

# Les C/M/R dans les laboratoires

## Les produits de substitution

Michel Boisset

Les médias ont largement répercuté ces derniers mois des déclarations tonitruantes mais sans fondement scientifique solide sur le rôle primordial des contaminants de l'environnement dans la progression de diverses pathologies, dont certains cancers et troubles de la reproduction, rendant marginal le rôle des expositions professionnelles aux substances classées cancérigènes, mutagènes et reprotoxiques (C/M/R).

Certes les informations qui permettent d'évaluer la proportion et le nombre des maladies attribuables à des expositions professionnelles en France sont très limitées, mais tout porte à croire que leur incidence dépasse plusieurs milliers de cas chaque année. Pour les seuls cancers de la vessie dans la population masculine, dont l'incidence augmente depuis trente ans, de 625 à 1110 cas/an seraient attribuables essentiellement à l'exposition aux amines aromatiques ou aux hydrocarbures aromatiques polycycliques<sup>1</sup>. Les effets sur la reproduction et le développement liés aux expositions professionnelles, exception faite des expositions à certains congénères d'éthers de glycol, demeurent aussi très mal appréciés, du fait de difficultés méthodologiques et de l'absence de bioindicateurs fiables.

Le remplacement de toute substance ou préparation chimique dangereuse est une obligation qui incombe à l'employeur, sauf en cas d'impossibilité technique avérée. Le code du travail pose la substitution comme une règle générale de prévention du risque chimique (Livre 2, Titre 3, Art. R231-54-6). Ce principe est nettement réaffirmé à la sous-section 6 de ce même code qui énumère les règles particulières de prévention contre les risques d'exposition aux agents C/M/R (Art. R231-56-2). Au-delà des risques pour la santé, doivent aussi être pris en compte les risques pour la population générale liée à la dissémination de ces agents dans l'environnement et pour les écosystèmes. L'obligation réglementaire se double donc d'une obligation éthique, pour l'ensemble des utilisateurs.

Si l'on excepte les produits dérivés de la houille ou du pétrole, le classement actuel pour les seules catégories 1 et 2 de l'Union Européenne, modifié par la Directive 2004/73 CE du 28 avril 2004, ne rassemble pas moins de 160 substances - ou groupes de congénères - présentant un effet cancérigène, mutagène ou reprotoxique, 13 d'entre elles présentent deux de ces effets critiques et enfin 5 présentent les trois effets associés. Le remplacement de l'ensemble de ces substances apparaît aujourd'hui irréalisable à court terme.

La substitution doit être envisagée en priorité pour les substances de catégories 1 ou 2, dont les effets sont considérés par les toxicologues comme dépourvus de seuils : il s'agit des mutagènes et des cancérigènes génotoxiques et de certains reprotoxiques qui perturbent le développement de l'embryon ou du fœtus. Pour ces différentes familles, le caractère irréversible et insidieux des effets démontrés ou la grande plausibilité

---

<sup>1</sup> Estimation du nombre de cas de certains cancers attribuables à des facteurs professionnels en France. E. Imbernon. 2005, Institut de Veille Sanitaire, Saint-Maurice, 22p.

biologique de leur occurrence dans l'espèce humaine, apparaissent comme des critères primordiaux de sélection. On considérera en premier lieu au sein de ce groupe les substances volatiles, sublimables ou facilement dispersibles.

Ceci n'exclut pas qu'on se penche aussi sur le devenir des C/M/R de catégorie 3, et la substitution devrait être aussi envisagée dès lors qu'il existe une suspicion d'effet suffisamment forte. Des preuves expérimentales solides sur plusieurs espèces animales, un haut degré d'analogie mécanistiques, même si pour cette classe de produits les données épidémiologiques sont inexistantes ou négatives, doivent conduire à adopter une attitude de prudence.

