

Les risques biologiques liés aux techniques de génie génétique en laboratoire

L'Institut national de recherche et de sécurité (INRS)

Dans le domaine de la prévention des risques professionnels, l'INRS est un organisme scientifique et technique qui travaille, au plan institutionnel, avec la CNAMTS, les Carsat, Cram, CGSS et plus ponctuellement pour les services de l'État ainsi que pour tout autre organisme s'occupant de prévention des risques professionnels.

Il développe un ensemble de savoir-faire pluridisciplinaires qu'il met à la disposition de tous ceux qui, en entreprise, sont chargés de la prévention : chef d'entreprise, médecin du travail, CHSCT, salariés.

Face à la complexité des problèmes, l'Institut dispose de compétences scientifiques, techniques et médicales couvrant une très grande variété de disciplines, toutes au service de la maîtrise des risques professionnels.

Ainsi, l'INRS élabore et diffuse des documents intéressant l'hygiène et la sécurité du travail : publications (périodiques ou non), affiches, audiovisuels, multimédias, site Internet... Les publications de l'INRS sont distribuées par les Carsat.

Pour les obtenir, adressez-vous au service Prévention de la caisse régionale ou de la caisse générale de votre circonscription, dont l'adresse est mentionnée en fin de brochure.

L'INRS est une association sans but lucratif (loi 1901) constituée sous l'égide de la CNAMTS et soumise au contrôle financier de l'État. Géré par un conseil d'administration constitué à parité d'un collègue représentant les employeurs et d'un collègue représentant les salariés, il est présidé alternativement par un représentant de chacun des deux collèges. Son financement est assuré en quasi-totalité par le Fonds national de prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles.

Les caisses d'assurance retraite et de la santé au travail (Carsat), les caisses régionales d'assurance maladie (Cram) et caisses générales de sécurité sociale (CGSS)

Les caisses d'assurance retraite et de la santé au travail, les caisses régionales d'assurance maladie et les caisses générales de sécurité sociale disposent, pour participer à la diminution des risques professionnels dans leur région, d'un service Prévention composé d'ingénieurs-conseils et de contrôleurs de sécurité. Spécifiquement formés aux disciplines de la prévention des risques professionnels et s'appuyant sur l'expérience quotidienne de l'entreprise, ils sont en mesure de conseiller et, sous certaines conditions, de soutenir les acteurs de l'entreprise (direction, médecin du travail, CHSCT, etc.) dans la mise en œuvre des démarches et outils de prévention les mieux adaptés à chaque situation. Ils assurent la mise à disposition de tous les documents édités par l'INRS.

Toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'INRS, de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause, est illicite.
Il en est de même pour la traduction, l'adaptation ou la transformation, l'arrangement ou la reproduction, par un art ou un procédé quelconque (article L. 122-4 du code de la propriété intellectuelle).
La violation des droits d'auteur constitue une contrefaçon punie d'un emprisonnement de trois ans et d'une amende de 300 000 euros (article L. 335-2 et suivants du code de la propriété intellectuelle).

Les risques biologiques liés aux techniques de génie génétique en laboratoire

Christine DAVID
et Véronique CARON (INRS)

Nous adressons nos remerciements à Bernard Cornillon (INSERM) pour sa collaboration, ainsi qu'aux différents spécialistes consultés en cours de rédaction :

- Marie-Laurence MOUSEL (Institut Pasteur de Paris),
 - Radia ZERGAOUI (Vectalys),
 - Jean-Pierre DE CAVEL (Institut Pasteur de Lille),
- et aux médecins du travail ayant participé à la réflexion.

Sommaire

Introduction	4
1. Rappels	6
1.1 Les cellules	6
1.2 Les gènes et protéines	7
1.3 Les virus	8
1.4 Cas particulier des Rétrovirus	11
2. Éléments nécessaires à la production d'OGM	12
2.1 Les plasmides	13
2.2 Les phages	14
2.3 Les Baculovirus	15
2.4 Les vecteurs viraux défectifs	15
2.5 Les cellules hôtes	17
3. Évaluation des risques liés à la production d'OGM	18
3.1 L'organisme donneur	19
3.2 La séquence insérée	19
3.3 Les vecteurs	20
3.4 L'organisme receveur	24
3.5 L'OGM	24
Conclusion	26
Annexes	27

> Introduction

Depuis la découverte de la structure en double hélice de l'ADN en 1953 par James Watson et Francis Crick, l'homme a saisi l'intérêt qu'il pouvait tirer de modifications des informations portées par cette molécule de vie. Il devenait possible d'enlever un gène d'une cellule d'une espèce et de l'insérer dans une cellule d'une autre espèce. Les premiers organismes génétiquement modifiés (OGM) sont ainsi apparus dans les années soixante-dix, notamment en 1978, avec la création d'une souche d'*Escherichia coli* modifiée par insertion d'un gène humain codant pour l'insuline. Les années suivantes ont vu l'essor de nouvelles techniques accompagnant le développement de nouvelles applications.

Au-delà de la recherche fondamentale, les OGM peuvent être employés dans le secteur médical pour caractériser, diagnostiquer les maladies, produire des molécules à usage thérapeutique (insuline, antithrombine...) ou développer des thérapies géniques. Les OGM sont également utilisés dans le secteur agricole pour aider les plantes à lutter contre les insectes ravageurs ou pour augmenter leur qualité nutritionnelle. Dans le cadre du développement durable favorisant les énergies renouvelables, des recherches portent sur la création d'OGM pouvant produire des biocarburants.

Selon le Haut Conseil des biotechnologies (HCB), on désigne par OGM tout organisme dont le matériel génétique a été modifié autrement que par multiplication ou recombinaison naturelle. Quel que soit l'OGM, sa création nécessite les mêmes éléments : un gène d'intérêt (appelé insert) issu d'organismes ou de cultures cellulaires, un véhicule (appelé vecteur) introduisant ce gène vers sa nouvelle cellule cible. Les cellules donneuses et receveuses peuvent être d'origine microbienne, végétale, animale ou humaine. Quant au vecteur, il peut provenir de bactéries ou de virus pouvant, à l'origine, être pathogènes pour l'homme.

La manipulation de cultures cellulaires de toutes origines, l'usage de vecteurs viraux comme outil, l'apparition de nouveaux vecteurs, la complexification des techniques, rendent l'évaluation et la prévention des risques professionnels particulièrement délicate dans les laboratoires construisant et manipulant des OGM.

Toute construction ou manipulation d'OGM en milieu confiné nécessite une « Déclaration d'utilisation ou demande d'agrément » auprès du Haut Conseil des biotechnologies. Pour cela, le demandeur doit faire une première analyse des risques de l'OGM, qu'il retranscrit dans sa déclaration déposée auprès du ministère en charge de la recherche. Cette demande est examinée par le comité scientifique du HCB, qui évalue les risques associés aux OGM utilisés et propose un avis de classement et de confinement. Cet avis est transmis au ministère en charge de l'enseignement supérieur et de la recherche, qui délivre alors les agréments nécessaires.

Ce guide a pour objectif d'aider les personnes en charge de la surveillance médicale et de la prévention, à mieux comprendre et évaluer les risques biologiques liés à la construction et la manipulation des OGM en laboratoire.

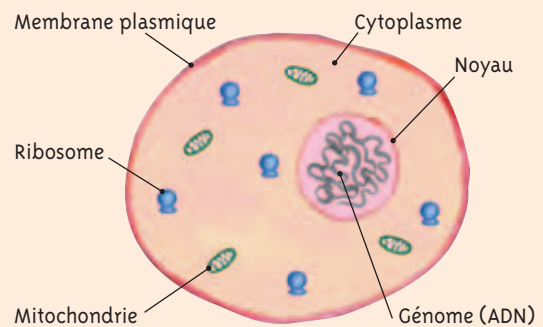
La première partie rappelle les mécanismes moléculaires de base. La seconde présente les différents éléments nécessaires à la production d'un OGM : insert, vecteur, organisme donneur et receveur (les manipulations sur animaux et végétaux ne seront pas abordées ici). La troisième partie, qui peut se lire indépendamment des précédentes, expose les dangers potentiels de chacun de ces éléments. Des arbres décisionnels reprennent les principales questions que peuvent se poser les médecins ou les préventeurs, afin d'évaluer les dangers de chaque élément participant à la construction de l'organisme génétiquement modifié.

> 1. Rappels

• 1.1. Les cellules

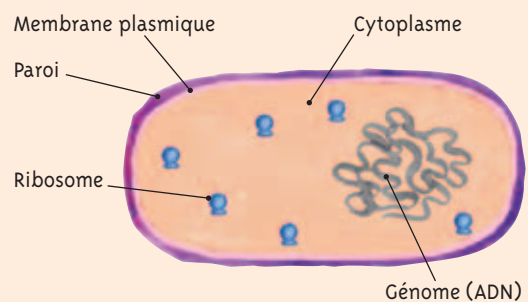
Les organismes vivants comme les animaux, les insectes, les plantes, les levures sont constitués de cellules **eucaryotes**. Ces cellules sont enveloppées d'une membrane plasmique enfermant la machinerie servant à leur survie (ribosomes, mitochondries...). Chaque cellule contient un noyau délimité par une membrane et contenant le patrimoine génétique sous forme de molécules d'ADN⁽¹⁾.

Figure 1 - Schéma d'une cellule eucaryote.



Par contre, les bactéries sont des cellules **procaryotes** dépourvues de noyau (ADN libre dans la cellule) et de certains éléments de la machinerie cellulaire (mitochondries...).

Figure 2 - Schéma d'une cellule procaryote.



(1) ADN : acide désoxyribonucléique.

• 1.2. Les gènes et protéines

Une molécule d'ADN double-brin (voir figure 3.1) comporte une succession de gènes qui codent chacun pour un peptide (une séquence d'acides aminés). Le passage du gène au peptide se fait en plusieurs étapes :

- la **transcription** d'un brin d'ADN en un brin image d'ARN² messenger,
- la **traduction** du brin d'ARN messenger en un peptide.

La séquence codante du gène est entourée de séquences jouant un rôle lors de la transcription :

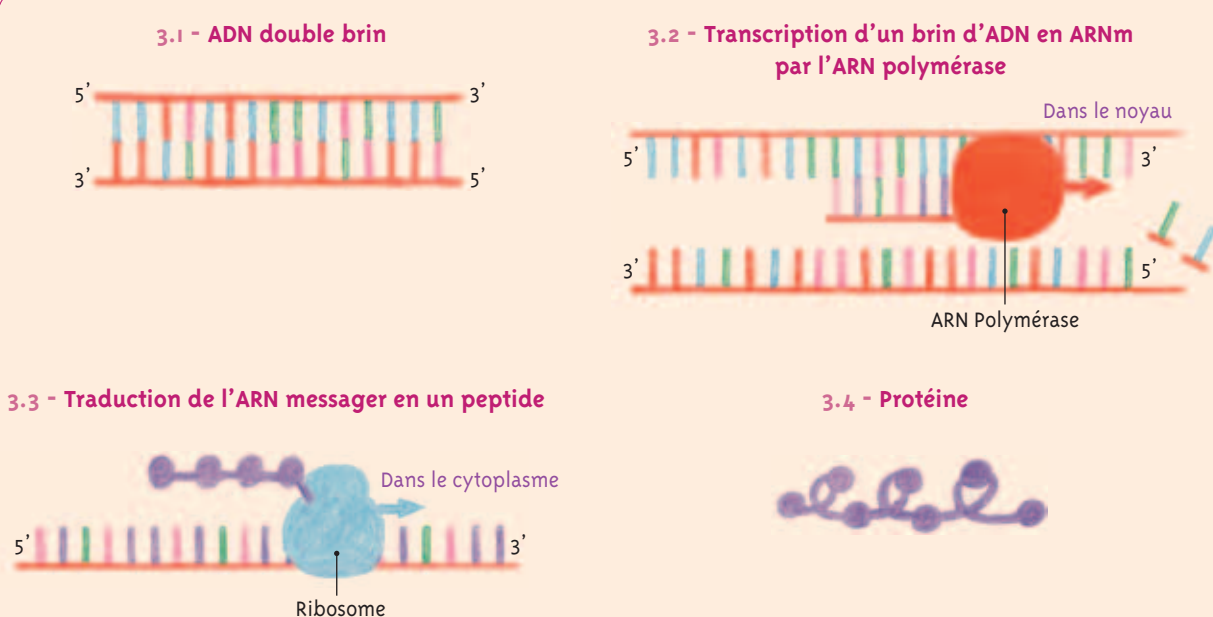
- un **promoteur** permettant l'initiation de la transcription de l'ADN en ARN,
- une ou des séquences de régulation de transcription : silencer, enhancer... (tous les gènes ne sont pas exprimés dans toutes les cellules, ni avec la même intensité),
- un codon d'initiation qui marque le début de la séquence d'ADN qui va être transcrite.
- une **séquence de terminaison** qui marque la fin de la transcription.

