

anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Connaître, évaluer, protéger

Alternatives potentielles au formaldéhyde en anatomie et cytologie pathologiques humaines

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

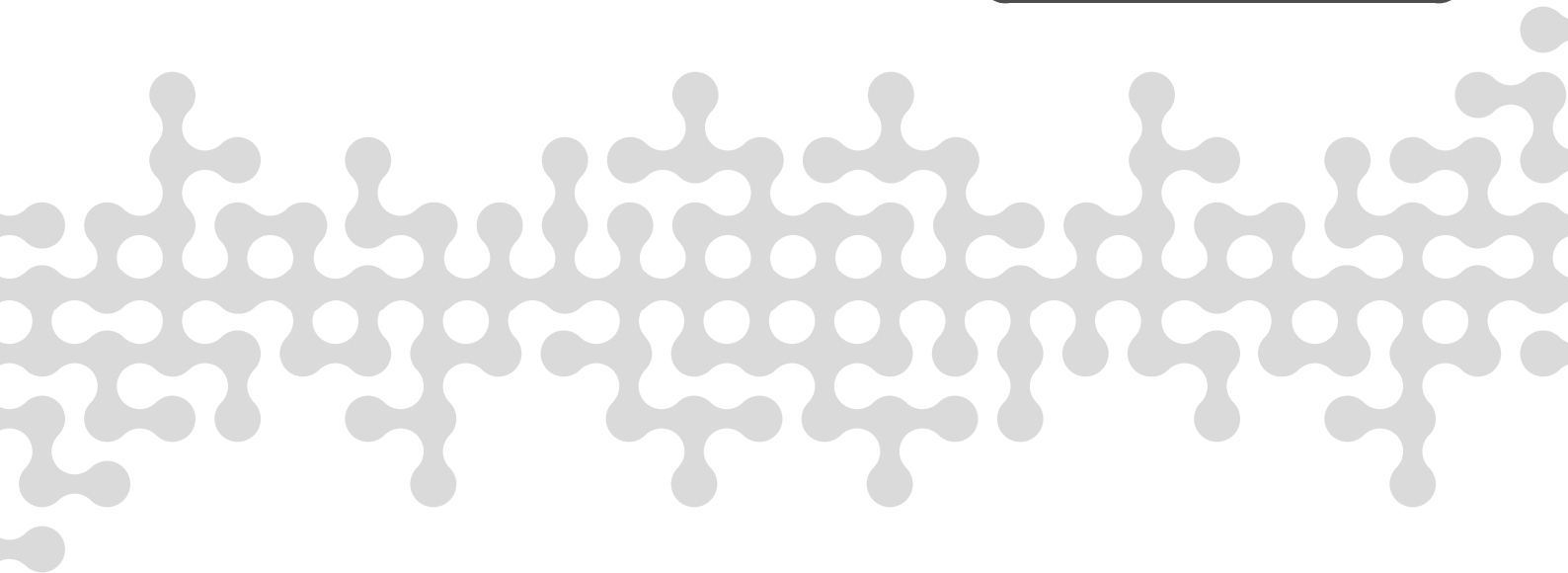
Décembre 2019 - Édition scientifique



Alternatives potentielles au formaldéhyde en anatomie et cytologie pathologiques humaines

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Décembre 2019 - Édition scientifique



Le directeur général

Maisons-Alfort, le 23 décembre 2019

AVIS

de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

relatif aux études des alternatives potentielles au formaldéhyde en anatomie et cytologie pathologiques humaines

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L. 1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 09 octobre 2014 de manière conjointe par la direction générale du travail (DGT), la direction générale de la santé (DGS), la direction générale de la consommation, de la concurrence et de la répression des fraudes (DGCCRF) et la direction générale de la prévention des risques (DGPR), pour la réalisation de l'expertise suivante : « Demande d'avis relatif à l'utilisation de substituts au formaldéhyde dans différents secteurs d'activité ».

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Le formaldéhyde a été classé en 2004 par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) dans le groupe 1 des cancérogènes avérés pour l'espèce humaine et cette classification a été confirmée en octobre 2009 sur la base de l'induction de tumeurs du nasopharynx et de leucémies. Au niveau européen, une évolution du classement de cancérogène de catégorie 2 à cancérogène de catégorie 1B a été adoptée par le règlement (UE) n° 605/2014 de la Commission du 5 juin 2014 modifiant, aux fins de son adaptation au progrès technique, le règlement CLP.

En France, l'arrêté du 13 juillet 2006 a ajouté « les travaux exposant au formaldéhyde » à la liste des substances, mélanges et procédés cancérogènes au sens de l'article R. 4412-60 du code du travail. La recherche de substitution des agents cancérogènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction (CMR) de catégorie 1A ou 1B est une obligation qui s'impose à l'employeur. Elle est énoncée dans les principes généraux de prévention à l'article L. 4121-2 du code du travail et est renforcée à l'article R. 4412-66. Ainsi, l'employeur doit pouvoir justifier des démarches fructueuses ou infructueuses qu'il a entreprises en vue de la substitution de tous les agents ou procédés CMR de catégories 1A et 1B inventoriés sur le lieu de travail. Le résultat de ces investigations doit, notamment, figurer dans le document unique d'évaluation des risques. Seul un argumentaire

technique fondé est recevable pour justifier de la non-substitution d'un agent ou procédé CMR de catégorie 1A ou 1B par un agent ou un procédé non ou moins dangereux.

Lorsque la substitution s'avère impossible, l'employeur doit mettre en œuvre tous les moyens permettant de réduire l'exposition en utilisant des mesures de prévention et de protection adaptées (système clos, autres moyens de protection collective, puis moyens de protection individuelle mais également formation et information du personnel, surveillance médicale).

Compte-tenu de ces nouvelles informations sur les propriétés de danger du formaldéhyde et la priorité à la substitution en matière de gestion des risques professionnels, l'Anses a été saisie, en date du 09 octobre 2014, de manière conjointe par la direction générale du travail (DGT), la direction générale de la santé (DGS), la direction générale de la consommation, de la concurrence et de la répression des fraudes (DGCCRF) et la direction générale de la prévention des risques (DGPR), pour une « Demande d'avis relatif à l'utilisation de substituts au formaldéhyde dans différents secteurs d'activité ».

Il est demandé à l'Anses d'éclairer les pouvoirs publics :

- sur l'intérêt du formaldéhyde par rapport aux autres substituts pour le diagnostic en matière d'anatomie et cytologie pathologiques dans les situations de routine et dans des situations particulières pour lesquelles le formaldéhyde reste indispensable et qu'il conviendra de préciser ;
- sur l'intérêt du formaldéhyde par rapport aux autres substituts pour les actes de thanatopraxie, avec un état des lieux sur les travaux en cours au niveau européen dans le cadre du règlement biocide en matière d'évaluation de la substance active formaldéhyde (TP 2, 3, 20 et 22). Par ailleurs, les directions souhaiteraient disposer, dans le cadre des travaux menés sur les substituts au formaldéhyde en anatomie et en cytologie pathologiques, d'une analyse sur les possibilités d'utilisation de ces substituts dans certains types de produits biocides, et notamment en TP 22, et sur les conséquences éventuelles en termes de toxicité et d'écotoxicité ;
- sur l'intérêt du formaldéhyde par rapport aux autres substituts pour l'utilisation en alimentation animale en tant qu'auxiliaire technologique pour la protection contre la dégradation ruminale, en tant qu'additif conservateur, en tant qu'additif d'ensilage et en tant qu'additif visant à limiter ou à réduire la charge microbienne des organismes pathogènes présents dans les aliments des animaux ;
- sur l'intérêt du formaldéhyde par rapport aux autres substituts pour l'utilisation en alimentation humaine en tant qu'auxiliaire technologique pour d'une part la fabrication de certains alginates et d'autre part l'utilisation comme bactériostatique dans la filière du secteur du sucre ;

Les utilisations du formaldéhyde dans les 4 secteurs d'activité précédemment décrits s'inscrivent dans un contexte où deux réglementations s'opposent. En effet, il existe d'une part un référentiel international ou une autorisation de mise sur le marché qui a été délivrée par les autorités européennes ou françaises légitimant ces usages du formaldéhyde et d'autre part, il y a les obligations du code du travail qui, suite à la classification du formaldéhyde, indiquent que la première des actions à mener est la substitution.

Les ministères de tutelles demandent à l'Anses de justifier l'intérêt du formaldéhyde par rapport aux autres substituts dans ces secteurs d'activités. Les experts de l'Anses estiment que la question posée revient à justifier l'utilisation d'un cancérigène de catégorie 1B par rapport à des substituts potentiellement moins dangereux. Les experts préfèrent se poser la question dans le sens inverse en identifiant des substituts moins dangereux capables de substituer la substance cancérigène dans les 4 secteurs d'activités.

Les experts de l'Anses ont développé une méthode de travail afin de pouvoir comparer et évaluer des substituts à une substance chimique dangereuse en s'appuyant sur une revue de la littérature. La description de cette méthode fait l'objet d'un rapport de l'Anses intitulé « Document méthodologique de comparaison des alternatives à une substance chimique » (Anses 2018).

La méthode a été appliquée aux substituts identifiés dans les secteurs d'activités ciblés dans la saisine.

Le présent avis détaille la partie de la saisine 2014-SA-0236 relative à l'application de la méthode aux alternatives potentielles au formaldéhyde dans le secteur de l'anatomie et cytologie pathologiques humaines.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise relève du domaine de compétences des comités d'experts spécialisé (CES) « Caractérisation des dangers des substances » (CES Substances) et « Valeurs sanitaires de référence » (CES VSR) depuis septembre 2017. L'Anses a confié l'expertise au groupe de travail « Formaldéhyde et substituts ». Les travaux relatifs à la substitution du formaldéhyde en anatomie et cytologie pathologiques humaines ont été présentés tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques au CES Substances les 08/12/2016 et 11/05/2017 et au CES VSR les 21/06/2018 et 18/10/2018.

Le rapport d'expertise collective a été validé pour mise en consultation publique par le CES VSR le 18 octobre 2018.

Le rapport d'expertise collective a fait l'objet d'une consultation publique du 11/03/2019 au 11/05/2019. Les commentaires reçus ont été examinés et discutés par le GT « Formaldéhyde et substituts » puis le CES VSR qui a adopté la version finalisée le 17/10/2019.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

Afin d'améliorer la compréhension de la problématique de la substitution, de collecter des informations sur l'utilisation du formaldéhyde ainsi que sur les tentatives de substitution menées dans le secteur de l'anatomie et cytologie pathologiques humaines, l'Anses a auditionné les différentes organisations suivantes : le Syndicat des Médecins Pathologistes Français (SMPF) ; l'Institut d'Histopathologie de Nantes (IHP) ; le Club des Cadres d'Anatomie et cytologie Pathologiques (CCAP) et la société Microm Microtech France (MM France).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

Trois phases d'activité distinctes permettant de décrire les différentes étapes suivies par un échantillon de son prélèvement jusqu'à son élimination ont été identifiées :

- la phase pré-analytique qui consiste à collecter et à transporter le prélèvement vers les laboratoires d'analyses ;
- la phase analytique qui consiste à préparer les échantillons et à mener des analyses de type tissulaire, cellulaire et moléculaire à des fins de diagnostic ;
- la phase post-analytique qui correspond à l'élimination des déchets et à la conservation par archivage des échantillons.

