

Règlement du laboratoire de culture cellulaire L1

Bâtiment IDA – Pièce H5

I. REGLES GENERALES

A. AUTORISATION D'ACCES

B. LES RISQUES EN L1

- 1) Les risques biologiques
- 2) Les voies d'entrée dans l'organisme
- 3) Les niveaux de confinement
- 4) Les postes de sécurité microbiologique (PSM)
- 5) L'inactivation et l'élimination des déchets issus du L1

II. PROCEDURES D'ACCES

A. PROCEDURE D'ENTREE

- 1) Entrée dans le L1
- 2) Ce qui ne peut pas entrer dans le L1
- 3) Elimination des déchets liquides

B. PROCEDURE DE SORTIE

- 1) Avant de sortir du L1
- 2) Sortie du L1

III. TRAVAIL DANS LE L1

A. REMARQUES GENERALES

B. UTILISATION DES POSTES DE SECURITE MICROBIOLOGIQUE

- 1) Organisation du travail sous le PSM
- 2) En fin de travail sous le PSM
- 3) En cas de contamination du PSM sous le plan de travail

C. UTILISATION DE LA CENTRIFUGEUSE

D. CONDUITE A TENIR EN CAS D'INCIDENT OU D'ACCIDENT

- 1) Projections ou blessures
- 2) Cas d'une contamination légère du local
- 3) Cas d'une contamination importante du local

IV. SORTIE D'ECHANTILLONS DU L1

A. SORTIE DE CELLULES

B. EVACUATION DES DECHETS

- 1) Evacuation des poubelles de déchets biologiques solides (poubelles jaunes)
- 2) Evacuation des déchets liquides
- 3) Elimination des casques contaminés

V. ENTRETIEN DU L1

A. REGLES GENERALES

- 1) Echéancier
- 2) Attribution des responsabilités

B. ENTRETIEN MENSUEL

- 1) Nettoyage
- 2) Vérification des incubateurs
- 3) Réapprovisionnement en consommables à l'intérieur du L1

VI. MAINTENANCE

I. REGLES GENERALES

A. AUTORISATION D'ACCES

L'accès au PSM du L1 IDA (pièce H5) est strictement réservé aux personnes autorisées par le responsable :

Frédéric SUBRA, poste 7741 ou 0626610627 pièce 119, Institut d'Alembert, fsubra@ens-cachan.fr

La liste des personnes autorisées est affichée à l'entrée du laboratoire. Chacun des utilisateurs s'engage à respecter les règles de bonnes pratiques présentées ci-après et à participer à l'entretien du L1.

- **Tout nouvel utilisateur doit être informé et formé par son responsable de projet (ou par une personne compétente désignée par le responsable de projet en accord avec le responsable du L1).**
- **L'attestation de réussite au module « risque biologique » de l'application NEO est un préalable obligatoire.**
- **Tout nouveau projet doit avoir fait l'objet d'une déclaration préalable (selon le modèle joint en annexe à ce règlement) validé par le responsable des installations présentes en pièce H5.**
- **Toute utilisation des équipements présents dans le laboratoire L1 doit faire l'objet d'une réservation sur l'application GRR (<http://www.ifr.ens-cachan.fr/reservation/>): les utilisateurs impliqués sur plusieurs projets doivent préciser l'acronyme du projet concerné.**

B. LES RISQUES EN L1

Le règlement du L1 a été rédigé en tenant compte de la législation concernant les laboratoires de niveau de sécurité biologique 1.

1) Les risques biologiques

Bactéries, virus, prions, parasites et champignons. Ces agents biologiques sont classés en quatre groupes de risque, du plus faible (1) au plus important (4).

Groupe 1 : N'est pas susceptible de provoquer une maladie chez l'homme.

Groupe 2 : Peut provoquer une maladie chez l'homme, mais sa propagation est peu probable. Des traitements ou des prophylaxies existent.

Groupe 3 : Est pathogène pour l'homme et sa propagation est possible, mais des traitements ou des prophylaxies existent généralement.

Groupe 4 : Cause de maladie grave chez l'homme, risque de propagation élevé, et il n'existe pas de moyen prophylactique, ni de traitement efficace.

Les prions, sans transmission par voie aérienne, sont rattachés au groupe 3.

Prélèvements biologiques humains/animaux. Le risque provient de la présence possible d'agents pathogènes. Un échantillon biologique provenant d'un donneur sain peut être porteur d'agents pathogènes pour le manipulateur.

Tout matériel biologique d'origine humaine/animale, doit donc être considéré comme potentiellement dangereux et manipulé en L1 au moins, avec les protections individuelles appropriées (blouse, gants, ...) et sous poste de sécurité microbiologique (PSM) de type II.

L'expérimentation sur du matériel biologique humain prélevé sur le personnel du laboratoire est interdite, à cause du risque accru de réimplantation accidentelle après modification.