Une ARN-polymérase se fixe sur le brin d'ADN (au niveau du promoteur d'un gène), synthétise un brin d'ARN messenger (ARNm) et se décroche au niveau de la séquence de terminaison (voir figure 3.2).

Dans les cellules eucaryotes, certaines séquences non codantes des ARNm (les introns) sont ensuite éliminées pour aboutir à un ARNm mature. Cet ARNm passe dans le cytoplasme puis est traduit en peptide par l'intermédiaire d'un ribosome (voir figure 3.3).

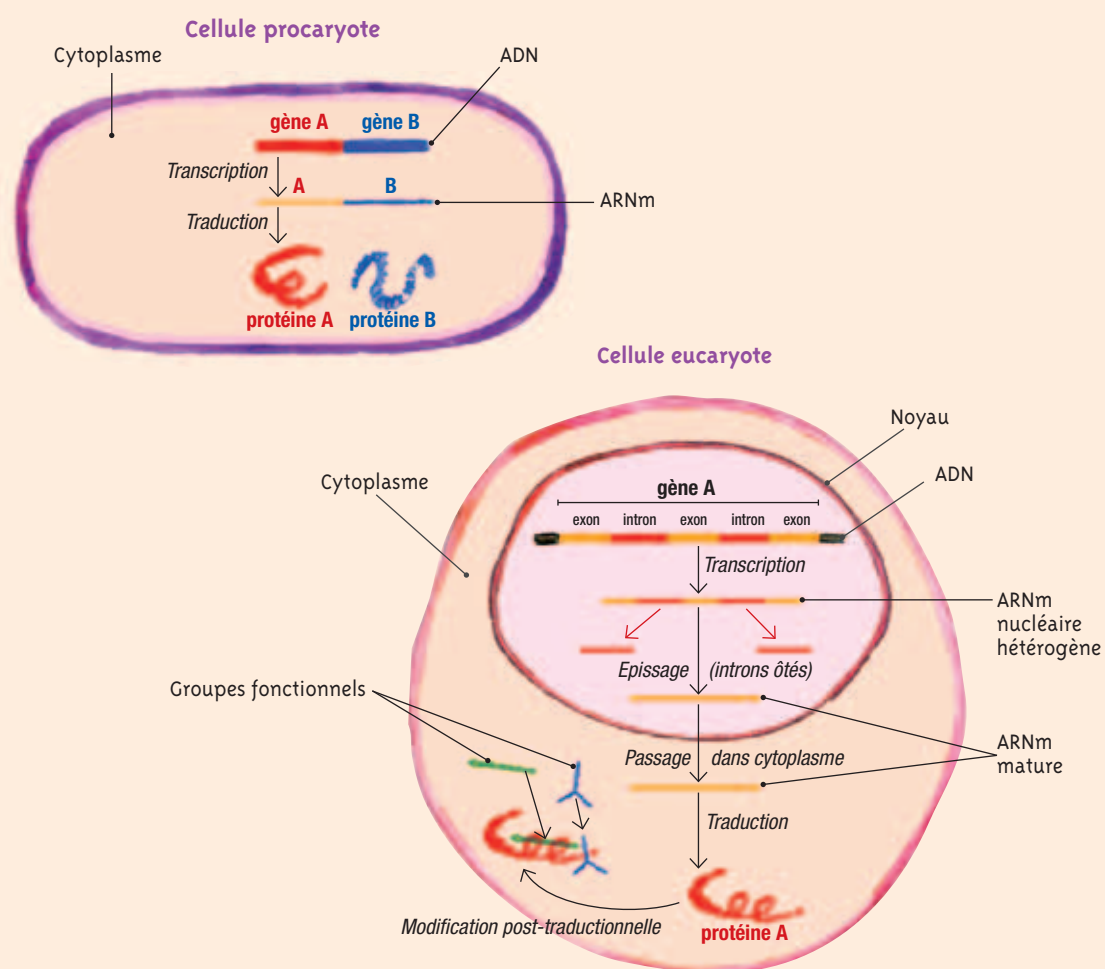
Le peptide ainsi produit (voir figure 3.4) peut subir des transformations post-traductionnelles, notamment par ajout d'autres peptides, de groupes fonctionnels de type glycosyl, acétyl, méthyl, phosphate, ou par création de ponts ou de clivages entraînant des changements de conformation dans l'espace (voir figure 4, page suivante).

Figure 3 - Synthèse des protéines



(2) ARN : acide ribonucléique.

Figure 4 - Production des protéines dans les cellules procaryotes et eucaryotes.



• 1.3. Les virus

Les virus sont des parasites obligatoires vivant dans un hôte (cellule animale ou végétale, bactérie), dont ils détournent à leur profit une partie de la machinerie cellulaire. Leur génome (ADN ou ARN) contient le minimum d'information pour assurer l'infection et les premières étapes de leur réplication dans l'hôte. Cet acide nucléique est entouré d'une capsidie et souvent d'une enveloppe, toutes deux constituées de protéines. Ces protéines servent notamment à la reconnaissance spécifique de la cellule hôte lors de l'infection. L'absence de l'une ou de plusieurs de ces protéines peut altérer, voire supprimer, l'infectiosité du virus.

Une fois la cellule hôte reconnue par le virus, le génome viral y pénètre (voir figure 5) et utilise la machinerie de la cellule pour se répliquer et synthétiser les protéines de sa capsidie et celles de l'enveloppe s'il en possède une. De nouveaux virus se forment dans la cellule et en sortent, provoquant ou non la lyse cellulaire. Certains virus s'entourent d'un fragment de membrane cellulaire ou de membrane nucléaire qui devient alors une partie de l'enveloppe virale.

Les **virus à ARN** présentent une étape spécifique après l'infection, la rétrotranscription, pendant laquelle le génome ARN est transformé en son image ADN.

Figure 5 - Exemple de réplication de virus à ADN nu (a) et enveloppé (b) dans une cellule eucaryote.

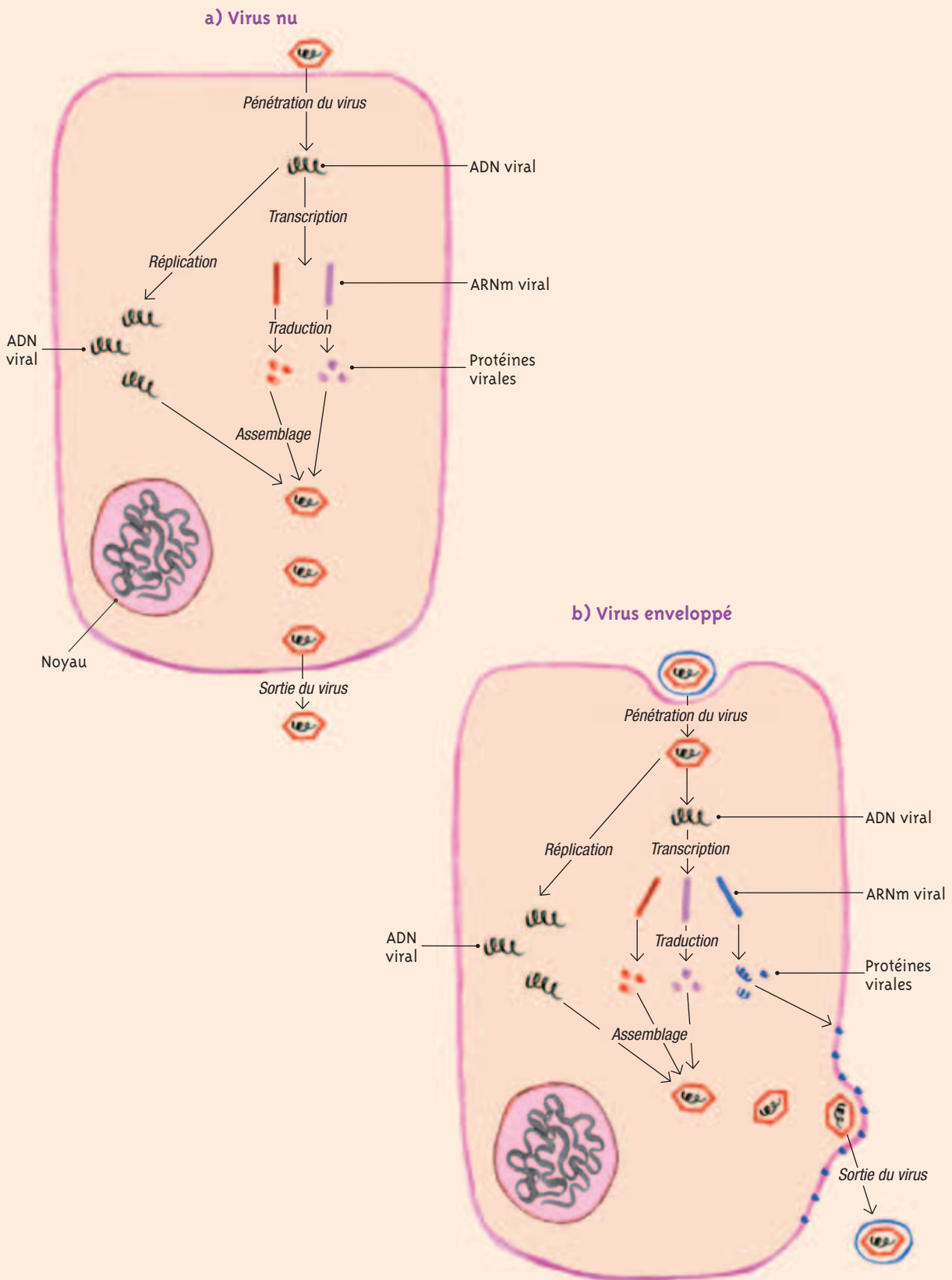
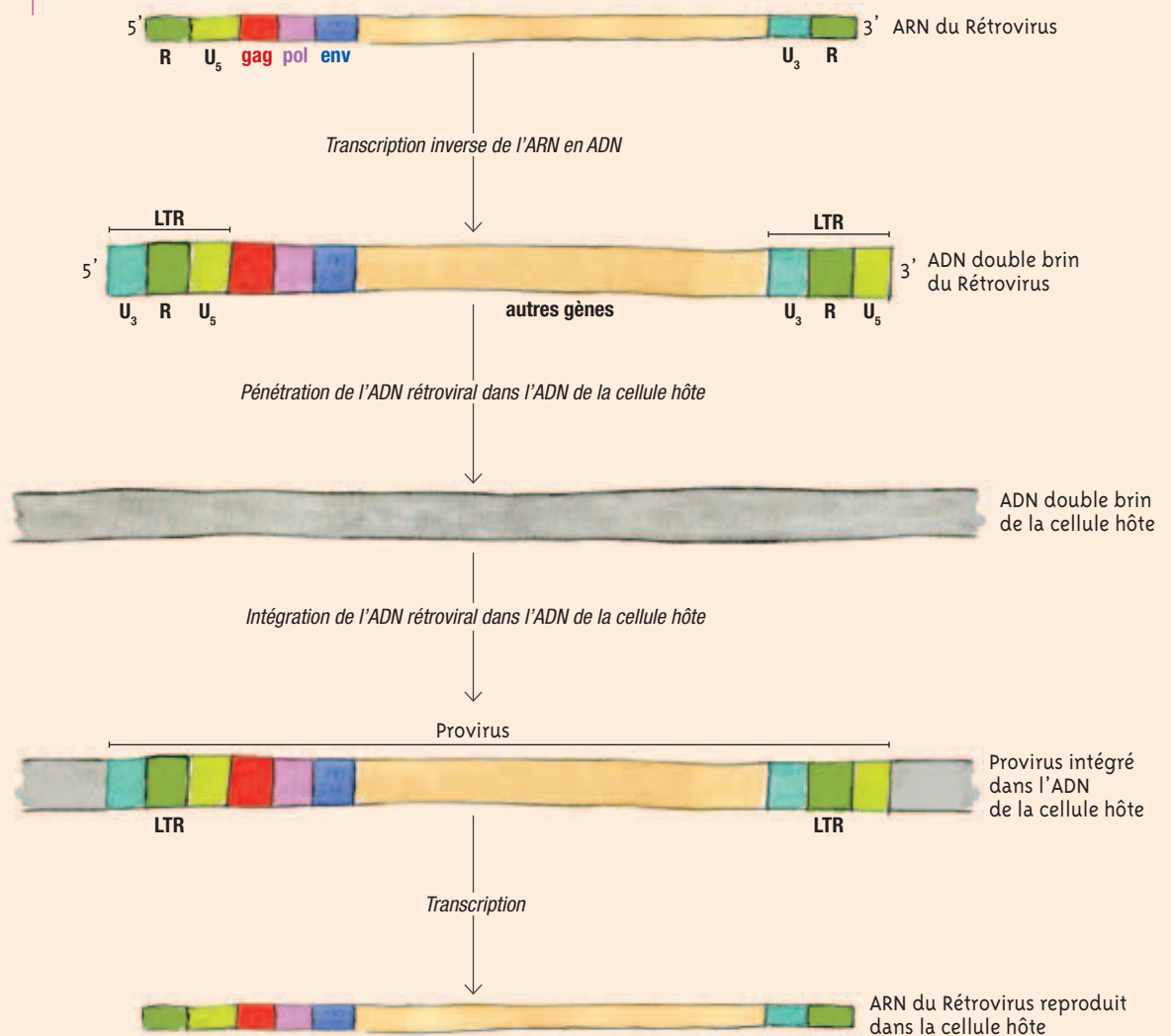


Figure 6 - Réplication d'un Rétrovirus.



