

FICHE TOXICOLOGIQUE

FT 236

Bromure d'éthidium

Fiche établie par les services techniques et médicaux de l'INRS
(N. Bonnard, M.-T. Brondeau, M. Falcy, D. Jargot, O. Schneider, P. Serre)

CARACTÉRISTIQUES

UTILISATIONS

Le bromure d'éthidium est un colorant fluorescent largement utilisé en :

- biologie moléculaire ;
- biologie cellulaire ;
- cytofluorométrie ;
- cytologie.

PROPRIÉTÉS PHYSIQUES [1 à 5]

Le bromure d'éthidium se présente sous la forme de cristaux de couleur rouge foncé, inodores, au goût amer.

Il est soluble dans l'eau (à raison de 5 g dans 100 g d'eau à 20 °C) et dans le trichlorométhane (1 g pour 750 g à 20 °C).

Ses principales caractéristiques physiques sont les suivantes :

Masse molaire	394,32
Point de fusion	238-240 °C



T+ - Très toxique

BROMURE D'ÉTHIDIUM

- R 22 – Nocif en cas d'ingestion.
 R 26 – Très toxique par inhalation.
 R 68 – Possibilité d'effets irréversibles.
 S 28 – Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec de l'eau.
 S 36/37 – Porter un vêtement de protection et des gants appropriés.
 S 45 – En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette).
 S 63 – En cas d'accident par inhalation, transporter la victime hors de la zone contaminée et la garder au repos.

214-984-6 – Étiquetage CE.



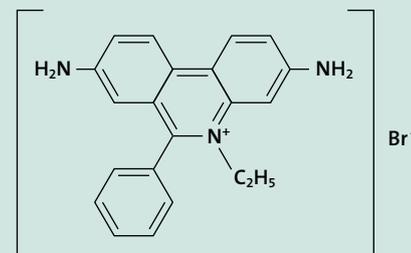
BROMURE D'ÉTHIDIUM

DANGER

- H 341 – Susceptible d'induire des anomalies génétiques.
 H 330 – Mortel par inhalation.
 H 302 – Nocif en cas d'ingestion.

Nota : Les conseils de prudence P sont sélectionnés selon les critères de l'annexe 1 du règlement CE n° 1272/2008.

214-984-6



$C_{21}H_{20}BrN_3$

Numéro CAS

1239-45-8

Numéro CE

214-984-6

Numéro INDEX

612-278-00-6

Synonymes

Bromure de 3,8-diamino-1-éthyl-6-phénylphénanthridinium
 Bromure de 3,8-diamino-5-éthyl-6-phénylphénanthridinium
 Bromure de 2,7-diamino-10-éthyl-9-phénylphénanthridinium
 Bromure d'homidium

PROPRIÉTÉS CHIMIQUES [1]

Dans les conditions normales, le bromure d'éthidium est un produit stable. Il peut cependant réagir vivement avec les agents oxydants forts.

INCENDIE – EXPLOSION [4]

Le bromure d'éthidium est un solide qui peut s'enflammer à température élevée ou au contact d'une source d'ignition. Ses poussières peuvent former des mélanges explosifs avec l'air.

En cas d'incendie, les agents d'extinction préconisés sont le dioxyde de carbone, les poudres chimiques, les mousses spéciales et l'eau sous forme de brouillard.

Les intervenants seront équipés d'appareils de protection respiratoire autonomes isolants.

PATHOLOGIE – TOXICOLOGIE

TOXICOCINÉTIQUE – MÉTABOLISME

Le bromure d'éthidium est un agent intercalant de l'ADN qui supprime ou inhibe la synthèse d'ARN et de protéines dans de nombreuses cellules.

L'absorption du bromure d'éthidium n'a été mesurée ni chez l'animal ni chez l'homme. Sa distribution dans l'organisme et sa transformation métabolique sont rapportées après injection intraveineuse, intrapéritonéale ou intramusculaire, chez la souris, le rat, le lapin ou le veau.