Cultures cellulaires. Les cultures primaires (cellules à durée de vie limitée) présentent les mêmes risques que les échantillons biologiques humains/animaux évoqués précédemment.

Les lignées cellulaires établies (cellules à durée de vie indéfinie), issues de tumeurs ou immortalisées/transformées artificiellement, présentent le risque d'une réimplantation accidentelle chez le manipulateur, susceptible d'induire la formation d'une tumeur. Les critères d'évaluation du risque sont la distance phylogénétique, la vitesse de prolifération et le mode d'immortalisation.

Les cultures de cellules de mammifères non primates peuvent, dans certaines conditions (traitement activateur, transduction par un rétrovirus recombinant), exprimer des rétrovirus endogènes et produire des particules virales infectieuses, incapables de réinfecter leur hôte mais capables d'infecter d'autres espèces au sein desquelles elles se multiplient, se propagent et se transmettent (cas des rétrovirus murins xénotropes capables d'infecter l'homme). Bien que de probabilité difficile à évaluer, ce phénomène a été décrit dans la littérature. Il est donc raisonnable de ne pas considérer d'emblée la manipulation de lignées cellulaires murines (ou d'autres mammifères non primates) comme totalement dépourvue de risque.

Le risque lié à la manipulation de lignées cellulaires peut également provenir des techniques de culture cellulaire : milieu de culture utilisé, présence de sérum, immortalisation des cellules, quantités manipulées, traitements appliqués (hormones, facteurs de croissance, antibiotiques, agents génotoxiques, promoteurs de tumeurs...).

Cas des organismes génétiquement modifiés (OGM). La modification du matériel génétique d'un agent biologique modifie potentiellement le risque associé à la manipulation de cet agent. Exemples : production d'une molécule toxique, augmentation de la vitesse de prolifération cellulaire, accroissement de la stabilité dans l'environnement... Toutes les catégories précitées sont concernées : virus (en tant que vecteurs) et micro-organismes recombinants, cellules infectées ou transfectées, tissus provenant d'animaux transgéniques, broyats de cellules d'OGM...

Le risque associé aux vecteurs viraux est lié à leur éventuelle capacité à s'intégrer dans le génome de l'hôte, à recombinaison avec des séquences de l'hôte, à être complété par des séquences de l'hôte.

Les séquences d'ADN insérées peuvent également présenter un risque : ADN codant une protéine toxique, ADN issu d'un micro-organisme pathogène, oncogène... Les mesures prises visent à éviter leur dissémination.

Les OGM sont classés en deux groupes.

Groupe I : Organismes non pathogènes de classe 1 pour lesquels la nature du vecteur et de l'insert ne justifie pas une modification de la classe de risque.

Groupe II : Organismes autres que les précédents, de classes de risque 2, 3 ou 4.

Pour les lignées cellulaires commerciales (ATCC), adopter le niveau de confinement recommandé par le fournisseur, sinon procéder comme pour les lignées non commerciales.

Pour les lignées non commerciales, adopter le niveau de confinement L1 au moins si les cellules sont :

- d'origine humaine ou simienne,
- tumorales de mammifères,
- immortalisées par un virus ou un oncogène,
- OGM du groupe I.

2) Les voies d'entrée dans l'organisme

- Voie aérienne : principale voie d'entrée, mais également la plus insidieuse, par l'inhalation d'aérosols créés au cours des manipulations (remise en suspension par aspirations-refoulements successifs, ouverture de tubes immédiatement après centrifugation ou après mélange au vortex, ...).

- Voie digestive : les interdictions de pipeter à la bouche, de boire, de manger et de fumer dans les laboratoires ont considérablement diminué le risque de contamination par ingestion, mais le non respect des règles

élémentaires d'hygiène (porter ses mains ou un crayon à sa bouche, par exemple) représente encore un risque non négligeable.

- Voies cutanée et oculaire : la contamination peut se faire par projection dans l'œil ou sur la peau, saine ou lésée, mais également suite à une piqûre, coupure, morsure, griffure. Certains micro-organismes peuvent franchir une peau saine ; certains composés tels que le DMSO facilitent ce passage. Une plaie ou une dermatose sont des voies d'entrée favorisées.

L'utilisation d'hématimètres en verre pour le dénombrement des cellules, source de coupures, doit être dans la mesure du possible évitée. Lui préférer l'utilisation de cellules de comptage en plastique (du type lames Kova). L'utilisation de pipettes en plastique doit également être préférée à celle de pipettes Pasteur en verre.

3) Les niveaux de confinement

La connaissance des agents biologiques manipulés et de leur classement en groupes de risques conditionne les règles de prévention à mettre en œuvre. Un confinement physique captant le risque au plus près de sa source et empêchant sa dissémination est mis en place. Chaque niveau de confinement correspond à un groupe de risques : niveaux L1 à L4 pour des agents des groupes 1 à 4, respectivement.