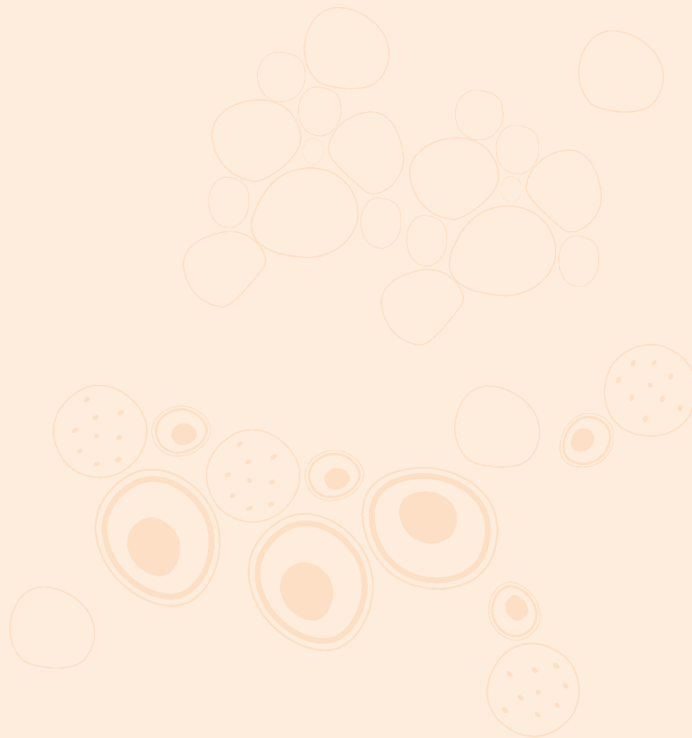
- **LTR (long terminal repeat) contenant les séquences U₃, R et U₅** : impliquées dans l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte et servant de promoteur de transcription.
- **U₃ en 5'** : promoteur de transcription du provirus et activateur agissant sur les séquences ADN du provirus. U₃ en 3' sert parfois de promoteur de transcription du génome *cellulaire* situé en aval.
- **R** : séquence répétée
- **U₅ en 3'** : rôle dans la terminaison de la transcription de l'ARN viral
- **Le gène gag** code pour des protéines de la capsid, **le gène pol** pour la transcriptase inverse et l'intégrase, **le gène env** pour une protéine de l'enveloppe virale.

• 1.4. Cas particulier des Rétrovirus

Les Rétrovirus, dont font partie par exemple les Lentivirus, ont un mécanisme de réplication particulier. Leur génome se trouve sous forme d'ARN (*voir figure 6*). Il faut l'intervention d'une enzyme particulière, la **transcriptase inverse**, pour produire un ADN double brin à partir de l'ARN simple brin viral.

L'ADN viral est ensuite intégré par une autre enzyme (**l'intégrase**) à n'importe quel endroit du génome de la cellule. Le **provirus** (l'ADN viral intégré) est alors assimilé au génome cellulaire et se transmet aux cellules filles. Les provirus peuvent être parfois activés. Dans ce cas, le provirus est transcrit en ARN qui pourra être traduit en protéine ou encapsidé pour produire un nouveau virus.

Ces notions auront leur importance lors de l'utilisation de vecteurs construits à partir de ces virus. Les vecteurs sont, par exemple, délévés des gènes *gag* (codant pour des protéines de capsid), *pol* (codant pour la transcriptase inverse et l'intégrase) et *env* (codant pour une protéine de l'enveloppe virale). Cette délétion les empêche de sortir de la cellule infectée. D'autres vecteurs sont délévés en U3 (vecteur Δ U3 ou SIN : self inactivating vector), ce qui inhibe la transcription du provirus.



> 2. Éléments nécessaires à la production d'OGM

Les constructions génétiques, effectuées en laboratoire, consistent globalement à couper des gènes d'intérêt présents dans les cellules d'un organisme, les assembler, les modifier et les intégrer dans d'autres cellules. Ces constructions génétiques peuvent avoir plusieurs objectifs :

- conserver des fragments d'ADN ou ADNc³ pour constituer des banques génomiques,
- produire une protéine (insuline...),
- produire un organisme transgénique (animal ou végétal),
- étudier la régulation d'un gène...

Les techniques utilisées pour intégrer une séquence génétique dans une cellule nécessitent :

- un fragment de génome d'intérêt (insert) : ADN ou ADNc.
- une cellule hôte recevant le fragment d'intérêt.
- un vecteur servant à introduire le fragment d'intérêt dans la cellule hôte.

Il existe différents types de vecteurs, d'origine virale ou non, dont le choix se fait en fonction de :

- la taille et le type de l'insert,
- l'hôte dans lequel doit s'exprimer le transgène,
- la durée et le contrôle de l'expression du transgène,
- l'innocuité du vecteur.

Parmi les vecteurs les plus courants (plasmides, phages, Baculovirus...), les vecteurs viraux tendent à se développer. En effet, ils s'avèrent plus efficaces que les autres vecteurs (l'infection virale possède un meilleur rendement que la transfection⁴ par un plasmide) et surtout permettent, dans certains cas, l'intégration de l'insert dans le génome de la cellule hôte et donc son expression durable et transmissible aux cellules filles.

(3) ADNc : ADN complémentaire synthétisé à partir de l'ARNm.

(4) Transfection : introduction d'un ADN étranger dans une cellule, ne faisant pas intervenir de virus.

2.1. Les plasmides

Les plasmides ne se trouvent naturellement que dans les bactéries. Il s'agit de séquences d'ADN double brin, circulaires, qui se répliquent indépendamment du génome de la bactérie hôte. Ils se multiplient dans la cellule bactérienne et passent naturellement dans les cellules filles ou dans des cellules bactériennes d'espèces différentes, éventuellement pathogènes.

En laboratoire, les plasmides utilisés sont conçus pour ne pas être facilement échangés entre bactéries par conjugaison⁵. De plus, on introduit dans ces bactéries, par exemple un gène de résistance à un antibiotique (ampicilline, tétracycline...). Les bactéries sont alors cultivées sur un milieu contenant l'antibiotique : seules les bactéries contenant le plasmide avec le gène de résistance pourront pousser sur ce milieu.

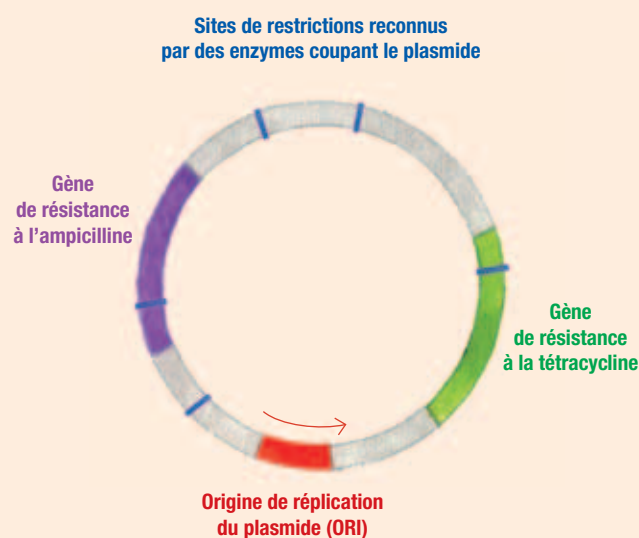
Les plasmides sont facilement isolés et purifiés. Ils peuvent être introduits artificiellement dans les cellules hôtes par :

- électroporation : une impulsion électrique courte induit la formation de pores dans la membrane plasmique de la cellule, permettant l'entrée de la séquence d'ADN ;
- choc osmotique ou thermique qui permet d'ouvrir les pores cellulaires naturels ;
- lipofection : fusion de la membrane cellulaire avec des liposomes contenant une séquence d'ADN ;
- ajout de polycations (par exemple l'hypochlorure de diéthylaminoéthyl dextrane ou DEAE-dextrane) qui facilitent les interactions entre l'ADN et la machinerie d'endocytose⁶ de la cellule.

L'un des premiers plasmides construits en laboratoire est le pBR322 issu de la bactérie *Escherichia coli*. Ce plasmide porte les gènes de résistance à l'ampicilline et à la tétracycline, ainsi que de nombreux sites de restriction, reconnus par des enzymes qui coupent le plasmide et permettent ainsi l'introduction de gènes d'intérêt (voir figure 7).

Les plasmides ne peuvent pas naturellement pénétrer dans les cellules eucaryotes. Par contre, ils peuvent s'y multiplier si on les introduit artificiellement et qu'on leur ajoute une origine de réplication eucaryote. Certains plasmides, dits « navette », ont deux origines de réplication, procaryote et eucaryote, et peuvent donc se répliquer dans les deux types de cellules.

Figure 7 - Exemple de structure de plasmide.



(5) Conjugaison : échange de plasmides par contact entre bactéries.

(6) Endocytose : mécanisme par lequel une cellule englobe une particule.

Autres constructions vectorielles

Il existe de nombreuses constructions génétiques élaborées par différentes équipes de recherche, par exemple :

○ **Les cosmides** sont des plasmides comprenant des gènes d'encapsidation du bactériophage λ , permettant d'infecter les bactéries *Escherichia coli*, dans lesquelles ils se multiplient de façon autonome.

Ces cosmides sont utilisés comme vecteur, pouvant intégrer des inserts de 40 kb⁷, ce qui les rend intéressants pour constituer des banques génomiques⁸.

○ **Les BAC** (Bacterial Artificial Chromosomes) ont été construits à partir d'un plasmide F et permettent de cloner de grands fragments d'ADN (100 à 300 kb) dans une souche spécifique d'*E.coli* qui tolère les BAC.

○ **Les YAC** (Yeast Artificial Chromosomes) sont des « chromosomes artificiels » de levure qui se multiplient dans la levure hôte comme des chromosomes normaux. Ils permettent de cloner de très grands fragments d'ADN (600 à 1 400 kb) et sont souvent utilisés pour la production de banques génomiques.

○ **Les YRP** (Yeast Replicating Plasmids) et **les YEP** (Yeast Episomal Plasmids) sont des vecteurs permettant de répliquer les gènes étrangers, sans intégration dans le génome de la levure hôte.

○ **Les YIP** (Yeast Integrating Plasmids) sont des plasmides permettant d'insérer les gènes étrangers au génome de la levure hôte.