La méthode de comparaison des alternatives (Anses 2018) n'a été appliquée que sur les 2 phases dans lesquelles le formaldéhyde est potentiellement utilisé, c'est-à-dire au cours de la phase pré-analytique et au cours de la phase analytique.

■ La substitution du formaldéhyde dans la phase pré-analytique

Le prélèvement est réalisé principalement dans des blocs opératoires (hôpital ou clinique) ou lors de consultations médicales en cabinet libéral. Les échantillons tissulaires (pièces opératoires ou biopsies) ou cellulaires sont potentiellement fixés et conservés dans une solution de formaldéhyde à 4% avant d'être transportés vers les laboratoires pour être analysés.

La méthode de comparaison des alternatives (Anses 2018) a été appliquée à la phase pré-analytique.

- L'identification des alternatives

Au regard des données collectées, trois procédés alternatifs ont été étudiés : le transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante au laboratoire avant analyses ; la conservation de la pièce fraîche à 4°C ainsi que la technologie de mise sous vide couplée au froid à 4°C.

La technologie de mise sous vide couplée avec l'utilisation de fixateur, de flaconnage avec insertion automatique de fixateur ou encore de distribution automatique de fixateur utilisent toutes les trois du formaldéhyde. Le GT a considéré qu'il s'agissait de procédés permettant de réduire les expositions au formaldéhyde sans toutefois s'y substituer. Par conséquent, ils n'ont pas été étudiés dans la suite de la méthode comme alternatives.

- Mise en œuvre de l'étape séquentielle

La première étape séquentielle de la méthode consiste à étudier les différentes alternatives au travers de 3 modules successifs contenant chacun des critères d'exclusion.

Le premier module « **capacités techniques** » consiste à exclure les alternatives qui n'assurent pas les fonctions essentielles recherchées par l'utilisation de la substance à substituer, c'est-à-dire maintenir l'intégrité des prélèvements et leur conservation jusqu'à leur fixation. Ainsi, la préservation de la morphologie des tissus, des protéines et des acides nucléiques sont les 3 critères retenus pour comparer les capacités techniques des alternatives à celles du formaldéhyde. Pour pouvoir comparer les capacités techniques des 3 procédés alternatifs, les experts de l'Anses ont associé à chacun d'entre eux une durée au-delà de laquelle la préservation de l'échantillon ne peut plus être garantie. Ainsi, le procédé de transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante avant analyse a été classé 4 « capacités techniques supérieures » lorsque la pièce est transférée au laboratoire et fixée en moins d'une heure. La conservation de la pièce fraîche à 4°C a été classée 4 « capacités techniques supérieures » lorsque la pièce est transférée au laboratoire et fixée en moins de 2 heures. La technologie de mise sous vide couplée au froid à 4°C a également été classée 4 « capacités techniques supérieures » lorsque la pièce est transférée au laboratoire et fixée dans les 72 heures.

Ainsi les 3 procédés alternatifs ont été évalués comme ayant des capacités techniques supérieures à celle du formaldéhyde. En effet, contrairement à la fixation des tissus qui peut dégrader et fragmenter les ARN, ces 3 alternatives permettent de préserver les acides nucléiques lorsqu'elles sont utilisées dans les délais impartis.

Le second module « **réglementation** » consiste à exclure des alternatives interdites par une réglementation nationale ou internationale. Aucune réglementation interdisant ces trois alternatives n'ayant été identifiée, elles ont pu être étudiées au travers du module suivant.

Le troisième module « **danger** » consiste ensuite à exclure les alternatives qui sont autant ou plus dangereuses que le formaldéhyde par l'utilisation de l'outil QCAT. Cet outil n'a pas été appliqué puisque les 3 alternatives n'utilisent pas de fixateur chimique.

Au final, les 3 alternatives ont pu être étudiées dans l'étape suivante dite étape simultanée.

- Mise en œuvre de l'étape simultanée

La seconde étape de la méthode consiste à comparer en parallèle les 3 alternatives au travers de 4 modules.

Concernant le module « **danger** », l'outil GreenScreen n'a pas pu être directement appliqué à l'ensemble des alternatives car ce sont des procédés n'utilisant pas d'agents chimiques. Aucun danger de nature chimique n'étant identifié, ces alternatives se voient attribuer la classe finale de 4 « substance chimique peu dangereuse ».

Concernant le module « **estimation des coûts de substitution** », les experts de l'Anses soulignent que le transport des prélèvements va être un enjeu majeur dans l'estimation des coûts de substitution. La nécessité de transporter les pièces existe majoritairement dans le cas d'un établissement ne possédant pas de laboratoire d'analyse au sein de sa structure. Ainsi, les experts de l'Anses ont distingué deux types de scénarios pour estimer le coût des alternatives au formaldéhyde. Le premier scénario concerne les établissements possédant un laboratoire *in situ* et le second concerne les établissements ne possédant pas de laboratoire au sein de leur structure. Dans les deux scénarios, la technologie de mise sous vide couplée à 4°C est classée 1 « coûts relatifs les plus élevés ». Le transfert de la pièce fraîche à température ambiante avant analyses ainsi que la conservation de la pièce à 4°C restent classées de la même manière dans les deux scénarios. C'est à dire soit dans la classe 4 : « coût relatif les moins élevés » dans le cas où les établissements possèdent leur laboratoire *in situ* ou soit dans la classe 2 « coût relatif moyennement élevés » dans le cas où les établissements doivent organiser un transport journalier à 4°C des échantillons vers le laboratoire d'analyses.

Concernant le module « **conditions d'exposition** », les critères du module n'ont pas pu être directement appliqués aux alternatives car il n'y a pas de substances chimiques mises en œuvre dans les procédés alternatifs. Une classe 4 « conditions d'exposition estimées négligeables » a été attribuée à l'ensemble des procédés alternatifs.

Le module « **autres impacts** » souligne que, quelle que soit la solution de substitution retenue, elle aura des impacts sur l'organisation des flux et notamment sur l'organisation des transports et des programmes de prélèvements qui devront être optimisés pour préserver les échantillons. Par ailleurs, la chaîne du froid devra être respectée jusqu'au laboratoire d'analyses dès lors qu'une alternative mettant en œuvre une conservation à 4°C est choisie. Enfin, le module souligne que la problématique du risque biologique semble être le risque le plus important à prendre en compte en cas de substitution du formaldéhyde à cette étape. L'absence de propriété biocide des alternatives conduit à un risque biologique qui doit faire l'objet d'une attention particulière dans le cadre de l'évaluation des risques. Cependant, les experts de l'Anses estiment que le risque biologique n'est pas majoré en raison de la mise en œuvre des règles d'hygiène et de sécurité du personnel et des contraintes réglementaires relatives à l'emballage multiple et aux transports (transport par route, Arrêté Transport des matières dangereuses Accord pour le transport des marchandises Dangereuses par la Route (TMD ADR)).

En **conclusion**, des alternatives à l'utilisation du formaldéhyde existent aujourd'hui pour l'ensemble des phases pré-analytiques dès lors que le temps entre le moment de l'exercice et la mise en contact avec le fixateur (temps d'ischémie) ne dépasse pas 72 heures.

- Présentation finale des résultats

Conformément à la méthodologie de comparaison des substituts, les résultats finaux sont présentés dans des tableaux qui présentent les différentes alternatives avec leurs avantages et leurs inconvénients de manière à laisser le décideur retenir la meilleure option en toute connaissance de cause, au regard des critères qu'il jugera comme prioritaires et acceptables.

**Tableau 1 : Comparaison des alternatives au formaldéhyde lors de la phase pré-analytique
Etablissements ayant un laboratoire *in situ***

| Conclusion des modules | Formaldéhyde | Alternatives | | |
|--|--------------|--|---|---|
| | | Le transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante au laboratoire avant analyses | La conservation de la pièce fraîche à 4°C | La technologie de mise sous vide couplée au froid à 4°C |
| Classe finale du module « capacités techniques » | Classe 3 | Classe 4 | Classe 4 | Classe 4 |
| Classe finale du module « dangers » (GreenScreen) | Classe 1 | Classe 4 | Classe 4 | Classe 4 |
| Classe finale du module « conditions d'exposition » | Classe 2 | Classe 4 | Classe 4 | Classe 4 |
| Classe finale du module « Estimation des coûts de substitution » | Classe 4 | Classe 4 | Classe 4 | Classe 1 |

**Tableau 2 : Comparaison des alternatives au formaldéhyde lors de la phase pré-analytique
Etablissements n'ayant pas de laboratoire *in situ***

| Conclusion des modules | Formaldéhyde | Alternatives | | |
|--|--------------|--|---|---|
| | | Le transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante au laboratoire avant analyses | La conservation de la pièce fraîche à 4°C | La technologie de mise sous vide couplée au froid à 4°C |
| Classe finale du module « capacités techniques » | Classe 3 | Classe 4 | Classe 4 | Classe 4 |
| Classe finale du module « dangers » (GreenScreen) | Classe 1 | Classe 4 | Classe 4 | Classe 4 |
| Classe finale du module « conditions d'exposition » | Classe 2 | Classe 4 | Classe 4 | Classe 4 |
| Classe finale du module « Estimation des coûts de substitution » | Classe 4 | Classe 2 | Classe 2 | Classe 1 |

Tableau 3 : Identification des autres impacts liés à la substitution en bloc opératoire

| Conclusion des modules | Formaldéhyde | Alternatives | | |
|---------------------------------------|--------------|---|---|--|
| | | Le transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante au laboratoire avant analyses | La conservation de la pièce fraîche à 4°C | La technologie de mise sous vide couplée au froid à 4°C |
| Identification des « autres impacts » | Sans objet | Réévaluation du risque biologique Nouvelles contraintes Temps d'ischémie inférieur à 1 heure Organisation des flux | Réévaluation du risque biologique Nouvelles contraintes Temps d'ischémie inférieur à 2 heures Organisation des flux Respect de la chaîne du froid | Réévaluation du risque biologique Nouvelles contraintes Temps d'ischémie inférieur à 72 heures Organisation des flux Respect de la chaîne du froid |

■ La substitution du formaldéhyde dans la phase analytique

Le prélèvement arrive au laboratoire déjà fixé au formaldéhyde ou non fixé. Dans ce dernier cas, la fixation de la pièce dans du formaldéhyde à 4% se déroule au laboratoire avant analyses. La pièce fixée est ensuite analysée à travers diverses techniques.

La méthode de comparaison des alternatives (Anses 2018) a été appliquée à la phase analytique.

• L'identification des alternatives

L'analyse de la littérature scientifique a permis d'identifier 58 alternatives potentielles à l'utilisation du formaldéhyde comme fixateur lors de la phase analytique.

En ce qui concerne la technologie de mise sous vide couplée avec l'utilisation de formaldéhyde, le GT a considéré qu'il s'agissait d'un procédé permettant de réduire les quantités de formaldéhyde lors du stockage des pièces dans les laboratoires sans toutefois le substituer. Par conséquent, il n'a pas été étudié dans la suite de la méthode.

La congélation à -80°C qui a été présentée par les parties prenantes de la profession comme une alternative possible à l'utilisation du formaldéhyde, n'a pas été retenue en tant que telle par le GT. En effet, une fois décongelées, les pièces doivent dans la plupart des cas être fixées au formaldéhyde avant d'être analysées. Le GT a conclu que ce procédé permet de stocker les échantillons sans fixateur mais ne supprime pas l'étape de fixation utilisant le formaldéhyde. Par conséquent, il n'a pas été étudié dans la suite de la méthode.