Que ce soit dans un protocole de recherche au laboratoire ou dans un procédé industriel de fabrication, la substitution nécessite une analyse approfondie des étapes de réalisation, chaque entité chimique ayant des caractéristiques physico-chimiques et des propriétés de réactivité singulières. **Il n'existera donc aucun substitut d'emploi universel et toute démarche de substitution nécessitera toujours une étude de validation dont la responsabilité incombe à l'utilisateur.** A noter qu'il peut s'avérer plus pertinent de remplacer le protocole – ou procédé - courant par un autre protocole – ou procédé - validé plutôt qu'un produit ou un mélange. Cette démarche est évidemment plus aisée dans le contexte d'un laboratoire que dans une industrie en raison du surcoût induit par la substitution pour les premiers et de la plus grande évolutivité des techniques employées pour les seconds.

L'évolution des connaissances toxicologique et l'approche particulièrement prudentielle de l'évaluation des risques pour les C/M/R entraîne le rejet de substances considérées naguère comme des alternatives moins dangereuses. **Une solution de substitution ne sera valide que pendant une durée limitée.**

Prenons quelques exemples de substitutions de C/M/R réalisées ou en cours de réalisation, de substitution possibles et de substitutions souhaitables.

### I- Les substitutions réalisées

1) L'utilisation du benzène, cancérigène majeur, a été pratiquement éradiquée à l'Inserm dès 1989. Le cyclohexane et l'anisole peuvent constituer des alternatives beaucoup plus sûres (tableau I). Le *n*-hexane, a été progressivement supplanté par l'heptane, dont le métabolisme ne donne pas d'intermédiaires neurotoxiques ou reprotoxiques.

**Tableau I.** -Substituts du benzène et du *n*-hexane

SOLVANT	DANGERS (€)	PEc (°C)	PEb (°C)	Log Ko/w (€)	SUBSTITUT	DANGERS	PEc (°C)	PEb (°C)	Log Ko/w
Benzène	F T Carc. Cat. 1	- 11	80,1	2,13	Cyclohexane	F Xn	-18	81	3,44
					Anisole	F N	52	155,5	2,11
<i>n</i> -Hexane	F Xn Repr. Cat. 3	- 22	68,7	3,90	<i>n</i> -Heptane	F Xn N	-4	98	4,66

PEc = point d'éclair ; PEb = point d'ébullition ; Log Ko/w = Logarithme décimal du coefficient de partage octanol-1/eau

€. Certaines des valeurs ont été calculées par sommation des contributions des fragments moléculaires.

£ Liste établie en fonction des classements de la 29<sup>ème</sup> adaptation de la Directive 67/548 CE.

2) Le mélange sulfo-chromique n'est pratiquement plus utilisé en laboratoire de biologie-biochimie pour éliminer des résidus organiques. Ce mélange est à la fois très corrosif, très toxique et dangereux pour l'environnement, en particulier pour les organismes aquatiques. Le dichromate de potassium est classé cancérigène de Cat. 2 et mutagène de Cat. 2 en plus de son caractère corrosif, irritant pour la peau, sensibilisant pour la peau et les voies respiratoires et enfin très toxique pour les organismes aquatiques (R 49-46-21-25-26-37/38-41-43-50/53). Sa substitution a été prônée depuis longtemps et le premier document de prévention de l'Inserm paru en 1988 y était consacré. Plusieurs solutions de remplacement sont utilisables :

- des solutions constituées par un oxydant et un acide inorganique fort telles que le mélange de peroxydisulfate d'ammonium (ou persulfate d'ammonium) et de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré, peuvent être utilisées comme substituts. Toutefois le persulfate est un peroxyde, explosif par chauffage, au choc et à la friction, et libère des oxydes de soufre irritants. Le mélange NoChromix fourni par Godax laboratories, Inc. consiste en une solution stabilisée de persulfates comportant moins de risque pour l'utilisateur et son environnement,
- l'eau régale (HCl / HNO<sub>3</sub>, 2/1) peut être utilisée pour le traitement des surfaces de verre et est très efficace contre des souillures inorganiques. Ce mélange d'hydracides est très agressif (attaque des métaux nobles) et doit être préparé et manipulé uniquement en petite quantité et exclusivement sous sorbonne, en raison de la libération de chlorure de nitrosyle (NOCl) très toxique,
- divers produits tensio-actifs commerciaux, parmi lesquels on peut citer à titre d'exemples :
  - les TFD4 et TFT 030F de Franklab,
  - les RBS 25, 35 et 48S de VWR International,
  - le DECON 90 de Fisher Bioblock Scientific,
  - l'Alconox et le Liqui-nox de Alconox Inc.