• 2.2. Les phages

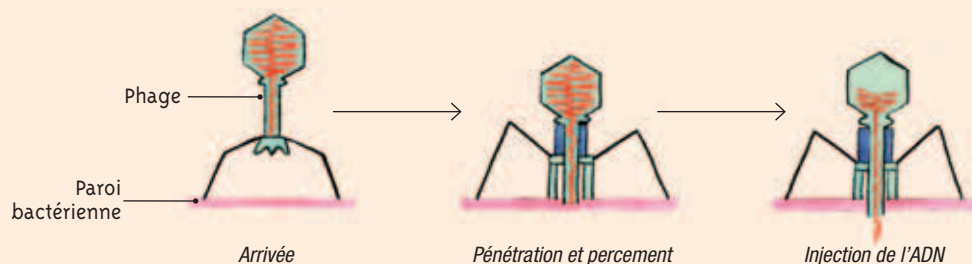
Les phages ou bactériophages sont des virus de bactéries. Comme la bactérie hôte *Escherichia coli* est la plus utilisée en biotechnologie, les phages spécifiques de cette bactérie (λ , M13, QB, phage T) sont les plus employés. Ces phages peuvent être modifiés artificiellement afin de leur faire porter des gènes d'intérêt.

Les phages se fixent sur la paroi bactérienne et injectent leur ADN dans la cellule (voir figure 8).

La machinerie de la bactérie est ensuite utilisée pour répliquer l'ADN viral et synthétiser les protéines servant à produire de nouveaux phages. Après accumulation des phages dans la cellule, celle-ci finit par éclater et libérer ces phages qui vont infecter d'autres bactéries.

Les phages sont utilisés en laboratoire pour constituer des banques génomiques ou de protéines. En effet, leur efficacité de pénétration dans *E. coli* est bien plus grande que celle des plasmides.

Figure 8 - Étapes de pénétration du génome phagique dans la bactérie.



(7) Kb : kilobase correspondant à 1000 bases d'un acide nucléique. Les bases peuvent être de 5 types : adénine, guanine, thymine, cytosine, uracile.
(8) Banque génomique : fragments d'ADN ou ADNc conservés dans des cellules.

2.3. Les Baculovirus

Les Baculovirus sont des virus de larves d'insectes pouvant se présenter sous deux formes :

- sous forme de polyèdre, enfermant plusieurs particules virales, leur permettant de résister dans l'environnement et de passer d'une larve à une autre ;
- sous forme d'une simple particule virale se propageant d'une cellule à l'autre à l'intérieur d'une même larve.

Cette particule virale simple peut se multiplier dans les cultures de cellules d'insecte. Les gènes intervenant dans la formation du polyèdre sont alors supprimés du génome viral, pour laisser place à des gènes d'intérêt pouvant avoir une taille très importante (50 kb). En effet, la taille de la capsid du Baculovirus s'adapte à la taille de l'ADN qu'elle emballe. Le Baculovirus peut pénétrer de nombreuses lignées cellulaires de mammifères, mais son génome ne peut pas y être transcrit, il n'y a donc pas production de particules virales. Par contre, l'insert qu'il porte sera transcrit parce qu'un promoteur aura été placé en amont.

En recherche, l'intérêt de ce système Baculovirus-cellule d'insecte est qu'il permet des modifications post-traductionnelles des protéines nouvellement synthétisées comme c'est le cas chez les vertébrés. Les baculo-

virus sont donc employés pour produire en grande quantité des protéines nécessitant des modifications post-traductionnelles (ajout de groupements glycosyl, acétyl, méthyl, phosphate...).

2.4. Les vecteurs viraux défectifs

Les vecteurs viraux défectifs utilisés en laboratoire sont des génomes de virus sauvages dont certains gènes ont été éliminés, pour limiter leur diffusion et leur pathogénicité. Ainsi, les Lentivirus sont dépourvus des gènes *vpu*, *vpr*, *vif*, *nef*... impliqués dans leur pathogénicité et d'autres gènes nécessaires à la réalisation du cycle viral, comme le gène *gag* (codant pour des protéines de capsid), le gène *env* (codant pour des protéines d'enveloppe), le gène *pol* (codant pour la transcriptase inverse et l'intégrase). Chez les vecteurs adénoviraux⁹, les gènes *early* impliqués dans la réplication des virus sont supprimés. **Les vecteurs défectifs sont donc a priori incapables de se multiplier naturellement.**

De nombreux vecteurs viraux peuvent être utilisés selon les buts recherchés : apporter durablement à un malade la protéine qui lui manque (thérapie génique) ou étudier la fonction d'une protéine en l'introduisant dans un système où elle n'existe pas naturellement (voir tableau 1).

Tableau 1 - Exemples de virus servant à la construction de vecteurs viraux.

Virus	Intégration de l'insert dans le génome de la cellule hôte	Infection de toutes les cellules quel que soit le stade de division cellulaire	Exemple
Rétrovirus	oui	n'infecte que les cellules en division (pas les neurones)	MLV (Murine Leukemia virus)
Rétrovirus du genre Lentivirus	oui	oui	VIH 1
Adénovirus (ADV)	non	oui	Ad5 humain
Virus associé aux Adénovirus* (AAV)	oui (max : 5 kb)	oui	AAV 2
Herpès virus (HSV)	oui	oui	HSV 1
Poxvirus	non	oui	Canarypox virus

* Virus associé aux Adénovirus : un petit virus généralement non pathogène.

(9) Vecteurs adénoviraux : vecteurs issus d'un Adénovirus.

Si l'on souhaite que le vecteur déficient se multiplie, il faut l'introduire :

- soit dans une lignée cellulaire spécifique, possédant les gènes manquant du virus déficient (cellules transcomplémentantes) (voir tableau 2) ;
- soit dans une lignée cellulaire normale, en même temps que des plasmides portant les gènes viraux manquants (plasmides auxiliaires), appelée aussi « cellule d'emballage » ou « cell packaging » (voir figure 9). Par mesure de sécurité, ces gènes sont répartis sur plusieurs plasmides. Cette technique tend à se développer.

Ces cellules pourront produire des vecteurs viraux recombinants pouvant infecter d'autres cellules. Par contre, sans le recours aux cellules transcomplémentantes ou aux plasmides auxiliaires, le virus déficient ne pourra pas se multiplier.

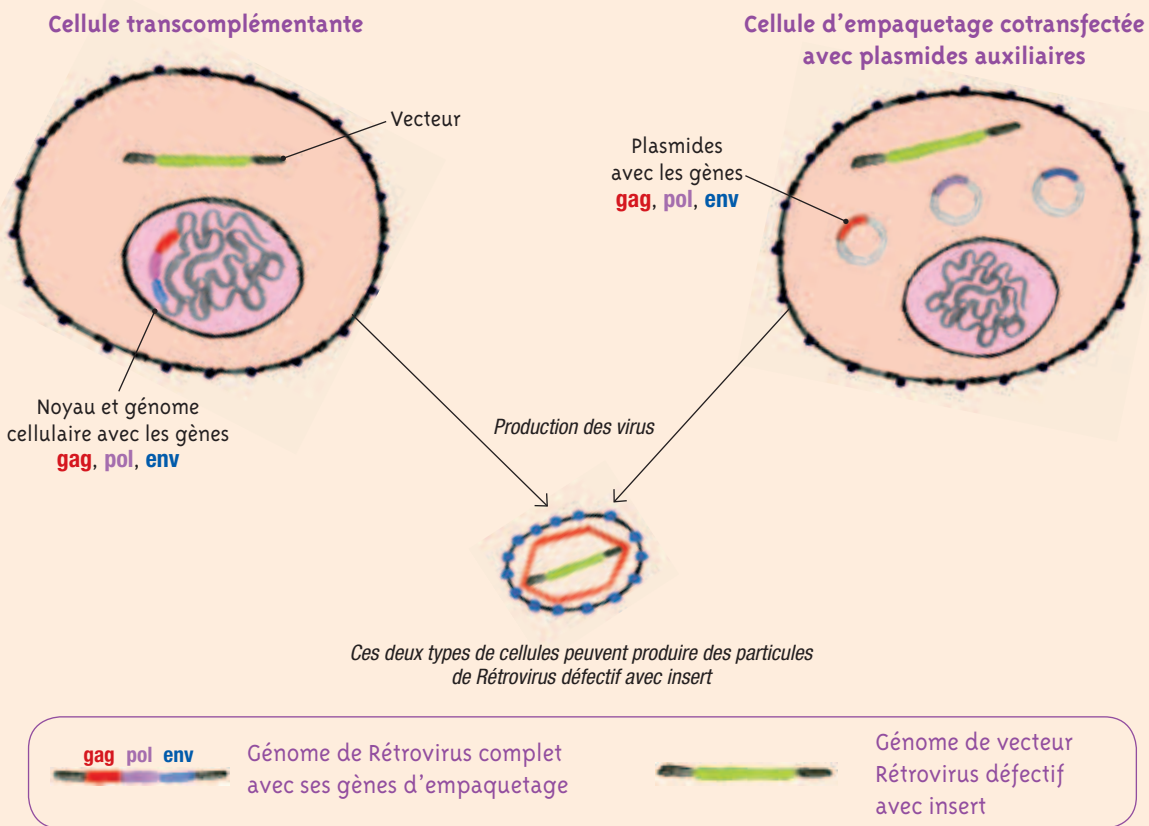
Il est également possible de changer certains gènes du virus (gènes codant pour des protéines d'enveloppe), afin qu'il reconnaisse des cellules hôtes appartenant à des espèces différentes. En effet, les protéines d'enveloppe participent à la reconnaissance et à la pénétration dans les cellules cibles. Ainsi, en intégrant le gène de la glycoprotéine G du VSV (virus de la stomatite vésiculaire) dans un Rétrovirus, celui-ci peut reconnaître et pénétrer dans de nombreuses autres lignées cellulaires reconnues par le VSV.

Les vecteurs rétroviraux de troisième génération peuvent également être délétés en U₃, ce qui inhibe la transcription des provirus (voir § 1.4 « Cas particulier des Rétrovirus »). L'insert peut néanmoins être transcrit puisqu'un promoteur spécifique au gène d'intérêt aura été placé en amont.

Tableau 2 - Lignées cellulaires transcomplémentantes utilisées en fonction des vecteurs viraux.

Virus	Gènes délétés	Lignée cellulaire hôte
MLV (Murine Leukemia virus)	<i>gag, env, pol</i>	HEK 293 (cellules rénales embryonnaires humaines)
VIH 1 (Human immunodeficiency virus)	<i>gag, env, pol, vif, vpr, nef, vpu, tat, rev</i>	HEK 293 FT
Ad2, Ad5 humain (Adénovirus de type 2 ou 5)	<i>E1, E2, E3</i>	HEK 293 ou HEK 911

Figure 9 - Mécanismes de transcomplémentation.



2.5. Les cellules hôtes

En fonction de l'application envisagée, le type de cellules hôtes sera choisi en concordance avec les types de vecteurs et d'inserts. Ainsi, différents types de cellules hôtes peuvent être envisagés :

● Les bactéries

Les souches d'*Escherichia coli* choisies sont généralement issues de la souche sauvage *E. coli* K 12 non pathogène pour l'homme.

● Les levures

La souche la plus utilisée est *Saccharomyces cerevisiae* (levure du boulanger). Cette levure très utilisée en agroalimentaire n'est pas pathogène pour l'homme.

● Les cultures cellulaires primaires

Les cellules mises en culture sont issues directement d'organes ou de tissus prélevés sur l'organisme. Ces cellules meurent après un certain nombre de divisions *in vitro*.

● Les lignées cellulaires immortalisées

Certaines cellules eucaryotes peuvent acquérir la capacité de proliférer indéfiniment *in vitro*. On parle alors de lignées établies ou immortalisées. Ce phénomène peut se produire spontanément en culture ou lors d'apparition de tumeur, mais peut également être provoqué par infection avec un virus transformant (SV40⁽¹⁰⁾ ou virus Epstein Barr par exemple) ou par introduction d'un oncogène, par exemple le gène de la protéine T du SV40.

(10) SV40 : Simianvirus 40.

>3. Évaluation des risques liés à la production d'OGM

L'évaluation des risques prend en compte le danger, c'est-à-dire la pathogénicité pour l'homme et l'environnement, que représente chaque élément nécessaire à l'élaboration de l'OGM :

- organisme donneur,
- séquence insérée (ou insert, gène d'intérêt),
- vecteur,
- organisme receveur,
- OGM final.

L'évaluation des risques doit également considérer les manipulations effectuées et les modes d'utilisation de l'OGM, afin d'évaluer les expositions possibles des opérateurs. Ceux-ci peuvent être exposés par :

- piqûre/coupure avec des seringues ou des objets contaminés,
- projection sur les muqueuses ou contact avec la peau lésée,
- inhalation de bioaérosols, pouvant être créés par rupture de films liquides présents à l'orifice des tubes, à l'extrémité des pipettes, sur les anses d'ensemencement, par vibration de liquide, par pulvérisation de lyophilisat...,
- ingestion, en portant les mains ou des objets contaminés à la bouche ou lors de projections sur les lèvres.

