désirée à un endroit voulu pour démontrer l'effet précis d'une base.

Mise en évidence des effets des modifications apportées

L'effet attendu des modifications structurales qui viennent d'être décrites est une augmentation ou une diminution de l'expression du gène correspondant ou une modification des propriétés de la protéine produite. Si celle-ci se traduit par une différence phénotypique, elle est facilement révélée ; sinon d'autres techniques qui utilisent les gènes reporters et les promoteurs inductibles sont possibles.

Transfert *ex vivo* et *in vivo* du matériel génétique

De nombreuses possibilités techniques permettent d'effectuer cette transfection. Mais, le résultat est aléatoire dans l'état actuel de la méthodologie. Il est impossible de maîtriser le nombre de copies et de prévoir si l'expression sera transitoire (l'étude pouvant se faire entre la 12^e et la 72^e heure) ou définitive [1, 2]. Plusieurs techniques sont possibles : technique au phosphate de calcium, technique au diéthylaminoéthyl dextran (DEAE dextran), technique d'électroporation avec des impulsions électriques à haute tension, et celle de projection de micro-particules revêtues de gènes.

Le ciblage génique est une autre technique qui permet d'intégrer un gène donné dans son homologue génomique ; l'application majeure future devrait être la thérapie génique.

La technique des micro-injections d'ADN dans les ovocytes fécondés permet l'obtention des souris transgéniques.

3. La toxicité des produits utilisés

La multiplicité et la diversité des produits chimiques utilisés dans les laboratoires où sont mises en œuvre des techniques de biologie moléculaire ne permet pas d'en donner une liste exhaustive, et encore moins de développer pour chacun, dans le cadre de cet article, l'état des connaissances toxicologiques.

Selon les produits, cet état des connaissances peut être de niveau très différent. Les effets sur la santé de certains produits sont bien connus, les publications sont nombreuses et des synthèses, telles que les fiches toxicologiques de l'INRS [19], sont publiées et peuvent être aisément consultées. En revanche, pour de nombreux produits, les connaissances sont encore très réduites, la toxicité suspectée sans être prouvée... Vouloir résumer ici ces données serait nécessairement réducteur et donc source d'inexactitudes, avec les dangers que cela peut entraîner. C'est pourquoi, pour chacun des principaux produits utilisés, il a paru préférable de donner uniquement les informations essentielles pour le repérage, l'évaluation et la gestion des risques.

Ces informations sont regroupées dans le **tableau III**, à savoir :

- le n° CAS, permettant d'identifier précisément le produit qui peut être connu sous plusieurs dénominations (pour des raisons pratiques, ce sont les dénominations habituellement utilisées dans les laboratoires qui sont retenues ici) et de faciliter les recherches bibliographiques [20] ;
- le numéro de la fiche toxicologique de l'INRS (FT), lorsqu'elle existe [19] ;
- la classification européenne, pour les produits classés cancérogènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction, ainsi que l'étiquetage réglementaire et les phrases de risque [21, 22] ; il faut savoir qu'une absence de classification peut indiquer soit que la substance n'a pas de propriété toxique, soit qu'elle n'a pas encore été étudiée par le groupe d'experts européens chargé de cette classification ; enfin, seul est mentionné dans le tableau l'étiquetage réglementaire européen, à l'exclusion de l'étiquetage volontaire par les producteurs qui peut exister pour certains produits ;
- les valeurs de VLE/VME valables en France au moment de la publication de cette étude (valeurs exprimées en ppm, sauf indication contraire) [23] ;
- les numéros de tableaux de maladies professionnelles du régime général de la Sécurité sociale.

4. Les études de poste

Des études de postes ont été réalisées dans quatre laboratoires différents par leur structure, leurs objectifs de recherche, leurs chercheurs et leurs méthodes de travail, ce qui a permis d'avoir un aperçu très global et diversifié du travail en laboratoire de biologie moléculaire. Aucun de ces laboratoires n'a une activité spécifique de biologie moléculaire, celle-ci ayant été secondairement intégrée pour les besoins de la recherche. En effet, c'est la découverte que des mécanismes génétiques et moléculaires étaient initiateurs des phénomènes pathologiques jusque là étudiés qui est à l'origine de l'implantation récente des techniques de biologie moléculaire dans ces laboratoires.

Les études de postes ont été effectuées sur plusieurs mois, délai imposé par l'organisation même du travail dans les laboratoires, qui dépend de nombreux facteurs propres à la recherche en biologie moléculaire (commande des réactifs ou des matériaux nécessaires à l'expérience tels que les nucléotides, par exemple ; échec d'une manipulation ; temps d'une réaction ; souillure d'une culture ; modification d'un protocole et nécessité de faire des essais pour prouver son efficacité ; mauvaise migration sur un gel d'électrophorèse qui impose de tout refaire ; durée d'un protocole étalé sur plusieurs jours...). Ceci a limité le nombre de postes étudiés. La diversification des lieux et des personnes observées a été privilégiée, et le travail a été aussi orienté sur le contact et l'échange avec les chercheurs et techniciens rencontrés, autre façon d'appréhender le risque, la façon dont il est connu, perçu, prévenu et vécu.

Ne sont retenues et présentées dans cet article, à titre d'exemples, que quelques études de poste jugées plus particulièrement représentatives, soit par les techniques mises en œuvre, soit par les observations recueillies.

4.1. LABORATOIRES

Laboratoire 1 (fiches de poste 1 à 3)

Construit depuis moins de 2 ans, son organisation a été modifiée à la suite d'un déplacement des locaux en prévoyant dès la conception l'implantation d'une activité de biologie moléculaire (recherche de localisations de gènes avec cartographie génétique, recombinaison, clonage, PCR, criblage de banques, hybridation, marquages, utilisation de vecteurs et d'organismes génétiquement modifiés). Les salles ne sont pas séparées, mais certaines paillasses, hottes et pièces sont spécifi-

**Éléments d'information sur la toxicité des principaux
produits chimiques utilisés en biologie moléculaire**

TABLEAU III

	N° CAS	N° FT INRS	Classification / étiquetage (1)	VLE/VME (2)	N° MP
Acétate de sodium	127-09-3				
Acide acétique	64-19-7	24	R10 - C ; R35	10 VLE	
Acide borique	10043-35-3	138			
Acide chlorhydrique	7647-01-0	13	T ; R23 - C ; R35	5 VLE	
Acide formique	64-18-6	149	C ; R35	5 VLE	
Acrylamide	79-06-1	119	Cancér. cat. 2 ; R45 - Muta. cat. 2 ; R46 - T ; R24/25 - 48/23/24/25	0,1 VME	
Alcool isoamylique secondaire	598-75-4	206		100 VME	84
Bromure d'éthidium (BET)	1239-45-8	236			
Chloroforme	67-66-3	82	Xn ; R22 - 48/20/22 - Xi ; R38 - Cancér. cat. 3 ; R40	5 VME / 50 VLE	12 ; 84
Chlorure de calcium	10043-52-4		Xi ; R36		
Chlorure de césium	7647-17-8				
Chlorure de magnésium	7786-30-3				
Chlorure de potassium	7747-40-7				
N,N'-Diméthylformamide (DMF)	68-12-2	69	Repro. cat. 2 ; R61 - Xn ; R20/21 - Xi ; R36	10 VME	84
Diméthylsulfoxyde (DMSO)	67-68-5	137			84
Dithiotréitol (DTT)	27565-41-9				
Dodécyl sulfate de sodium (SDS)	151-21-3				
Ethanol	64-17-5	48	F ; R11	1000 VME / 5000 VLE	84
Ethylène diamine tétra acétate (EDTA)	60-00-4				
Formaldéhyde	50-00-0	7	Cancér. cat. 3 ; R40 - T ; R23/24/25 - C ; R34 - R43	0,5 VME / 1 VLE	43
Formamide	75-12-7			20 VME	
Hydrazine	302-01-2	21	Cancér. cat. 2 ; R45 - T ; R23/24/25 - C ; R34 - R43 - R10 - N ; R50-53	0,1 VME	
Hydroxyméthyl mercure			T+ ; R26/27/28 - R33 - N ; R50-53	0,01 mg/m ³ en Hg VME	
Isobutanol	78-83-1	117	Xi ; R37/38-41 - R67 - R10		84
Isopropanol	67-63-0	66	Xi ; R36 - R67 - F ; R11		84
2-Mercaptoéthanol	60-24-2				84
Méthanol	67-56-1	5	T ; R23/24/25 - 39/23/24/25 - F ; R11	200 VME / 1000 VLE	84
Persulfate d'ammonium	7727-54-0				65 ; 66
Phénol	108-95-2	15	T ; R24/25 - C ; R34	5 VME	
Phényl méthyl sulfonyl fluoride (PMSF)	329-98-6				
Pipéridine	110-89-4		T ; R23/24 - C ; R34 - F ; R11		
Polyéthylène glycol (PEG)	25322-68-3				
Silicone	63148-62-9				
Soude	1310-73-2	20	C ; R35	2 mg/m ³ VME	
Sulfate de diméthyle (DMS)	77-78-1	78	Cancér. cat. 2 ; R45 - Muta. cat. 3 ; R40 ; T+ ; R26 - T ; R25 ; C ; R35 - R43	0,1 VME	
Sulfate de dextran	9042-14-2				
N,N,N',N'-Tétraméthylène diamine (TEMED)	110-18-9		Xn ; R20/22 - C ; R34 - F ; R11		
Thiocyanate de guanidine	593-84-0				
1,1,1-Trihydroxyméthyl- aminométhane (TRIS)	77-86-1				

(1) Valable jusqu'à la 26^e adaptation. (2) En ppm sauf indications contraires.