Leur caractère alcalin et donc corrosif pour certains matériaux – dont la peau de l'utilisateur ! - est à considérer. Leur manipulation nécessite le port de gants et de lunettes de protection avant dilution et de gants à la dilution d'emploi. Ces produits en solution sont également utilisables pour le nettoyage dans des bains à ultrasons permettant une décontamination en quelques minutes à température ambiante. Après cette première décontamination en phase aqueuse, un traitement avec un solvant (acétonitrile, isopropanol) permet d'éliminer les résidus les plus lipophiles comme les traces de corps gras.

3) Le Bromure d'éthidium (BET) est une sonde fluorescente de l'ADN encore largement utilisée en laboratoire. Ce composé de la famille des phénanthridinium se comporte comme un agent intercalant. Il est nettement mutagène – comme beaucoup d'intercalants - *in vitro* et *in vivo* et faiblement cancérigène chez les rongeurs. Une des alternatives possibles au BET pour la révélation de l'ADN bicaténaire sur laquelle on dispose de données toxicologiques est le SYBR Green I de Molecular Probes Inc., sonde fluorescente de la famille des cyanines asymétriques ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} \sim 497/520$  nm), dont le rendement de fluorescence est 6 fois plus élevé que celui du BET, d'où une sensibilité 25 fois plus élevée à pH 7,5 - 8,0. De plus, ce dérivé n'est pas ionisé au pH du tampon d'électrophorèse et, contrairement au BET, il n'a pas tendance à migrer dans le champ ce qui permet une sensibilité constante même pour des temps de migration inhabituels. Il ne se révèle beaucoup moins mutagène que le BET *in vitro* sur *S. typhimurium* (test d'Ames), et uniquement après activation métabolique. Par ailleurs, il n'induit pas de mutation génique (TK<sup>+</sup>/TK<sup>-</sup>), sur les cellules de lymphome murin

L5178Y, pas d'aberrations chromosomiques sur des lymphocytes humains en culture et ne provoque pas de transformations morphologiques sur les cellules d'embryon de hamster en culture (SHE cells), ce dernier test étant bien corrélé avec l'effet cancérogène chez les rongeurs. Il constitue donc une alternative plus « sûre » et techniquement meilleure au BET ce qui ne signifie pas qu'il puisse être manipulé sans prendre les précautions habituelles réservées au génotoxiques. Il existe sur le marché d'autres produits tels que le SYBR Gold, le MégaFluor sur lesquels on dispose encore de peu d'informations toxicologiques.

## II- Les substitutions possibles

Les produits dangereux les plus fréquemment utilisés sont les solvants et près de 15 % de l'ensemble des salariés y sont exposés<sup>2</sup>. Tous les solvants organiques présentent des dangers de nature physico-chimique, toxique et écotoxique et une majorité de ceux utilisés en laboratoire de recherche biologique ou médicale fait l'objet d'un classement C/M/R. (ex : benzène, chloroforme, dichlorométhane, dichloro-1,2-éthylène, trichloréthylène, formamide, *N*-méthylformamide, *N,N*-diméthylformamide, 2-éthoxyéthanol – ou éther monoéthylique de l'éthylène-glycol, 2-méthoxyéthanol – ou éther monométhylique de l'éthylène-glycol). Ils doivent donc être remplacés par des produits moins néfastes pour la santé.