Quel que soit le mode de pénétration, les conséquences pour l'opérateur pourraient être de différents types :

- risques d'infections (multiplication chez l'opérateur du micro-organisme donneur, vecteur, receveur ou de l'OGM),
- risques liés aux produits d'expression de l'insert (ex : toxine, protéine oncogène),
- risques liés au site d'intégration de l'insert (risque d'oncogénicité ou d'insertion au milieu d'un gène fonctionnel).

Le médecin du travail ne peut évaluer seul les risques encourus lors de la construction et de la manipulation des OGM. C'est une démarche collective pluridisciplinaire, à mener avec les préventeurs et les chercheurs. En effet, l'évaluation des dangers est très difficile en raison de la grande diversité des éléments intervenant dans la construction d'un OGM (ADN, ARN, virus, bactéries, plasmides, cellules humaines ou animales, autres OGM, etc.). Cette évaluation doit se faire étape par étape, en considérant chaque élément : l'organisme/cellule donneur, l'insert, le vecteur et l'organisme/cellule receveur.

• 3.1. L'organisme donneur

Bien que ne faisant pas partie des éléments constitutifs de l'OGM, l'organisme donneur à l'origine de l'insert pourrait représenter un danger au moment de sa manipulation.

En effet, le gène d'intérêt peut provenir d'organismes pluricellulaires (homme, souris...), d'organes, de tumeurs, d'OGM, de micro-organismes, de souches cellulaires achetées dans des banques spécialisées (ATCC¹¹, DSMZ¹², CRBIP¹³...) ou échangées entre laboratoires.

Le micro-organisme donneur peut être pathogène et classé en fonction de son groupe de danger 2 ou 3¹⁴. Cependant, ce n'est pas parce qu'un micro-organisme n'est pas classé qu'il ne présente pas de danger. Une étude bibliographique permettra d'estimer le danger des micro-organismes non classés. Concernant les organes ou échantillons biologiques prélevés *in vivo*, il est important de disposer d'un maximum d'informations sur le statut du donneur. La qualification des échantillons, selon les critères de l'EFS¹⁵, permettra au moins de s'assurer de l'absence de certains pathogènes, comme les agents responsables du Sida, des hépatites B ou C, de la leucémie lymphoïde T de l'adulte,

de la syphilis, de la maladie d'Epstein-Barr, d'infection à Cytomégalovirus, de la toxoplasmose et du paludisme. D'autres agents pathogènes peuvent être recherchés dans l'échantillon, en fonction de l'organe ou de la zone géographique dont il provient (zones endémiques pour la fièvre Ebola, la fièvre de la vallée du Rift, l'histoplasmosse...). À défaut d'information, il convient dans la mesure du possible de conserver un échantillon permettant de faire des analyses ultérieures en cas d'accident.

Si l'organisme donneur provient de souches cellulaires commercialisées ou échangées entre laboratoire, le groupe de danger 1, 2 ou 3 sera communiqué par le fournisseur.

Les questions permettant d'analyser les dangers des organismes donneurs sont reprises dans l'arbre décisionnel de l'annexe 1.

• 3.2. La séquence insérée

Lors des étapes précédant l'intégration du gène d'intérêt dans un vecteur, l'opérateur peut entrer en contact accidentel avec l'acide nucléique. En théorie, pour s'exprimer chez l'homme, un fragment d'ADN nu devrait pénétrer une cellule et intégrer le génome. S'il s'agissait d'un ARNm, il pourrait être traduit dans le cytoplasme grâce à la messagerie cellulaire.

Tout ceci reste peu probable. Il n'a pas été montré qu'un fragment d'acide nucléique puisse pénétrer naturellement à l'intérieur des cellules humaines. À l'heure actuelle, aucune pathologie liée à de telles circonstances n'a été signalée.

Par contre, une fois insérée dans un vecteur, une séquence d'ADN peut pénétrer la cellule et représenter un danger pour l'homme, si cet ADN code pour une protéine susceptible d'interférer dans le fonctionnement d'une cellule.

(11) ATCC : American Type Culture Collection.

(12) DSMZ : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

(13) CRBIP : Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur.

(14) Art. R.4421-3 du code du travail et liste des agents biologiques pathogènes définie dans l'arrêté du 18 juillet 1994 modifié.

(15) EFS : établissement français du sang.

Ainsi, le Haut Conseil des biotechnologies distingue deux situations :

- les inserts de type A, pour lesquels il n'y a pas *a priori* de danger dû à leur expression.
- les inserts de type B, pour lesquels il existe un risque présomptif ou avéré (par exemple, gènes codant pour des récepteurs hormonaux, des facteurs de croissance, gènes de reprogrammation, d'activation ou d'inhibition de la prolifération cellulaire, gène agissant sur l'apoptose ou le développement embryonnaire...).

Une « liste indicative et *non exhaustive* de séquences de catégories A et B »¹⁶, disponibles sur le site du HCB, peut aider le médecin du travail et les préventeurs à évaluer le danger. Cette liste prend en compte les séquences virales, cellulaires et les toxines. Ces dernières sont considérées comme appartenant *a priori* à la catégorie B. De même, le Haut Conseil des biotechnologies précise que les séquences virales susceptibles de modifier le tropisme¹⁷ d'un virus (en modifiant les protéines de surface de type glycoprotéine par exemple) sont considérées comme des séquences de catégorie B.

En l'absence d'information sur le danger de la protéine produite par l'insert, il est conseillé de considérer l'insert comme appartenant au type B.

Les questions permettant d'analyser les dangers des séquences insérées sont reprises dans l'arbre décisionnel de l'annexe 2.

• 3.3. Les vecteurs

Les vecteurs véhiculent une séquence clonée éventuellement modifiée. Certains vecteurs peuvent être dangereux pour l'homme, parce qu'ils sont naturellement pathogènes ou parce qu'ils peuvent s'intégrer dans le génome de la cellule hôte.

• Les plasmides et les phages

Les plasmides et les phages sauvages ne pénètrent pas naturellement dans les cellules eucaryotes. S'ils y pénétraient artificiellement, ils ne pourraient pas s'y multiplier. Par contre, en cas de pénétration accidentelle dans les cellules humaines, des plasmides auxquels a été ajoutée une origine de réplication de type eucaryote (*voir § 2.1 « Les plasmides »*) pourraient se multiplier.

• Les Baculovirus

Les Baculovirus sont des virus d'insectes. Ils sont utilisés pour intégrer des gènes d'intérêt dans des cellules d'insectes, bien qu'ils puissent également pénétrer d'autres cellules de mammifère (*voir § 2.3 « Les Baculovirus »*). En cas d'accident, certains Baculovirus peuvent donc pénétrer des cellules humaines, mais il n'y a alors :

- ni intégration de l'insert dans le génome cellulaire,
- ni transcription du génome viral,
- ni production de particules virales.

Les Baculovirus sont donc naturellement inoffensifs pour l'homme.

• Les autres vecteurs viraux

Les voies de pénétration des vecteurs viraux sont théoriquement celles des virus sauvages : par exemple la voie respiratoire pour les Adénovirus et les voies sanguine et muqueuse pour le VIH. Cependant, certaines recherches peuvent nécessiter le changement de tropisme d'un virus pour une espèce, un organe, un tissu ou un type cellulaire. Il est donc important de connaître précisément les cellules cibles de chaque vecteur.

On utilise régulièrement des vecteurs issus du Rétrovirus murin sauvage MLV, du Lentivirus humain VIH 1, de l'Adénovirus Ad5 et d'autres virus tels que l'Adeno-Associated virus (AAV), ou encore le virus de la vaccine ou de la rougeole (*voir tableau 1*).

Les vecteurs viraux sont utilisés sous forme de particules virales défectives. Privés de leurs

(16) www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/cid54116/principes-de-classement-et-guides-officiels-de-la-commission-de-genie-genetique-fevrier-2001.html

(17) Tropisme : affinité d'un agent infectieux pour un règne, un genre, une famille, une espèce, un organe, un tissu ou un type cellulaire.

gènes codant pour des protéines indispensables au cycle de multiplication, ils ne pourront pas se reconstituer et donc se propager hors de la cellule. Ainsi, ils peuvent s'introduire dans une cellule eucaryote, mais ne peuvent pas propager l'infection, ce qui protège le manipulateur en cas d'accident (voir tableau 2).

Cependant, les vecteurs privés de leurs gènes *gag*, *pol*, *env* pour les Rétrovirus, ou *E1*, *E2*, *E3* pour les Adénovirus, pourraient se recombiner avec des virus déjà présents dans les cellules hôtes. Il en va de même pour tous les virus délétés utilisés en laboratoire.

En effet, *in vitro*, les vecteurs viraux défectifs ne se reconstituent que parce qu'ils ont trouvé dans les cellules transcomplémentantes les protéines qui leur manquent. De même, en cas d'accident, si le virus délété pénètre dans un organisme ayant préalablement été contaminé par un virus sauvage de la même espèce, le virus défectif pourrait trouver des gènes transcomplémentants. En effet, le virus sauvage est capable de synthétiser toutes les protéines nécessaires à la fabrication du virus entier. Dans ce cas, le virus défectif pourrait se propager chez le manipulateur.

● Cas particulier des Rétrovirus

Les Rétrovirus (par exemple HIV et MLV) s'intègrent dans le génome cellulaire. Même les vecteurs défectifs pour les gènes *gag*, *pol*, *env* gardent leur promoteur de transcription U_3 et donc leur capacité à transcrire leur provirus (voir § 1.4 «Cas particulier des Rétrovirus»).

Afin d'éviter toute multiplication d'un vecteur chez le manipulateur en cas d'accident, on utilise des vecteurs délétés en U_3 (vecteur ΔU_3 ou SIN : self inactivating vector). Le provirus ne peut alors plus être transcrit. Aucune particule virale ne peut se reformer, même par transcomplémentation en cas de présence d'un virus sauvage dans la cellule (voir tableaux 3 et 4, pages suivantes).

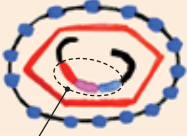

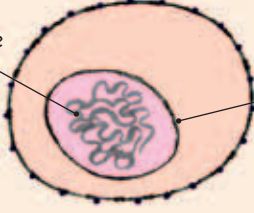
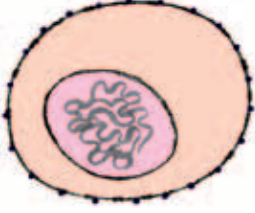
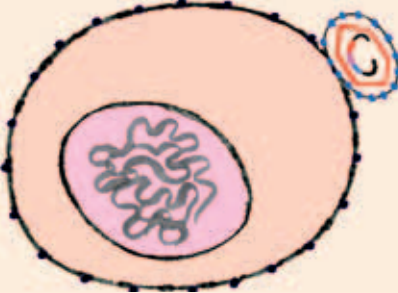
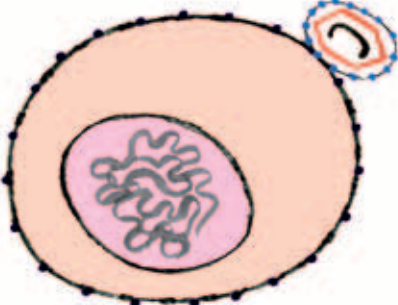
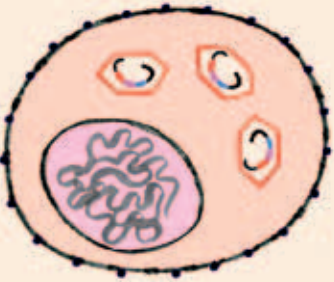
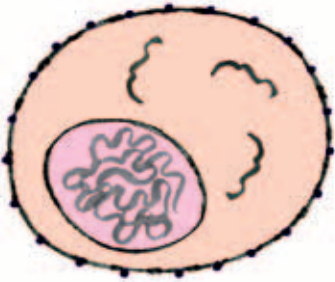
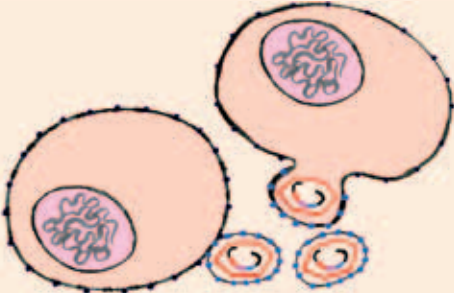
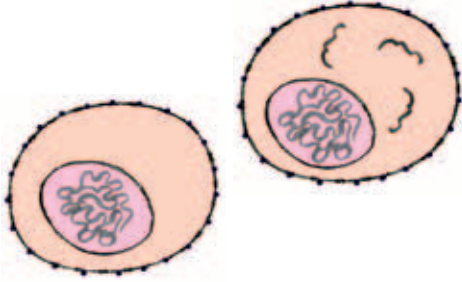
Afin de s'assurer de l'efficacité de ces techniques de délétion, il est possible d'effectuer différents types de tests, permettant de détecter d'éventuels vecteurs recombinants compétents pour la réplication.





