

Micro-manipulations et sécurité

par Christian CLAVERIE

Laboratoire de Chimie Organique

Faculté des Sciences - 97400 Saint-Denis de La Réunion

Ces techniques ont été développées dans les années 1980, aux États-Unis, par plusieurs professeurs américains, dont D.W. MAYO, R.D. PIKE et S.S. BUTCHER.

A l'origine, elles furent créées pour améliorer la sécurité du Laboratoire d'enseignement de chimie organique, mais leurs caractéristiques particulières leur confèrent désormais une place originale, dans la recherche, et l'enseignement de la chimie.

En effet, la recherche de produits naturels destinés aux tests biochimiques généraux (antitumoraux, antibiotiques...) conduit les laboratoires modernes à explorer les ressources du monde végétal qui nous entoure. On analyse donc la composition des fruits, des feuilles, des tiges, des racines (à la Réunion : le vetyver, le géranium, la vanille, le piment...), de même, en chimie marine, l'étude des éponges, des gorgones, des algues (famille des stérols, notamment).

Les techniques modernes détectent et peuvent élucider la structure de quantités de plus en plus faibles de l'ordre de 1 à 10 mg. Il faut pour cela utiliser des méthodes d'extraction et de purification fiables. Certains laboratoires de détermination des structures, ont aussi été conduits à réaliser des réactions chimiques particulières sur ces produits pour compléter leur étude. Par exemple, la position d'une double liaison dans une longue chaîne latérale d'un stérol impose la synthèse d'un dérivé bromé ou bien l'acétylation d'une fonction alcool. Il faut alors, à nouveau, purifier, et, analyser les spectres RMN, UV-visible, IR, spectrométrie de masse... Les chercheurs ont donc développé des techniques et du matériel spécifiques.

Les laboratoires d'analyse (*exemple* : Laboratoire de la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des fraudes...) sont confrontés aux mêmes situations : identifier, purifier, des quantités minimales de produits d'origines diverses (vanilline naturelle, vanilline artificielle...).

Ces micro-manipulations de chimie ont simplement pour but de réaliser des synthèses, ou des analyses avec des volumes de 0,1 à 10 ml, et des masses comprises entre 1 et 150 mg.

La technique des micro-manipulations offre des avantages spécifiques, parmi eux, le plus important, concerne la sécurité. En effet, dans tous les pays, le même problème se pose : un nombre d'étudiants sans cesse croissant, des réactions chimiques nouvelles utilisant des produits particuliers, ou des programmes d'enseignement ré-actualisés, mais des crédits d'équipement et de fonctionnement n'évoluant pas au même rythme.

Nous développons ici, le point de vue de la sécurité, dans les salles telles que nous les connaissons, avec les objectifs des programmes tels qu'ils sont, après avoir rappelé quelques généralités sur les risques liés à la chimie, et sur leur évaluation...

1. RAPPELS

Il est, en effet, bon de récapituler, avant d'envisager tout nouvel enseignement expérimental de la chimie, quels sont les divers types de dangers rencontrés, pour voir dans quelle mesure les micro-manipulations en diminuent certains, tandis qu'elles en laissent d'autres inchangés.

1.1. Nature des risques

– **Risques physiques** : les blessures sont dues aux flammes, aux explosions, et aux équipements annexes : coupure par bris de verre, choc électrique des appareils défectueux, ou maladresse dans l'utilisation des instruments (pipetage à la bouche de solutions toxiques...).

Les micro-manipulations ne peuvent pas les réduire, a priori !

– **Risques dus au contact avec les produits chimiques par exposition externe** : les blessures sur la peau et sur les yeux.

De même, les micro-manipulations ne les réduisent pas à coup sûr : il faut bien utiliser des flacons commerciaux, même si pour les étudiants leur partage en petit flacon (10 ml), rend la manipulation plus facile.

– **Exposition interne** : ingestion et inhalation.