**Pour les solvants halogénés, il y a aussi un impératif de nature écologique à la substitution** car ces produits ont un fort potentiel de destruction de la couche d'ozone (classement R 59). En application du protocole de Montréal, ils sont (seront) progressivement interdits d'emploi. Rappelons que la production de 1,1,1-trichloroéthane est interdite depuis janvier 1996 et son utilisation depuis octobre 2000, ainsi que celle du 1,1,2-trichloro-1,2,2-trifluoroéthane. L'utilisation du 1,1-dichloro-1-fluoroéthane est limitée aux applications aérospatiales et aéronautiques depuis janvier 2002. Le tétrachlorure de carbone n'est plus produit et son usage est limité depuis 2000 à des utilisations « essentielles » dans le domaine analytique (ex : dosage des hydrocarbures dans l'eau de mer). La Directive 1999/13 CE relative aux émissions des composés organiques volatils (COV) a fixé des obligations particulières concernant les solvants les plus toxiques en termes de réduction d'émission et de substitution pour les substances ou préparations comportant les phrases de risque R45, R46, R49, R60 ou R61). L'objectif général visé par la directive est une réduction d'environ 60% des émissions d'ici à 2007. Ces dispositions ont été transposées dans la réglementation française par l'arrêté du 29 mai 2000 et le délai de mise en conformité pour les installations industrielles existantes a été ramené au 30 octobre 2005.

Pour les solvants courants, il existe des possibilités de remplacement variées dont certaines sont déjà éprouvées dans l'industrie. Chaque solvant se caractérise par un profil de propriétés physico-chimiques uniques parmi lesquels on peut citer :

- le caractère polaire, apolaire protique ou apolaire aprotique,
- la lipophilie,
- la solubilité (eau et autres solvants),
- la miscibilité (eau et autres solvants),

---

<sup>2</sup> L'exposition aux risques et aux pénibilités du travail de 1994 à 2003. Premiers résultats de l'enquête SUMER 2003, DARES-Premières synthèses, 2004, 52.1, 1-8.

- la volatilité,
- l'indice de réfraction,
- les propriétés spectrales (transparence optique),

au sein d'une même famille chimique le comportement dans un protocole donné varie d'un congénère à l'autre.

Leur disponibilité à l'état de réactif de pureté analytique et leur coût limitent fortement leur emploi. C'est le cas notamment du 1,1,1-trifluorotoluène (n° CAS 98-08-8) qui s'avère en pratique être le seul solvant halogéné qui ne fasse pas l'objet d'une menace plus ou moins imminente de bannissement.

**Tableau II.** Substituts de quelques solvants chlorés

SOLVANT	DANGERS (£)	PEc (°C)	PEb (°C)	Log Ko/w (¢)	SUBSTITUT	DANGERS	PEc (°C)	PEb (°C)	Log Ko/w
Tétrachlorure de carbone	T N Carc. Cat. 3	NI	76,8	2,83	$\alpha,\alpha,\alpha$ - Trifluorotoluène	FN	12	101	3,11
Chloroforme	Xn Carc. Cat. 3	-	61,2	1,97					
Dichlorométhane	Xn Carc. Cat. 3	-	40	1,25					
Dichloro-1,2-éthylène	F Xn	2	55	2,00					
Trichloréthylène	T Carc. Cat. 2 Muta. Cat. 3	NI	87,2	2,61					
Perchloréthylène	Xn N Carc. Cat. 3	NI	121,3	3,40					

PEc = point d'éclair ; PEb = point d'ébullition ; Log Ko/w = Logarithme décimal du coefficient de partage octanol-1/eau

¢. Certaines des valeurs ont été calculées par sommation des contributions des fragments moléculaires.

£ Liste établie en fonction des classements de la 29<sup>ème</sup> adaptation de la Directive 67/548 CE.

Dans un certain nombre de cas il est possible de se passer tout bonnement de solvant chloré. Ainsi, la technique très populaire d'extraction des acides nucléiques par la méthode phénol/chloroforme./isopropanol combine les dangers du phénol (corrosif, toxique et Muta. Cat. 3) et celui du chloroforme (nocif par inhalation ou ingestion et également cancérogène suspecté de Cat. 3).