La concentration sanguine maximale de [¹⁴C]-bromure d'éthidium est atteinte, chez le lapin et le veau, 1 heure après une injection intramusculaire (1 mg/kg), puis elle diminue rapidement en 24 heures chez le veau et 96 heures chez le lapin. L'excrétion urinaire représente 33 % de la dose chez le lapin après 4 jours et 20 % chez le veau après 2 jours ; la majeure partie de la dose injectée est éliminée dans les fèces par la bile (60 % chez le lapin, 50 % chez le veau). Il n'y a pas de réabsorption intestinale, l'excrétion de molécules marquées mesurée à la sortie de la bile et l'excrétion fécale sont identiques. Après 9-10 jours, il reste 2 à 4 % de la dose injectée dans l'animal, avec une accumulation dans le foie et les reins [8].

Injecté par voie intraveineuse chez le rat (15mg/kg), le bromure d'éthidium radiomarké s'accumule, après 4 heures, dans les reins, les surrénales, la thyroïde et le cœur [8]. Chez la souris, des signes de passage du bromure d'éthidium des vaisseaux sanguins vers le système nerveux sont notés dès 3 minutes après l'injection (0,1 ml d'une solution à 0,1 %) ; dans cette étude, il n'est pas retrouvé dans les régions protégées par la barrière méningée. L'étendue et l'intensité du marquage dans le système nerveux augmentent pendant 30 minutes, puis diminuent ; le bromure d'éthidium n'est plus détecté après 24-48 heures [9]. L'excrétion biliaire est de 14-15 % de la dose après 7 heures chez le rat [8] et 50-55 % de la dose après 16-18 heures chez la souris.

In vitro, le bromure d'éthidium est acétylé, par le cytochrome P₄₄₈ hépatique de rat et une protéine soluble, en un ou plusieurs métabolites mutagènes pour *S. typhimurium* [8].

In vivo, les métabolites majeurs sont le 8-acétyl éthidium, l'éthidium inchangé et le 8-acétyl-2-hydroxy éthidium glucuronide (Fig. 1). Ce dernier n'est présent dans la bile qu'en cas d'induction du système métabolique hépatique [10].