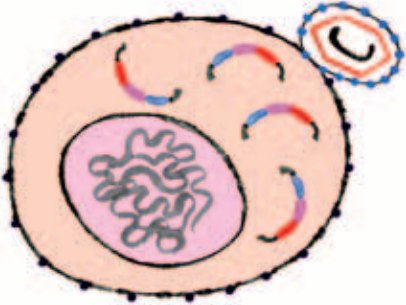


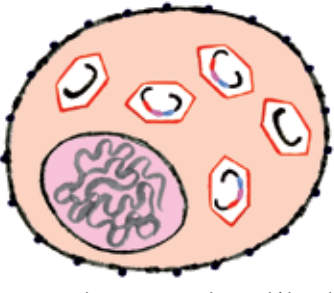


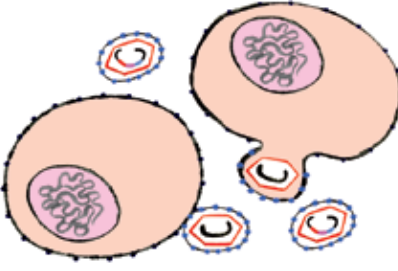
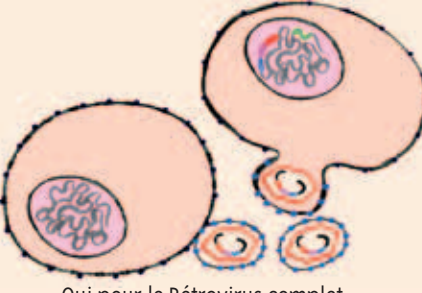
Les questions permettant d'analyser les dangers des vecteurs sont reprises dans l'arbre décisionnel de l'annexe 3.

Tableau 3 - Étapes de réplication possibles selon les délétions des Rétrovirus (d'après P. Bouillé).

Réplication Rétrovirus	Rétrovirus délété <i>gag/pol/env</i>	Rétrovirus délété <i>gag/pol/env/U₃</i>
Reconnaissance du récepteur	Reconnaissance du récepteur	Reconnaissance du récepteur
Entrée	Entrée	Entrée
Transcription inverse	Transcription inverse	Transcription inverse
Translocation nucléaire	Translocation nucléaire	Translocation nucléaire
Intégration dans le génome	Intégration dans le génome	Intégration dans le génome
Transcription du provirus	Transcription du provirus (transcription de l'insert)	Pas de transcription du provirus (transcription de l'insert grâce à l'ajout d'un promoteur en amont de l'insert)
Epissage	Epissage	
Traduction	Traduction	
Assemblage des virions	Pas d'assemblage des virions, en l'absence de <i>gag</i> , <i>pol</i> , <i>env</i>	
Sortie du virus		

Tableau 4 - Différents mécanismes d'infection selon la nature du virus et de la cellule hôte.

<p>Virus de laboratoire</p>	<p>Complet</p>  <p>Génome nécessaire à l'empaquetage</p>	<p>Défectif</p> 
<p>Cellule hôte</p>	<p>Naturelle</p>  <p>Génome</p> <p>Noyau</p>	<p>Naturelle</p> 
<p>Reconnaissance virus-cellule</p>		
<p>Reconstitution de nouveaux virus dans la cellule</p>	 <p>Oui</p>	 <p>Non</p>
<p>Invasion des cellules voisines</p>	 <p>Oui</p>	 <p>Non</p>

Défectif	Défectif	Rétrovirus délété U ₃
<p>Transcomplémentante</p> 	<p>Naturelle mais déjà contaminée par un virus complet de la même espèce que le virus du laboratoire</p> 	<p>Naturelle mais déjà contaminée par un Rétrovirus complet de la même espèce que le virus du laboratoire</p> 
		
 <p>Oui</p>	 <p>Oui pour le virus complet et défectif</p>	 <p>Oui pour le Rétrovirus complet. Non pour le Rétrovirus délété U₃.</p>
 <p>Oui</p>	 <p>Oui pour le virus complet et défectif</p>	 <p>Oui pour le Rétrovirus complet. Non pour le Rétrovirus délété U₃.</p>

• 3.4. L'organisme receveur

L'organisme ou les cultures cellulaires recevant le vecteur et son insert peuvent présenter un danger pour l'homme et l'environnement. L'évaluation des risques du receveur est similaire à celle effectuée pour les organismes/cellules donneurs (annexe 1).

• Les cellules procaryotes

Parmi les bactéries utilisées comme organisme receveur, les plus couramment employées sont les souches d'*Echerichia Coli* issues de la souche *E. coli* K12 non pathogène pour l'homme.

• Les cellules eucaryotes naturelles

Il peut s'agir de cellules de moisissures, de levures, d'insectes, de plantes ou provenant de tissus d'espèces et d'organes divers. Les lignées cellulaires peuvent être pathogènes et seront alors classées dans les groupes de danger 2 ou 3¹⁸.

Pour les lignées commercialisées, il est indispensable de demander au fournisseur le groupe de danger du matériel biologique et le niveau de confinement nécessaire à sa manipulation.

Lors des échanges entre laboratoires, la réglementation prévoit que le laboratoire fournisseur doit communiquer en même temps que le matériel biologique, la référence du dossier correspondant déposé auprès du Haut Conseil des biotechnologies.

Pour les cultures primaires établies en laboratoire, la nature du risque est identique à celle des échantillons biologiques dont elles sont issues. Il est alors important de qualifier l'échantillon (voir § 3.1 «L'organisme donneur») et de conserver un échantillon permettant de faire des sérologies ultérieures en cas d'accident.

• Les cellules transcomplémentantes

En laboratoire, les cellules transcomplémentantes ont, dans leur génome ou dans des plasmides, les gènes manquant au vecteur délété. Ainsi, le vecteur délété peut se répliquer dans la cellule transcomplémentante (par exemple : HEK 293/MLV, HEK 911/Ad5..., voir tableau 2).

Afin de connaître la dangerosité de ces cellules, il convient de se référer au classement fourni par la banque de cellules.

• 3.5. L'OGM

La classe de l'OGM final est évaluée en fonction de chacun des éléments qui le composent : vecteur, insert et organisme receveur. Le danger présenté par l'élément le plus dangereux sera prédominant.

De plus, il faut prendre en compte les interactions entre chaque élément de l'OGM. Ainsi une cellule transcomplémentant un vecteur délété peut modifier le niveau du vecteur. L'organisme résultant de l'assemblage de ces éléments peut parfois présenter un danger supérieur ou inférieur à celui du plus dangereux des composants du trinôme.

Les questions permettant d'analyser les dangers des OGM sont reprises dans l'arbre décisionnel de l'annexe 4.

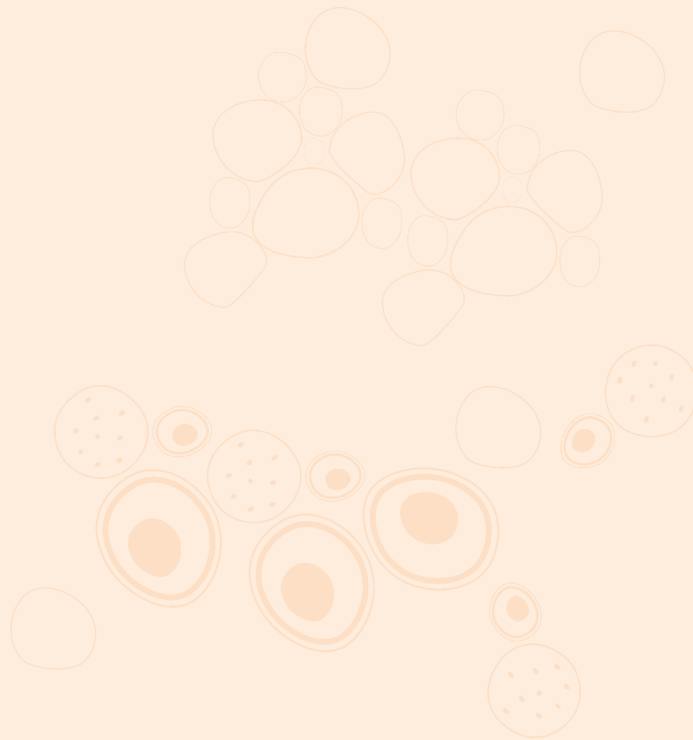
L'évaluation des risques sera retranscrite dans la « Déclaration d'utilisation ou demande d'agrément » à adresser au Haut Conseil des biotechnologies (HCB), qui donnera son avis final sur le classement et les niveaux de confinement. Ces derniers peuvent varier selon l'étape de construction d'un OGM, en fonction des risques identifiés. Ainsi, certaines étapes peuvent nécessiter un confinement de niveau 3, tandis que pour d'autres le confinement de niveau 2 suffira.

(18) Art. R. 4421-3 du code du travail et liste des agents biologiques pathogènes définie dans l'arrêté du 18 juillet 1994 modifié.

Exemple de classement

L'Adénovirus humain de type 5 (Ad5), initialement de groupe de danger 2, est utilisé comme vecteur défectif pour la réplication. En tant que vecteur adénoviral, il est considéré par le Haut Conseil des biotechnologies comme étant de groupe de danger 2. Le couple vecteur Ad5-insert porteur de séquences de catégorie A, ne présentant

pas de danger objectif ou potentiel, est de classe 2. Par contre, le couple vecteur Ad5-insert porteur de séquences de catégorie B, présentant un danger potentiel estimé plus élevé que le danger présenté par le vecteur Ad5 ou l'insert, considérés séparément, est de classe 3 (guide du Haut Conseil des biotechnologies).



> Conclusion

Il existe pratiquement autant de constructions d'organismes génétiquement modifiés (OGM) que d'équipes de recherche. L'évaluation des dangers doit donc se faire au cas par cas, en tenant compte des différents éléments intervenant dans la construction de l'OGM : insert, vecteur, organisme donneur et receveur. Les arbres décisionnels éclairent le préventeur sur les nécessaires questions permettant d'évaluer les dangers de chaque élément pris séparément.

Une fois les dangers estimés, l'observation des postes de travail permettra de mettre en évidence les expositions possibles à ces dangers : par piqûres/coupures avec du matériel contaminé, par inhalation de particules virales naturellement pathogènes par voie respiratoire, par contact main-bouche après avoir manipulé des bactéries pathogènes par voie digestive, etc.

Suite à cette évaluation de risques, les mesures de prévention techniques habituelles en laboratoires de biologie seront appliquées. Les travaux se dérouleront dans une salle technique confinée respectant les dispositions de l'arrêté du 16 juillet 2007 définissant les niveaux de confinement (contraintes techniques concernant les locaux, le matériel et les pratiques de travail). Ces dispositions pourront éventuellement être complétées par des mesures spécifiques préconisées par le Haut Conseil des biotechnologies (HCB). Les niveaux de confinement peuvent varier en fonction des étapes de la construction de l'OGM. Le confinement peut ainsi passer d'un niveau 1 (préparation de plasmide) à un niveau 3 (préparation de vecteur), puis revenir à un niveau 2 (utilisation de vecteur défectif)... De plus, il conviendra de respecter les règles de prévention en laboratoire (ne pas pipeter à la bouche, porter les vêtements et les équipements de protection spécifiques, travailler sous poste de sécurité microbiologique en cas de production de bioaérosols...) et les mesures d'hygiène (se laver les mains, ne pas boire ou manger sur le lieu de travail).