Le confinement L1 se caractérise par les obligations suivantes :

- Balisage "Risques biologiques" sur la porte du local
- Ventilation mécanique du local (45 m³ par heure et par personne)
- Manipulations génératrices d'aérosols obligatoirement effectuées sous PSM de type II certifié NF
- Sol facilement décontaminable
- Autoclave à proximité (Pièce 117, 1^{er} étage IDA, contact : Frédéric Subra)
- Inactivation des déchets avant leur collecte
- Accès réservé aux seuls personnels formés et amenés à y travailler

Le ménage doit être effectué par les agents du laboratoire.

Toute intervention de personnel extérieur au laboratoire (plombier, peintre, technicien de maintenance, ...) doit être réalisée en dehors des périodes d'activité et après décontamination des locaux. Les responsables du laboratoire doivent s'assurer que ce personnel a été informé des risques et connaît les locaux.

4) Les postes de sécurité microbiologique (PSM)

Les PSM de type II, utilisés dans les conditions requises, assurent une protection de la manipulation, du manipulateur et de l'environnement, en accord avec les exigences du niveau de confinement L2. **Ils sont le seul moyen de protection contre les dangers liés aux aérosols engendrés lors des manipulations.**

La protection du manipulateur est permise par une aspiration créée au bord avant du plan de travail qui constitue une barrière entre lui et le matériel manipulé (veine de garde).

La protection de l'environnement est assurée par filtration de l'air sortant de l'enceinte de travail à travers un filtre à très haute efficacité (HEPA).

La protection de la manipulation dans l'enceinte de travail est assurée par un flux d'air descendant préalablement filtré à travers un filtre HEPA (flux laminaire vertical).

Sur un PSM de type II, seule la certification NF garantit l'efficacité. Le contrôle des performances du PSM porte sur l'intégrité des filtres HEPA, l'efficacité de la veine de garde et la laminarité du flux. Il doit être effectué au minimum une fois par an, ainsi qu'après changement du filtre ou manutention du PSM. Les dates de contrôle doivent être affichées sur le PSM.

Les opérations d'entretien doivent être réalisées par un spécialiste. Les filtres HEPA doivent être changés par un technicien agréé et traités comme des déchets biologiques.

5) L'inactivation et l'élimination des déchets issus du L1

Les déchets d'un laboratoire ne sont pas des ordures ménagères mais des déchets industriels. Les déchets industriels peuvent être sans risques (DIB, déchets industriels banals) ou présenter un risque (DIR, déchets industriels à risques). Si ce risque est biologique, ce sont des déchets d'activités de soins à risque infectieux (DASRI), collectés par une société habilitée, pour être incinérés dans des incinérateurs agréés.

Le matériel piquant ou coupant doit être éliminé dans des boîtes à aiguilles comme DASRI.

Les déchets solides doivent être autoclavés avant leur élimination comme DASRI.

Les déchets liquides, issus des cultures réalisées sous PSM, sont inactivés, chimiquement ou par autoclavage, avant rejet à l'égout.

La stérilisation par chaleur humide sous pression (autoclavage) est actuellement la méthode la plus fiable, efficace et facile d'emploi. Son association à un traitement chimique permet d'obtenir l'efficacité maximale.

L'activité de désinfection par une méthode chimique dépend de la concentration du produit employé, de la température d'utilisation, de la durée de contact, du pH.

| DÉCONTAMINANTS | MICROORGANISMES | | | | |
|--|-----------------|-----------|--------|--------|-------|
| | Bactéries | Mycobact. | Spores | Champ. | Virus |
| Halogénés iodés (Bétadine) | +++ | ++ | ++ | +++ | + |
| Halogénés chlorés (Eau de Javel) | +++ | +/- | + | ++ | + |
| Alcools (Éthanol) | +++ | ++ | 0 | +/- | +/- |
| Aldéhydes (Glutaraldéhyde) | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Ammonium quaternaire (Chlorure de benzalkonium) | ++/+ | +/- | 0 | +/- | +/- |

L'eau de javel est efficace à la concentration de 0,4% en 15 minutes sur du matériel souillé, et à la concentration finale de 1% en 30 minutes sur les déchets liquides (à diluer à partir d'une solution stable à 2,6% = 12° chlorométriques). On tient compte du fait que son activité est partiellement inhibée par la présence de protéines. Les comprimés de dichloroisocyanurate de sodium (ex. "Haz tabs") sont stables, d'utilisation facile **mais d'activité désinfectante moindre** que l'eau de javel. **En conséquence, la décontamination des déchets produits sous PSM s'effectuera dans des pots munis de bouchons (ou dans les fioles d'aspiration reliées à une pompe à vide munie d'une capsule filtrante HEPA) à l'aide d'1 comprimé "Haz tab" de 4,5 g — libérant 2,5 g de chlore actif — dissous dans un peu d'eau, et ces déchets liquides seront laissés en décontamination la nuit avant d'être transvasés dans le bidon de collecte et éliminés à l'évier.**

L'éthanol est peu sensible à la présence de protéines. L'inconvénient de son utilisation est son évaporation rapide. Il doit être utilisé à la concentration de 70% au moins.