• Mise en œuvre de l'étape séquentielle

La première étape séquentielle de la méthode consiste à étudier les différentes alternatives au travers de 3 modules successifs contenant chacun des critères d'exclusion.

Le premier module « **capacités techniques** » consiste à exclure les alternatives qui n'assurent pas les fonctions essentielles recherchées par l'utilisation de la substance à substituer. Un substitut au formaldéhyde doit :

- garantir la conservation des caractéristiques morphologiques et être compatible avec le fonctionnement de tous les automates, les colorations standards et spéciales ;
- être compatible avec le fonctionnement des techniques d'immunohistochimie (IHC) ;

- être compatible avec le fonctionnement des techniques d'hybridation in situ (HIS) ;
- être compatible avec le fonctionnement des techniques d'extraction d'ADN ;
- être compatible avec le fonctionnement des techniques d'extraction d'ARN ;
- posséder un potentiel biocide ;
- garantir la conservation des échantillons pendant 10 ans pour le suivi des patients.

L'évaluation des capacités techniques des 58 alternatives, au travers de 7 critères jugés essentiels a conduit à ne pouvoir classer que 12 d'entre elles. En effet, bien souvent pour une même alternative, la majorité des critères techniques retenus par les experts de l'Anses n'ont pas été évalués par les auteurs.

4 alternatives (Glyo-Fixx®, RCL2-CS100®, Weigner fixateur® et ZBF®) ont été classées 1 « capacités techniques insuffisantes » et n'ont donc pas été étudiées dans la suite de la méthode. Au final, 7 mélanges, à savoir le PAXgene®, l'Excell Plus®, le FineFix®, le Green-Fix®, l'HydroSafe®, le RCL2® et l'UMFIX® ont été classés 2 « capacités techniques inférieures » et ont pu être étudiés dans la suite de la méthode. Le procédé HOPE® a également été classé 2 « capacités techniques inférieures » et a pu être étudié dans la suite de la méthode.

Le second module « **réglementation** » consiste à exclure des alternatives interdites par une réglementation nationale ou internationale. Aucune réglementation interdisant pour des raisons sanitaires ces 8 alternatives n'ayant été identifiée, elles ont pu être étudiées au travers du module suivant.

Le troisième module « **danger** » consiste à exclure les alternatives qui sont autant ou plus dangereuses que le formaldéhyde. Les mélanges PAXgene®, Green-Fix® et UMFIX® ont été classés selon l'outil QCAT dans la même classe de danger que celle du formaldéhyde cancérigène sur la base des propriétés neurotoxiques du méthanol présent dans les mélanges. Le procédé HOPE® a été également classé dans la même classe de danger que celle du formaldéhyde dans la mesure où l'une des substances du mélange est classée cancérigène de catégorie 1B par le règlement CLP.

Au final, l'Excell Plus®, l'HydroSafe®, le FineFix® et le RCL2® ont été identifiés comme des alternatives pouvant être étudiées dans la phase simultanée de la méthode.

- Mise en œuvre de l'étape simultanée

La seconde étape de la méthode consiste à comparer les 4 alternatives au travers de 4 modules.

En ce qui concerne le module « **danger** », l'outil GreenScreen a permis d'attribuer une classe finale à chacune des alternatives. L'HydroSafe® ; le FineFix® et le RCL2® ont été classés 2 « substance chimique très dangereuse »¹ en raison de la classification « H225 – Liquide et vapeurs très inflammables » de l'éthanol. L'Excell Plus® a également été classé 2 « substance chimique très dangereuse » en raison de la classification « H341 - mutagène de catégorie 2 » du glyoxal et de la présence d'éthanol dans le mélange.

Concernant le module « **estimation des coûts de substitution** », les experts de l'Anses ont été confrontés au fait que l'Excell Plus® et l'HydroSafe® ne sont plus actuellement disponibles sur le marché. De plus, la commercialisation de l'Excell Plus® a été arrêtée au début de l'année 2018 et les experts de l'Anses ont utilisé le prix d'achat du mélange à cette date pour attribuer une classe finale au mélange. Sans aucune information réaliste sur le coût d'achat de l'HydroSafe®, il n'a pas été possible de comparer ce mélange au formaldéhyde à travers ce module. La classe « Non

¹ pour mémoire, le formaldéhyde est en classe 1, classe correspondant aux substances chimiques extrêmement dangereuses.

spécifié par manque de données » lui a été attribuée. Au final, l'Excell Plus® et le RCL2® présenteraient les coûts relatifs de substitution les plus élevés (classe 1) et le FineFix® présenterait des coûts relatifs peu élevés (classe 4).

Concernant le module « **conditions d'exposition** », les experts se sont basés sur le fait que tous les mélanges contiennent de l'éthanol, une substance très inflammable, pour leur attribuer une classe finale. Ainsi, les experts ont attribué la classe 3 « conditions d'exposition faibles » à l'Excell Plus® dans la mesure où le mélange contient moins de 10% d'éthanol. Par ailleurs, les experts ont attribué la classe 2 « conditions d'exposition moyennes » au FineFix®, à l'Hydrosafe® et au RCL2® dans la mesure où les trois mélanges contiennent 70 % d'éthanol.

Enfin le module « **autres impacts** » souligne d'abord que deux des alternatives identifiées (l'Excell Plus® et l'Hydrosafe®) ne sont plus disponibles sur le marché. Ensuite, il est indiqué que la substitution du formaldéhyde va nécessiter le développement d'un nouveau standard international afin de permettre une inter-comparaison des prélèvements avec l'ensemble des structures participant à des protocoles internationaux. Enfin, la problématique du risque biologique doit être prise en compte en cas de substitution du formaldéhyde. L'absence de propriété biocide conduit à un risque biologique qui doit faire l'objet d'une attention particulière dans le cadre de l'évaluation des risques. Cependant, les experts de l'Anses estiment que le risque biologique en laboratoire n'est pas majoré puisque le personnel des laboratoires peut déjà être amené à manipuler des prélèvements biologiques non fixés et suit déjà les règles d'hygiène et de sécurité relatives à ce risque.

Les experts de l'Anses soulignent le fait que dans le cas où les prélèvements arrivent frais à température ambiante ou à 4°C ou sous-vide à 4°C dans le laboratoire, il sera alors nécessaire d'équiper le laboratoire de réfrigérateurs ou de chambres froides à 4 °C pour pouvoir réceptionner les prélèvements sans interrompre la chaîne du froid et d'organiser le flux de traitement des échantillons afin d'organiser leur fixation en respectant le temps d'ischémie.

En **conclusion**, en l'état actuel des connaissances, aucun substitut ne satisfait l'ensemble des critères techniques retenus par les experts de l'Anses. En effet, certaines alternatives étudiées ont pu montrer de bons résultats uniquement sur certaines techniques analytiques mais jamais sur l'ensemble d'entre elles et les critères « potentiel biocide » et « conservation d'un échantillon sur 10 ans » n'ont pu être évalués par manque de données.

- Présentation finale des résultats

Conformément à la méthodologie de comparaison des substituts, les résultats finaux sont présentés dans des tableaux qui présentent les différentes alternatives avec leurs avantages et leurs inconvénients de manière à laisser le décideur retenir la meilleure option en toute connaissance de cause, au regard des critères qu'il jugera comme prioritaires et acceptables.

Tableau 4 : Comparaison des alternatives au formaldéhyde

| Conclusion des modules | Formaldéhyde à 4% | Alternatives | | | |
|--|-------------------|--------------|----------|----------|------------|
| | | Excell Plus® | FineFix® | RCL2® | Hydrosafe® |
| Classe finale du module « capacités techniques » | Classe 3 | Classe 2 | Classe 2 | Classe 2 | Classe 2 |
| Classe finale du module « danger » (GreenScreen) | Classe 1 | Classe 2 | Classe 2 | Classe 2 | Classe 2 |

| | | | | | |
|--|----------|----------|----------|----------|------------------------------------|
| Classe finale du module « Estimation des coûts de substitution » | Classe 4 | Classe 1 | Classe 4 | Classe 1 | Non spécifié par manque de données |
| Classe finale du module « Conditions d'exposition » | Classe 1 | Classe 3 | Classe 2 | Classe 2 | Classe 2 |

Tableau 5 : Identification des autres impacts liés à la substitution

| Conclusion des modules | Formaldéhyde à 4% | Alternatives | | | |
|---------------------------------------|-------------------|--|--|--|--|
| | | Excell Plus® | FineFix® | RCL2® | Hydrosafe® |
| Identification des « autres impacts » | Sans objet | Réévaluation du risque biologique Nouvelles contraintes Développement d'un nouveau standard international Disponibilité de l'alternative | Réévaluation du risque biologique Nouvelles contraintes Développement d'un nouveau standard international | Réévaluation du risque biologique Nouvelles contraintes Développement d'un nouveau standard international | Réévaluation du risque biologique Nouvelles contraintes Développement d'un nouveau standard international Disponibilité de l'alternative |

Au regard de la construction très protectrice de la méthode de comparaison utilisée (qui peut classer dans une même classe de danger un cancérigène avéré et un neurotoxique avéré et classer dans une même classe de danger un agent chimique suspecté mutagène et un liquide très inflammable), la méthode peut conduire à n'identifier qu'une liste d'alternatives potentielles très réduite.

De plus, la méthodologie compare uniquement les dangers de chacun des constituants connus des mélanges de façon individuelle sans que ne soit réalisée une évaluation des risques pour l'Homme et l'environnement des mélanges dans leur globalité.

■ Recommandations

Pour la phase pré-analytique, au regard de l'évaluation des alternatives à l'utilisation du formaldéhyde, il existe des alternatives possibles dès lors que le temps d'ischémie ne dépasse pas 72h. Le CES recommande la mise en œuvre d'un des trois procédés alternatifs suivants :

- le transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante au laboratoire avant analyses à condition que le temps d'ischémie reste inférieur à 1 heure ;
- la conservation de la pièce fraîche à 4°C à condition que le temps d'ischémie reste inférieur à 2 heures ;
- la technologie de mise sous vide couplée au froid à 4°C à condition que le temps d'ischémie reste inférieur à 72 heures.

Le CES recommande également que la fixation des pièces à analyser soit réalisée systématiquement dans les laboratoires d'analyses.

Pour la phase analytique, compte tenu qu'aucun substitut ne satisfait l'ensemble des critères techniques, le CES recommande :

- d'utiliser un ou plusieurs fixateurs alternatifs donnant de bons résultats sur des techniques analytiques bien spécifiques. Le CES souhaite rappeler qu'indépendamment du fait que le décideur devra retenir en toute connaissance de cause la meilleure option au regard des critères qu'il jugera comme prioritaires et acceptables, les alternatives ayant pu être évaluées au travers de l'ensemble des modules de la méthode sont toutes moins dangereuses que le formaldéhyde, cancérigène avéré.

Dans un objectif de réduction des expositions au formaldéhyde lors de la phase analytique pour les opérations de stockage des pièces fraîches lorsqu'elles sont reçues au laboratoire, le CES recommande de recourir aux techniques du froid (selon les cas, 4°C ou - 80°C).

Dans la mesure où le risque biologique lié à l'utilisation des alternatives n'a pas été évalué dans le cadre de ces travaux, les experts rappellent que les règles d'hygiène et de sécurité relatives à ce risque doivent continuer à être mises en œuvre dans les laboratoires.