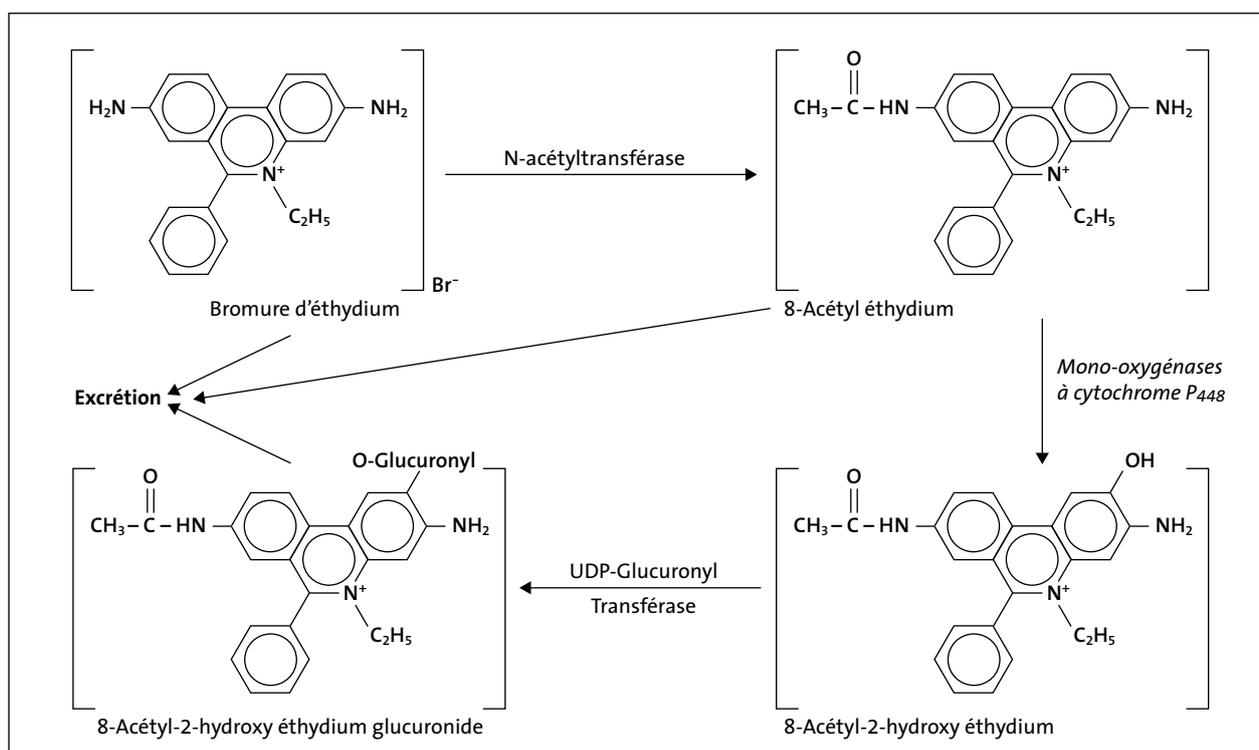


Fig. 1 Transformation métabolique du bromure d'éthidium chez le rat (d'après [11])

TOXICITÉ EXPÉRIMENTALE

Toxicité aiguë

Il n'y a pas de donnée publiée concernant la toxicité du bromure d'éthidium administré par les voies courantes d'exposition. La DL50 par voie sous-cutanée chez la souris est de 110 mg/kg [8].

Les souris survivent à une injection intraveineuse de 0,1 ml d'une solution à 0,1 % ; 30 % des animaux recevant 0,1 ml d'une solution à 0,5 % meurent en 4 minutes, les survivants présentent des signes de détresse respiratoire qui se prolongent 12 à 16 heures après l'injection.

Après injection intra-crânienne chez le rat (2,5 mg/kg), le bromure d'éthidium induit un état spongieux diffus de la région ventro-latérale du tronc cérébral. Ces lésions sont caractérisées par une dégénérescence des oligodendrocytes et la formation de vacuoles dans la myéline ; elles sont suivies d'une démyélinisation des axones (après 6 jours) avec, dans ces zones, une disparition complète des oligodendrocytes. La myéline se reforme après 12 jours. Chez la souris, le bromure d'éthidium se concentre dans les noyaux et les nucléoles de certaines cellules nerveuses situées à l'extérieur de la barrière méningée, mais ne la traverse pas [12].

Effets génotoxiques [8]

De nombreuses études ont été menées pour évaluer le potentiel mutagène et les effets sur l'ADN du bromure d'éthidium.

In vitro, la majorité des résultats sont positifs ou faiblement positifs, généralement en présence de système d'activation métabolique :

- il induit des mutations, uniquement en présence d'activateur métabolique, sur *S. typhimurium* TA1537, TA1538 et TA98 (ni TA100, ni TA1535) ;
- il donne des résultats positifs dans le test du lymphome de souris et dans le SOS Chromotest, en présence d'activateur métabolique, sur *S. typhimurium* ; ces résultats sont négatifs sur *E. coli* ;
- il induit la recombinaison chromosomique sur *S. cerevisiae* ;
- il génère la réparation de l'ADN dans les hépatocytes de rat mais non l'inhibition de la synthèse d'ADN dans les cellules HeLa ;
- il provoque un étirement des chromosomes dans les lymphocytes humains en culture et antagonise l'action de la colchicine ;
- il arrête la division cellulaire dans les fibroblastes d'embryon de poulet ;
- il provoque la formation de micronoyaux dans les cellules embryonnaires de hamster syrien ;
- par contre, il n'induit ni mutation cellulaire ni échange entre chromatides-sœurs sur cellules V79 ; la réponse mutagène est faible sur cellules CHO de hamster chinois.