II. PROCEDURES D'ACCES

A. PROCEDURE D'ENTREE

Le L1 est accessible du lundi au vendredi

Un vendredi par mois, entre 15h à 16h (selon le planning fixé par le responsable, visible dans GRR) : NETTOYAGE DES PSM !

1) Entrée dans le L1

- 1.- Entrer et refermer correctement la porte
- 2.- Mettre une casaque jetable spéciale L1 : elles sont personnalisée (mettre celle en cours d'usage portant votre nom ou en prendre une neuve)
- 3.- Mettre des gants. **Le port de gants est obligatoire dans le L1**

2) Ce qui ne peut pas entrer dans le L1

De manière générale, tout ce qui ne peut pas être stérilisé ou passé à l'éthanol 70%, comme les emballages cartonnés, les boîtes en polystyrène expansé, ...

3) Elimination des déchets liquides

Avant manipulation, chaque utilisateur doit :

- 1.- Vider, dans le bidon collecteur de déchets liquides, le contenu d'un pot et d'une fiole à aspiration laissés en décontamination la nuit (en recueillant les solides — cônes, microtubes — dans la passoire prévue à cet effet)
- 2.- Vider la passoire dans une poubelle à déchets biologiques solides
- 3.- Rincer le pot et la fiole avec un peu d'eau — à recueillir dans le bidon collecteur de déchets liquides — et les vaporiser à l'éthanol 70%
- 4.- Vider le bidon collecteur de déchets liquides dans l'évier
- 5.- A la fin de la journée, démonter la fiole à aspiration, introduire une pastille « Haz tab » et laisser décontaminer la nuit

B. PROCEDURE DE SORTIE

1) Avant de sortir du L1

- 1.- Ranger tous les réactifs et le matériel : il est rappelé que le matériel entreposé sous les PSM doit être réduit au strict minimum (boîtes de cônes, pots de microtubes, portoir pour tubes, pipettes automatiques, marqueur, poubelle à déchets liquides, boîte de Pétri contenant la cellule de comptage en cours d'utilisation)
- 2.- Sortir la poubelle à déchets solides du PSM après l'avoir vaporisée avec de l'éthanol 70%, placer les pipettes cotonnées dans le grand béccher à décontamination, rincer la poubelle à l'eau et vaporiser d'éthanol 70%.
- 3.- Si elle est pleine, fermer la poubelle à déchets liquides, la sortir du PSM après l'avoir vaporisée avec de l'éthanol 70% et la laisser à décontaminer sur la pailasse jusqu'au lendemain
- 4.- Nettoyer le PSM : essuyer le plan de travail et les parois avec un papier absorbant imbibé (utiliser du papier qui ne se déchire pas et ne peluche pas afin de ne pas colmater le filtre du PSM), vaporiser avec de l'éthanol 70% et laisser sécher
- 5.- Nettoyer de la même façon les surfaces de travail utilisées hors PSM
- 6.- Vérifier que les poubelles dans le L1 ne sont pas pleines ; sinon les fermer, et les descendre à la soute régulièrement (pas plus de 2 poubelles fermées dans la pièce).
- 7.- S'assurer que les microscopes optiques sont éteints
- 8.- Vérifier la bonne fermeture des portes du réfrigérateur et des incubateurs
- 9.- Vérifier les indications de T° et % de CO₂ des incubateurs

10.- Enlever ses gants

11.- Enlever sa casaque, la replier soigneusement sur l'envers en poussant le haut d'une manche dans l'autre, l'accrocher par le haut des manches à son porte-manteau

2) Sortir du L1

III. TRAVAIL DANS LE L1

A. REMARQUES GENERALES

Il y a deux PSM, un réservé aux expériences de bactériologie et l'autre aux cellules eucaryotes (cellules animales).

Le port d'une blouse fermée à manches longues et à poignets serrés et le port de gants sont obligatoires, celui d'un masque et d'un bonnet est conseillé ; les changer dès qu'ils sont souillés.

Il est formellement interdit de pipeter à la bouche, de boire, de manger, d'introduire des aliments ou des boissons dans le L1.

Toutes affaires personnelles ne pouvant pas être décontaminées, tels que les téléphones portables, sont proscrits au sein du L1.

En cours de manipulations, les gants doivent être considérés comme contaminés. Il faut les changer avant de toucher des objets nécessaires et ne pouvant pas être décontaminés, tels que les chronomètres...

Toute manipulation portant sur du matériel à risque doit se faire sous PSM de type II. Parmi ces manipulations, il faut inclure celles qui peuvent provoquer la création ou la dispersion d'aérosols : ouverture des rotors ou des tubes de centrifugation, broyage de tissus, transferts de liquides à la pipette, opérations de cryotonie...