Dans une perspective de développement de substituts, le CES recommande :

- de développer des techniques de mise sous vide couplées avec un fixateur autre que le formaldéhyde ;
- de développer des techniques de flaconnage prêt à l'emploi avec un fixateur autre que le formaldéhyde ;
- d'encourager les travaux de recherches complémentaires sur les fixateurs ayant démontré de très bons résultats pour certaines techniques analytiques uniquement ;
- de mener une veille sur les fixateurs sans formaldéhyde. Les 46 mélanges identifiés comme des alternatives potentielles qui n'ont pas pu être évalués par les experts de l'Anses faute de données pourraient constituer une liste de départ.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions et recommandations du CES. Par ailleurs, l'Agence rappelle que le travail mené consiste à coter des pistes de substitution du formaldéhyde dans le secteur de l'anatomie et cytologie pathologiques humaines à l'issue d'une démarche multi-paramétrique englobant les facettes de l'efficacité technique, du danger, des conditions d'exposition et d'une approche des coûts en s'appuyant sur un état des lieux des connaissances et des auditions. L'Anses rappelle que la décision finale de mise en application revient aux professionnels, en tant qu'employeurs, qui peuvent par ailleurs se mobiliser au sein de la filière pour faire progresser la mise en œuvre d'alternatives.

Dr Roger Genet

MOTS-CLÉS

Formaldéhyde, substitution, alternative, anatomie cytologie pathologiques, santé au travail, exposition professionnelle, comparaison de substituts, CMR, cancérigène, mutagène, reprotoxique.

Formaldehyde, substitution, alternative, pathological anatomy and cytology, occupational health, occupational exposure, comparison of substitutes, CMR, carcinogen, mutagen, reprotoxic.

Études des alternatives potentielles au formaldéhyde en anatomie et cytologie pathologiques humaines

Saisine n°2014-SA-0236

RAPPORT d'expertise collective

Comité d'experts spécialisé « Valeurs sanitaires de référence »

Groupe de travail « Formaldéhyde et substituts »

Octobre 2019

Mots clés

Formaldéhyde, substitution, alternative, anatomie cytologie pathologiques, santé au travail, exposition professionnelle, comparaison de substituts, CMR, cancérigène, mutagène, reprotoxique.

Formaldehyde, substitution, alternative, pathological anatomy and cytology, occupational health, occupational exposure, comparison of substitutes, CMR, carcinogen, mutagen, reprotoxic

Présentation des intervenants

PRÉAMBULE : Les experts externes, membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

GRUPE DE TRAVAIL

Les travaux, objets du présent rapport ont été menés par le groupe de travail suivant :

- « Formaldéhyde et substituts »

Président

M. Jean-François CERTIN – Retraité (anciennement Ingénieur conseil de la CARSAT Pays de la Loire) – Compétences : substitution des CMR en milieu professionnel, évaluation des risques professionnels, connaissance du secteur d'activité « anatomie et cytologie pathologiques »

Membres

M. Marc BARIL – Professeur associé à l'Université de Montréal – Compétences : Chimiste toxicologue, hygiène industrielle

Mme. Corine BAYOURTHE – Professeur à l'ENSA de Toulouse – Compétences : connaissance du secteur d'activité « alimentation animale »

Mme Céline BOTINEAU – Ingénieur de prévention du risque chimique au CEA – Compétences : évaluation des risques professionnels, connaissance du secteur d'activité « anatomie et cytologie pathologiques »

M. Jean-Marc BRIGNON – Ingénieur et chef de l'unité « économie et aide à la décision » à l'INERIS – Compétences : faisabilité économique de la substitution

Mme Ségolène CALVEZ – Maître de conférences à l'ONIRIS – Compétences : connaissance du secteur d'activité « pisciculture »

Mme Barbara DUFEU – Ingénieur en prévention des risques professionnels à l'APHP de Paris – Compétences : évaluation des risques professionnels, connaissance des secteurs d'activité « anatomie et cytologie pathologiques » et « thanatopraxie »

M. Luc FILLAUDEAU - Responsable du laboratoire d'ingénierie des systèmes biologiques et des procédés au CNRS UMR792 INRA, à l'INSA de Toulouse – Compétences : génie des procédés, auxiliaires technologiques, connaissance du secteur d'activité « alimentation humaine »

M. Loïc GARRAS – Hygiéniste industriel au sein de Santé Publique France – Compétences : évaluation des expositions, évaluation des risques professionnels

Mme Martine GOLIRO – Ingénieur conseil à la CARSAT Bourgogne et Franche-Comté – Compétences : substitution des CMR en milieu professionnel, évaluation des risques professionnels

M. Pierre LAMBERT – Ingénieur conseil à la CARSAT Aquitaine – Compétences : substitution des CMR en milieu professionnel, évaluation des risques professionnels, connaissance du secteur d'activité « anatomie et cytologie pathologiques » - Démission en janvier 2018

M. Armand LATTES - Président honoraire de la Fédération Française pour les sciences de la chimie – Compétences : connaissance du secteur d'activité « thanatopraxie »

Mme Sophie LE BOUQUIN-LENEVEU – Chef d'unité « Epidémiologie et bien-être en aviculture et cuniculture » au Laboratoire de Ploufragan à l'Anses – Compétences : connaissance du secteur d'activité « pisciculture »

M. Raymond VINCENT - Retraité (anciennement Chargé de mission à la Direction Déléguée aux Applications (INRS)) - Compétences : chimie, métrologie des polluants, évaluation des risques professionnels

COMITÉ D'EXPERTS SPÉCIALISÉ

Les travaux, objets du présent rapport ont été suivis et adoptés par les CES suivants :

- « Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de référence »

Président

M. Michel GUERBET – Professeur de toxicologie à l'UFR médecine pharmacie de Rouen - Pharmacien toxicologue

Vice-président

M. Dominique LAFON – Médecin toxicologue chez Nexter Group – Médecine du travail, toxicologie, reprotoxicité

Membres

M. Marc BARIL - Professeur associé à l'Université de Montréal – Chimiste toxicologue, VLEP

M. Sylvain BILLET – Enseignant chercheur / maître de conférence en toxicologie à l'Université du Littoral Côte d'Opale – Toxicologie respiratoire, nanomatériaux

Mme Michèle BISSON – Responsable d'étude à l'INERIS – Pharmacien toxicologue, toxicologie générale - VTR

Mme Anne CHEVALIER – Epidémiologiste retraitée de l'Institut de Veille Sanitaire

M. François CLINARD – Epidémiologiste à l'Institut de Veille Sanitaire – Pharmacien toxicologue, épidémiologie, évaluation des risques sanitaires

Mme Fatiha EL-GHISSASSI – Scientifique, Section des Monographies de IARC (IMO) Centre International de Recherche sur le Cancer - Docteur es science en biochimie spécialiste en cancérogénèse et génotoxicité

Mme Mounia EL-YAMANI – Responsable d'unité à l'Institut de Veille sanitaire – Docteur es science en biochimie, toxicologie, VLEP

M. Claude EMOND – Professeur adjoint de clinique à l'Université de Montréal – Toxicologie, modèle PBPK, toxicocinétique, nanotoxicologie, perturbateurs endocriniens

M. Guillaume GARCON – Professeur de toxicologie à l'Université de Lille 2 – Toxicologie générale, cancérologie, modèles expérimentaux, toxicologie respiratoire, pollution atmosphérique

M. Ludovic LE HEGARAT – Chef d'unité adjoint Toxicologie des contaminants - Anses – Laboratoire de Fougères- Toxicologie, génotoxicité, nanomatériaux

Mme Véronique MALARD – Ingénieur chercheur en toxicologie au CEA, Centre de Cadarache. Docteur es science – Toxicologie « in vitro », biologie cellulaire, nanotoxicologie, protéomique.

M. Fabrice MICHIELS – Médecin du travail / toxicologue à l'Association Interentreprises pour la Santé au Travail 19

M. Jean-Paul PAYAN – Chef du laboratoire Pénétration Cutanée, Cinétique et Métabolisme à l'INRS, Nancy – Pharmacien toxicologue, toxicocinétique

M. Henri SCHROEDER – Enseignant chercheur à l'URAFPA (unité de recherche animal et fonctionnalités des produits animaux), INRA USC 340, Faculté des Sciences et Technologies, Université de Lorraine - Pharmacien biologiste - Neurotoxicité, comportement animal, développement cérébral, exposition périnatale

M. Alain SIMONNARD – Pharmacien toxicologue, ERT (Toxicologue Européen agréé), retraité de l'INRS

M. Olivier SORG – Chef de groupe de recherche à l'Université de Genève – Docteur es science en biochimie, toxicologie expérimentale, dermatotoxicologie

Mme Lydie SPARFEL – Professeur à l'Université de Rennes 1 / IRSET 'Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail' UMR INSERM 1085– Pharmacien Toxicologue, immunotoxicologie, toxicogénomique, cancérologie, biologie cellulaire et moléculaire

M. Jérôme THIREAU – Chargé de recherche au CNRS – Docteur es science, physiologie animale, biologie cellulaire, cardiotoxicité

■ « Valeurs sanitaires de référence »

Président

M. Fabrice MICHIELS – Médecin du travail / toxicologue à l'Association Interentreprises pour la Santé au Travail en Corrèze

Membres

M. Marc BARIL – Professeur associé à l'Université de Montréal – Compétences : Chimiste toxicologue, hygiène industrielle

M. Stéphane BINET – Pharmacien toxicologue à la direction scientifique à l'INRS – Compétences : toxicologie générale et industrielle

Mme Michèle BISSON – Responsable d'étude à l'INERIS – Compétences : Pharmacien toxicologue, toxicologie générale

Mme Anne CHEVALIER – Epidémiologiste retraitée de l'Institut de Veille Sanitaire -Compétences : épidémiologie

Mme Fatiha EL-GHISSASSI – Scientifique, Section des Monographies de IARC (IMO) Centre International de Recherche sur le Cancer - Compétences : Docteur es science en biochimie spécialiste en cancérogénèse et génotoxicité

Mme Mounia EL-YAMANI – Responsable d'unité à Santé publique France (anciennement Institut de Veille sanitaire) – Compétences : Docteur es science en biochimie, toxicologie

M. Claude EMOND – Professeur adjoint de clinique à l'Université de Montréal – Compétences : Toxicologie, modèle PBPK, toxicocinétique, nanotoxicologie, perturbateurs endocriniens

M. Reginald Edward FITZGERALD – Expert en toxicologie réglementaire au Centre Suisse de Toxicologie Humaine Appliquée - Compétences : toxicologie de la reproduction, neurotoxicité du développement, évaluation des risques humains

M. Robert GARNIER – Médecin toxicologue, Centre antipoison de Paris - Compétences : Toxicologie médicale – Médecine du travail

Mme Perrine HOET – Professeur à l'Université Catholique de Louvain – Compétences : médecine, toxicologie industrielle

Mme Yuriko IWATSUBO – Médecin épidémiologiste à Santé publique France (anciennement Institut de Veille sanitaire) – Compétences : épidémiologie des risques professionnels

Mme Cécile KAIRO – Évaluateur de risques sanitaires - (anciennement Institut de Veille sanitaire) Compétences : Docteur en pharmacie spécialisé en environnement, toxicologie générale et évaluation des risques

Mme Laila LAKHAL – Ingénieur INRA unité Toxalim - Compétences : Toxicologie, métabolisme, perturbateurs endocriniens

M. Frédéric LIRUSSI – Maître de Conférences des Universités– Praticien Hospitalier (MCU-PH) à l'UFR des Sciences de Santé & CHU de Dijon - Compétences : Toxicologie Clinique, Toxicologie analytique, Immunité Innée, Reprotoxicité

Mme Anne MAITRE – Professeur des Universités – Praticien Hospitalier (PU-PH) au Laboratoire de Toxicologie Professionnelle et Environnementale, CHU de Grenoble ; Responsable de l'équipe « Environnement et prédiction de la santé des populations », Laboratoire TIMC, Université Grenoble Alpes – Compétences : médecine, toxicologie, IBE, métrologie des polluants, hygiène industrielle

Mme Florence PILLIERE – Conseiller médical en toxicologie à l'INRS – Compétences : médecine du travail, toxicologie, IBE. Décédée en mars 2019.