In vivo, il provoque des mutations létales récessives et la recombinaison mitotique chez la drosophile, la formation de micronoyaux dans les larves de triton et des échanges entre chromatides sœurs dans la moelle osseuse de la souris.

Effets cancérogènes [8]

L'effet cancérogène du bromure d'éthidium n'a pas été testé sur l'animal. On lui attribue un potentiel antitumorigène, par exemple sur les cellules de mélanome de hamster ; la survie de l'animal est augmentée par le traitement au bromure d'éthidium. Le mécanisme d'action semble basé sur une forte inhibition de la synthèse d'ADN de ces cellules par inhibition de l'ADN polymérase ARN dépendante. Un effet antitumorigène a aussi été montré chez la souris porteuse de lymphome.

Effets sur la reproduction [8]

Le bromure d'éthidium provoque des malformations sévères dans un essai de tératogenèse sur l'embryon de grenouille (test FETAX). Les malformations atteignent tous les organes majeurs ; on observe, entre autres, courbure de la moelle épinière, anencéphalie, microcéphalie et microphthalmie. La DL50 du bromure d'éthidium dans ce test est de 0,05 mg/ml et la dose efficace qui induit 50 % de malformations (DE50) est de 0,035 mg/ml.

TOXICITÉ SUR L'HOMME

Il n'y a pas de donnée publiée concernant des effets toxiques, aigus ou chroniques, liés au bromure d'éthidium chez l'homme. En particulier, aucun trouble neurologique traduisant une démyélinisation n'est rapporté.

Par analogie à certains autres composés voisins, on peut penser que le produit est moyennement irritant pour la peau et l'œil.

Du fait de son activité mutagène expérimentale, la possibilité d'un effet cancérogène et de troubles de la reproduction est posée. Un article suggère que le travail en laboratoire de biologie moléculaire peut être à l'origine d'une augmentation du risque d'apparition de certains cancers (os, lymphomes non hodgkiniens). Les sujets sont généralement polyexposés : bromure d'éthidium mais aussi autres molécules potentiellement cancérogènes (acrylamide, méthylnitrosoguanidine, méthanesulfonate de méthyle) et substances radioactives [13].

Le suivi d'un certain nombre de grossesses chez des femmes travaillant avec du bromure d'éthidium n'a pas retrouvé de malformations chez les enfants. Dans deux cas, l'analyse chromosomique effectuée sur des cellules prélevées par ponction amniotique n'a pas révélé d'anomalie. Ces observations sont toutefois en nombre trop restreint pour permettre de conclure à l'innocuité de la substance (données non publiées).

RÉGLEMENTATION

Rappel : La réglementation citée est celle en vigueur à la date d'édition de cette fiche : 4^e trimestre 2010.

Les textes cités se rapportent essentiellement à la prévention du risque en milieu professionnel et sont issus du Code du travail et du Code de la sécurité sociale. Les rubriques « Protection de la population » et « Protection de l'environnement » ne sont que très partiellement renseignées.

HYGIÈNE ET SÉCURITÉ DU TRAVAIL

1. Mesures de prévention des risques chimiques (agents chimiques dangereux)

- Articles R. 4412-1 à R. 4412-58 du Code du travail.
- Circulaire DRT n° 12 du 24 mai 2006 (non parue au *JO*).

2. Aération et assainissement des locaux

- Articles R. 4222-1 à R. 4222-26 du Code du travail.
- Circulaire du ministère du Travail du 9 mai 1985 (non parue au *JO*).
- Arrêtés des 8 et 9 octobre 1987 (*JO* du 22 octobre 1987) et du 24 décembre 1993 (*JO* du 29 décembre 1993) relatifs aux contrôles des installations.