Récolte de milieu de culture ou de cellules, lyse cellulaire doivent également s'effectuer sous le PSM.

Même si les produits de cette opération n'ont pas besoin de rester aseptiques, la protection du manipulateur et de l'environnement demeure indispensable.

L'utilisation d'une pompe à vide pour aspirer des liquides et les entraîner hors du PSM court-circuite la protection du manipulateur et de l'environnement assurée par le PSM : l'aspiration crée d'abondants aérosols que la pompe rejette en grande partie dans l'air ambiant du laboratoire, brassé par la ventilation du local. En conséquence, la pompe ne doit être utilisée que si sa sortie est équipée d'une capsule filtrante HEPA, et sans pastille d'eau de javel.

Certains produits fréquents en culture cellulaire sont mis en commun, tels que le sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté et aliquoté, la pénicilline/streptomycine (PS) aliquotée et le PBS.

Pour le SVF, la personne se servant du dernier aliquot est en charge de décongeler, décomplémenter et aliquoter une nouvelle bouteille. Les aliquots (tubes Falcon de 50 ml) doivent être datés et conservés dans le réfrigérateur du L1.

Pour la PS, la personne se servant du dernier aliquot est en charge de décongeler et aliquoter une nouvelle bouteille. Les aliquots (tubes Falcon de 15 ml) doivent être datés et conservés dans le congélateur -20°C situé dans la pièce.

Pour une bonne organisation de travail, il est important d'utiliser la réservation des PSM disponible en ligne (<http://www.ifr.ens-cachan.fr/reservation/>) avant d'accéder au L1.

B. UTILISATION DES POSTES DE SECURITE MICROBIOLOGIQUE

1) Organisation du travail sous le PSM

Quand on manipule sous un PSM, il faut y introduire **le minimum de matériel** nécessaire pour travailler. En effet, **plus il y a de matériel sous le PSM, plus les mouvements d'air (flux laminaire) se trouvent perturbés, ce qui accroît les risques de contamination des cultures et diminue la protection du manipulateur.**

- Allumer la lampe UV pendant minimum 5 minutes
- Pour mettre en route le PSM, retirer la portière, l'accrocher sur le côté (**ne surtout pas la poser sur le sol**), mettre la clé en position 1, attendre que l'alarme s'arrête avant de commencer à travailler sous le PSM
- Vaporiser le plan de travail à l'éthanol 70%, laisser sécher
- Prévoir le matériel nécessaire à toute la manipulation : **éviter au maximum les mouvements entre l'intérieur et l'extérieur du PSM pour ne pas perturber le flux laminaire**
- Limiter l'obturation des perforations en général
- Ne pas utiliser de source de chaleur dans l'enceinte du PSM
- Ne pas projeter de liquide ou de solide sur la face interne du filtre
- Introduire sous le PSM une poubelle pour déchets liquides (pot avec bouchon, autoclavable, dans lequel auront été introduit une pastille « Haz tab » et un peu d'eau)
- Introduire sous le PSM une poubelle pour déchets solides (bêcher d'1 L sur la première paille)
- Passer à l'éthanol 70% tout matériel non stérile avant son introduction sous le PSM
- Aucune feuille de papier ne doit pénétrer sous le PSM : utiliser les aimants pour fixer les protocoles à l'extérieur du PSM
- Il est également interdit d'introduire sous le PSM des boîtes ou des portoirs en carton ou en polystyrène expansé, de la glace ou de la carboglace (utiliser des portoirs réfrigérants ou des coussins-glaçons)
- Toujours travailler seul, quelle que soit la taille du plan de travail
- Ne pas éternuer ni tousser en direction du PSM
- Travailler au-delà de la première série de perforations permettant la prise de l'air entrant (veine de garde)
- Proscrire les mouvements brusques
- Ne jamais laisser les flacons ou tubes ouverts, sans bouchon, sous le PSM
- **Les pipettes cotonnées utilisées sous le PSM doivent être décontaminées** et déposées dans la poubelle pour déchets liquides. Pour cela, aspirer de la solution de décontamination dans chaque pipette après utilisation, déconnecter la pipette du système d'aspiration et laisser redescendre le liquide par gravité lors du dépôt de la pipette dans le pot. Même procédure pour les cônes.

- **Aspirer également un peu de solution de décontamination dans chaque pipette non cotonnée** avant de la déconnecter de la pompe à vide et de la déposer dans la poubelle pour déchets liquides
- En fin de manipulation, transférer les pipettes dans la poubelle pour déchets solides sous le PSM
- Les tubes et les flacons, boîtes ou plaques de culture doivent également être soigneusement décontaminés, par rinçage à la solution de décontamination et aspiration, avant d'être refermés et jetés.