Mme Anne PLATEL – Maître de conférences à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille – Laboratoire de Toxicologie Génétique, Institut Pasteur de Lille - Compétences : Toxicologie, Génotoxicité, QSAR

M. Henri SCHROEDER – Enseignant chercheur à l'URAFPA, INRA USC 340, Faculté des Sciences et Technologies, Université de Lorraine - Pharmacien biologiste - Compétences : Neurotoxicité, comportement animal, développement cérébral, exposition périnatale

M. Olivier SORG – Chef de groupe de recherche à l'Université de Genève - Compétences : Docteur es science en biochimie, toxicologie expérimentale, dermatotoxicologie

M. Jérôme THIREAU – Chargé de recherche au CNRS - Compétences : Docteur es science, physiologie animale, biologie cellulaire, cardiotoxicité

M. Claude VIAU – Professeur associé à l'université de Montréal – Compétences : Toxicologie, IBE, hygiène industrielle, métrologie des polluants

M. Raymond VINCENT - Retraité (anciennement Chargé de mission à la Direction Déléguée aux Applications (INRS)) - Compétences : chimie, métrologie des polluants, évaluation des risques professionnels

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

M. Geoffrey ARGILES – Coordinateur d'expertises scientifiques – Anses

Contribution scientifique

M. Geoffrey ARGILES – Coordinateur d'expertises scientifiques – Anses

Mme Dominique BRUNET – Adjointe au chef de l'unité Evaluation des Substances chimiques – Anses

Mme Karen BURGA – Ecotoxicologue - Anses

Mme Sandrine CHARLES – Pharmacien toxicologue – Anses

Mme Karine FIORE – Economiste - Anses

Secrétariat administratif

Mme Séverine BOIX – Anses

AUDITIONS DE PERSONNALITÉS EXTÉRIEURES

Syndicat des Médecins Pathologistes Français (SMPF)

Mme Elisabeth RUSS - Présidente du Syndicat des Médecins Pathologistes Français

Institut d'histopathologie de Nantes (IHP)

Mr Jérôme CHETRITT – Directeur de l'institut d'histopathologie de Nantes

Club des Cadres d'Anatomie et Cytologie Pathologiques (CCAP)

Mme Françoise Odile CHABERT – Cadre supérieur de Santé

Microm Microtech France

Mme Arlette MARDUEL – Directrice scientifique et responsable assurance qualité

M. Daniel PIERRON Daniel – Président Directeur Général de Microm Microtech France

M. Guillaume PAGE – Chef de produits immunohistochimie et pré-analytique

M. Julien VIMON – Directeur régional des ventes

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| Présentation des intervenants | 3 |
| Sigles et abréviations | 12 |
| Liste des tableaux | 14 |
| Liste des figures | 17 |
| 1 CONTEXTE, OBJET ET MODALITÉS DE TRAITEMENT DE LA SAISINE | 18 |
| 1.1 Contexte de la demande | 18 |
| 1.2 Objet de la saisine | 18 |
| 1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation | 19 |
| 1.4 Champ d'expertise de l'étude | 19 |
| 1.5 Prévention des risques de conflits d'intérêts | 20 |
| 2 L'UTILISATION DU FORMALDÉHYDE DANS LE SECTEUR DE L'ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES HUMAINES | 21 |
| 2.1 Le cheminement d'un prélèvement | 21 |
| 2.1.1 La phase pré-analytique | 21 |
| 2.1.2 La phase analytique..... | 21 |
| 2.1.3 La phase post-analytique..... | 22 |
| 2.1.4 Principe de fixation | 23 |
| 2.1.5 Le formaldéhyde, fixateur de référence actuel | 23 |
| 2.1.6 Les limites de l'utilisation du formaldéhyde | 24 |
| 2.2 Les expositions au formaldéhyde | 24 |
| 2.2.1 La répartition des effectifs..... | 24 |
| 2.2.2 Les quantités utilisées | 25 |
| 2.2.3 Les postes les plus exposés..... | 25 |
| 2.2.3.1 La phase pré-analytique..... | 25 |
| 2.2.3.2 La phase analytique | 25 |
| 2.2.3.3 La phase post-analytique..... | 26 |
| 2.2.4 L'application de la méthode de comparaison des substituts | 26 |
| 3 PRÉSENTATION DE LA MÉTHODE DE COMPARAISON DE SUBSTITUTS | 27 |
| 3.1 Description générale de la méthode | 27 |
| 3.2 Présentation des 3 modules de l'étape séquentielle | 27 |
| 3.2.1 Le module « Capacités techniques » | 27 |
| 3.2.2 Le module « Réglementation »..... | 28 |
| 3.2.3 Le module « Danger » | 28 |
| 3.3 Présentation des 4 modules de l'étape simultanée | 28 |
| 3.3.1 Le module « Danger » | 28 |
| 3.3.2 Le module « Estimation des coûts de substitution » | 28 |
| 3.3.3 Le module « Conditions d'exposition » | 29 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.3.4 | Le module « Autres impacts » | 29 |
| 3.4 | Présentation finale des résultats | 29 |
| 4 | LA SUBSTITUTION DU FORMALDÉHYDE LORS DE LA PHASE PRÉ-ANALYTIQUE | 30 |
| 4.1 | L'identification des alternatives au formaldéhyde | 30 |
| 4.1.1 | L'identification des alternatives à travers l'examen de la littérature scientifique | 30 |
| 4.1.1.1 | La méthode d'identification des études bibliographiques | 30 |
| 4.1.1.2 | La description des études retenues | 30 |
| 4.1.1.3 | Les alternatives potentielles identifiées | 31 |
| 4.1.2 | L'identification des alternatives à travers l'audition de professionnels | 31 |
| 4.1.2.1 | Le transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante au laboratoire avant analyses | 31 |
| 4.1.2.2 | La technologie de mise sous vide couplée au froid (4°C) | 31 |
| 4.1.2.3 | La technologie de mise sous vide couplée avec l'utilisation de fixateur | 32 |
| 4.1.2.4 | Le flaconnage avec insertion automatique de fixateur | 32 |
| 4.1.2.5 | Le distributeur automatique de fixateur | 32 |
| 4.1.2.6 | Bilan des alternatives recensées <i>via</i> les auditions | 32 |
| 4.1.3 | Bilan des alternatives retenues pour l'application de la méthode | 33 |
| 4.2 | Les modules de la phase séquentielle | 33 |
| 4.2.1 | Le module « Capacités techniques » | 33 |
| 4.2.1.1 | Choix des critères du module « Capacités techniques » | 33 |
| 4.2.1.2 | Evaluation du formaldéhyde | 34 |
| 4.2.1.3 | Evaluation des alternatives | 34 |
| 4.2.1.4 | Conclusions du module « capacités techniques » | 35 |
| 4.2.2 | Le module « réglementation » | 35 |
| 4.2.2.1 | Identification des réglementations | 35 |
| 4.2.2.2 | Conclusions du module « Réglementation » | 35 |
| 4.2.3 | Le module danger « QCAT » | 36 |
| 4.2.3.1 | Evaluation du mélange à base de formaldéhyde | 36 |
| 4.2.3.2 | Evaluation des alternatives | 36 |
| 4.2.3.3 | Conclusions du module danger « QCAT » | 36 |
| 4.2.4 | Conclusions de la phase séquentielle | 37 |
| 4.3 | Les modules de la phase simultanée | 37 |
| 4.3.1 | Le module de danger « GreenScreen » | 37 |
| 4.3.1.1 | Evaluation du mélange à base de formaldéhyde | 37 |
| 4.3.1.2 | Evaluation des alternatives | 37 |
| 4.3.2 | Le module « Estimations des coûts de substitution » | 38 |
| 4.3.2.1 | Scénarios de substitution et données pour un établissement possédant un laboratoire <i>in situ</i> | 38 |
| 4.3.2.2 | Scénarios de substitution et données pour un établissement ne possédant pas un laboratoire <i>in situ</i> | 40 |
| 4.3.3 | Le module « Conditions d'exposition » | 44 |
| 4.3.3.1 | Evaluation du formaldéhyde | 44 |
| 4.3.3.2 | Evaluation des alternatives | 45 |
| 4.3.4 | Le module « Autres impacts » | 46 |
| 4.3.4.1 | La réévaluation du risque biologique | 46 |
| 4.3.4.1 | L'organisation des flux lors du transport des prélèvements | 46 |
| 4.3.4.2 | Le respect de la chaîne du froid lors du transport des prélèvements | 47 |
| 4.3.5 | Présentation des résultats et conclusions | 47 |
| 5 | LA SUBSTITUTION DU FORMALDÉHYDE LORS DE LA PHASE ANALYTIQUE | 49 |
| 5.1 | L'identification des alternatives pour les besoins de fixation | 49 |
| 5.1.1 | L'identification des alternatives au travers la littérature scientifique | 49 |
| 5.1.1.1 | La méthode d'identification des études bibliographiques | 49 |
| 5.1.1.2 | La description des études retenues | 49 |
| 5.1.1.3 | Les principaux résultats issus des études bibliographiques | 50 |
| 5.1.1.4 | La liste des alternatives identifiées | 50 |
| 5.1.2 | L'identification des alternatives à travers l'audition de professionnels | 52 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 5.1.2.1 | La mise sous vide couplée avec l'utilisation de fixateur | 52 |
| 5.1.2.2 | La congélation..... | 53 |
| 5.1.2.3 | Conclusions | 53 |
| 5.1.3 | Bilan des alternatives identifiées pour les besoins de fixation | 53 |
| 5.2 | Les modules de la phase séquentielle | 53 |
| 5.2.1 | Le module « Capacités techniques » | 53 |
| 5.2.1.1 | Choix des critères du module « Capacités techniques » | 53 |
| 5.2.1.2 | Evaluation du formaldéhyde..... | 54 |
| 5.2.1.3 | Evaluation des alternatives | 54 |
| 5.2.2 | Le module « réglementation » | 68 |
| 5.2.2.1 | Identification des réglementations..... | 68 |
| 5.2.2.2 | Conclusions du module « Réglementation »..... | 69 |
| 5.2.3 | Le module Danger « QCAT » | 69 |
| 5.2.3.1 | Présentations des principes de l'outil QCAT | 69 |
| 5.2.3.2 | Adaptation de l'outil QCAT par les experts de l'Anses | 70 |
| 5.2.3.3 | Attribution des niveaux de danger..... | 71 |
| 5.2.3.4 | Evaluation des solutions à base de formaldéhyde | 71 |
| 5.2.3.5 | Evaluation du mélange PAXgene®..... | 72 |
| 5.2.3.6 | Evaluation du mélange Excell Plus® | 75 |
| 5.2.3.7 | Evaluation du mélange FineFix® | 83 |
| 5.2.3.8 | Evaluation du mélange Green-Fix®..... | 89 |
| 5.2.3.9 | Evaluation du mélange RCL2®..... | 90 |
| 5.2.3.10 | Evaluation du mélange Hydrosafe®..... | 93 |
| 5.2.3.11 | Evaluation du mélange UMFIX ®..... | 94 |
| 5.2.3.12 | Evaluation de la technique de fixation HOPE®..... | 95 |
| 5.2.3.13 | Conclusions du module danger QCAT..... | 95 |
| 5.3 | Les modules de la phase simultanée | 95 |
| 5.3.1 | Le module danger « GreenScreen » | 95 |
| 5.3.1.1 | Présentation des principes de l'outil GreenScreen | 95 |
| 5.3.1.2 | Adaptation de l'outil GreenScreen par les experts de l'Anses..... | 97 |
| 5.3.1.3 | Evaluation des solutions à base de formaldéhyde | 99 |
| 5.3.1.4 | Evaluation du mélange Excell Plus® | 99 |
| 5.3.1.5 | Evaluation du mélange FineFix® | 109 |
| 5.3.1.6 | Evaluation du mélange RCL2®..... | 120 |
| 5.3.1.7 | Evaluation du mélange Hydrosafe®..... | 127 |
| 5.3.1.8 | Conclusions du module danger GreenScreen | 128 |
| 5.3.2 | Le module « Estimation des coûts de substitution » | 129 |
| 5.3.2.1 | Les hypothèses retenues pour comparer les alternatives | 129 |
| 5.3.2.2 | Les données collectées pour comparer les alternatives | 130 |
| 5.3.2.3 | L'attribution des classes finales du module..... | 131 |
| 5.3.3 | Le module « Conditions d'exposition » | 131 |
| 5.3.3.1 | Evaluation de la solution de formaldéhyde..... | 132 |
| 5.3.3.2 | Evaluation de l'Excell Plus®..... | 133 |
| 5.3.3.3 | Evaluation du FineFix®..... | 134 |
| 5.3.3.4 | Evaluation du RCL2® | 134 |
| 5.3.3.5 | Evaluation de l'Hydrosafe®..... | 135 |
| 5.3.3.6 | Bilan des évaluations des alternatives | 136 |
| 5.3.4 | Le module « Autres impacts » | 137 |
| 5.3.4.1 | Le développement d'un nouveau standard international..... | 137 |
| 5.3.4.1 | Le respect de la chaîne du froid au sein du laboratoire | 137 |
| 5.3.4.2 | L'organisation des flux au sein du laboratoire | 137 |
| 5.3.4.3 | La réévaluation du risque biologique | 137 |
| 5.3.4.4 | La disponibilité des alternatives | 137 |
| 5.3.5 | Présentation des résultats | 137 |
| 6 | CONCLUSIONS DU GROUPE DE TRAVAIL | 139 |
| 7 | RECOMMANDATIONS DU GROUPE DE TRAVAIL..... | 144 |
| 8 | BIBLIOGRAPHIE | 145 |