3. Douches

- Articles R 4228-8, R 4228-9 et R 3121-2 du Code du travail ; arrêté du 23 juillet 1947 modifié (*JO* du 30 juillet 1947) relatif aux douches mises à la disposition du personnel effectuant des travaux insalubres ou salissants : annexe, tableau II, fabrication et manipulation des matières colorantes.

4. Maladies de caractère professionnel

- Articles L. 461-6 et D. 461-1 et annexe du Code de la sécurité sociale : déclaration médicale de ces affections.

5. Classification et étiquetage

L'étiquette doit être conforme au règlement CLP à compter du 1^{er} décembre 2010 pour les substances et du 1^{er} juin 2015 pour les mélanges.

a) bromure d'éthidium *pur* :

Le règlement CLP (règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 (*JOUE* L 353 du 31 décembre 2008)) introduit dans l'Union européenne le nouveau système général harmonisé de classification et d'étiquetage ou SGH. La classification et l'étiquetage du bromure d'éthidium, harmonisés selon les deux systèmes (directive 67/548/CEE et règlement) figurent dans l'annexe VI du règlement CLP.

La classification est :

- selon la directive 67/548/CEE (31° ATP = directive 2009/2/CE de la Commission du 15 janvier 2009)
 - Mutagène catégorie 3 ; R 68
 - Très toxique ; R 26
 - Nocif ; R 22
- selon le règlement (CE) n° 790/2009 de la Commission du 10 août 2009 modifiant le règlement (CE) n° 1272/2008
 - Mutagène catégorie 2 ; H 341
 - Toxicité aiguë (par inhalation) catégorie 2 ; H 330
 - Toxicité aiguë (par voie orale) catégorie 4 ; H 302

Se reporter aux étiquettes au début de la fiche toxicologique.

b) *mélanges (préparations)* contenant du bromure d'éthidium :

- Arrêté du 9 novembre 2004 modifié (*JO* du 18 novembre 2004) transposant la directive 1999/45/CE ou
- Règlement (CE) n° 1272/2008.

6. Entreprises extérieures

- Arrêté du 19 mars 1993 (*JO* du 27 mars 1993) fixant la liste des travaux dangereux pour lesquels il est établi par écrit un plan de prévention.

PROTECTION DE LA POPULATION

- Article L. 5132-2, articles R. 5132-43 à R. 5132-73, du Code de la santé publique :
 - détention dans des conditions déterminées (art. R 5132-66) ;
 - étiquetage (cf. 5) ;
 - cession réglementée (art. R 5132-58 et 5132-59).

PROTECTION DE L'ENVIRONNEMENT

Installations classées pour la protection de l'environnement, Paris, imprimerie des Journaux Officiels, brochure n° 1001 :

- n° 1110 : fabrication industrielle de substances et préparations très toxiques ;
- n° 1111 : emploi ou stockage de substances et préparations très toxiques.

TRANSPORT

Se reporter éventuellement aux règlements suivants.

1. Transport terrestre national et international (route, chemin de fer, voie de navigation intérieure)

- ADR, RID, ADN

2. Transport par air

- IATA

3. Transport par mer

- IMDG

RECOMMANDATIONS

I. AU POINT DE VUE TECHNIQUE

En raison de la génotoxicité du bromure d'éthidium, une extrême prudence et une grande rigueur (respect des procédures de travail destinées à réduire l'exposition au maximum) sont nécessaires lors du stockage et de la manipulation de ce produit dans les laboratoires (se reporter au document INRS : Manipulation des substances génotoxiques utilisées au laboratoire [6]).

Stockage

■ Stocker le bromure d'éthidium dans des locaux séparés, bien ventilés, spécialement aménagés pour les produits génotoxiques, balisés par une signalisation rappelant le danger, fermés à clé. Seul, le personnel autorisé pourra y pénétrer.

Le stock sera géré de façon très rigoureuse (registre des sorties tenu à jour avec nom du manipulateur et quantités prélevées).