C'est évidemment sur l'inhalation que les micro-manipulations auront le plus grand rôle à jouer, car si on diminue par cent, la quantité

des produits utilisés, les quantités émises diminuent aussi, et c'est ce qui a été étudié de façon quantitative. Mais il y a aussi des attitudes de sécurité, qu'il faut autant que possible respecter et faire respecter. Elle est mesurée quantitativement par le prélèvement et l'analyse des gaz du laboratoire, l'I.N.R.S. (Institut National de Recherche et de Sécurité) peut se charger de l'analyse, et donne l'agrément à des laboratoires spécialisés.

Le suivi (ingestion et inhalation) est aussi réalisé par l'analyse du sang et des urines du personnel des laboratoires.

1.2. Réduction des risques

Certains comportements permettent de réduire ces risques que les manipulations soient de taille macro, semi-macro, micro : [4]

- ***Respect des instructions écrites figurant sur le protocole, et des consignes orales, énoncées par l'enseignant.***

Malheureusement, l'observation didactique en situation de recherche, sur la transmission de l'information aux cours des séances de T.P. de chimie, vérifiable en enregistrant (ou en notant) les instructions orales, et en observant le comportement résultant des différents groupes (binômes) de T.P. le contredit. En général, l'enseignant donne (ou répète) une instruction essentielle du protocole ; *exemple* : «décanner une solution en enlevant le bouchon d'une ampoule à décanter», la réalité montre alors que la même personne (situation observée plusieurs fois sur des classes différentes) va devoir la répéter à presque chaque groupe de T.P. Parmi les fautes manipulatoires observées [6], au niveau I.U.T. de chimie, la non ouverture de l'alimentation en eau d'un réfrigérant est la plus répandue, et cela, malgré l'étude préalable de la technique de distillation.

Il faudrait sans doute imaginer d'autres situations de communication. Peut être pourrait-on essayer des symboles écrits sur les protocoles, correspondant à la nécessité de faire vérifier le montage (des astérisques placés avant les opérations de chauffage, d'ouverture d'un robinet d'une ampoule...) ?

- Port des lunettes, de blouse, de gants.
- Ne rien pipeter à la bouche.
- Ne pas mettre en présence flammes et solvants inflammables.
- Utilisation de récipients de récupération.
- Cheveux attachés, pas de nu-pieds.

- Garder la paillasse propre.
- Dispositifs de sécurité en état de marche : extincteurs, hottes, rince-œil, couverture, douches, sorties...

- ***Les mêmes instructions demeurent inchangées pour les micro-manipulations***

Nous nous intéresserons, par la suite à un seul aspect : l'étude quantitative de la limitation des risques en limitant les quantités émises par modification des quantités des réactifs utilisés.

2. ÉVALUATION DES RISQUES PAR INHALATION

La source incontestable est la fiche technique distribuée par le fabricant, qu'on peut se procurer dans les caisses de sécurité sociale, les publications de l'I.N.R.S. bien qu'elles ne mentionnent pas les établissements scolaires comme destinataires, ni même les C.R.D.P. (Centre Régional de Documentation Pédagogique) [5]. Il existe aussi une diffusion par CD-ROM [1].

Pourtant, aujourd'hui encore, il n'existe pas en France de possibilité de consultation automatisée des données quantitatives sur la toxicité des produits, de façon accessible (type minitel, téléphone...) [2].

2.1. Fiche technique du produit

Elles sont en général divisées en différents secteurs : identification, précautions d'emploi, données physiques, chimiques, conditions de stockage, et de transport, données liées aux risques par inhalation, et par ingestion dont nous rappellerons ci-dessous quelques définitions nécessaires à leur lecture.