L'extraction en phase liquide peut aujourd'hui être remplacée par des méthodes d'extraction en phase liquide sans phénol ou encore par l'extraction en phase solide (SPE), reposant sur l'adsorption de l'ADN sur de la silice (microparticules de verre) en présence d'agents dénaturants tels que l'iodure de sodium, le thiocyanate ou le chlorhydrate de guanidine. La force ionique du milieu et le pH modulent le phénomène d'adsorption permettant une séparation de certaines catégories d'acides nucléiques. L'élution de l'acide nucléique purifié se fait toujours par un tampon de faible force ionique. Cette technique a été utilisée pour la purification de l'ADN de plasmides, des phages et de l'ADN génomique à partir de différentes matrices et est d'application générale.



**Figure 1.** Schéma d'extraction de l'ADN par adsorption sur particules de silice magnétisées (source Roche Applied Science)

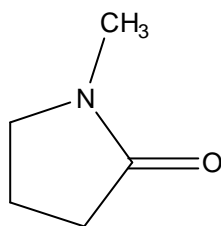
Plusieurs dizaines de kits de réactifs pour l'extraction et la purification des acides nucléiques par :

- extraction en phase liquide,
- absorption en phase solide sur silice,
- chromatographie d'échange d'ions,
- purification par affinité (hybridation sur matrice)

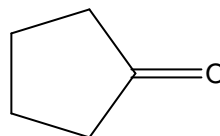
sont aujourd'hui disponibles auprès de nombreux fournisseurs

Pour des solvants dits particuliers, d'usage moins répandu en laboratoire, quelques solutions de remplacement existent aussi. Les éthers méthylique et éthylique de l'éthylène-glycol – (2-éthoxyéthanol et 2-méthoxyéthanol) qui figurent parmi les éthers de glycol classés reprotoxiques peuvent être remplacés par le Méthoxy-3-méthyl-3-butanol-1 (n° CAS 56539-66-3), ce composé n'ayant à ce jour aucun effet toxique répertorié.

La 1-méthyl-2-pyrrolidone (NMP) est un solvant aprotique très utilisé dans la pétrochimie, la formulation de colorants, d'insecticides et des peintures « à l'eau ». Elle était jusqu'alors considérée comme le produit de remplacement des trois congénères : la formamide, la *N*-méthylformamide et la *N,N*-diméthylformamide, classés en catégorie 2 de reprotoxiques. Elle est actuellement classée irritante pour les yeux et la peau (Xi, R 36/38) mais l'INRS a proposé au bureau européen des produits chimiques (ECB) son reclassement en Repr. Cat. 2 (Xi; R 61-36/37/38) sur la base d'une nouvelle appréciation des ses effets embryotoxiques à forte dose chez l'animal. Le substitut le plus satisfaisant est la cyclopentanone (n° CAS 120-92-3) qui possède une polarité voisine, mais dont le seul effet toxique répertorié est un pouvoir irritant pour les yeux et la peau (Xi, R 36/38). En revanche elle est inflammable (figure 2 et tableau III).



1-Méthyl-2-pyrrolidone  
CN1CCCC1=O  
 LogP = - 0,026  
 TPSA = 20,309 Å<sup>2</sup>



Cyclopentanone  
O=C1CCCC1  
 LogP = 1,087  
 TPSA = 17,071 Å<sup>2</sup>

LogP = Logarithme décimal du coefficient de partage octanol-1/eau ; TPSA = surface polaire totale accessible<sup>3</sup>