Parce que les constructions d'OGM sont disparates, le suivi médical devra se faire au cas par cas, en fonction des manipulations et des individus. Les arbres décisionnels aideront le médecin du travail dans son questionnement avec le manipulateur, afin d'établir avec lui un suivi médical personnalisé et des conduites à tenir en cas d'accident.

Annexes

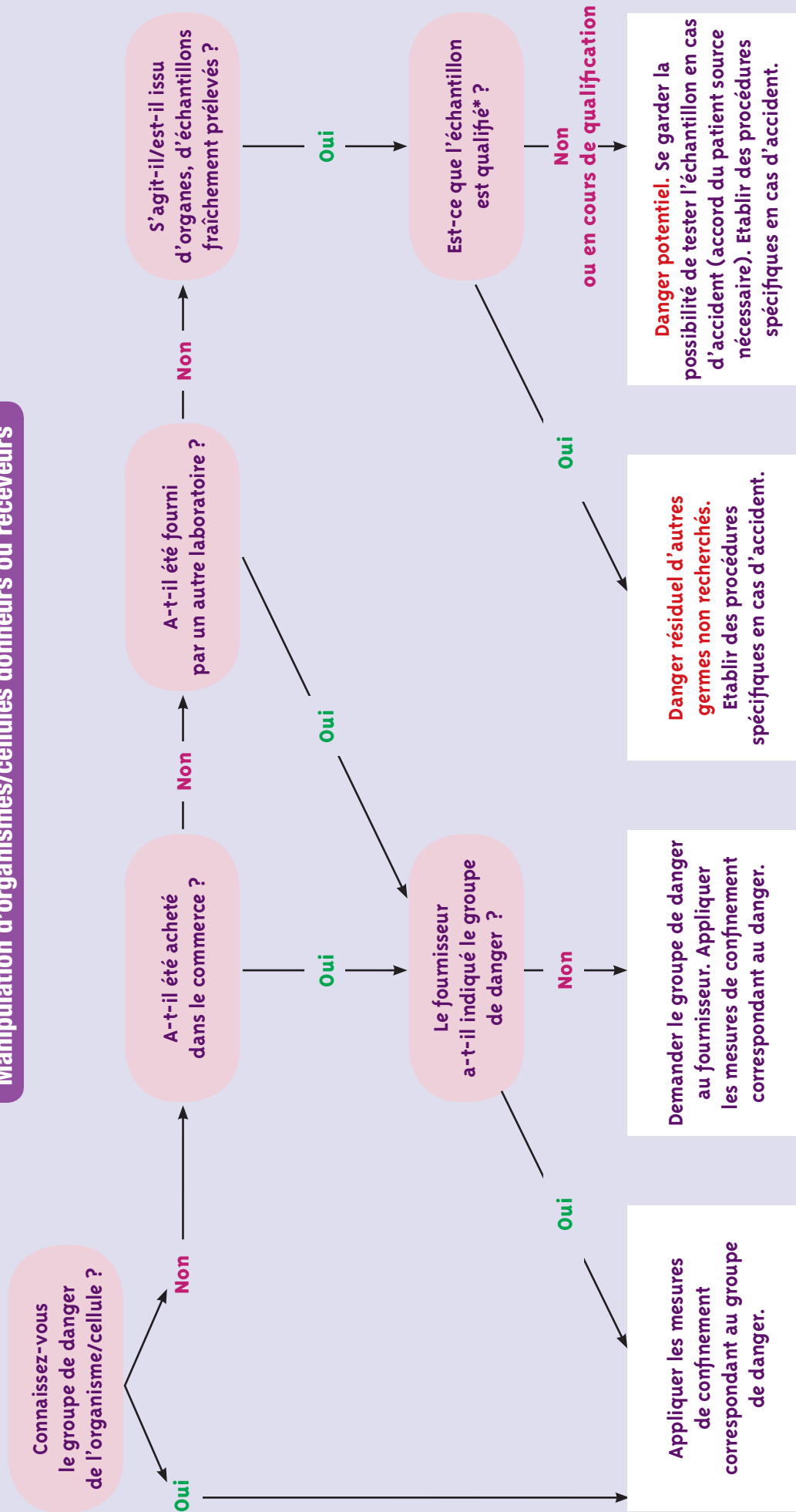
1. Manipulation d'organismes/cellules donneurs ou receveurs

2. Manipulation d'inserts

3. Manipulation de vecteurs

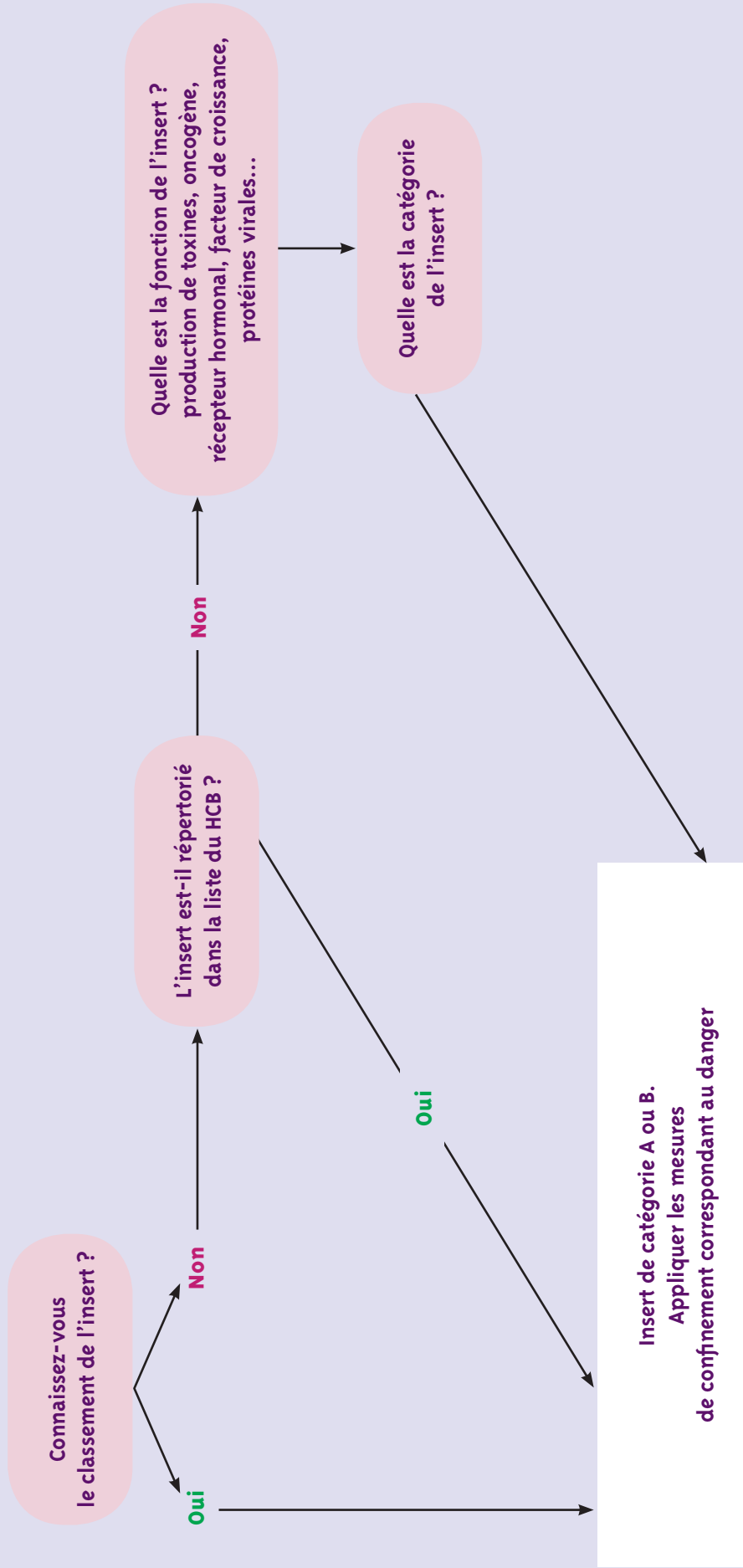
4. Manipulation d'OGM en milieu confiné

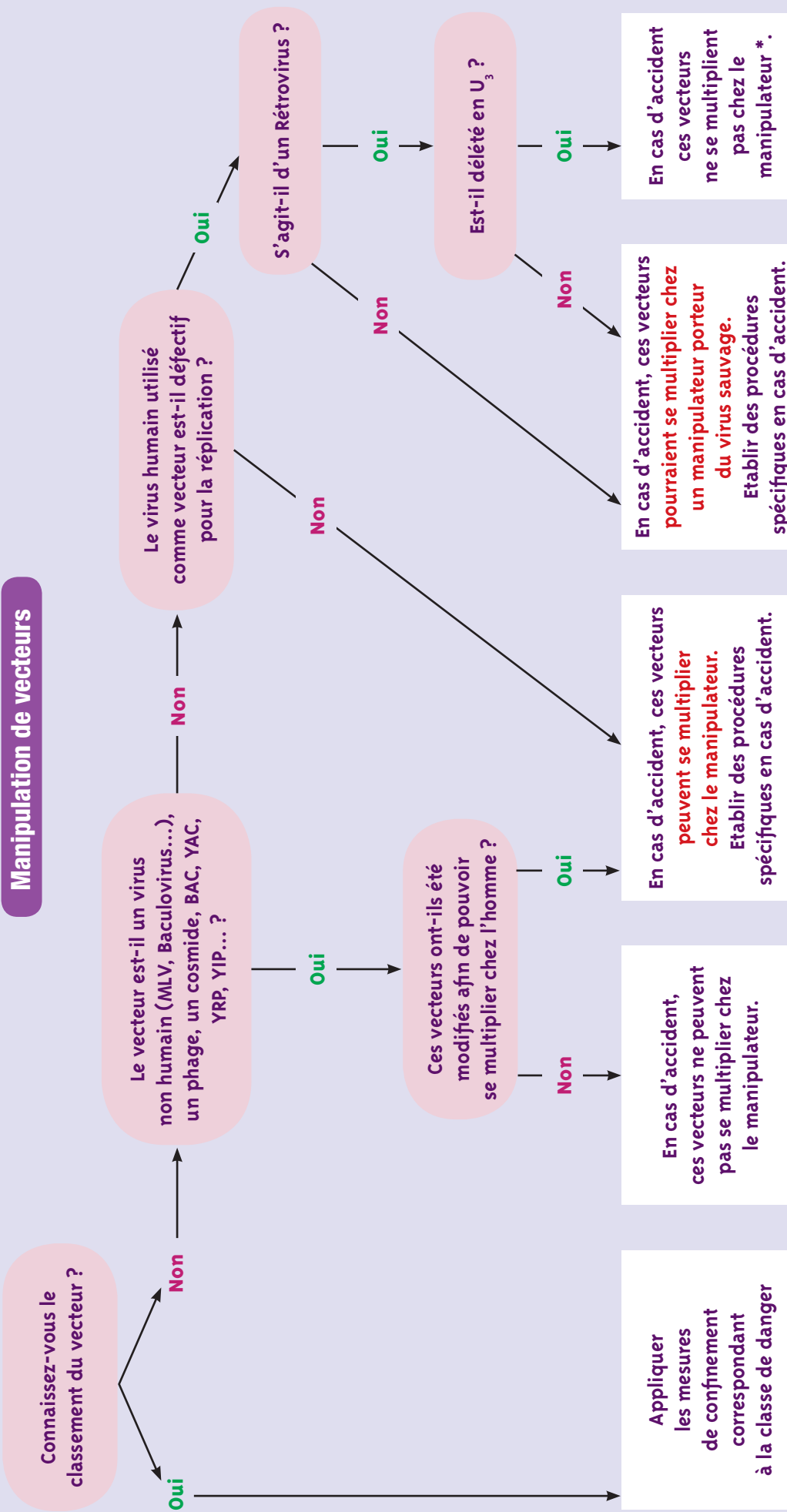
Manipulation d'organismes/cellules donneurs ou receveurs



*Qualifié : échantillon dans lequel on a vérifié l'absence des pathogènes suivants : agents responsables du Sida, des hépatites B ou C, de la leucémie lymphoïde T de l'adulte, de la syphilis, de la maladie d'Epstein-Barr, d'infection à Cytomégalo virus, de la toxoplasmose et du paludisme (liste EFS sujette à actualisation).