2.2. Les échelles de risques [2]

a - VME

Valeur Moyenne d'Exposition (en anglais, **TLV-TWA** : Threshold Limit Values - Time Weighted Average) : correspondant à la concentration massique volumique maximale que peut tolérer un travailleur

exposé huit heures par jour, cinq jours par semaine et cinquante semaines par an, elle s'exprime en mg/m^3 . *Exemple :*

	Acétone	Ammoniac	Benzène
VME (mg/m^3)	1780 (le moins toxique)	18	16 (le plus toxique)

b - VLE

Valeur Limite d'Exposition (en anglais, **TLV-STEL** : Short Time Exposure Level).

Elle correspond à la concentration massique volumique d'une durée maximale de quinze minutes que peut tolérer occasionnellement un travailleur, elle s'exprime en mg/m^3 .

	Acétone	Ammoniac	Benzène
VLE (mg/m^3)	2375 (le moins toxique)	36	32 (le plus toxique)

Elle est naturellement plus grande que la VME, mais d'un facteur relativement faible (environ une fois et demie à deux fois la VME, mais pas plus... !). On ne peut donc pas manipuler n'importe quel produit, dans n'importe quelles conditions, sous prétexte que l'échelle VLE existe !

c - DL 50

Dose létale 50 (Lethal dose 50) : dose mortelle 50 %.

Elle correspond à une concentration massique maximale qui provoque la mort de 50 % des souris (des rats, ou d'autres animaux...) ayant ingéré la dose correspondante ; elle s'exprime en milligrammes de substance ingérée par kilogramme de travailleur.

Ainsi la dose diffère suivant les individus atteints...

	Acétone	Chloroforme
LD 50 (mg/kg)	9750 (le moins toxique)	80 (le plus toxique)

Parmi les trois échelles, nous nous contenterons d'utiliser la première, car elle est la plus adaptée aux conditions de travail des enseignants (!).

2.3. Critère de sécurité

Les trois variables à prendre en compte sont les limites VME, qui doivent être indiquées sur le protocole, la quantité estimée de produits vaporisés, et la ventilation effective de la classe.

Remarque : Nous supposerons ainsi que le risque d'inhalation d'une petite quantité plus toxique (VME faible) est équivalent à celui d'une grande quantité d'un produit moins toxique (VME forte).

a - Volume d'air pollué émis par binôme

Soit m , la masse (en mg) de produit émis par groupe d'étudiants au cours d'une manipulation déterminée (les quantités sont indiquées sur les protocoles de manipulation, nous indiquerons par la suite de quelle manière, elles sont calculées). Le volume d'air pollué peut se calculer par la relation $V_p = m/VME$ en m^3 .

Dans le cas où plusieurs composés sont utilisés, le risque est évalué, en faisant la somme des risques inhérents à chaque produit i :

$$V_p = \sum V_{p,i} = \sum m_i / (VME)_i$$

En considérant un protocole expérimental donné, il est possible de le calculer.

b - Volume d'air disponible par binôme

Il peut se calculer en évaluant le volume du laboratoire, et en le divisant par le nombre n d'étudiants (ou de binômes), et dans le cas où le laboratoire est ventilé, il faut lui ajouter le volume d'air ventilé :

$$V_D = V_{\text{laboratoire}}/n + V_{\text{ventilé}}/n = 1/n (V_{\text{laboratoire}} + kQt)$$

où Q est le débit de la hotte en mètre cube par minute, t la durée de la séance (en général, pour les enseignements en option ou en spécialité, trois heures), k est le facteur de mélange des produits dans le volume du laboratoire (il dépend de la position de la hotte, ...) sa valeur moyenne est de 0,3 environ d'où $V_D = 1/n (V_{\text{labo}} + 0,3 Qt)$.

Exemple : en mètre cube, pour dix groupes de T.P.