| | |
|---|------------|
| 8.1 Publications | 145 |
| 8.2 Législation et réglementation | 151 |
| 8.3 Bases de données..... | 152 |
| Annexe 1 : Lettre de saisine | 154 |
| Annexe 2 : Calcul du module « estimation des coûts » pour un établissement possédant un laboratoire in situ..... | 158 |
| Annexe 3 : Calcul du module « estimation des coûts » pour un établissement ne possédant pas un laboratoire in situ | 160 |
| Annexe 4 : Consultation publique..... | 162 |
| Annexe 5 : Suivi des actualisations du rapport | 163 |

Sigles et abréviations

ACP : Anatomie et cytologie pathologiques

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFSSET : Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

AP-HP : Assistance publique - Hôpitaux de Paris

ARN : Acide ribonucléique

BCF : Facteur de bioconcentration

CE₅₀ : Concentration efficace médiane

CES : Comité d'experts spécialisé

CIRC : Centre international de recherche sur le cancer

CL₅₀ : Concentration létale médiane

CLP : Classification, étiquetage et emballage (classification labelling and packaging)

CMR : Cancérogène, mutagène et toxique pour la reproduction

DGCCRF : Direction générale de la consommation, de la concurrence et de la répression des fraudes

DGPR : Direction générale de la prévention des risques

DGS : Direction Générale de la Santé

DGT : Direction générale du travail

DL₅₀ : Dose létale médiane

DSL : Liste intérieure des substances d'Environnement et Changement climatique (Domestic substances list)

ECHA : Agence européenne des substances chimiques (European Chemicals Agency)

EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments (European Food Safety Authority)

FDS : Fiche de données et de sécurité

GHS : Système général harmonisé (Globally harmonized system)

GT : Groupe de travail

HE : Hématoxyline-Eosine

HES : Hématoxyline-Eosine-Safran

HIS : Hybridation in situ

HSDB : Base de données des substances chimiques (Hazard Substances Data Bank)

IHC : Immunohistochimie

INRS : Institut National de Recherche et Sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles

Kow : Coefficient de partage n-octanol/eau

MAK : Concentration maximale au poste de travail (Maximale Arbeitsplatz-Konzentration)

NOAEL : Dose sans effet adverse observé (No observed adverse effect level)

NOEL : Dose sans effet observé (No observed effect level)

OEHHA : Le Bureau d'évaluation des risques pour la santé liés à l'environnement (the Office of Environmental Health Hazard Assessment)

Pe : Point éclair

PBT : Persistant, bioaccumulable et toxique

QCAT : Outil d'évaluation rapide des substances chimiques (Quick chemical assessment tool)

QSAR : Relations quantitatives structure-activité (Quantitative structure-activity relationship)

RCS : Registre du Commerce et des Sociétés

Teb : Température d'ébullition

UNEP-SIDS : Fiches d'informations du Programme des Nations-Unies pour l'environnement (Screening Information DataSet by United Nations Environment Programme)

US EPA : Agence américaine de protection de l'environnement (The United States Environmental Protection Agency)

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Assignment des classes du module « Capacités techniques » | 27 |
| Tableau 2 : Assignment des classes de danger selon l'outil QCAT | 28 |
| Tableau 3 : Assignment des classes de danger selon l'outil GreenScreen | 28 |
| Tableau 4 : Assignment des classes du module « Estimation des coûts de substitution » | 29 |
| Tableau 5 : Assignment des classes du module « Conditions d'exposition » | 29 |
| Tableau 6 : Alternatives potentielles identifiées dans la littérature scientifique | 31 |
| Tableau 7 : Alternatives potentielles identifiées à travers les auditions de professionnels..... | 33 |
| Tableau 8 : Alternatives potentielles identifiées dans la littérature scientifique | 33 |
| Tableau 9 : Comparaison des alternatives selon le module « Capacités techniques » | 35 |
| Tableau 10 : Evaluation du mélange à base de formaldéhyde selon l'outil QCAT | 36 |
| Tableau 11 : Comparaison des alternatives selon le module « danger » (outil QCAT) | 36 |
| Tableau 12 : Evaluation du mélange à base de formaldéhyde selon l'outil GreenScreen..... | 37 |
| Tableau 13 : comparaison des alternatives selon le module « danger » GreenScreen | 38 |
| Tableau 14 : Coût des scénarios de substitution pour un établissement possédant un laboratoire in situ | 40 |
| Tableau 15 : Comparaison des alternatives selon le module « Estimation des coûts de substitution » - Etablissements ayant un laboratoire <i>in situ</i> | 40 |
| Tableau 16 : Coût des scénarios de substitution pour un établissement ne possédant pas de laboratoire <i>in situ</i> | 43 |
| Tableau 17 : Comparaison des alternatives selon le module « Estimation des coûts de substitution » - Etablissements n'ayant pas de laboratoire <i>in situ</i> | 43 |
| Tableau 18 : Critères d'évaluation du module "Conditions d'exposition" | 44 |
| Tableau 19 : Définitions des classes du critère "Fréquence d'utilisation" | 44 |
| Tableau 20 : Définitions des classes du critère "Quantités utilisées"..... | 44 |
| Tableau 21 : Evaluation des "conditions d'exposition" pour le formaldéhyde | 45 |
| Tableau 22 : Comparaison des alternatives selon le module "Conditions d'exposition" | 45 |
| Tableau 23 : Comparaison des alternatives au formaldéhyde lors de la phase pré-analytique Etablissements ayant un laboratoire <i>in situ</i> | 47 |
| Tableau 24 : Comparaison des alternatives au formaldéhyde lors de la phase pré-analytique Etablissements n'ayant pas de laboratoire <i>in situ</i> | 47 |
| Tableau 25 : Identification des autres impacts liés à la substitution en bloc opératoire..... | 48 |
| Tableau 26 : Liste des fixateurs alternatifs identifiés dans la littérature scientifique..... | 50 |
| Tableau 27 : Légende des colonnes des tableaux 29 et 30 | 57 |
| Tableau 28 : Signification des sigles utilisés dans les tableaux 29 et 30..... | 57 |
| Tableau 29 : comparaison des capacités techniques des substituts identifiés dans la bibliographie ayant pu conduire à l'attribution d'une classe finale autre que « non classé » | 59 |
| Tableau 30 : comparaison des « capacités techniques » des substituts identifiés dans la bibliographie ayant conduit à l'attribution de la classe finale « non classé » | 61 |
| Tableau 31 : Bilan des capacités techniques des alternatives identifiées | 68 |
| Tableau 32 : Effets étudiés par l'outil QCAT | 69 |
| Tableau 33 : Evaluation des mélanges à base de formaldéhyde selon l'outil QCAT | 72 |