Documents
pour le médecin
du travail
N° 85
1^{er} trimestre 2001

quement réservées à la biologie moléculaire. Une pièce pour la PCR est équipée d'une hotte à flux laminaire horizontal. Les produits sont rangés sur les étagères surplombant les paillasses où ils sont utilisés, étiquetés et datés. Une hotte a été conçue pour l'utilisation de certains produits comme le phénol, le chloroforme, elle est régulièrement vérifiée et est aux normes d'utilisation. Le stockage se fait dans un réfrigérateur pour les produits nécessitant une basse température et dans une armoire ventilée pour les solvants. Tout est étudié pour limiter les déplacements, hormis ceux justifiés par l'utilisation de produits radioactifs qui impose une pièce séparée, balisée et d'accès limité (appelée « pièce chaude »). Des panneaux d'affichage sur les mesures d'hygiène et de sécurité sont répartis dans les locaux. Une liste des produits utilisés est régulièrement mise à jour par le correspondant hygiène et sécurité du laboratoire.

Laboratoire 2 (fiche de poste 4)

De conception ancienne (plus de 20 ans), il n'a pas une activité spécifique de biologie moléculaire, mais celle-ci se développe de plus en plus depuis une dizaine d'année : analyse d'ARNm par hybridation in situ, Northern blot, PCR, clonage, fabrication de banques d'ADNc, transfections... Initialement, la conception des locaux n'avait pas prévu cette activité croissante, les laboratoires sont donc « mixtes » (biochimie/biologie moléculaire/biologie cellulaire) et l'augmentation de la quantité de matériels et de produits génère un encombrement souvent important des laboratoires et paillasses ainsi qu'une multiplication des déplacements en particulier dans les couloirs où se situent parfois armoires de stockage, centrifugeuses et four à micro-ondes. Les flacons étiquetés sont rangés au-dessus des paillasses sur des étagères, sans ordre car plusieurs personnes peuvent être amenées à travailler sur le même espace. Les hottes sont communes avec la biochimie, certains produits y sont manipulés et les flacons y sont entreposés. Le stockage des produits est limité à de petites quantités, gérées par une seule personne, dans une armoire ouverte sans bac de rétention ni ventilation. Une liste est tenue à jour avec identification des produits cancérogènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction, et noms des utilisateurs. Un tableau d'évaluation des risques liés aux activités spécifiques du laboratoire est régulièrement complété par le correspondant hygiène et sécurité, il inclue les moyens de prévention à respecter.

Laboratoire 3 (fiche de poste 5)

Depuis quelques années son activité de biologie moléculaire, non prévue au moment de la conception des locaux anciens, est croissante. Les laboratoires sont plus découpés et individualisés, ce qui fait que l'activité de chaque petit laboratoire est déterminée par l'objectif de recherche de celui qui y travaille. De même, l'aménagement, la répartition des produits, leur stockage et leur étiquetage (après transvasement) sont différents selon l'utilisateur. Des panneaux d'affichage avec notamment des indications concernant la prévention, l'hygiène et la sécurité se trouvent dans les couloirs. Certaines pièces sont communes (on y trouve l'autoclave, les stériliseurs...), ce qui impose quelques déplacements. Une liste des produits cancérogènes utilisés est tenue à jour.

Laboratoire 4 (fiche de poste 6)

La structure de ce laboratoire, qui se trouve dans des locaux universitaires, n'est pas détaillée car des travaux s'y sont déroulés pendant toute la période d'observation. L'organisation des locaux et des méthodes de travail y étaient transitoires, et les études de postes n'ont porté que sur le déroulement de certaines manipulations.

4.2. ETUDES DE POSTES

Les études de postes ont été numérotées de façon aléatoire en indiquant pour chacune un numéro de laboratoire qui correspond à la description précédente. Quand à la classification des opérateurs, elle est aussi aléatoire et permet de les différencier ou les comparer. Ont été observés : un technicien de laboratoire (fiches de poste 1 à 3), deux chercheurs, dont l'un de formation universitaire et enseignant (fiches de poste 5 et 6), quatre étudiants en science travaillant dans chacun des quatre laboratoires, y recevant la formation pratique qui y est enseignée de façon différente (la fiche d'étude de poste 4 correspond à l'observation de l'un d'entre eux). Les différentes informations obtenues pour chaque poste étudié sont synthétisées dans une fiche récapitulative. Cette fiche inclue les différentes étapes des manipulations, mais aussi des remarques concernant les risques observés et les mesures de prévention prises par l'expérimentateur. Une notion de temps, déduite de l'observation, a été ajoutée de façon à avoir un aperçu de la durée d'exposition. Ce type de tableau est reproductible pour chaque étude et permet une quantification approximative de l'exposition.

Préparation d'une électrophorèse sur gel d'acrylamide (laboratoire 1, technicien de laboratoire)

La manipulation intervient dans un protocole plus global d'analyse de microsatellites ⁽¹⁾ sur ADN génomique. Le gel d'acrylamide non dénaturant (caractère fixé notamment par le rapport des concentrations d'acrylamide/bis-acrylamide) est préparé afin de réaliser une électrophorèse pour étudier la migration des différents fragments d'ADN. Avant l'électrophorèse, l'ADN génomique a été extrait, mis en solution, coupé par des enzymes de restriction et amplifié par PCR.

Le manipulateur dispose d'un protocole écrit, dont

il connaît les grands points, afin de planifier sa manipulation (temps de préparation et de cinétique des réactions). Il porte une blouse en coton à manches longues, des gants en latex non stériles (changés environ tous les quarts d'heure durant la manipulation) et porte des lunettes de correction.

La solution d'acrylamide a été préparée avant, en grande quantité (environ 750 ml), et est conservée à + 4 °C pour éviter la polymérisation. L'acrylamide est utilisé sous forme liquide et conservé au réfrigérateur dans

FICHE D'ÉTUDE DE POSTE 1

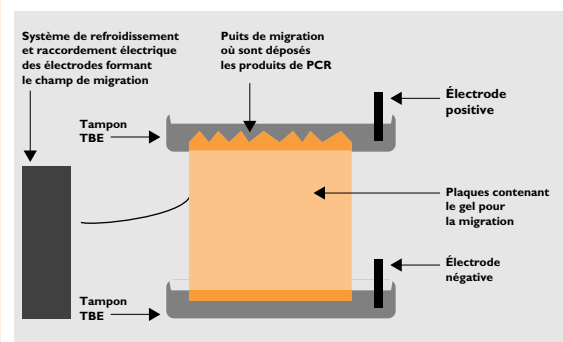
Préparation d'une électrophorèse sur gel d'acrylamide (pour étude de la migration de microsatellites d'ADN après PCR) Laboratoire 1 ; technicien de laboratoire ; durée totale : environ 2 h30

Matériel et méthodes	Produits utilisés	Observations	Prévention
Préparation des 2 plaques de coulage (nettoyage + lubrification + serrage par crochets selon épaisseur désirée du gel)	Silicone en solution aqueuse (Glass coat [®])	Odeur irritante de la solution, temps d'utilisation environ 10 mn	Manipulation sous hotte, blouse, gants
Prélèvement de la quantité nécessaire (11,25 ml) d'une solution d'acrylamide déjà préparée.	Acrylamide liquide + bis-acrylamide + eau distillée (flacon étiqueté conservé à 4 °C)	Transvasements délicats et minutieux (plusieurs mn)	Bonnes pratiques de laboratoire (BPL), champ sur paillasse (papier Whatman), blouse, gants, lunettes, pipettes automatiques jetables. Information sur toxicité et prévention
Préparation du mélange	Ajout glycérol à 5 % + 15 ml TBE (prêt dans flacon étiqueté)	Idem	
Dégazage du mélange	Idem	Difficultés de manipulation de tuyaux rigides sous vide (risque accru de projections) : plus ou moins long selon quantité de bulles (≈ 15 minutes)	Blouse, gants, lunettes (de correction et non de protection)
Fin préparation du mélange	Ajout de persulfate d'ammonium (300 µl) + TEMED (30 µl)	Agitation manuelle (secousses) de la fiole (risque accru de projections ou inhalations)	BPL, blouse, gants, lunettes, pipettes automatiques jetables
Coulage de la solution entre les deux plaques	Mélange identique	Fuites possibles si étanchéité imparfaite (contact cutané prolongé possible) ; opération lente (≈ 15 minutes) et délicate	Champ de protection sur paillasse, BPL, blouse, gants
Polymérisation du gel	Idem	Attente 1 à 2 h	
Préparation des puits dans le gel par incrustation du peigne	Idem	Contact avec le gel possible	Blouse, gants
Conservation du surplus du mélange versé dans flacon plastique (témoin de polymérisation)	Idem	Contact avec le gel possible	Blouse, gants. Etiquetage, élimination secondaire avec déchets toxiques
Transfert en pièce « chaude » pour essai, mise des plaques sur support vertical (fig. 4) après retrait des pinces de serrage et du peigne et rinçage des plaques	Tampon TBE	Après environ 2h	BPL, blouse, gants
Essai qualité du gel (remplissage de 2-3 puits, 0,5 µl)	Liquide témoin (formaldéhyde à 50 %, bleu de xylène, bleu de bromophénol)	Remplissage délicat, posture pénible (manipulation bras levés). Migration longue (une nuit)	BPL, blouse, gants
Élimination des déchets toxiques (gants, papiers Whatman, pipettes...)			Étiquetage des déchets toxiques pour incinération