Pour une salle fermée de 300 m ³	30
Pour un laboratoire peu ventilé (une hotte)	50
Pour un laboratoire très bien ventilé (quatre hottes fonctionnant en permanence)	110

Pour déterminer le critère de sécurité, on comparera le volume d'air pollué par binôme, avec le volume d'air effectivement disponible. Il faut que le volume d'air pollué soit plus petit que le volume d'air disponible, alors les produits se dilueront dans le volume d'air disponible offert, et leur concentration diminuera.

$$V_p < V_D$$

C'est le but à atteindre en ce qui concerne la sécurité dans une salle de T.P. La principale difficulté de ce raisonnement est relative aux calculs des quantités de matière émises.

2.4. Détermination des quantités émises : m

Il faut d'abord évaluer les quantités utilisées à partir du protocole expérimental fourni :

a - Quantités utilisées

A partir de la description de l'expérience, on peut y arriver en faisant attention de ne pas oublier toutes les utilisations du même produit.

Exemple : Dans une séance de T.P. en micro-manipulation sur la vanille réalisée à l'Université de La Réunion, le dichlorométhane est utilisé en trois fractions de 2 ml, pour extraire la vanilline de la solution aqueuse, mais il est aussi employé comme éluant dans la chromatographie sur couche mince, environ 5 ml, soit au total, 11 ml.

b - Quantités émises

Elles dépendent des situations envisagées. On distingue en général :

– **émission totale** : cas de la purification d'un produit par évaporation totale du solvant, c'est la situation dans l'obtention de l'huile essentielle de clous de girofle ;

– **émission partielle** :

	Acétone
Bécher (50 ml, ouvert) en mg/h à 25°C	920
Reflux en mg/h	75
Transfert éprouvette macro en mg/h	75
Transfert pipette pasteur micro en mg/h	10

Pour les autres produits, on peut estimer l'émission à température ambiante en utilisant la pression de vapeur saturante de l'acétone à 25°C : $P_S = 181$ mm de Hg, (sa température d'ébullition normale étant de 56°C), et la pression de vapeur saturante à 25°C du produit considéré.

3. EXEMPLES

3.1. Volume d'air disponible - Volume d'air pollué

Exemple

Énoncé : Un laboratoire a quatre hottes de 30 cm de diamètre. Quand le panneau coulissant est ouvert sur une hauteur de 10 cm, et que les hottes fonctionnent, à plein régime, la vitesse de l'air est de 1 m/s.

a - Calculons la ventilation totale de cette pièce en supposant qu'il n'y a pas d'autres sorties

b - Le laboratoire de volume 300 m^3 est utilisé par dix groupes (binômes). Évaluons le volume d'air disponible par étudiant avec un facteur de mélange $k = 0,3$ et sachant que l'expérience dure trois heures.

c - Dans le protocole étudié, il faut évaporer 7 ml de dichlorométhane (masse volumique : $1,335 \text{ g/cm}^3$). Connaissant la VME (Valeur Moyenne d'Exposition) du dichlorométhane : 350 mg/m^3 , calculons le volume d'air pollué par binôme.

Réponse :

$$a - Q = 4 * \Pi * (0,15)^2 * 1 = 0,283 \text{ m}^3/\text{s}.$$

$$b - V_D = V_{\text{labo}}/n + kQt/n = 300/10 + 0,3 * 0,283 * 3 * 3600/10 = 121,6 \text{ m}^3.$$

$$c - V_p = m/VME = 1,335 * 7/0,35 = 26,7 \text{ m}^3.$$

On peut effectivement réaliser la manipulation dans les conditions prévues, (sinon on peut diminuer le nombre de groupes (binômes en trinômes), ou bien évaporer le dichlorométhane sous la hotte fermée).