■ Conserver les récipients contenant le bromure d'éthidium ou les solutions diluées de bromure d'éthidium au réfrigérateur (pour réduire le risque de contamination bactérienne) balisé, fermé à clé, à l'écart de toute autre substance ou préparation.

■ Fermer soigneusement les récipients et les étiqueter conformément à la réglementation (symbole(s), phrase(s) de risque, conseil(s) de prudence). Reproduire l'étiquetage en cas de fractionnement des emballages.

■ Le nettoyage des locaux sera assuré par du personnel

informé des risques et spécialement formé (procédures à suivre).

Manipulation

Les prescriptions relatives aux zones de stockage sont applicables aux locaux où est utilisé le bromure d'éthidium. En outre :

- Limiter l'utilisation du bromure d'éthidium aux seuls cas où cette substance est impérativement indispensable. Des substances de remplacement sont proposées, par exemple l'iode de propidium [6], mais on ne dispose pas de données permettant d'évaluer leurs dangers.
- Instruire parfaitement le personnel des risques présentés par le produit, des précautions à observer telles que celles préconisées pour les substances génotoxiques et des mesures à prendre en cas d'accident [6].
- Privilégier l'achat et l'emploi de bromure d'éthidium en solution afin d'éviter la manipulation du produit en poudre.
- Dans le cas où le bromure d'éthidium est livré sous forme solide, l'inhalation de poussières doit être évitée lors des opérations de pesée ou de mise en solution.
- Effectuer en appareil clos toute opération qui s'y prête (sorbonnes, enceintes de sécurité). Prévoir des appareils de protection respiratoire pour certains travaux de courte durée, à caractère exceptionnel ou pour des interventions d'urgence.
- Contrôler la pollution des surfaces par essuyage à l'aide de lingettes mouillées et mesure de la fluorescence des eaux de lavage [7].
- Éviter tout contact du produit (pur ou en solution) avec la peau et les yeux. Mettre à la disposition du personnel des équipements de protection individuelle, de préférence à usage unique : vêtements de travail, gants appropriés, lunettes de sécurité dont le port sera obligatoire à chaque manipulation du bromure d'éthidium. Ces effets seront jetés après usage (en sacs plastifiés spéciaux dans des poubelles d'évacuation spécifiques) pour être incinérés.
- Ne pas fumer, boire et manger dans les locaux ; observer une hygiène corporelle très stricte : lavage des mains et du visage avant les repas...
- Les matériels devant subir un entretien ou une réparation, et qui auraient été en contact avec le bromure d'éthidium, devront être convenablement décontaminés préalablement à l'intervention des équipes d'entretien. Cette décontamination sera poussée le plus loin possible compte tenu des moyens techniques existants. Les équipes d'entretien seront prévenues des risques encourus et, si nécessaire, munies de dispositifs de protection appropriés.

Les équipes d'entretien seront constituées exclusivement par du personnel spécialisé et expérimenté. Elles ne pourront effectuer leurs travaux qu'avec permis d'intervention.

La décontamination devra être effectuée sous l'autorité du responsable du laboratoire utilisant ledit matériel.

Un entretien préventif programmé permettra de limiter les interventions d'urgence.

- Une attention particulière sera portée à l'entretien, ainsi qu'au bon fonctionnement (changement, dépose...) des filtres destinés à assurer l'épuration de l'air avant rejet. Le personnel chargé de ce travail sera muni de dispositifs de protection individuelle (protection respiratoire, vêtements étanches...), et les filtres usagés seront transportés dans des emballages étanches avant d'être décontaminés ou détruits.
- En cas de déversement accidentel de produit solide, récupérer immédiatement les déchets dans des récipients prévus à cet effet, propres et secs, résistants et étanches. Laver ensuite à grande eau la surface ayant été souillée.
- En cas de déversement accidentel d'une solution de bromure d'éthidium, une procédure de décontamination est proposée [6, 7] à l'aide de lingettes imprégnées d'une solution aqueuse de nitrite de sodium et d'acide hypophosphoreux.
- Ne pas rejeter à l'égout ou dans le milieu naturel les eaux polluées par le bromure d'éthidium.
- Conserver tous les déchets (y compris les produits issus de différentes phases de nettoyage : résidus, lingettes, eaux de lavage...) dans des récipients spécialement prévus à cet effet et les éliminer dans les conditions autorisées par la réglementation (destruction des substances dangereuses et incinération selon des procédures validées).