une bouteille de verre étiquetée (contenu et date) et une note est affichée sur le réfrigérateur rappelant toxicité, mesures de prévention, conduite à tenir en cas de projection ; ces données sont connues du manipulateur qui prend les précautions nécessaires en évitant notamment tout contact cutané ou projection oculaire. Pour la préparation de la solution du gel, la paillasse est recouverte d'un champ de papier plastifié (papier Whatman) qui éponge les fuites. Un premier mélange est effectué en ajoutant du glycérol à 5 % et du tampon de migration TBE (TRIS - acide borique - EDTA) à la solution d'acrylamide préalablement transvasée dans un flacon en quantité voulue. La réaction entre ces produits entraîne la formation de bulles qu'il faut éliminer pour la qualité du gel (transvasement dans une fiole branchée sous vide). 300 ml de persulfate d'ammonium et 30 ml de TEMED sont ajoutés ensuite. Le mélange entre ces différents éléments se fait par agitation manuelle de la fiole. L'étape suivante doit être rapide car il faut couler immédiatement le gel pour éviter un début de polymérisation. Le contenu du flacon est déversé de façon douce entre les deux plaques préalablement préparées en évitant la formation de bulles par tapotage ; les fuites sont difficilement évitables en raison du manque d'étanchéité du montage des plaques, ce qui rend indispensable le port de gants ; il en est de même lors de l'incrustation du peigne pour la formation des puits d'électrophorèse. La polymérisation complète nécessite une à deux heures d'attente. Le surplus du mélange est versé dans un flacon plastique étiqueté qui sert de témoin de polymérisation avant d'être éliminé avec les déchets toxiques et inci-

né (de même que les gants, les papiers Whatman et les pipettes jetables utilisées pour les transvasements). La PCR étant radioactive, les plaques contenant le gel sont transportées ensuite en pièce « chaude ». Les plaques sont placées dans un support vertical, avec un système assurant le refroidissement du gel pour une migration qui demande une température de + 4 °C. Le gel doit baigner en haut et en bas dans un tampon TBE, l'ensemble est raccordé aux électrodes (figure ci-dessous).

DISPOSITIF SCHEMATIQUE DU MONTAGE D'ELECTROPHORESE



Avant de lancer l'électrophorèse avec les produits de la PCR, un essai « à blanc » pour vérifier la qualité du gel est réalisé en déposant dans deux ou trois puits un liquide témoin coloré en bleu. Cette migration témoin demande la nuit, l'électrophorèse n'est faite que le lendemain. Le remplissage des puits (0,5 ml) est une étape délicate qui demande concentration et habileté ; la posture est fatigante, le niveau des puits se situe au-dessus des épaules et nécessite de manipuler bras levés. —

ETUDE DE POSTE 2

Préparation d'un gel d'agarose pour électrophorèse avec révélation par le bromure d'éthidium (laboratoire 1, technicien de laboratoire)

De même que la manipulation décrite dans l'étude de poste 1, celle-ci intervient dans le cadre de l'étude de migration de fragments d'ADN génomique après extraction et amplification par PCR.

L'opérateur suit un protocole écrit. Il porte une blouse en coton à manches longues, des gants en vinyle jetables qu'il change tous les quart d'heures environ et des lunettes de correction (et non de protection). Il place un papier Whatman sur sa paillasse afin d'absorber les fuites possibles et prépare les deux plaques de la même façon que dans l'étude 1. Il pèse la poudre d'agarose à l'aide d'une petite cuillère et d'une balance électronique. Cette poudre est transvasée dans un flacon dans lequel sont ajoutés 200 ml d'eau déminéralisée. Ce mélange est chauffé quelques minutes dans un four

micro-ondes pour faire évaporer l'eau. Le chauffage entraîne la formation d'une mousse abondante en surface, ce qui a été prévu en utilisant un flacon de volume supérieur à celui de la solution. L'opérateur se méfie de la chaleur du flacon (il le retire avec un linge) et des projections de mousse encore en ébullition à la sortie du four. Il explique qu'il est souvent amené à manipuler ce même mélange chaud alors qu'il contient déjà des traces de bromure d'éthidium (BET), quand il réutilise le surplus d'un mélange préparé (conservé dans un flacon étiqueté avec composition et date de préparation). Une solution antérieurement préparée de TBE est ajoutée et le mélange est agité manuellement, flacon ouvert. Pour finir, et au dernier moment, une goutte de BET est ajoutée (liquide marron conservé dans un petit flacon fermé, dans l'emballage carton-

né d'origine en raison de la photosensibilité du produit, et étiqueté). Le flacon est à nouveau agité manuellement de façon à obtenir un mélange homogène. Le technicien connaît la toxicité du BET, les mesures de prévention à respecter et est particulièrement attentif à limiter les projections lors des secousses du flacon.

Le gel est ensuite coulé entre les deux plaques en prêtant attention à limiter les fuites, les puits sont préparés à l'aide du peigne. La solidification du gel prend 15 à 25 mn, temps pendant lequel la solution de tampon TBE pour la migration est préparée. La solidification faite, les plaques sont placées horizontalement

dans une cuve contenant le tampon et raccordées aux électrodes. Les fragments d'ADN obtenus après PCR sont placés dans les puits pour la migration. La révélation se fait par autoradiographie (UV à 280 nm) dans une enceinte noire, fermée hermétiquement, qui ne peut être ouverte pendant la diffusion des UV ; la lecture se fait sur un écran de visualisation séparé limitant toute exposition. Le gel et la solution tampon qui contient du BET après la migration sont déposés dans un bidon et traités sur colonne de charbon activé avant d'être incinérés.

FICHE D'ÉTUDE DE POSTE 2

Préparation d'un gel d'agarose (pour étude de migration de fragments d'ADN par électrophorèse et révélation par le BET)

Laboratoire 1 ; technicien de laboratoire ; durée totale : environ 2 h30

Matériel et méthodes	Produits utilisés	Observations	Prévention
Préparation des 2 plaques (cf. étude de poste 1)	Silicone en solution aqueuse	Odeur irritante (≈ 10 minutes)	Manipulation sous hotte, blouse, gants vinyle
Pesée de l'agarose et transvasement dans un flacon	Agarose en poudre (6g)	Risque d'inhalation de poudre	Blouse, gants, lunettes de correction (et non de protection) ; pas de masque
Ajout d'eau	Eau déminéralisée (200 ml)		Choix d'un flacon de volume supérieur à celui de la solution en prévision de la formation de mousse
Chauffage dans four micro-ondes	Dissolution agarose-eau (+ traces de BET lors d'utilisation des restes d'un mélange préparé antérieurement)	Formation de mousse à la chaleur, risque de brûlures cutanées, de projections cutanées et oculaires à la sortie du four (≈ 15 minutes)	Blouse, gants, lunettes (idem)
Mélange avec solution tampon, puis ajout de l'agent intercalant pour visualisation de l'ADN	TBE (1/10 ^e du volume) Mélange + 1 goutte de bromure éthidium (BET)	Agitation manuelle du mélange encore chaud (vapeurs), flacon ouvert (risque de projection) (≈ 1 à 2 minutes)	BPL, blouse, gants, lunettes (idem), pipette automatique jetable Connaissance de la toxicité du BET
Coulage du gel entre les 2 plaques	Idem	Fuites possibles (risque contact cutané) opération lente (≈ 15 minutes) et délicate	Blouse, gants, papier Whatman sur paillasse
Polymérisation du gel/ préparation des puits, préparation du tampon	Idem + TBE	Attente de 15 à 25 minutes / transvasements (quelques minutes)	Blouse, gants
Positionnement horizontal de la plaque dans cuve contenant TBE, branchement électrodes, remplissage des puits, migration	TBE + gel contenant BET Fragments d'ADN obtenus par PCR	Risque contact cutané (≈ 15 minutes)	BPL, blouse, gants, papier Whatman sur paillasse, pipette jetable
Révélation par autoradiographie		UV (quelques minutes)	Ecran protecteur, enceinte fermée
Gestion des déchets et du surplus du mélange agarose/ BET	Gel et solution tampon contenant du BET après migration	Risque contact cutané	BPL, blouse, gants Étiquetage des déchets Dépose gel et solution dans un bidon, traitement sur charbon activé avant incinération



Documents
pour le médecin
du travail
N° 85
1^{er} trimestre 2001

PCR radioactive (laboratoire 1, technicien de laboratoire)

Cette manipulation intervient dans un protocole beaucoup plus long d'étude de microsatellites d'ADN. La technique de PCR radioactive permet d'éviter certaines étapes de pré-hybridation et hybridation avec des sondes marquées. L'objectif est d'amplifier les microsatellites d'ADN tout en les marquant au ^{32}P par incorporation directe d'un nucléotide radioactif dans le tampon de la réaction. Cette méthode qui permet de préparer moins de microsatellites, est plus rapide, plus simple et les signaux radioactifs sont plus forts.