2) En fin de travail sous le PSM

- **Retirer du PSM tout le matériel** à l'exception des boîtes de cônes, pots de microtubes, portoir pour tubes, pipettes automatiques, marqueur, boîte de Pétri contenant la cellule de comptage en cours d'utilisation, poubelle à déchets liquides (si elle n'est pas pleine et que vous n'êtes pas le dernier utilisateur)
- Essuyer le plan de travail du PSM avec un papier absorbant imbibé de bactopin dilué à 0,25% ; utiliser du papier qui ne se déchire pas et ne peluche pas pour éviter de colmater le filtre du PSM
- Vaporiser à l'éthanol 70% et laisser sécher
- Arrêter la hotte et la refermer si vous êtes le dernier utilisateur

3) En cas de contamination du PSM sous le plan de travail

Sortir tout le matériel du PSM après l'avoir vaporisé à l'éthanol 70%

Essuyer le dessous des grilles du plan de travail à l'aide d'un papier absorbant imbibé de bactopin dilué à 0,25%, vaporiser à l'éthanol 70%, laisser sécher

Éteindre le PSM, puis enlever les grilles du plan de travail pour accéder au plancher du PSM

Vaporiser le plancher du PSM au bactopin dilué, laisser agir 5 minutes, essuyer à l'aide d'un papier absorbant qui ne se déchire pas et ne peluche pas, vaporiser à l'éthanol 70%, laisser sécher

Replacer les grilles du plan de travail.

C. UTILISATION DE LA CENTRIFUGEUSE

LES CONTAMINATIONS PAR LES AÉROSOLS SONT LES PLUS DANGEREUSES.

Pour toute centrifugation, y compris celles qui sont pratiquées dans une centrifugeuse à basse ou moyenne vitesse, il est impératif que le matériel soit traité en **tubes bouchés**. Il est recommandé de laisser un espace d'au moins 1 cm entre le niveau du liquide et le bord de chaque tube à centrifuger.

L'intérieur des rotors doit être examiné après chaque centrifugation pour déceler une éventuelle contamination. La centrifugeuse doit être le cas échéant désinfectée et nettoyée.

D. CONDUITE A TENIR EN CAS D'INCIDENT OU D'ACCIDENT

1) Projections ou blessures

En cas de blessure (coupure) : ne pas faire saigner, laver immédiatement à l'eau et au savon, puis désinfecter par trempage (au moins 5 minutes) avec un dérivé chloré (Dakin, eau de javel à 12° chlorométrique diluée au 1/5) ou avec de la polyvidone iodée ou avec de l'éthanol 70%

En cas de projection :

- au niveau des yeux ou des muqueuses : nettoyer immédiatement à l'eau pendant au moins 10 minutes ; appliquer Hextril dans la bouche ou Vitabact dans les yeux
- au niveau de la peau ou d'une plaie : décontaminer immédiatement à l'éthanol 70%

Dans tous les cas :

Identifier la provenance du matériel éventuellement contaminant.

Prévenir les responsable du L1, votre responsable scientifique ainsi que l'assistante de prévention Gladys MBEMBA, poste 7683, labo 205, mbemba@lbp.ens-cachan.fr

Effectuer une déclaration d'accident du travail à l'Administration dans les 48 heures (cahier au secrétariat, pièce 123).

2) Cas d'une contamination légère du local

Lors d'une contamination accidentelle peu importante (pailleuse, sol, mur, interrupteur, ...) :

- 1.- nettoyer immédiatement avec du papier absorbant et du bactopin dilué à 0,25%
- 2.- vaporiser de l'éthanol à 70%.
- 3.- ne pas essuyer l'éthanol, laisser évaporer

3) Cas d'une contamination importante du local

Dans le L1 :

- 1.- Enlever et jeter dans l'ordre les gants, la casaque. Se laver les mains.
- 2.- Signaler l'interdiction de pénétrer dans le L1 sur la porte d'entrée.
- 3.- Prévenir les responsables :
 - Frédéric SUBRA, poste 7741 ou 0626610627 pièce 119, Institut d'Alembert, fsubra@ens-cachan.fr
 - Véronique MATHET, poste 2148, IDA pièce 127.
- 5.- Mentionner, la date, l'heure, la nature et l'ampleur de l'incident dans le cahier.
- 6.- Attendre 30 minutes, ventilation arrêtée, avant d'entrer à nouveau dans le L1 pour procéder au nettoyage. L'habillement sera le suivant : blouse, surblouse, gants en latex + caoutchoucs, cagoule, surbottes.
- 7.- Penser à emporter tout le matériel nécessaire au nettoyage afin de ne pas avoir à entrer et sortir (papier absorbant, sac poubelle autoclavable avec lien, bactopin dilué, éthanol 95%)
- 8.- Délimiter la zone contaminée en tenant compte des projections éventuelles (horizontales et verticales).
- 9.- Pour les étapes de nettoyage et décontamination, procéder en allant de l'extérieur vers le centre de la zone contaminée :
 - Absorber le liquide répandu avec le papier absorbant qui sera jeté dans la poubelle en évitant les projections et les aérosols
 - Imbibé du papier absorbant avec du bactopin dilué et en enduire la surface contaminée
 - Essuyer
 - Asperger avec de l'éthanol 95%, laisser sécher
- 10.- Le déshabillage, les blouses et lunettes seront mises dans un sac poubelle fermé. Les autres vêtements jetables seront placés dans un sac séparé également fermé. On procédera immédiatement à un cycle d'autoclavage.
- 11.- Lorsque toute la surface potentiellement contaminée aura été ainsi nettoyée, on procédera à un ménage complet du L1 et à une désinfection du local par voie aérienne.