3.2. Détermination des conditions de sécurité concernant un protocole opératoire donné

Considérons la réaction d'oxydation du cyclohexanol en cyclohexanone, elle peut être conduite de façon micro, ou semi macro [3], au cours d'une séance de trois heures. Les conditions de travail sont celles favorables d'une salle équipée comme précédemment (nous

envisageons un effectif de dix binômes), soit $V_D = 121,6 \text{ m}^3$. Nous chercherons à choisir entre les deux types de manipulation, après avoir recensé dans **un tableau d'environnement**, les données.

a - Micro-manipulation [4]

Substances utilisées (nature de l'émission considérée)	Quantité (protocole)	VME (mg/m ³)	Émissions (mg)	Volume V _p (m ³)
Cyclohexanol (max)	100 mg	200	100	0,5
Cyclohexanone (max)	77 mg	100	77	0,8
acide acétique (max)	0,25 ml	25	262	10,5
Hypochlorite de sodium (1,8 M) (max)	2 ml	3	268	89,3
Éther (max)	2 ml	1 200	1 171	1
VP total (m ³)				101,6

b - Semi-macro manipulation (classique) [3]

Substances utilisées (nature de l'émission considérée)	Quantité (protocole)	VME (mg/m ³)	Émissions (mg)	Volume V _p (m ³)
Cyclohexanol (max)	9,9 g	200	9 900	49,5
Cyclohexanone (max)	9 g	100	9 000	90
acide acétique (max)	66 ml	25	69 168	2 766
Hypochlorite de sodium (max)	66 ml	3	8 844	2 948
Éther (max)	100 ml	1 200	58 550	48,7
VP total (m ³)				5 852,5

Sachant que nous avons calculé un volume d'air disponible de $121,6 \text{ m}^3$, pour chaque binôme, on peut accepter le risque par inhalation, en manipulant de façon micro.

Il faut remarquer que le volume d'air pollué émis se «concentrera» dans le volume d'air disponible. On peut alors estimer la concentration réelle supérieure à la concentration admissible d'un facteur $5852/121,6 = 48,1$!

Même si on oppose qu'en réalité, la chance est minime pour que tous les groupes de T.P. vaporisent la totalité de leurs produits le même jour, il faut bien remarquer qu'il n'est pas impossible d'admettre l'idée qu'un groupe sur dix, échoue sur la manipulation proposée par non

respect des consignes du protocole opératoire. Dans ce cas, on peut calculer un facteur de concentration de $48,1/10 = 4,81$!

Remarque :

Nous n'avons pas tenu compte du réactif **et** du produit dans le total, mais nous avons choisi d'ajouter celui des deux qui contribue de la façon la plus importante, au volume d'air pollué.

Ce calcul simple («simpliste ?»), nous propose une piste d'implantation des micro-manipulations : elles sont, a priori, envisageables pour nos salles d'enseignement, lorsqu'un produit figurant dans le protocole a une VME très faible (de l'ordre de 20 mg/m^3).

REMERCIEMENTS

Je remercie ici les collègues qui m'ont aidé : Mme SMADJA, (professeur à l'Université de La Réunion), pour sa relecture, ainsi que M. AKNIN, pour les exemples qu'il m'a fourni en chimie marine.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] CD-ROM Material Safety Data Sheet, valid novembre 1994 - janvier 1995, SIGMA, ALDRICH, FLUKA.
- [2] A. PICOT et P. GRENOUILLET : «*La sécurité au laboratoire de chimie et de biochimie*» - Éditions Lavoisier Tec et Doc - 1992.
- [3] Y. BLANZAT et J.-P. FOULON : «*Oxydation d'alcools secondaires à l'aide de l'eau de Javel*» - B.U.P. n° 678 - pp. 239-243.
- [4] D.W. MAYO, R.M. PIKE et S.S. BUTCHER : «*Microscale Organic Laboratory*» - Éditions J. Wiley & Sons - 1988.
- [5] C. HOARAU : «*Mémoire d'I.U.F.M. de deuxième année*» - IUFM La Réunion - 1995.
- [6] B. MONTFORT, J. CARRETTO, A. RINALDY et M. CHASTRETTE : «*Processus simultané d'évaluation et d'auto-évaluation dans le laboratoire de chimie*», Mesure et évaluation en éducation - 1993 - vol 15 - n° 4 - pp. 3-29.