L'expérimentateur porte une blouse en coton à manches longues, ne porte pas de gants et a des

lunettes correctrices. Il connaît les risques de la radioactivité et des produits utilisés. Un protocole écrit (réactifs à utiliser, composition des solutions, concentrations, temps), plusieurs fois modifié pour les besoins des expérimentations, lui sert de référence ; des calculs restent nécessaires pour adapter les concentrations. Le technicien commence par la préparation minutieuse des micro-plaques de PCR (plaques plastifiées standardisées comportant, selon les besoins, de 20 à 48 puits d'un volume de l'ordre de quelques micro-litres - 32 puits dans la manipulation observée). Les lignes et colonnes formées par les puits sont notées sur la plaque

FICHE D'ÉTUDE DE POSTE 3
PCR radioactive (pour amplification élective de microsatellites et marquage radioactif pour révélation)

Laboratoire 1 ; technicien de laboratoire ; durée totale : 3 heures 30

Matériel et méthodes	Produits utilisés	Observations	Prévention
Préparation de la microplaque (32 puits), marquage au feutre		Etape initiale \approx 15minutes	Pièce dédiée à la PCR blouse
Remplissage des 32 puits :		Importance de ne pas souiller la manipulation	Sous hotte ventilée et éclairée Connaissance des risques des produits utilisés
- Remplissage 1	ADN : 5 μl /puits, 1 ADN différent par colonne	Gestes précis, répétés, attention soutenue (\approx 15 minutes)	Micropipette automatique à cônes jetables
- Remplissage 2, même ordre pour chaque puits	Huile : 1 goutte par puits	Idem	Idem
- Remplissage 3 (3 ^e couche dans les puits)	Microsatellites : 5 μl /puits, 1 type différent par ligne	Idem	Idem
- Centrifugation de la plaque		(\approx 5 minutes)	Centrifugeuse sous hotte
- Remplissage 4	Solution tampon (MgCl_2 , nucléotides, SDS) : 10 μl /puits	Remplissage délicat pour ne pas faire mousser le SDS (sans secouer tube et pipette), (\approx 15 minutes)	Sous hotte, micropipettes automatiques à cônes jetables
- Remplissage 5	Taq polymérase : 0,076 μl /puits	Microtubes conservés dans glace, pipetage minutieux (\approx 15 minutes)	Idem
Changement de lieu pour passage en pièce « chaude »		Déplacement avec plaque, puits demi-remplis (risque de chute de la plaque)	Plaque recouverte
Dernier remplissage	Ajout de dCTP marqué au ^{32}P	Risques liés à la manipulation de la radioactivité (\approx 20 minutes)	Connaissance du risque radioactivité Ajout de gants, écran et boîte fermée en plexiglas, dosimètre, compteur Geiger
Centrifugation en pièce « chaude »	Radioactivité	Déplacements avec la plaque Surveillance de la centrifugeuse, vérification absence de contamination (\approx 10 minutes)	Idem
Mise en place de la plaque dans machine à PCR, programmation pour 30 cycles	Radioactivité	Déplacements avec la plaque Durée 2 heures	Idem

PLAQUE PCR UTILISÉE DANS L'ÉTUDE DE POSTE 3

	ADN 1	ADN 2	ADN 3	ADN 4
Microsatellites A	●	●	●	●
Microsatellites B	●	●	●	●
Microsatellites C	●	●	●	●
Microsatellites D	●	●	●	●
Microsatellites E	●	●	●	●
Microsatellites F	●	●	●	●
Microsatellites G	●	●	●	●
Microsatellites H	●	●	●	●

à l'aide d'un feutre (fig. ci-dessus). Les remplissages successifs de ces puits avec les différents produits et nucléotides sont des opérations à la fois minutieuses (micropipetages, attention soutenue nécessaire pour respecter l'ordre de remplissage avec des concentrations et des compositions différentes pour chaque puits, suivi stricte des quantités) et répétitives (gestes répétés 32 fois x nombre de remplissages). Ce travail est fait sous hotte dans le but principal de préserver la manipulation. A chaque changement de produit, le cône stérile du micropipetteur est changé et jeté dans un récipient prévu à cet effet. La première phase de remplissage consiste en un micropipetage de 5 ml d'ADN déjà préparé (ADN à étudier différents selon les colonnes) ; les gestes doivent être précis (ne pas toucher le fond du puits), vifs (pour vider d'un seul coup le contenu de la pipette sans créer d'aérosols), réfléchis (respect de l'ordre de remplissage des puits pour ne pas en oublier un, ce qui n'est visible qu'en se penchant franchement au-dessus de la plaque, posture difficile

sous hotte) ; ils sont répétitifs, avec surtout des mouvements du poignet et une pression du pouce droit pour chaque expulsion de liquide. La même manipulation est répétée pour ajouter dans chaque puits une goutte d'huile qui sert d'interface avec les microsatellites. Chaque ligne de 4 puits est ensuite remplie de 8 microsatellites différents étiquetés dans des tubes conservés au froid. A ce stade, on effectue une centrifugation de la plaque, sous la hotte, pour homogénéiser ce premier mélange. Le même enchaînement de gestes se répète pour ajouter la solution tampon, kit tout prêt et spécifique de la Taq polymérase utilisée. Cette manoeuvre est rendue plus délicate que les autres pipetages par la propriété qu'a le SDS de mousser ce qui nécessite de limiter les mouvements du tube et de ne pas brusquer l'injection dans le puits. La Taq polymérase, conservée dans un bac de glace, est ensuite ajoutée à la quantité de 0,076 ml par puits. Avant la dernière opération, la plaque est recouverte pour permettre le déplacement dans la pièce « chaude ». Des précautions supplémentaires sont prises : ajout de gants, travail derrière un écran ou boîte en plexiglas d'une épaisseur d'au moins 1 mm, port du dosimètre sur la blouse au niveau du thorax et vérification régulière du taux de radioactivité par compteur Geiger. Le dernier remplissage est celui qui correspond à l'ajout de la quantité manquante de dCTP marquée au ^{32}P dans chaque puits. La plaque est de nouveau centrifugée pour homogénéiser le mélange et placée dans la machine à PCR que l'expérimentateur programme pour 30 cycles d'amplification, soit environ 2 heures (centrifugeuse réservée à cette pièce, plaque déplacée à l'aide de la boîte en plexiglas fermée).

Préparation d'ARN (laboratoire 2, étudiant)

Les ARN sont préparés à partir de cellules d'aorte de lapin (conservées à l'étuve dans des boîtes de Pétri fermées hermétiquement). La disposition du laboratoire occasionne des déplacements dans les couloirs et escaliers avec les boîtes de culture et les flacons de produits.

L'expérimentateur porte une blouse en coton à manches courtes et des gants stériles qu'il change à intervalles réguliers. Il commence par préparer la solution détergente qui provoquera l'éclatement des cellules et la libération des acides nucléiques : mélange de thiocyanate de guanidine (solution déjà préparée - à partir de la poudre, manipulée avec masque et gants - conservée à température ambiante dans une bouteille de verre entourée d'une feuille d'aluminium), avec du

Sarcosyl® (sodium lauryl sarcosinate) formant le tampon de lyse. Le travail sur cellules est fait sous la hotte située dans la pièce de culture. L'opérateur ne porte pas de gants mais prend toutes les dispositions pour ne pas souiller ses cultures : lavage des mains à l'alcool, nettoyage de la surface de travail à l'alcool, utilisation de pipettes stériles stockées sous la hotte. La préparation des milieux nutritifs (glucose et protéines) se fait sans manipulation d'antibiotiques ou de produits chimiques. Les cellules sont récupérées par raclage doux des cultures et sont transférées par micropipetages successifs et délicats dans de petits tubes. L'opérateur se rend ensuite dans le laboratoire où se trouve la hotte utilisée pour les produits chimiques toxiques. Les manipulations dans cette hotte sont rendues difficiles

ÉTUDE DE POSTE 4



Documents
pour le médecin
du travail
N° 85
1^{er} trimestre 2001

par son encombrement (stockage de nombreux flacons de produits) et par le positionnement de l'écran de protection qui ne laisse que le passage des mains. L'opérateur ajoute dans chacun des tubes une micro-quantité de β -mercaptoéthanol (flacon conservé dans un tube fermé, étiqueté et abrité de la lumière par une feuille métallisée). Le mélange se fait à l'aide de micropipettes automatiques à cône terminal jetable. Les déchets sont laissés sous la hotte dans un flacon prévu à cet effet. Les tubes sont ensuite hermétiquement fermés, annotés (composition et date) et sont amenés dans une autre pièce pour la congélation à moins 80 °C. L'emplacement dans les congélateurs des différents tubes est codifié et chaque expérimentateur y dispose d'une place déterminée. Ces congélateurs sont régulièrement vérifiés (fonctionnement, température, date des tubes). Une batterie peut prendre le relais en cas de problème d'alimentation électrique.