| | |
|---|-----|
| Tableau 34 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil QCAT pour le méthanol | 73 |
| Tableau 35 : Niveaux de danger attribués aux effets du méthanol selon l'outil QCAT | 74 |
| Tableau 36 : Evaluation du mélange PAXgene® selon l'outil QCAT | 75 |
| Tableau 37 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil QCAT pour le glyoxal | 76 |
| Tableau 38 : Niveaux de danger attribués aux effets du glyoxal selon l'outil QCAT | 77 |
| Tableau 39 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil QCAT pour l'éthylène glycol | 78 |
| Tableau 40 : Niveaux de danger attribués aux effets de l'éthylène glycol selon l'outil QCAT | 79 |
| Tableau 41 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil QCAT pour l'éthanol | 81 |
| Tableau 42 : Niveaux de danger attribués aux effets de l'éthanol selon l'outil QCAT | 83 |
| Tableau 43 : Evaluation des produits Excell Plus® selon l'outil QCAT | 83 |
| Tableau 44 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil QCAT pour l'alcool polyvinylique | 84 |
| Tableau 45 : Niveaux de danger attribués aux effets de l'alcool polyvinylique selon l'outil QCAT | 85 |
| Tableau 46 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil QCAT pour le propylène glycol | 86 |
| Tableau 47 : Niveaux de danger attribués aux effets du propylène glycol selon l'outil QCAT | 87 |
| Tableau 48 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil QCAT pour le sorbitol | 88 |
| Tableau 49 : Niveaux de danger attribués aux effets du sorbitol selon l'outil QCAT | 89 |
| Tableau 50 : Evaluation des produits FineFix® selon l'outil QCAT | 89 |
| Tableau 51 : Evaluation du produit Green-Fix® selon l'outil QCAT | 90 |
| Tableau 52 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil QCAT pour l'acide acétique | 91 |
| Tableau 53 : Niveaux de danger attribués aux effets de l'acide acétique selon l'outil QCAT | 92 |
| Tableau 54 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil QCAT pour le tréhalose | 92 |
| Tableau 55 : Niveaux de danger attribués aux effets du tréhalose selon l'outil QCAT | 93 |
| Tableau 56 : Evaluation du produit RCL2® selon l'outil QCAT | 93 |
| Tableau 57 : Evaluation du produit Hydrosafe® selon l'outil QCAT | 94 |
| Tableau 58 : Evaluation du produit UMFIX selon l'outil QCAT | 94 |
| Tableau 59 : Evaluation des mélanges selon l'outil QCAT | 95 |
| Tableau 60 : Effets étudiés par l'outil GreenScreen | 96 |
| Tableau 61 : Attribution des niveaux de danger à partir des données identifiées dans des listes B . | 98 |
| Tableau 62 : Evaluation du formaldéhyde selon l'outil GreenScreen | 99 |
| Tableau 63 : Comparaison entre les niveaux de danger attribués aux effets du glyoxal selon les outils QCAT et GreenScreen | 99 |
| Tableau 64 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil GreenScreen pour le glyoxal | 101 |
| Tableau 65 : Niveaux de danger attribués aux effets du glyoxal selon l'outil GreenScreen | 103 |
| Tableau 66 : Comparaison entre les niveaux de danger attribués aux effets de l'éthylène glycol selon les outils QCAT et GreenScreen | 103 |

| | |
|--|-----|
| Tableau 67 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil GreenScreen pour l'éthylène glycol | 104 |
| Tableau 68 : Niveaux de danger attribués aux effets de l'éthylène glycol selon l'outil GreenScreen | 105 |
| Tableau 69 : Comparaison entre les niveaux de danger attribués aux effets de l'éthanol selon les outils QCAT et GreenScreen..... | 106 |
| Tableau 70 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil GreenScreen pour l'éthanol | 107 |
| Tableau 71 : Niveaux de danger attribués aux effets de l'éthanol selon l'outil GreenScreen | 109 |
| Tableau 72 : Evaluation des produits Excell Plus® selon l'outil QCAT | 109 |
| Tableau 73 : Comparaison entre les niveaux de danger attribués aux effets de l'alcool polyvinylique selon les outils QCAT et GreenScreen | 110 |
| Tableau 74 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil GreenScreen pour l'alcool polyvinylique | 111 |
| Tableau 75 : Niveaux de danger attribués aux effets de l'alcool polyvinylique selon l'outil GreenScreen | 113 |
| Tableau 76 : Comparaison entre les niveaux de danger attribués aux effets du propylène glycol selon les outils QCAT et GreenScreen..... | 113 |
| Tableau 77 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil GreenScreen pour le propylène glycol..... | 114 |
| Tableau 78 : Niveaux de danger attribués aux effets du propylène glycol selon l'outil GreenScreen | 116 |
| Tableau 79 : Comparaison entre les niveaux de danger attribués aux effets du sorbitol selon les outils QCAT et GreenScreen..... | 116 |
| Tableau 80 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil GreenScreen pour le sorbitol | 118 |
| Tableau 81 : Niveaux de danger attribués aux effets du sorbitol selon l'outil GreenScreen | 120 |
| Tableau 82 : Evaluation des produits FineFix® selon l'outil GreenScreen | 120 |
| Tableau 83 : Comparaison entre les niveaux de danger attribués aux effets de l'acide acétique selon les outils QCAT et GreenScreen..... | 121 |
| Tableau 84 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil GreenScreen pour l'acide acétique | 122 |
| Tableau 85 : Niveaux de danger attribués aux effets de l'acide acétique selon l'outil GreenScreen | 124 |
| Tableau 86 : Comparaison entre les niveaux de danger attribués aux effets du tréhalose selon les outils QCAT et GreenScreen | 124 |
| Tableau 87 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil GreenScreen pour le tréhalose | 125 |
| Tableau 88 : Niveaux de danger attribués aux effets du tréhalose selon l'outil GreenScreen..... | 127 |
| Tableau 89 : Evaluation du produit RCL2® selon l'outil QCAT | 127 |
| Tableau 90 : Evaluation du produit Hydrosafe® selon l'outil QCAT..... | 128 |
| Tableau 91 : Evaluation des mélanges selon l'outil GreenScreen..... | 128 |
| Tableau 92 : Comparaisons des prix des différents fixateurs | 131 |
| Tableau 93 : Comparaison des alternatives selon le module « Estimation des coûts de substitution » | 131 |
| Tableau 94 : Critères d'évaluation du module « Conditions d'exposition »..... | 131 |

| | |
|--|-----|
| Tableau 95 : Définitions des classes du critère "Fréquence d'utilisation" | 132 |
| Tableau 96 : Définitions des classes du critère "Quantités utilisées" | 132 |
| Tableau 97 : Evaluation des "conditions d'exposition" pour le formaldéhyde | 133 |
| Tableau 98 : Evaluation des "conditions d'exposition" pour l'Excell Plus® | 133 |
| Tableau 99 : Evaluation des "conditions d'exposition" pour le FineFix® | 134 |
| Tableau 100 : Evaluation des "conditions d'exposition" pour le RCL2® | 135 |
| Tableau 101 : Evaluation des "conditions d'exposition" pour le l'Hydrosafe® | 135 |
| Tableau 102 : Comparaison des alternatives selon le module "Conditions d'exposition" | 136 |
| Tableau 103 : Comparaison des alternatives au formaldéhyde | 138 |
| Tableau 104 : Identification des autres impacts liés à la substitution | 138 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Technique de fixation HOPE® | 55 |
|--|----|

1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine

1.1 Contexte de la demande

Le formaldéhyde a été classé en 2004 par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) dans le groupe 1 des cancérrogènes avérés pour l'espèce humaine et cette classification a été confirmée en octobre 2009 sur la base de l'induction de tumeurs du nasopharynx et des leucémies. En France, l'arrêté du 13 Juillet 2006 a ajouté « les travaux exposant au formaldéhyde » à la liste des substances, mélanges et procédés cancérrogènes au sens de l'article R. 4412-60 du code du travail.

Au niveau européen, une évolution du classement de cancérrogène de catégorie 2 à cancérrogène de catégorie 1B a été adoptée par le règlement (UE) n° 605/2014 de la Commission du 5 juin 2014 modifiant aux fins de son adaptation au progrès technique le règlement CLP.

En France, sur les lieux de travail, la recherche de substitution des agents cancérrogènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction (CMR) de catégorie 1A ou 1B est une obligation qui s'impose à l'employeur. Elle est énoncée dans les principes généraux de prévention à l'article L. 4121-2 du code du travail et est renforcée à l'article R. 4412-66. Ainsi, l'employeur doit pouvoir justifier des démarches fructueuses ou infructueuses qu'il a entreprises en vue de la substitution de tous les agents ou procédés CMR de catégories 1A et 1B inventoriés sur le lieu de travail. Le résultat de ces investigations doit, notamment, figurer dans le document unique d'évaluation des risques. Seul un argumentaire technique fondé est recevable pour justifier de la non-substitution d'un agent ou procédé CMR de catégorie 1A ou 1B par un agent ou un procédé non ou moins dangereux.

Lorsque l'application du principe de substitution s'avère impossible, l'employeur doit mettre en œuvre tous les moyens permettant de réduire l'exposition en utilisant des mesures de prévention et de protection adaptées (système clos, autres moyens de protection collective, puis moyens de protection individuelle mais également formation et information du personnel, surveillance médicale).

1.2 Objet de la saisine

Compte-tenu de ces nouvelles informations sur les propriétés dangereuses du formaldéhyde et la priorité à la substitution en matière de gestion des risques professionnels, l'Anses a été saisie, en date du 09 octobre 2014 (reçu par courrier le 22 janvier 2015), de manière conjointe par la direction générale du travail (DGT), la direction générale de la santé (DGS), la direction générale de la consommation, de la concurrence et de la répression des fraudes (DGCCRF) et la direction générale de la prévention des risques (DGPR), pour une « Demande d'avis relatif à l'utilisation de substituts au formaldéhyde dans différents secteurs d'activité ».

Il est demandé à l'Anses d'éclairer les pouvoirs publics :

- sur l'intérêt du formaldéhyde par rapport aux autres substituts pour le **diagnostic en matière d'anatomie et cytologie pathologiques** dans les situations de routine et dans des situations particulières pour lesquelles le formaldéhyde reste indispensable et qu'il conviendra de préciser ;
- sur l'intérêt du formaldéhyde par rapport aux autres substituts pour les actes de **thanatopraxie**, avec un état des lieux sur les travaux en cours au niveau européen dans le cadre du règlement biocide en matière d'évaluation de la substance active formaldéhyde (TP 2, 3, 20 et 22). Par ailleurs, les directions souhaiteraient disposer, dans le cadre des travaux menés sur les substituts au formaldéhyde en anatomie et en cytologie pathologiques, d'une analyse sur les possibilités d'utilisation de ces substituts dans certains types de produits biocides, et notamment en TP 22, et sur les conséquences éventuelles en termes de toxicité et d'écotoxicité ;
- sur l'intérêt du formaldéhyde par rapport aux autres substituts pour l'utilisation en **alimentation animale** en tant qu'auxiliaire technologique pour la protection contre la dégradation ruminale,

en tant qu'additif conservateur, en tant qu'additif d'ensilage et en tant qu'additif visant à limiter ou à réduire la charge microbienne des organismes pathogènes présents dans les aliments des animaux ;

- sur l'intérêt du formaldéhyde par rapport aux autres substituts pour l'utilisation en **alimentation humaine** en tant qu'auxiliaire technologique pour d'une part la fabrication de certains alginates et d'autre part l'utilisation comme bactériostatique dans la filière du secteur du sucre ;

Si des substituts au formaldéhyde peuvent être utilisés, les directions souhaitent que soit étudiée leur toxicité pour les professionnels et la population générale.

1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'Anses a mis en place le groupe de travail (GT) « Formaldéhyde et substituts » le 14 septembre 2015.

L'Anses a confié au GT « Formaldéhyde et substituts », rattaché au comité d'experts spécialisé (CES) « Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de référence » l'instruction de cette saisine.

Les travaux relatifs à la substitution du formaldéhyde en anatomie et cytologie pathologiques humaines, objet du présent rapport, ont été suivis et présentés tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques au CES « Caractérisation des dangers des substances » les 8 décembre 2016 et 11 mai 2017 puis au CES « Valeurs sanitaires de référence » le 21 juin 2018 et le 18 octobre 2018.

Ces travaux sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires.

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

Ces travaux ont été validés pour mise en consultation publique par le CES « Valeurs sanitaires de référence » le 18 octobre 2018.

Le rapport d'expertise collective a fait l'objet d'une consultation publique du 11/03/2019 au 11/05/2019. Les personnes ou organismes ayant contribué à la consultation publique sont listés en annexe 4. Les commentaires reçus ont été examinés et discutés par le GT « formaldéhyde et substituts » puis le CES VSR qui a adopté cette version finalisée le 17/10/2019.