**Figure 2.** Propriétés comparées de la 1-méthyl-2-pyrrolidone (NMPO) et de son substitut possible la cyclopentanone.

**Tableau III.** Substituts de quelques solvants particuliers

SOLVANT	DANGERS (€)	PEc (°C)	PEb (°C)	Log Ko/w (€)	SUBSTITUT	DANGERS	PEc (°C)	PEb (°C)	Log Ko/w
Formamide	T Repr. Cat. 2	154,4	210,5	-1,51	1-Méthyl-2-pyrrolidone (§)	Xi	96	202	-0,54
N-Méthylformamide	T Repr. Cat. 2	98	185	-0,97	Cyclopentanone	F Xi	31	130,6	0,24
Diméthylformamide	T Repr. Cat. 2	58	153	-1,01					
2-Éthoxyéthanol	F T Repr. Cat. 2	42	135	-0,32	Méthoxy-3-méthyl-3-butanol-1	-	71	174	0,46
2-Méthoxyéthanol	F T Repr. Cat. 2	37-39	126	-0,77					

PEc = point d'éclair ; PEb = point d'ébullition ; Log Ko/w = Logarithme décimal du coefficient de partage octanol-1/eau

§. Certaines des valeurs ont été calculées par sommation des contributions des fragments moléculaires.<sup>4</sup>

€ Liste établie en fonction des classements de la 29<sup>ème</sup> adaptation de la Directive 67/548 CE.

### III- Les substitutions souhaitables

Le formaldéhyde a de très nombreux emplois dans l'industrie et est aussi largement utilisé dans les laboratoires de recherche en biologie d'une part comme **désinfectant** (locaux confinés, animaleries, postes de sécurité microbiologique, incubateurs) et comme **fixateur en histologie**. Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) à indiqué en septembre 2004 que le formaldéhyde devait désormais être considéré comme un cancérigène avéré pour l'homme (Groupe 1) alors que de précédentes évaluations en 1987 et 1995, n'avaient relevé qu'un effet cancérigène probable (Groupe 2A). Sur la base de nouvelles données épidémiologiques, le CIRC a estimé que les preuves étaient suffisantes pour conclure qu'il provoque le cancer du

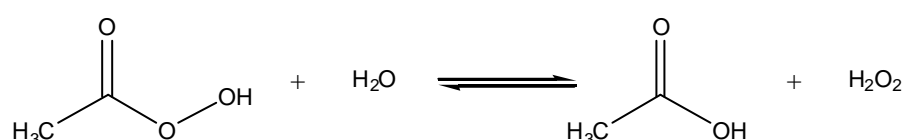
<sup>3</sup> voir P. Ertl et coll. Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. J.Med.Chem. 2000, 43, 3714-3717.

<sup>4</sup> Calculé à l'aide du logiciel de MolInspiration (<http://www.molinspiration.com>)

rhinopharynx, un cancer rare dans les pays développés<sup>5</sup>. Il existe aussi des indications limitées pour le cancer des fosses nasales et des sinus. En revanche la présomption d'effet leucémogène évoquée par le CIRC semble devoir être écartée en raison de son manque de plausibilité biologique et de la mauvaise qualité des données épidémiologiques<sup>6</sup>. Il n'est pour l'instant que suspect (Carc. Cat. 3) par la CE depuis 1996, mais son classement sera à coup sûr révisé à très court terme. Il importe de le considérer comme un cancérigène pour l'homme et de lui trouver des substituts.

La désinfection terminale par fumigation de formaldéhyde peut entraîner un risque pour le manipulateur exposé aux vapeurs et éventuellement le personnel du laboratoire, si le local – ou le matériel - n'a pas été rendu étanche. Après décontamination, il est nécessaire d'éliminer complètement les résidus secs déposés sur les surfaces. Pour ces diverses raisons, la formolisation devrait toujours être réalisée par une entreprise spécialisée, mais on sait qu'elle se pratique encore de manière plus ou moins satisfaisante dans les laboratoires. Deux solutions alternatives sont actuellement proposées. Elles reposent sur l'utilisation de deux agents oxydants forts : l'acide peracétique et l'eau oxygénée.