L'étape suivante est la préparation d'un gel d'agarose pour l'électrophorèse des acides nucléiques. L'opérateur garde sa blouse, mais ne porte pas de gants (en revanche, il explique qu'il met des gants lorsqu'il manipule de l'acrylamide). La solution tampon est déjà prête (TBE). L'agarose en poudre est pesé sur une petite balance électronique. La poudre est mélangée avec la solution tampon par transvasement et le mélange est chauffé au four micro-ondes. L'opérateur utilise un linge pour sortir le flacon chaud où le liquide est encore en ébullition et l'agite pour obtenir un meilleur mélange. Il se méfie des projections et pratique bras éloignés du corps. La solution est ensuite laissée au repos (quelques mn). Le BET n'est pas ajouté dans le gel, mais dans le bain de migration qui est composé de la même solution tampon que celle du gel (TBE).

FICHE D'ÉTUDE DE POSTE 4

Préparation d'ARN (pour étude des ARN par électrophorèse sur gel d'agarose)

Laboratoire 2 ; étudiant ; durée totale : environ 2 heures

Matériel et méthodes	Produits utilisés	Observations	Prévention
Préparation de la solution détergente (tampon de lyse des cellules)	Thiocyanate de guanidine (déjà en solution) + Sarcosyl® (sodium lauryl sarcosinate)	(≈ 15 mn)	Blouse, gants changés régulièrement, pipetage automatique avec cônes jetables (masque et gants pour manipuler la poudre à l'étape précédente)
Préparation milieux nutritifs Récupération des cellules sur milieu de culture, transfert dans des tubes	Glucose et protéines (ni antibiotiques, ni autre produit chimique)	Déplacements Micropipetages et raclages successifs très délicats (≈ 30 mn)	Mesures pour éviter souillures des cultures - sous hotte - pas de gants, mais lavage des mains à l'alcool - micropipettes stériles
Ajout dans chaque tube (dans autre pièce)	β Mercaptoéthanol (microquantité)	Déplacements Produit stocké dans hotte encombrée Posture difficile (≈ 30 mn)	Sous hotte ventilée avec écran de protection baissé, Utilisée pour produits chimiques toxiques Micropipettes
Fermeture et étiquetage des tubes, transport dans autre pièce, puis congélation		Déplacements	
Préparation gel d'agarose (pesée, puis mélange)	Agarose en poudre + solution tampon TBE	Transvasement, pesée par tâtonnement (≈ 20 mn)	Blouse, pas de gants
Chauffage au micro-ondes	Même mélange	Déplacements Flacon chaud, liquide bouillant + agitation manuelle, secousses (risque de brûlures cutanées, de projections cutanées et oculaires) (≈ 20 mn)	Linge pour protection contre la chaleur, manipulation bras éloignés du corps
Phase de repos de la solution avant coulage du gel	Idem (le BET n'est pas ajouté dans le gel, mais sera mis dans le bain de migration, avec le TBE)		

Préparation de solutions d'extraction (laboratoire 3, chercheur)

Un protocole complet expose les compositions des solutions, leurs concentrations et les pH. La solution de PMSF est préparée à partir de paillettes très volatiles. L'opérateur en connaît le caractère nocif et corrosif : il porte blouse, gants, masque anti-poussières, lunettes (de correction) et limite courants d'air et déplacements pendant la manipulation. La pesée est délicate, elle est effectuée par légers tapotements sur le flacon (0,348 g) qui est ensuite refermé hermétiquement avec un film paraffine et replacé dans l'armoire où il est conservé étiqueté. Après transvasement dans un tube isopropylène, le PMSF est dilué avec 20 ml

d'isopropanol. La solubilisation n'étant pas instantanée, l'opérateur secoue le tube après l'avoir fermé. S'il y a contact, même avec les gants, il se lave immédiatement les mains à grandes eaux. A ce stade, il enlève le masque, sachant qu'en solution le PMSF n'est plus volatil, et prépare des aliquotes ⁽¹⁾ de solution, en remplissant 20 tubes Eppendorf® de 1 ml (avec une pipette automatique à cônes jetables). Ces solutions sont congelées à moins 20 °C pour les conserver en évitant la dégradation du PMSF.

La seconde préparation est celle d'une solution de DTT à partir de la poudre cristallisée, non volatile

FICHE D'ÉTUDE DE POSTE 5

Préparation de solutions d'extraction (pour extractions d'acides nucléiques)

Laboratoire 3 ; chercheur ; durée totale : environ 2 heures 30

Matériel et méthodes	Produits utilisés	Observations	Prévention
Préparation de la solution de PMSF			
Pesée de la poudre et mise en solution	PMSF en poudre + solution isopropanol (concentration en alcool < 1 %)	Paillettes très volatiles, pesée délicate, transvasements, agitation manuelle du flacon (fermé)	Blouse, gants, lunettes correctrices (et non de protection), masque antipoussières Flacon étiqueté Porte du laboratoire fermée et limitation des déplacements
Après mélange (20 ml), séparation en 20 tubes de 1 ml, puis congélation	Solution de PMSF	Pipetage (≈ 40 minutes)	Retrait du masque (produit en solution, non volatil) Pipette automatique
Préparation de la solution de DTT			
Pesée de la poudre et mise en solution	Dithiotréitol (DTT) en poudre + acétate de sodium 0,1 M	Poudre cristallisée odeur désagréable, irritante pour la peau et les muqueuses, flacon étiqueté Agitation par secousses successives (tube fermé) Filtration sur membrane Pipetage (≈ 40 minutes)	Gants, lunettes correctrices (pas de lunettes de protection) Pipettes automatiques Étiquetage avec symbole et phrases de risque
Filtration, séparation en 20 tubes de 1 ml, puis congélation			
Préparation de 2 solutions à pH différents	Addition d'acide acétique en proportion variable	Ajustement délicat du pH, par tâtonnement ≈ 20 minutes	Gants, lunettes Pipettes automatiques
Préparation de la solution de TBE			
Pesée et mise en solution Ajustement final du volume	TRIS en poudre + acide borique en poudre + EDTA en solution + eau stérile	Préparation d'une grande quantité, pesée des poudres, pipetage de l'EDTA à la bouche Agitation par agitateur magnétique (≈ 20 minutes)	Pas de blouse, pas de gants, pas de masque, lunettes correctrices BPL non respectées
Autoclavage de la solution		120 °C pendant 20 minutes	

d'odeur désagréable, contenue dans un flacon fermé, étiqueté avec symbole et phrases de risque (irritant pour la peau, les muqueuses oculaires et respiratoires). Il remet des gants et porte des lunettes correctrices. La dissolution de 3,09 g de DTT (pesée délicate) se fait dans 20 ml d'acétate de sodium 0,1 M (pH 5,2), en mélangeant par secousses successives le tube de polypropylène fermé par un film de paraffine. Le mélange est ensuite filtré à travers une membrane de 0,22 µm de diamètre pour éliminer les impuretés avant d'être séparé en 20 aliquotes de 1 ml par pipetage automatique dans des tubes Eppendorf®, qui seront congelés à moins 20 °C pour conservation. D'autres solutions de composition identique mais avec des concentrations différentes ou des pH différents sont préparées pour les besoins des expériences. La variation du pH est

obtenue en ajoutant de l'acide acétique dans les solutions d'acétate de sodium (proportion d'acide acétique d'environ 1/10^e du volume total). L'acide acétique est manipulé avec gants et lunettes.

Une solution TBE est ensuite préparée en grande quantité (très utilisée et se conservant très longtemps). L'opérateur ne porte ni blouse, ni gants, ni masque ; il porte des lunettes correctrices. Il pèse 54 g de TRIS en poudre, les transvase dans un flacon, ajoute 27,5 g d'acide borique en poudre. Il pipette à la bouche 20 ml d'EDTA sachant qu'il s'agit d'un produit non toxique et les verse sur les poudres. Il dilue ensuite avec de l'eau stérile et mélange avec un agitateur magnétique. L'ajustement final se fait avec de l'eau stérile pour obtenir 1 litre de solution.

Marquage de sondes d'ADN et hybridation moléculaire (laboratoire 4, chercheur)

Le protocole débute par le marquage de l'ADN avec du ³²P. Une préhybridation de l'ADN avec de l'ADN de sperme de saumon est nécessaire pour saturer les sites non spécifiques avant la synthèse des sondes radioactives. Une hybridation ADN/ARN (support : membrane de nylon) peut alors se faire.