IV. SORTIE D'ECHANTILLONS DU L1

A) SORTIE DE CELLULES

Les cellules peuvent être sorties des PSM uniquement dans des contenants hermétiquement clos.

B) EVACUATION DES DECHETS

1) Evacuation des poubelles de déchets biologiques solides (poubelles jaunes)

- 1.- Dans le L1, fermer les poubelles jaunes pour déchets biologiques solides de manière hermétique et irréversible
- 2.- Les transférer dans la pièce B12 « déchets biologiques » ; un stockage **transitoire** d'au maximum deux poubelles est toléré dans le laboratoire
- 3.- Remonter autant de poubelles vides que de poubelles pleines descendues (stockage dans le laboratoire)

Le traitement des déchets est assuré par la Société MEDICLINE :

34, rue du Général Malleret Joinville
94400 Vitry-sur-Seine
Tél : 01 46 86 37 24
Fax : 01 46 86 94 29

2) Evacuation des déchets liquides

- 1.- Le liquide contenu dans les pots et les fioles en décontamination est vidé dans le bidon collecteur de déchets liquides
- 2.- Les pots et les fioles sont rincés à l'eau puis à l'éthanol 70% avant réutilisation
- 3.- Les solides sont jetés dans la poubelle jaune pour déchets biologiques solides
- 4.- Le bidon collecteur de déchets liquides est vidé chaque matin dans l'évier de la laverie du L1

3) Elimination des casaques contaminées

Les casaques jetables, lorsqu'elles sont contaminées, s'éliminent dans les poubelles jaunes comme les autres déchets biologiques solides.

V. ENTRETIEN DU L1

A. REGLES GENERALES

1) Echéancier

L'entretien du L1 est effectué selon un double échéancier :

- entretien **mensuel**, le dernier vendredi de chaque mois
- entretien **annuel**, impliquant un arrêt des activités, qui comprend :
 - la désinfection de la pièce par voie aérienne (et donc le dégivrage du réfrigérateur ainsi que le nettoyage des incubateurs)
 - la calibration des incubateurs.

2) Attribution des responsabilités

La planification des responsabilités mensuelles est effectuée selon un calendrier tenu à jour par le responsable du L1, visible dans le planning de la salle interface (via GRR).

Chaque utilisateur doit impérativement accomplir toutes les tâches demandées. S'il n'est pas disponible, il est de sa responsabilité de trouver un échange avec un autre utilisateur.

B. ENTRETIEN MENSUEL

1) Nettoyage

Nettoyage du bain-marie:

- 1.- Si elle est sale, vider l'eau du bain-marie dans le bidon collecteur prévu à cet effet (bidon de 10 L dans lequel auront été préalablement introduites 4 pastilles "Haz tabs")
- 2.- Nettoyer la cuve et les accessoires au bactopin dilué à 0,25% (essuyer) puis à l'éthanol 70% (laisser évaporer)
- 3.- Remplir le bain-marie avec de l'eau distillée stérile ; ajouter un peu de Rea-stabil® (ou quelques grains de sulfate de cuivre)

Nettoyage des surfaces :

- 1.- Ranger les paillasses
- 2.- Nettoyer au bactopin dilué à 0,25% (essuyer) puis à l'éthanol 70% (laisser évaporer) les paillasses, les portes des incubateurs et du réfrigérateur, les poignées, les interrupteurs, les microscopes, les parois et les vitres des PSM
- 3.- Nettoyer entièrement les PSM : vitre, parois, plan de travail, espace situé sous les grilles

2) Vérification des incubateurs

Vérifier le niveau et la propreté de l'eau dans les incubateurs ; si nécessaire, ajuster le niveau avec de l'eau distillée stérile ; si besoin, vider l'eau dans le bidon collecteur prévu à cet effet (cf. §1a-1), nettoyer le bac à l'éthanol 70% (laisser évaporer), remettre de l'eau distillée stérile, ajouter quelques grains de sulfate de cuivre.

Si les incubateurs ne fonctionnent pas correctement, faire l'autozéro :

- 1.- Prévenir les responsables du dysfonctionnement des incubateurs
- 2.- Presser les touches * et ← en même temps
- 3.- Ouvrir la porte pendant 60 secondes pour vider l'incubateur (un compte à rebours s'affiche sur la porte)
- 4.- Fermer la porte au signal sonore et laisser 10 minutes pour la calibration (un compte à rebours s'affiche sur la porte)
- 5.- Presser une touche ou ouvrir la porte à la fin de l'autozéro pour revenir en mode "marche".