L'acide peracétique est classé inflammable et comburant en solution concentrée, nocif et très toxique pour les organismes aquatiques en solution diluée (R 7-10-20/21/22-35-50) et seulement irritant à des concentrations comprises entre 1 et 5 %. L'exposition à des concentration inférieures à 1 mg/m<sup>3</sup>, peut causer une irritation des yeux, du nez et de la gorge, Il ne fait l'objet d'aucun classement en catégorie de C/M/R mais exhibe, comme de nombreux peroxydes, un effet promoteur de la cancérogenèse cutanée chez la souris. L'acide peracétique possède une activité biocide à large spectre et peut être utilisé par trempage ou nébulisation. Le principal désavantage des formulations à base d'acide peracétique réside dans sa tendance à s'hydrolyser spontanément - si des stabilisants ne sont lui pas associés - en acide acétique et eau oxygénée. Cette dernière est en grande partie responsable de son activité biocide, dans la mesure où le peroxyde d'hydrogène peut donner naissance à des entités très réactives de l'oxygène par la réaction de Fenton.



En présence de traces de métaux, il se décompose en acide acétique et oxygène. La demi-vie des vapeurs d'acide peracétique est inférieure à 20 min.

L'eau oxygénée peut aussi être utilisée pour la désinfection terminale par voie aérienne, par volatilisation instantanée à chaud, puis condensation des vapeurs sur les surfaces froides à traiter.

<sup>5</sup> Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-*tert*-Butoxy-2-propanol. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 88 (à paraître)

<sup>6</sup> voir Collins, J.J. & Lineker, G.A. A review and meta-analysis of formaldehyde exposure and leukemia. Regul. Toxicol. Pharmacol. 2004, 40, 81-91.

**Pour l'instant ces techniques de désinfection qui utilisent des matériels spécifiques ne sont pas pleinement validées** (stabilité des produits, mesure des concentrations actives, nature des résidus, compatibilité avec les métaux et matières plastiques).

L'aldéhyde formique demeure le fixateur le plus largement utilisé en histologie-histochimie en raison de sa grande diffusibilité dans les tissus, en dépit de quelques désavantages, notamment son pouvoir dénaturant de l'ADN<sup>7</sup>. On sait au travers de diverses études que l'exposition du personnel des laboratoires d'anatomo-pathologie et des salles d'embaumement ou on manipule quotidiennement du formaldéhyde en solution, on peut dépasser assez fréquemment la VME (0,5 ppm ou 0,7 mg/m<sup>3</sup>). Dans les laboratoires de recherche, le développement des méthodes immuno-histochimiques nécessite d'opérer une fixation très rapide des tissus par perfusion *in situ* de solutions contenant 2 à 4% de paraformaldéhyde - oligomère précurseur - susceptible d'exposer le manipulateur. A notre connaissance, hormis la cryofixation, il n'existe pas actuellement de méthode de fixation *in situ* qui comporte l'emploi d'un substitut du paraformaldéhyde.

### III- Conclusion

Au travers de ces quelques exemples ayant trait à l'activité dans le domaine de la recherche en biosciences, il apparaît que la recherche des produits de substitution aux C/M/R, est une tâche difficile et de longue haleine. Il n'y aura jamais de solution de substitution universelle et permanente.

L'utilisateur, parce qu'il connaît et maîtrise l'ensemble des étapes de son protocole doit en être l'artisan principal. Il est aussi responsable de la validation technique de la substitution.

Le préventeur, à l'écoute des données scientifiques publiées et des innovations techniques, doit tracer des pistes de réflexion, identifier les possibilités de substitution et peser les avantages et inconvénients de la substitution en termes de risques pour le manipulateur, le laboratoire et l'environnement.

Le préventeur doit aussi convaincre les utilisateurs de rompre avec les certitudes, les habitudes acquises de longue date et un certain conformisme intellectuel qui constituent peut être les obstacles majeurs à franchir pour entamer une démarche de substitution.

---

<sup>7</sup> voir M. Srinivasan et coll. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. Am. J. Pathol., 2002, 161, 1961-1971.