Pour le marquage de l'ADN, l'opérateur ne porte pas de blouse, mais met des gants ; il porte des lunettes correctrices. L'ADN est mélangé avec de l'eau stérile par micropipetage et placé à 95 °C pendant 5 mn dans un bain marie pour le dénaturer (séparation des brins), puis immédiatement dans la glace pendant 1 mn. La solution tampon (kit tout prêt livré avec l'enzyme qui contient du TRIS-HCl et du chlorure de magnésium) est ajoutée, ainsi que les désoxyribonucléotides, puis les amorces hexanucléotidiques et l'enzyme. Le mélange est mis à reposer pendant 30 mn dans une étuve à 37 °C pour permettre l'élongation de l'ADN. Pour l'arrêter et saturer les sites non spécifiques, l'opérateur ajoute 30 ml d'une solution qu'il prépare dans un tube (23 ml d'une solution TE déjà prête, puis 3 ml d'EDTA à 50 mM, puis 3 ml d'ADN de sperme de saumon et enfin 15 ml de chlorure de sodium 5M) ; pour que le mélange s'effectue, il place le tube sur le vortex (quelques mn) et le centrifuge (quelques mn). Il manipule ensuite dans une enceinte close en plexiglas (laissant juste deux ouvertures pour les mains), après vérification de l'absence de radioactivité par compteur Geiger. Au mélange précédant, et après superposition d'une deuxième paire de gants, il ajoute 5 ml de dCTP marqués (conservé au congélateur dans du plomb et

une boîte fermée en plexiglas). Il centrifuge le tout (la centrifugeuse est utilisée exclusivement pour les mélanges marqués) puis ajoute 2 ml d'enzyme et laisse reposer de nouveau 30 mn à 37 °C (synthèse des brins complémentaires avec incorporation des nucléotides marqués). Puis il précipite la sonde avec 160 ml d'éthanol absolu pendant 5 mn (plusieurs aspirations et refoulements successifs avec la pipette) et centrifuge pendant 10 minutes. Il élimine le surnageant (qui contient les excès de radioactivité, des sels et de l'éthanol) et le met à décroître. Il rince le culot à l'éthanol à 70 °C, le laisse sécher et le reprend dans 500 ml de solution TE pour le dissoudre.

Pour hybrider l'ARN avec l'ADN marqué, une préhybridation est nécessaire. L'opérateur plonge la membrane de nylon sur laquelle se trouve les ARN dans une large cuve avec le tampon de préhybridation préparé à l'avance (40 ml de formamide désionisé à 40 %, 18 ml de NaCl 5M, 10 ml de phosphate de sodium 0,5 M, 1 ml d'EDTA 2M, 0,5 ml d'ADN de sperme de saumon à 0,05 mg/ml avec 4 ml de sa solution tampon, 10 ml de sulfate de dextran à 5 %, 10 ml de SDS à 1 % et 6,5 ml d'eau stérile). Il place le tout dans une étuve à 45 °C pendant 1 heure, temps de saturation des sites non spécifiques. Enfin, après lavage, il positionne la membrane dans un tampon d'hybridation (même composition sans l'ADN de sperme de saumon, mais avec ajout du mélange préparé ci-dessus qui contient les sondes d'ADN marquées) et laisse la préparation dans l'étuve à 46 °C pendant une nuit.

FICHE D'ÉTUDE DE POSTE 6

Marquage de sondes d'ADN et hybridation moléculaire (pour hybridation ARN/ADN marqué)

Laboratoire 4 ; chercheur ; durée totale : environ 4 heures (en dehors de la phase d'hybridation)

Matériel et méthodes	Produits utilisés	Observations	Prévention
Dénaturation ADN	ADN + eau stérile (micropipetage)	Chauffage à 95 °C pendant 5 minutes + glace pendant 1 minute	Pas de blouse, gants, lunettes correctrices (et non de protection)
Ajout solution tampon, mélange avec nucléotides, amorces et enzyme	TRIS + acide chlorhydrique + chlorure de magnésium	Solution prête à l'emploi (kit) (≈ 15 minutes)	Idem
Mise au repos à l'étuve (élongation de l'ADN)	Idem	30 minutes dans étuve à 37 °C	
Préparation et ajout d'une solution qui stoppe l'élongation	+ TE 23 µl (solution déjà prête) + EDTA 3 µl + ADN de sperme de saumon 3 µl + chlorure de sodium 15 µl	Micropipetages minutieux, mélange par vortex et centrifugation (≈ 15 minutes)	Gants, lunettes de correction Pipette automatique
Ajout des nucléotides marqués, puis de l'enzyme	+ dCTP marqué avec ³² P + enzyme 2 µl	Manipulations délicates + centrifugation (≈ 20 minutes)	Ajout 2 ^e paire de gants, enceinte close en plexiglas, compteur Geiger
Repos à l'étuve (incorporation des nucléotides marqués)	Idem	30 minutes dans étuve à 37°C	
Précipitation de la sonde, puis centrifugation et élimination du surnageant	Ethanol absolu 160 µl	Aspirations et refoulements successifs à la pipette (≈ 5 minutes + 10 minutes pour centrifugation)	Gants, lunettes correctrices
Rinçage du culot + séchage + reprise dans tampon pour dissolution	Ethanol à 70°, puis solution TE		Idem
Préhybridation (membrane de nylon supportant ARN marqué dans cuve de tampon)	Formamide 40 ml + NaCl 18 ml + phosphate de sodium 10 ml + ADN de sperme de saumon 4 ml + EDTA 1 ml + sulfate de dextran 10 ml + SDS 10 ml + eau stérile 6,5 ml	Préparation de la solution, transvasement dans cuve Temps de préhybridation = 1 heure à 45°C	Gants, lunettes correctrices Pipettes automatiques
Phase d'hybridation ARN/ADN	Même solution sans ADN de sperme de saumon, mais avec sondes radioactives + TE	Etuve à 45°C pendant une nuit.	Mêmes précautions que pour préparation sondes radioactives

4.3. RÉSULTATS ET COMMENTAIRES

Cette étude d'un type de risque particulier, ici le risque chimique, sur plusieurs postes de travail n'est pas une analyse ergonomique d'un poste comme le sous-entend le terme étude de poste mais plutôt un ensemble de données d'observations ciblées qui permettent une meilleure évaluation de l'exposition toxicologique. Cela émane de la volonté de diversifier les observations afin d'en ressortir les mesures de prévention les plus adaptées à ce type d'activité.

Analyse des résultats

De nombreuses variations interviennent dans l'organisation du travail en laboratoire :

- variabilité importante des manipulations selon les protocoles expérimentaux ; pour un même expérimentateur, les tâches peuvent être tout aussi multiples et diverses que répétitives et identiques : dans certains protocoles, on peut retrouver des dizaines de fois la même manipulation à effectuer au cours d'une même période (PCR multiples, confrontations de migrations par électrophorèses analytiques avec préparations de plusieurs gels identiques, comparaison de plusieurs échantillons, vérifications de résultats discordants...), dans d'autres cas les manipulations peuvent être beaucoup plus diversifiées et les techniques de travail différentes peuvent se chevaucher ou se succéder ;

- variabilité des manipulations par leur durée, les lieux où elles sont effectuées, les produits manipulés et les conditions de travail, pas toujours prévisibles ; les durées demandées par une manipulation, par la préparation des solutions, ou les temps que mettent certaines phases comme la centrifugation, la PCR ou encore l'hybridation moléculaire varient souvent d'une expérience à l'autre, ce qui nécessite une planification particulière, avec régulièrement chevauchement de deux voire trois manipulations, parfois sur plusieurs jours ; ceci est complexe pour le manipulateur dont les facultés d'adaptation doivent être importantes et les organisations de travail rigoureuses ;

- la charge de travail varie selon les expériences et les contraintes occasionnées par les aléas de la recherche en biologie : les sources de retards imprévus, les délais de livraison (des kits, des nucléotides, des cellules...), la souillure d'une culture ou d'une PCR qui rend les résultats inexploitable, une migration électrophorétique ininterprétable, un résultat incompatible avec le témoin sans raison apparente... toutes ces raisons, et d'autres, obligent à refaire l'ensemble de la technique et décalent l'expérience, donc les manipulations sui-

vantes. L'objectif même de l'expérience peut imposer un protocole différent pour une manipulation déjà connue, une modification de la durée, de la température, des concentrations... Aucune préparation n'est effectuée par réflexe, et la réflexion qu'occasionne ces changements n'inclut pas toujours les mesures de prévention. Alors qu'il est recommandé de rédiger pour chaque technique une procédure précise, détaillée, intégrant les mesures de prévention et devant être réécrite et approuvée lorsque des modifications sont mises au point, les difficultés dans la réalisation des manipulations font que cela n'est pas toujours effectué. Tout ceci est à l'origine d'un stress qui peut se révéler important et occasionner des erreurs de manipulation, ce qui est incompatible avec le calme et l'attention nécessités par la recherche fondamentale.