II. AU POINT DE VUE MÉDICAL

- Éviter l'exposition des sujets qui présentent des dermatoses chroniques ou des troubles neurologiques sérieux. Au cours des examens systématiques, rechercher plus particulièrement des troubles cutanés et neurologiques. Bien qu'aucun examen complémentaire ne soit exigé, il est souhaitable de vérifier la NFS chez les sujets qui manipulent de façon importante cette substance.
- Insister sur la nécessité de se protéger pour éviter tout contact cutané. Les projections cutanées doivent être rapidement décontaminées, la zone atteinte sera lavée à l'eau pendant au moins 10 minutes. Il est souhaitable de consulter un médecin pour traitement éventuel et enregistrement de l'accident.
- En cas de projection oculaire, laver immédiatement et abondamment à l'eau et consulter un ophtalmologiste.
- Les effets par ingestion accidentelle ne sont pas connus ; le sujet doit dans tous les cas être rapidement vu par un médecin pour décider d'une hospitalisation et d'une surveillance médicale. Si le sujet est conscient, il est possible d'essayer de le faire vomir.

BIBLIOGRAPHIE

1. The Sigma-Aldrich Library of Chemicals safety data, 1^{re} éd. Sigma-Aldrich Corporation ; 1985 : 864.
2. The Merck Index, 12^e éd. Rahway, Merck & Co ; 1996 : 809.
3. SAX's Dangerous Properties of Industrial Materials, 9^e éd. New York : Van Nostrand Reinhold ; 1996 : 1031.
4. Ethidium Bromide. In : Base de données MSDS, Hamilton : Centre canadien d'hygiène et de sécurité ; 1996 : n° 21265/2.
5. Muranyi-Kovacs I – Le bromure d'éthidium : destruction et décontamination. Dossier Prévention des risques chimiques, 2^e éd. Paris : INSERM ; sept. 1988 : 13 p.
6. Castegnaro M, Falcy M – Manipulation des substances génotoxiques utilisées au laboratoire : prévention et sécurité. Éditions INRS ED 769. Paris : INRS ; 2001, 116 p.
7. Lunn G, Sansone EB – Decontamination of Ethidium Bromide Spills. *Applied Industrial Hygiene*. 1989 ; 4 (9) : 234-237.
8. Summary of data for chemical selection. Ethidium Bromide. National Toxicology Program, 1994. http://ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/Chem_Background/ExecSumm/EthidiumBromide.html
9. Cesarini K et al – Cytofluorescence localization of ethidium bromide in the nervous system of the mouse. I. Ethidium bromide : its distribution in regions within and without the blood-brain barrier after intravenous injection. *Acta Neuropathol* (Berl). 1985 ; 68 (4) : 273-278.
10. Fraire C, Lecionte P, Paoletti C – Metabolism of ethidium bromide in rats. *Drug Metabolism Disposition*. 1981 ; 9 (2) : 156-160.
11. Gaugain B et al – Chemical structure of ethidium bromide metabolites extracted from rat bile. *FEBS Letters*. 1981 ; 129 (1) : 70-76.
12. Yajima K, Suzuki K – Demyelination and remyelination in the rat central nervous system following ethidium bromide injection. *Laboratory Investigation*. 1979 ; 41 (5) : 385-392.
13. Cordier S, Mousel ML, Le Goaster C, Gachelin G, Le Moual N, Mandereau L, Carrat F, Michaud G, Hemon D – Cancer risk among workers in biomedical research. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*. 1995 ; 21 (6) : 450-459.