3) Réapprovisionnement en consommables à l'intérieur du L1

1.- Faire un état des stocks des consommables sur la base de la liste établie :

- Pipettes, tubes, flacons, boîtes et plaques de culture
- Boîtes de cônes, pots de tubes Eppendorf autoclavés
- Essuie-main, gants
- Eau stérile
- Haz tabs

2.- Réapprovisionner le sas à partir du stock commun : pièce B8, ouverture chaque lundi de 9h30 à 10h30
Déclarer les matériels pris sur la feuille « salle H5 »

VI. MAINTENANCE

Le cahier comporte un registre dans lequel il vous est demandé de bien vouloir noter les demandes d'interventions et les interventions effectuées.

| Matériel | Maintenance | Coordonnées |
|----------------------------|--------------------------|--|
| PSM Incubateurs | Oxygen | Miniparc du Verger 1 rue de Terre Neuve 91967 COURTABOEUF Tél. 01 60 92 31 70 |
| Centrifugeuse | Thermo Fisher Scientific | Parc d'innovation - BP 50111 67403 ILLKIRCH CEDEX Tél. 03 88 67 53 20 www.fr.fishersci.com Commercial : Karim BENLAMINE Tél. 06 72 28 02 02 karim.benlamine@thermofisher.com |
| Microscopes | Micromecanique SAS | "Le Diamant " Domaine Technologique de Saclay 4, rue René Razel 91400 SACLAY Tél. 01 60 78 68 78 Technicien : M. Perada |

ANNEXE I : PROCÉDES CHIMIQUES D'INACTIVATION

1- Désinfectants à base d'aldéhyde (formaldéhyde, glutaraldéhyde)

Les désinfectants qui contiennent les aldéhydes à la dilution d'emploi de 0.5 à 1% sont efficaces contre le virus. Cependant, l'activité des aldéhydes est réduite par les protéines (inactivation par le sang, le sérum, etc...) et il faut les laisser agir assez longtemps, entre 30 minutes à 1 heure pour qu'ils soient efficaces.

2- Produits à base d'alcool

L'alcool éthylique à la concentration de 70% au moins détruit le virus. La réduction de l'activité de l'alcool par les protéines est faible mais la nature volatile de l'alcool est un désavantage et de bonnes conditions de conservation doivent donc être observées. En cas d'application sur des et des objets, il y a lieu de tenir compte du fait que l'alcool agit rapidement mais que l'évaporation est forte. Par conséquent, l'alcool se prête plutôt à la désinfection de surfaces lisses pas trop souillées.

Les bidons de 5 L sont à remplir à la soute avec de l'alcool à 96° puis faire la dilution à 70° dans un flacon.

3- Produits à base de phénol

Il est démontré expérimentalement qu'un savon à base de dérivés phénols à 0.5% est efficace pour l'inactivation des virus. Les phénols sont utilisés principalement sous la forme de dérivés et présentent l'avantage de voir leur activité non réduites par les protéines ou par le savon. Toutefois, leur toxicité pour les nouveaux nés est un inconvénient certain.

4- L'hypochlorite de sodium (eau de javel)

L'hypochlorite de sodium en solution à 0.1% inactive totalement le virus en 15 minutes. Outre l'odeur pénétrante, elle a le défaut de l'instabilité et de la corrosivité pour les métaux oxydables : nickel, fer, acier non inoxydable. Il doit être proscrit dans le nettoyage des autoclaves.

ANNEXE 2 : DECONTAMINATION DU L1 AU NOCOSPRAY

1- Préparation de la pièce

- Vider puis éteindre les incubateurs, vider les bacs à eau, laver les étagères, les laisser ouverts
- Vider puis éteindre le frigo/congélateur, essuyer l'eau, le laisser ouvert
- Vider les hottes mais les laisser fonctionner
- Sortir les poubelles
- Sortir les pots des déchets liquides et tout autre petit matériel autoclavable
- Libérez les espaces confinés
- Préparation du sas :
 - Vider la poubelle
 - Sortir le papier

2- Procédure de décontamination

- Positionner l'appareil à décontaminer au centre de la pièce.
- Régler le temps en fonction de la surface de la pièce à l'aide du bouton sur la gauche de l'appareil (pour le L1 100 m³)
- Couper la ventilation de la pièce
- Mettre en route l'appareil (temps de démarrage 10 secondes).
- Sortir et colmater la dernière porte avec du gros adhésif
- Positionner un panneau annonçant la décontamination en cours, ne pas entrer

3- Remise en route

- Rentrer dans le L1
- Nettoyer avec de l'eau distillée stérile l'intérieure des incubateurs et toutes les surfaces
- Remettre en route les appareils
- Indiquer sur le classeur la date de réalisation de la décontamination et toute autre observation