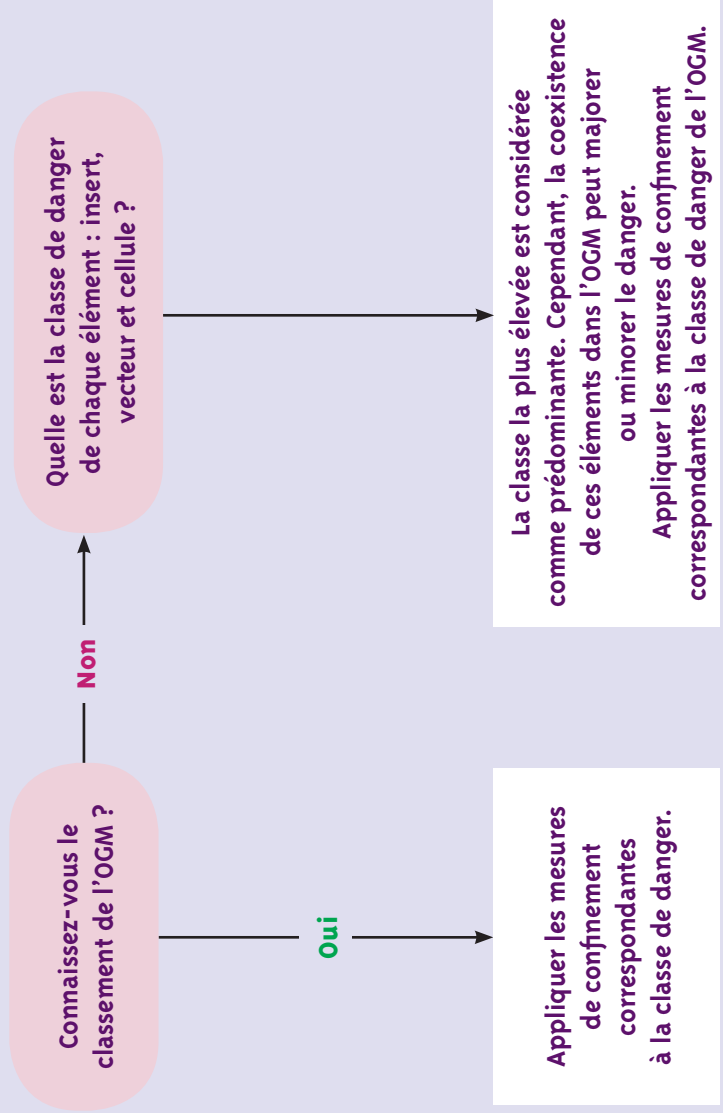
Manipulation d'inserts





* Le HCB précise que la manipulation de Lentivecteur ΔU₃ contenant un insert de type A peut se faire dans une salle technique de niveau de confinement 2. Par contre si le volume de Lentivecteur préparé excède 200 mL de surnageant brut non purifié et non concentré, les manipulations se feront en laboratoire de niveau de confinement 3.

Manipulation d'OGM en milieu confiné



Pour obtenir en prêt les audiovisuels et multimédias et pour commander les brochures et les affiches de l'INRS, adressez-vous au service Prévention de votre Carsat, Cram ou CGSS.

Services Prévention des Carsat et des Cram

Carsat ALSACE-MOSELLE

(67 Bas-Rhin)
14 rue Adolphe-Seyboth
CS 10392
67010 Strasbourg cedex
tél. 03 88 14 33 00
fax 03 88 23 54 13
prevention.documentation@carsat-am.fr
www.carsat-alsacemoselle.fr

(57 Moselle)
3 place du Roi-George
BP 31062
57036 Metz cedex 1
tél. 03 87 66 86 22
fax 03 87 55 98 65
www.carsat-alsacemoselle.fr

(68 Haut-Rhin)
11 avenue De-Lattre-de-Tassigny
BP 70488
68018 Colmar cedex
tél. 03 88 14 33 02
fax 03 89 21 62 21
www.carsat-alsacemoselle.fr

Carsat AQUITAINE

(24 Dordogne, 33 Gironde,
40 Landes, 47 Lot-et-Garonne,
64 Pyrénées-Atlantiques)
80 avenue de la Jallère
33053 Bordeaux cedex
tél. 05 56 11 64 36
fax 05 57 57 70 04
documentation.prevention@carsat-aquitaine.fr
www.carsat.aquitaine.fr

Carsat AUVERGNE

(03 Allier, 15 Cantal, 43 Haute-Loire,
63 Puy-de-Dôme)
48-50 boulevard Lafayette
63058 Clermont-Ferrand cedex 1
tél. 04 73 42 70 76
fax 04 73 42 70 15
preven.carsat@orange.fr
www.carsat-auvergne.fr

Carsat BOURGOGNE et FRANCHE-COMTÉ

(21 Côte-d'Or, 25 Doubs, 39 Jura,
58 Nièvre, 70 Haute-Saône,
71 Saône-et-Loire, 89 Yonne,
90 Territoire de Belfort)
ZAE Cap-Nord, 38 rue de Cracovie
21044 Dijon cedex
tél. 08 21 10 21 21
fax 03 80 70 52 89
prevention@carsat-bfc.fr
www.carsat-bfc.fr

Carsat BRETAGNE

(22 Côtes-d'Armor, 29 Finistère,
35 Ille-et-Vilaine, 56 Morbihan)
236 rue de Châteaugiron
35030 Rennes cedex
tél. 02 99 26 74 63
fax 02 99 26 70 48
drpcdi@carsat-bretagne.fr
www.carsat-bretagne.fr

Carsat CENTRE

(18 Cher, 28 Eure-et-Loir, 36 Indre,
37 Indre-et-Loire, 41 Loir-et-Cher, 45 Loiret)
36 rue Xaintrailles
45033 Orléans cedex 1
tél. 02 38 81 50 00
fax 02 38 79 70 29
prev@carsat-centre.fr
www.carsat-centre.fr

Carsat CENTRE-OUEST

(16 Charente, 17 Charente-Maritime,
19 Corrèze, 23 Creuse, 79 Deux-Sèvres,
86 Vienne, 87 Haute-Vienne)
4 rue de la Reynie
87048 Limoges cedex
tél. 05 55 45 39 04
fax 05 55 45 71 45
cirp@carsat-centreouest.fr
www.carsat-centreouest.fr

Cram ÎLE-DE-FRANCE

(75 Paris, 77 Seine-et-Marne,
78 Yvelines, 91 Essonne,
92 Hauts-de-Seine, 93 Seine-Saint-Denis,
94 Val-de-Marne, 95 Val-d'Oise)
17-19 place de l'Argonne
75019 Paris
tél. 01 40 05 32 64
fax 01 40 05 38 84
prevention.atmp@cramif.cnamts.fr
www.cramif.fr

Carsat LANGUEDOC-ROUSSILLON

(11 Aude, 30 Gard, 34 Hérault,
48 Lozère, 66 Pyrénées-Orientales)
29 cours Gambetta
34068 Montpellier cedex 2
tél. 04 67 12 95 55
fax 04 67 12 95 56
prevdoc@carsat-lr.fr
www.carsat-lr.fr

Carsat MIDI-PYRÉNÉES

(09 Ariège, 12 Aveyron, 31 Haute-Garonne,
32 Gers, 46 Lot, 65 Hautes-Pyrénées,
81 Tarn, 82 Tarn-et-Garonne)
2 rue Georges-Vivent
31065 Toulouse cedex 9
tél. 0820 904 231 (0,118 €/min)
fax 05 62 14 88 24
doc.prev@carsat-mp.fr
www.carsat-mp.fr

Carsat NORD-EST

(08 Ardennes, 10 Aube, 51 Marne,
52 Haute-Marne, 54 Meurthe-et-Moselle,
55 Meuse, 88 Vosges)
81 à 85 rue de Metz
54073 Nancy cedex
tél. 03 83 34 49 02
fax 03 83 34 48 70
documentation.prevention@carsat-nordest.fr
www.carsat-nordest.fr

Carsat NORD-PICARDIE

(02 Aisne, 59 Nord, 60 Oise,
62 Pas-de-Calais, 80 Somme)
11 allée Vauban
59662 Villeneuve-d'Ascq cedex
tél. 03 20 05 60 28
fax 03 20 05 79 30
bedprevention@carsat-nordpicardie.fr
www.carsat-nordpicardie.fr

Carsat NORMANDIE

(14 Calvados, 27 Eure, 50 Manche,
61 Orne, 76 Seine-Maritime)
Avenue du Grand-Cours, 2022 X
76028 Rouen cedex
tél. 02 35 03 58 22
fax 02 35 03 60 76
prevention@carsat-normandie.fr
www.carsat-normandie.fr

Carsat PAYS DE LA LOIRE

(44 Loire-Atlantique, 49 Maine-et-Loire,
53 Mayenne, 72 Sarthe, 85 Vendée)
2 place de Bretagne
44932 Nantes cedex 9
tél. 02 51 72 84 08
fax 02 51 82 31 62
documentation.rp@carsat-pl.fr
www.carsat-pl.fr

Carsat RHÔNE-ALPES

(01 Ain, 07 Ardèche, 26 Drôme, 38 Isère,
42 Loire, 69 Rhône, 73 Savoie,
74 Haute-Savoie)
26 rue d'Aubigny
69436 Lyon cedex 3
tél. 04 72 91 96 96
fax 04 72 91 97 09
preventionrp@carsat-ra.fr
www.carsat-ra.fr

Carsat SUD-EST

(04 Alpes-de-Haute-Provence,
05 Hautes-Alpes, 06 Alpes-Maritimes,
13 Bouches-du-Rhône, 2A Corse-du-Sud,
2B Haute-Corse, 83 Var, 84 Vaucluse)
35 rue George
13386 Marseille cedex 5
tél. 04 91 85 85 36
fax 04 91 85 75 66
documentation.prevention@carsat-sudest.fr
www.carsat-sudest.fr

Services Prévention des CGSS

CGSS GUADELOUPE

Immeuble CGRR, Rue Paul-Lacavé, 97110 Pointe-à-Pitre
tél. 05 90 21 46 00 – fax 05 90 21 46 13
lina.palmont@cgss-guadeloupe.fr

CGSS GUYANE

Espace Turenne Radamonthe, route de Raban,
BP 7015, 97307 Cayenne cedex
tél. 05 94 29 83 04 – fax 05 94 29 83 01

CGSS LA RÉUNION

4 boulevard Doret, 97704 Saint-Denis Messag cedex 9
tél. 02 62 90 47 00 – fax 02 62 90 47 01
prevention@cgss-reunion.fr

CGSS MARTINIQUE

Quartier Place-d'Armes, 97210 Le Lamentin cedex 2
tél. 05 96 66 51 31 et 05 96 66 51 32 – fax 05 96 51 81 54
prevention972@cgss-martinique.fr
www.cgss-martinique.fr

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) désigne par OGM, tout organisme dont le matériel génétique a été modifié autrement que par multiplication ou recombinaison naturelle. Quel que soit l'OGM, sa création nécessite les mêmes éléments : un gène d'intérêt, un vecteur introduisant ce gène vers sa nouvelle cellule cible. La manipulation de cultures cellulaires de toutes origines, l'usage de vecteurs viraux comme outil, l'apparition de nouveaux vecteurs, la complexification des techniques, rendent l'évaluation et la prévention des risques professionnels particulièrement délicates dans les laboratoires construisant et manipulant les OGM.

Ce guide a pour objectif d'aider les personnes en charge de la surveillance médicale et de la prévention à mieux comprendre et évaluer les risques biologiques liés à la construction et la manipulation des OGM en laboratoire.

La première partie rappelle les mécanismes moléculaires de base. La seconde présente les différents éléments nécessaires à la production d'un OGM : insert, vecteur, organismes donneur et receveur (les manipulations sur animaux et végétaux ne sont pas abordées ici). La troisième partie, qui peut se lire indépendamment des précédentes, expose les dangers potentiels de chacun de ces éléments. Des arbres décisionnels reprennent les principales questions que peuvent se poser les médecins ou les préventeurs, afin d'évaluer les dangers de chaque élément participant à la construction de l'organisme génétiquement modifié.



Institut national de recherche et de sécurité
pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles
30, rue Olivier-Noyer 75680 Paris cedex 14 • Tél. 01 40 44 30 00
Fax 01 40 44 30 99 • Internet: www.inrs.fr • e-mail: info@inrs.fr

Édition INRS ED 6131

1^{re} édition • juillet 2012 • 5 000 ex. • ISBN 978-2-7389-2019-5