L'évaluation du risque chimique

Il est nécessaire d'étudier les protocoles, les conditions de travail et les comportements individuels pour évaluer le risque chimique et déterminer les mesures de prévention à mettre en œuvre.

Ces professions de laboratoires (chercheurs, techniciens, chimistes) sont particulières et de nombreuses différences apparaissent clairement entre manipulateurs ou entre laboratoires :

- les formes sous lesquelles les produits sont manipulés diffèrent selon les laboratoires, et, dans un même laboratoire, elles ne sont pas homogènes selon les manipulateurs. Certains préfèrent l'utilisation sous forme de poudre (forme régulièrement plus toxique, augmentant le risque, surtout celui lié à l'inhalation) plutôt qu'en solution aqueuse (forme préconisée pour sa toxicité moindre) ;

- l'hétérogénéité des méthodes de travail selon les expérimentateurs et la diversité des protocoles selon les objectifs de recherche scientifique en cours font qu'il n'existe pas de manipulations standardisées ; une même expérience avec utilisation des mêmes produits peut être réalisée de plusieurs façons selon le laboratoire ou selon l'expérience professionnelle du manipulateur, rendant les techniques opératoires très dépendantes de celui qui les effectue (temps, température, précision, ordre de mélange...) ;

Le facteur individuel est important dans la pratique de la biologie moléculaire, et l'évaluation du risque chimique doit être pris en compte, car souvent les risques de contact, de projections, d'inhalation et les durées d'exposition sont dépendantes de l'opérateur. La méthode d'expérimentation dépend de l'expérience professionnelle antérieure (formation et information) et de la perception personnelle du risque. Lorsque les expérimentateurs ne sont pas spécifiquement biologistes moléculaires (ou techniciens), mais pratiquent en parallèle d'autres spécialités biologiques (biologie cellulaire, immuno-histochimie...) ou lorsqu'ils se sont

secondairement orientés vers la biologie moléculaire, après un cursus initial différent, ils ont une connaissance moindre des produits utilisés en biologie moléculaire et de leurs règles de manipulation (pratique plus récente, apprentissage sur le terrain au fur et à mesure des besoins). Cette dimension pluridisciplinaire est à intégrer, car elle entraîne souvent une majoration du risque d'exposition par la méconnaissance, mais aussi par la plus grande multiplicité des produits manipulés.

Les bonnes pratiques de laboratoires (BPL)

Cet ensemble de règles simples, fondamentales concernant l'hygiène, l'organisation du travail et les consignes de sécurité, ne sont pas toujours respectées.

Tous connaissent ces BPL. Elles ne dépendent pas du produit utilisé, mais sont plutôt un art de travailler dans les laboratoires. On pourrait donc émettre l'hypothèse de leur respect strict ; en fait, les études de poste ont permis de constater que même les BPL ne sont pas toujours appliquées (ainsi, le pipetage à la bouche reste pratiqué - cf. étude de poste 5 - ce qui n'est pas admissible, même « justifié » par l'absence de toxicité du produit). Plusieurs facteurs interviennent : les convictions personnelles font que certains jugent les BPL trop rigoureuses ou trop générales et préfèrent les adapter au coup par coup en ciblant les mesures de prévention (surtout les protections individuelles) en fonction de leur connaissance du(des) produit(s) manipulé(s) ; les organisations de travail peuvent les rendre plus difficilement applicables (qu'elles soient inhérentes à l'opérateur ou à la structure organisationnelle du laboratoire) ; le manque de matériel (pas de masque ou de lunettes disponibles, hotte déjà occupée)... Enfin, en ce qui concerne les protections oculaires, on peut noter la confusion entre port de lunettes correctrices et protection oculaire, manifeste chez la plupart des opérateurs observés. En outre, certains impératifs de recherche expérimentale font parfois oublier les règles fondamentales à respecter (quand une manipulation a échoué, par exemple, le manque de temps peut entraîner gestes brusques, déplacements rapides, oubli de la nécessité de travailler sous hotte). À l'inverse, ces impératifs peuvent conduire à prendre des précautions supplémentaires à celles préconisées par l'utilisation de produits toxiques, quand il s'agit de protéger la préparation contre les éventuelles contaminations.

Les mesures de prévention spécifiques

L'application des mesures de prévention spécifiques à l'utilisation de chaque produit font l'objet des mêmes écarts dont le facteur déterminant est la méconnaissance du risque.

Les observations ont permis de constater que les mesures de prévention technique, imposées par l'usage de certains produits toxiques pour la santé, étaient plus ou moins respectées selon les expérimentateurs. Il res-

sort que le facteur le plus déterminant pour expliquer ces différences est la connaissance de la toxicité et, ce qui en découle, la perception du risque. Cette perception résulte d'abord d'une donnée globale qui repose sur la volonté (ou non) d'un laboratoire de sensibiliser l'ensemble des personnes y travaillant. Plusieurs acteurs peuvent intervenir à ce niveau : les responsables de laboratoire, les ingénieurs d'hygiène et de sécurité, les médecins du travail ou de prévention, les institutions représentatives du personnel et chaque salarié.

L'étude a également porté sur cette perception à l'échelon individuel. De nombreuses différences d'application des mesures de prévention ont été constatées. Les conversations avec les opérateurs ont permis de souligner les disparités concernant la connaissance et la prise de conscience du risque toxique. C'est aussi l'appréhension personnelle, voire l'inquiétude face à un produit (de toxicité connue, inconnue mais d'odeur désagréable, dont le nom évoque un risque ou dont l'étiquetage souligne la toxicité) qui conditionne les réflexes de travail, l'utilisation des moyens de protection collective et le port de protections individuelles. Cette sorte de crainte que certains ressentent (non toujours justifiée) peut être à l'origine d'un excès de mesures préventives, mais aussi d'un stress supplémentaire qui peut occasionner des erreurs de manipulation néfastes.

L'influence de la formation initiale

Qu'elle soit universitaire, scientifique, médicale, ou conduisant à un diplôme de technicien, la formation initiale est certainement un élément déterminant. La comparaison des procédures de travail et de l'application des mesures de prévention retrouve en effet de nombreuses différences selon le cursus antérieur des opérateurs : enseignements pratiques limités chez les étudiants qui rendent leurs gestes souvent malhabiles, protections individuelles plus ou moins portées selon la façon dont la technique a été apprise, connaissances plus ou moins larges selon la formation initiale ou continue qui inclue ou non des notions de risque toxique et de prévention.

En résumé, de l'ensemble de ces observations des points importants ressortent :

- des postes de travail où interviennent de nombreuses variations à prendre en compte en matière de prévention ;
- des différences selon les laboratoires ou à l'échelon individuel ;
- un manque d'information concernant le risque chimique ;
- des formations très différentes selon le cursus antérieur, ce qui conditionne autant les procédures de travail que les connaissances ou les applications des mesures de prévention.

Propositions

Un certain nombre de moyens d'action peuvent être proposés à l'issue de cette analyse des résultats d'études de postes :

Il apparaît important d'insister sur la **nécessité d'une formation appropriée et homogène, incluant les gestes et pratiques de prévention**, mais aussi d'une information précise, claire et dispensée à tous (opérateurs et acteurs de prévention). Des rappels réguliers de ces notions, avec des compléments chaque fois que des données nouvelles sont disponibles, concernant aussi bien la toxicologie que l'adaptation des mesures préventives, semblent indispensables afin de maintenir une prise de conscience permanente des risques toxicologiques inhérents à ces travaux de laboratoire. A cet égard, il faut souligner l'importance de la formation des opérateurs à la lecture de l'étiquetage et des phrases de risques.

Le rôle du médecin de prévention ou du médecin du travail (selon le statut du laboratoire) est important à cet égard, et les visites médicales périodiques doivent être autant l'occasion d'un interrogatoire précis sur les expositions, d'un examen clinique de dépistage (et/ou d'examen complémentaires adaptés aux expositions) que d'une information pour sensibiliser chaque fois l'opérateur. Il paraît bien évident que les études de postes sont complémentaires, pour évaluer les risques, les modalités d'exposition mais aussi pour poursuivre le travail d'information et de sensibilisation initié lors des visites médicales. Le médecin n'est pas le seul à devoir jouer ce rôle dans la prévention : à tous les niveaux (employeur, chef d'établissement, responsable administratif, ingénieur d'hygiène et de sécurité et ses correspondants dans les laboratoires, comités d'hygiène et de sécurité, ensemble des opérateurs), chacun doit prendre connaissance des risques et agir dans le sens de leur prévention, en rappelant que l'utilisation de produits moins toxiques doit être privilégiée lorsque cela est possible, et que les mesures de protection collective sont prioritaires par rapport aux mesures de protection individuelle.

Des pratiques d'information et de sensibilisation existent déjà dans certains laboratoires [24] ; elles peuvent servir de base : élaboration de fiches individuelles des risques professionnels (fiche présentant une liste des produits utilisés que l'opérateur complète en cochant ses expositions et remet au médecin de prévention qui peut adapter la surveillance médicale), fiches collectives d'exposition à remplir pour l'ensemble du laboratoire qui permettent de mettre à jour les listes de produits utilisés, de recenser tous les risques et de déterminer le nombre de personnes exposées... Dans un laboratoire, une étude est en cours qui

visait à attribuer à chaque tâche, un type de risque et une liste de produits, avec une estimation d'exposition par un système de logiciel informatique à plusieurs portes d'entrée pour créer une base de données utile à tous les préventeurs [25].

5. Conclusions

Pour évaluer le risque chimique dans ces laboratoires, l'étude théorique préalable des techniques de biologie moléculaire est indispensable. En effet, qu'il s'agisse de l'évaluation d'une exposition par l'interrogatoire lors de la visite médicale ou d'une étude de poste, la première étape reste toujours le descriptif d'une technique, avec une terminologie très spécialisée et un protocole parfois difficile à suivre.

Il faut garder en mémoire que le laboratoire est un milieu de multi-expositions chimiques où les risques toxiques se cumulent, ce qui nécessite une étude toxicologique complète de chaque produit incriminé. Actuellement, et devant le manque de données épidémiologiques, on tend à considérer le laboratoire de biologie moléculaire comme un milieu complexe à haut risque pour la santé, et à maximaliser la surveillance médicale autant que les mesures de prévention (d'autant que, si ce travail ne porte que sur le risque chimique, bien d'autres types de risques sont rencontrés dans ces laboratoires, liés notamment à l'utilisation d'agents biologiques, de produits radioactifs... [26, 27]). Dans ce sens, la poursuite des études de poste, avec l'idée de pouvoir créer une matrice de type emploi-exposition, et des études épidémiologiques paraissent nécessaires.

Les études de poste dans les laboratoires permettent de mieux évaluer le risque chimique et la façon dont il est perçu par les expérimentateurs, les méthodes de travail et les mesures de prévention appliquées. Des différences individuelles importantes, influencées par les différences de formation et d'expériences professionnelles, sont constatées. Elles reposent sur la connaissance ou non des risques des produits manipulés, dont certains sont d'utilisation récente et de toxicité non encore démontrée. Ceci souligne la nécessité de former et d'informer les personnes exposées, et en particulier de les former à la lecture des étiquetages.

Le médecin de prévention, avec les autres acteurs de prévention, a un rôle à jouer à ce niveau. Pour mieux appréhender les risques, c'est-à-dire les identifier, les évaluer, les analyser et les comprendre, il doit s'aider de ses observations des procédés de travail lors de son

tiers-temps et des données bibliographiques récentes sur la toxicité des produits peu connus. C'est ainsi qu'il pourra participer à la mise en oeuvre des moyens de prévention pour limiter ou soustraire les risques chimiques et adapter son suivi médical. Enfin, il paraît essentiel de motiver les chercheurs, lors de la mise au

point ou de la modification de techniques de biologie moléculaire, à y intégrer la sécurité des manipulateurs en privilégiant l'utilisation de produits les moins toxiques possibles, en application du principe de substitution.

Éléments bibliographiques

- [1] KRUH J. - La biologie moléculaire. Que sais-je ? Paris, Presses universitaires de France, 1994.
- [2] KAPLAN J.C., DEPECH M. - Biologie moléculaire et médecine. Paris, Médecine-sciences, Flammarion, 1995, 2^e éd.
- [3] GORNY P. - L'aventure de la médecine. Paris, J.C. Lattes, 1991.
- [4] MORANGE M. - Histoire de la biologie moléculaire. Paris, La découverte, Histoire des sciences, 1994.
- [5] LEHN P. - Le balbutiement nécessaire des essais cliniques. *La recherche*, 1998, **315**, pp. 61-62.
- [6] KICHLER A., DANOS O. - La transgénèse sans l'aide des virus ? Des vecteurs entièrement synthétiques tentent de mimer les mécanismes viraux. *La recherche*, 1998, **315**, pp. 58-60.
- [7] SASCO A.J. - Risques pour la santé dans les laboratoires de recherche biologique et médicale. Le point sur les connaissances épidémiologiques actuelles. *Médecine Sciences*, 1989, **5**, pp. 489-498.
- [8] VECCHIO D. - Modello di intervento informatizzato e analisi epidemiologica dei lavoratori della sanità, agricoltura, biotecnologie e delle industrie annesse operanti nelle zone transfrontaliere italo-francesi-interreg II. Convegno : La tutela della salute dei lavoratori : sicurezza e qualità del lavoro., Genova, novembre 1996.
- [9] BROWN T.P., PAULSON J., PANNETT B. ET COLL. - Mortality pattern among biological research laboratory workers. *British Journal of Cancer*, 1996, **73**, pp. 1152-1155.
- [10] CARPENTIER L., BERAL V., ROMAN E., SWERDLOW A.J., DAVIES G. - Cancer in laboratory workers. *The Lancet*, 1991, **338**, pp. 1080-1081.
- [11] CORDIER S., MOUSEL M.L., LE GOASTER C. ET COLL. - Cancer risk among workers in biomedical research. *Scandinavian Journal of Work and Environmental Health*, 1995, **21**, pp. 450-459.
- [12] CORDIER S. - Risk of cancer among laboratory workers. *The Lancet*, 1990, p. 1097.
- [13] SASCO A.J. - Cancer risk in laboratory workers. *The Lancet*, 1992, **339**, p. 684.
- [14] SASCO A.J. - Méthodes de recueil et d'enregistrement des données d'exposition lors d'une étude épidémiologique en milieu de travail. L'exemple de l'étude rétrospective de mortalité pour les travailleurs des laboratoires de recherche. Extrait du rapport technique n°14 du CIRC. Lyon, Centre international de recherche contre le cancer, 1992.
- [15] WENNBORG H., YUEN J., AXELSSON G., AHLBOM A., GUSTAUSSON P., SASCO A.J. - Mortality and Cancer Incidence in Biomedical Laboratory Personnel in Sweden. *American Journal of Industrial Medicine*, 1999, **35**, pp. 382-389.
- [16] DAVID J.C. - Eléments de sécurité en biologie moléculaire. Paris, Médecine-sciences, Flammarion, 1997.
- [17] MANIATIS T., FRITSCH E.F., SAMBROOK J. - Moléculaire cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- [18] INSERM - Prévention des risques professionnels spécifiques. Expérimentation en biologie. Tome 1 : Notions générales de prévention. Les différents risques et leur prévention. Tome 2 : Principes généraux d'agencement et d'équipement de laboratoire. Tome 3 : Conception des protocoles expérimentaux. Analyse des risques et prévention dans des exemples de techniques expérimentales. Cahiers de l'INSERM et du CNED. Paris, Ed. Inserm, 1999.
- [19] Recueil des fiches toxicologiques, Paris, INRS, ED 613 ou CD 613, 2000.
- [20] Sélection de sites Web pour le préven- teur sur le risque chimique. *Documents pour le Médecin du Travail*, 2000, **81**, pp. 102-107.
- [21] Produits chimiques cancérigènes, mutagènes, toxiques pour la reproduction. Classification réglementaire. Tiré à part des *Cahiers de Notes Documentaires-Hygiène et Sécurité du travail*, ND 2063, mise à jour en décembre 1998.
- [22] Classification, emballage et étiquetage des substances et préparations chimiques dangereuses. *Guide de classification et d'étiquetage*. Méthodes d'essais. Tiré à part des *Cahiers de Notes Documentaires-Hygiène et Sécurité du travail*, ND 1961, mise à jour en décembre 1998.
- [23] Valeurs limites d'exposition profes- sionnelle aux agents chimiques en France. *Cahiers de Notes Documentaires-Hygiène et Sécurité du travail*, 1999, **174**, ND 2098, pp. 59-77.
- [24] RIASSE C. - Démarche du médecin du travail pour étudier l'utilisation de produits cancérigènes dans un centre de recherche. *Archives des Maladies Professionnelles*, 1997, **58**, 3, pp. 228-229.
- [25] LERY L., MARTIN J.M., DARTOIS E. - Acquisition assistée de tâches pour la préven- tion des risques professionnels à l'INSERM. *Archives des Maladies Professionnelles*, 1999, **60**, 1, pp. 18-28.
- [26] PICOT A., GRENOUILLET P. - La sécurité en laboratoire de chimie et biochimie : 2^e édition, Paris, Lavoisier, 1992, 452 p.
- [27] TRIOLET J., MAIRESSE M. - Manipulations dans les laboratoires de chimie ; Risques et prévention. *Cahiers de Notes Documentaires-Hygiène et Sécurité du travail*, INRS, 1998, **173**, ND 2092, pp. 429-444.

INRS, Institut national de recherche et de sécurité, 30 rue Olivier-Noyer 75 680 Paris cedex 14

Tiré à part de *Documents pour le Médecin du Travail* 1^{er} trimestre 2001, n° 85 - TC 81 - 300 ex. - N CPPAP 2094
AD/PC/DC du 16/04/87. Directeur de la publication : J.L. Marié - ISSN 0339-6517 - ISBN 2-7389-0980 - 9.