1.4 Champ d'expertise de l'étude

Les utilisations du formaldéhyde dans les 4 secteurs d'activité précédemment décrits s'inscrivent dans un contexte où deux réglementations s'opposent. En effet, il existe d'une part un référentiel international ou une autorisation de mise sur le marché qui a été délivrée par les autorités européennes ou françaises légitimant ces usages du formaldéhyde et d'autre part, il y a les obligations du code du travail qui, suite à la classification du formaldéhyde, indiquent que la première des actions à mener est la substitution.

Les ministères de tutelles demandent à l'Anses de justifier l'intérêt du formaldéhyde par rapport aux autres substituts dans ces secteurs d'activités. Les experts de l'Anses estiment que la question posée revient à justifier l'utilisation d'un cancérigène de catégorie 1B par rapport à des substituts potentiellement moins dangereux. Les experts préfèrent se poser la question dans le sens inverse en identifiant des substituts moins dangereux capables de substituer la substance cancérigène dans les 4 secteurs d'activités.

Les experts de l'Anses ont développé leur propre méthode de travail afin de pouvoir comparer et évaluer des substituts à une substance chimique dangereuse en s'appuyant sur une revue de la littérature. La description de cette méthode fait l'objet d'un rapport de l'Anses intitulé « Document méthodologique de comparaison des alternatives à une substance chimique » (Anses 2018).

La méthode est ici appliquée aux substituts identifiés dans le secteur de l'anatomie et cytologie pathologiques humaines.

Le présent rapport détaille la partie de la saisine 2014-SA-0236 relative à l'étude des alternatives potentielles au formaldéhyde dans le secteur de l'anatomie et cytologie pathologiques humaines.

1.5 Prévention des risques de conflits d'intérêts

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont rendues publiques *via* le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

2 L'utilisation du formaldéhyde dans le secteur de l'anatomie et cytologie pathologiques humaines

L'anatomie et cytologie pathologiques (ACP) a pour mission de :

1. poser le diagnostic de maladies ou d'y contribuer, par l'interprétation morphologique, macroscopique, microscopique ou moléculaire d'organes, de tissus ou de cellules analysés ;
2. fournir le cas échéant aux cliniciens des informations à valeur pronostique et/ou prédictive de la réponse thérapeutique. Ainsi, les laboratoires d'ACP jouent un rôle important dans le dépistage et le traitement des maladies : mis à part le diagnostic des maladies de type cancer du sang et de la moelle osseuse, l'ACP contribue à la gestion de la totalité des diagnostics des tumeurs bénignes et malignes (Afsset 2009, INRS 2014a).

2.1 Le cheminement d'un prélèvement

Les experts de l'Anses ont retenu 3 phases d'activité distinctes permettant de décrire les différentes étapes suivies par un échantillon, de son prélèvement jusqu'à son élimination : la phase pré-analytique, la phase analytique et la phase post-analytique.

En raison de la diversité des pratiques au sein des lieux de prélèvement et des laboratoires d'ACP et de l'évolution rapide des techniques d'analyses biologiques, l'inventaire proposé ci-après ne peut être exhaustif. Seules les tâches rencontrées le plus couramment en milieu professionnel sont décrites ci-dessous.

2.1.1 La phase pré-analytique

La phase pré-analytique correspond à la collecte des organes, tissus, cellules et/ou des fluides d'origine humaine.

Le prélèvement est réalisé principalement dans des blocs opératoires (hôpital ou clinique) ou lors de consultations médicales en cabinet libéral. Les échantillons tissulaires (pièces opératoires ou biopsies) ou cellulaires peuvent être fixés et conservés dans une solution de formaldéhyde, ou être transportés non fixés vers le laboratoire (spécimens « frais ») pour être analysés (Afsset 2009, CCAP 2016).

2.1.2 La phase analytique

La phase analytique consiste à préparer des échantillons en vue d'analyses de type tissulaire, cellulaire et moléculaire à des fins de diagnostics.

Cette phase se déroule dans les laboratoires d'anatomie cytologie pathologiques privés ou publics.

Le prélèvement suit le cheminement type suivant (Afsset 2009, INRS 2014a) :

- La réception : dans la salle dédiée de réception / tri des échantillons, les échantillons sont reçus sous emballage étanche. La prise en charge des échantillons varie selon leur caractère fixé ou frais ;
- L'étude macroscopique : description du prélèvement à l'œil nu (observation, mensuration, éventuellement pesée et photographie) et dissection. Cette étape est réalisée sur pièce fraîche ou fixée. Le pathologiste prélève ensuite des échantillons représentatifs de la lésion observée (tumeur...) (CCAP 2016). Si le prélèvement est déjà fixé, cette étape doit s'effectuer sur une table de macroscopie ;
- La fixation : des prélèvements destinés à l'étude microscopique sont disposés dans des cassettes avec post-fixation dans des solutions de formaldéhyde. Cette étape peut être automatisée en vase clos ;
- L'inclusion : après l'étude macroscopique et la fixation, des techniques sont mises en œuvre afin de permettre l'analyse microscopique du spécimen. L'observation des structures cellulaires nécessite la réalisation de coupes régulières très fines. Une telle coupe n'est

possible que sur un matériau rigide, c'est pourquoi les échantillons sont inclus dans un matériau qui, une fois solidifié, présente une faible élasticité. Dans la plupart des cas, il s'agit de paraffine. L'inclusion en paraffine peut être réalisée par automate en vase clos et comporte les étapes de déshydratation et de clarification rendues nécessaires par l'hydrophobie du milieu d'enrobage. Ces étapes sont réalisées dans un local dédié ;

- La coupe : les blocs obtenus sont ensuite débités au microtome en coupes de 3 à 10 µm, elles-mêmes déposées sur des lames de verre ;
- La coloration des lames : elle permet de mettre en évidence les structures cellulaires. Lors de cette opération, les échantillons sont « déparaffinés », réhydratés, immergés dans différents bains colorants, puis à nouveau déshydratés. Les colorations « de routine », qui peuvent être automatisées en vase clos, sont à différencier des colorations « spéciales ». Les premières révèlent les constituants cellulaires (noyaux et cytoplasmes) et tissulaires (fibres). Pour les colorations de routine, la coloration Hématoxyline-Eosine-Safran (HES) est la coloration standard utilisée en France alors que les autres pays utilisent la coloration Hématoxyline-Eosine (HE) (MM France 2016). Les colorations spéciales servent à mettre en évidence des composants particuliers au sein des cellules (mucus, collagène...) et des agents pathogènes (bactéries, champignons, parasites) ;
- L'immunomarquage : parfois réalisé en complément de la coloration, il consiste à rechercher et localiser des protéines indicatrices de certaines pathologies dans les tissus ou cellules prélevés. Cette technique met en jeu un anticorps spécifique de la protéine recherchée (antigène) ainsi qu'un système de révélation de la réaction anticorps-antigène permettant de localiser les antigènes par observation microscopique du prélèvement ;
- La microscopie : la lecture des lames consiste à effectuer une observation sous microscope. De nombreuses techniques peuvent alors être utilisées selon le diagnostic recherché comme l'immunohistochimie (IHC) par exemple qui est l'application de l'immunomarquage dans les cellules d'une coupe de tissu. Au stade de la microscopie, certaines macromolécules (acides nucléiques principalement) peuvent être extraites des coupes pour étude moléculaire ;
- L'hybridation *in situ* (HIS) : cette technique de biologie moléculaire permet de détecter et de localiser une séquence nucléotidique (ADN ou ARN). Elle repose sur la spécificité de l'appariement (hybridation) entre la séquence à détecter et celle d'une sonde marquée ;
- La conservation pendant l'examen : les pièces opératoires fixées mais non incluses dans leur totalité sont conservées dans des conteneurs étanches au sein d'une salle d'entreposage et/ou dans des armoires ventilées jusqu'à ce que le diagnostic soit rendu par le médecin. En effet, les pièces doivent être gardées au sein du laboratoire pour éventuellement être reprises. Les pièces sont généralement gardées 5 à 6 semaines en milieu hospitalier (CCAP 2016) ;
- Le tri des déchets en vue de leur destruction : l'élimination est l'ensemble des étapes de tri, conditionnement, collecte, transport, stockage dans un local d'entreposage intermédiaire ou centralisé. Les déchets issus de l'activité des laboratoires d'ACP peuvent présenter divers risques (infectieux, chimique et toxique). Afin d'éviter l'exposition professionnelle, l'ouverture des récipients dans le but de séparer les prélèvements des solutions de conservation est formellement à proscrire. Si exceptionnellement, une telle séparation doit être réalisée, celle-ci a lieu à un poste dédié ventilé au même niveau d'exigences que celles du poste de macroscopie.

2.1.3 La phase post-analytique

La phase post-analytique en laboratoire d'ACP correspond à : l'élimination des déchets et la conservation par archivage des échantillons présentant un intérêt médical majeur pour les patients et pour la recherche médicale.

- L'élimination et le traitement des déchets : l'élimination est l'ensemble des étapes de chargement/déchargement sur les lieux de production, de transport vers le lieu de traitement.

Le traitement est principalement l'incinération, mais aussi le prétraitement par désinfection (arrêtés du 07/09/1999 et arrêté du 24/11/2003). Une réglementation spécifique impose que tous les déchets anatomiques correspondant à des fragments humains non aisément identifiables par un non spécialiste, même ceux qui ne présentent pas de risque infectieux, soient éliminés comme des déchets d'activité de soins à risques infectieux (DASRI) (arrêté du 29 mai 2009 et arrêté du 24/11/2003). Les pièces anatomiques d'origine humaine suivent une filière d'élimination spécifique et doivent être entreposées dans des enceintes frigorifiques ou de congélation dédiées jusqu'à leur incinération dans un crématorium autorisé. Les déchets à risques chimiques et toxiques (DRCT) exempts de risques infectieux doivent être entreposés dans un local dont la conception et la ventilation doivent satisfaire aux mêmes exigences que celles du lieu de stockage des produits chimiques.

- La conservation par archivage des échantillons en laboratoire d'ACP a un intérêt médical majeur. Il permet le réexamen du diagnostic en cas de litige ainsi que le réexamen du matériel pour effectuer des investigations complémentaires à visée diagnostique, pronostique ou à caractère prédictif, pouvant être non disponibles au moment de l'examen initial, voire pour mener des travaux de recherche d'envergure internationale sur l'identification des nouveaux marqueurs spécifiques aux tumeurs par exemple.

2.1.4 Principe de fixation

Les échantillons doivent dans la grande majorité des cas être fixés avant de pouvoir être examinés au laboratoire.

La fixation est une étape cruciale dans la préparation des tissus pour leur analyse et stockage, elle permet de préserver l'architecture et la composition des cellules contenues dans les tissus dans un état aussi proche que possible de l'état vivant et de tolérer les étapes successives de la préparation à l'analyse. La fixation permet également de préserver les protéines, glucides (carbohydrates) et autres entités biologiquement actives dans leur relation spatiale au sein de la cellule pour leur étude (Fox *et al.* 1985).

Théoriquement, ce processus peut être séparé en 2 étapes successives : la première consiste en la pénétration du fixateur dans les tissus jusqu'à atteindre une concentration qui dépend de la nature et de la taille des pièces. La deuxième passe par une action physique ou chimique consistant à stabiliser les structures protéiques cellulaires.

Trois mécanismes de fixation sont possibles :

- Le piégeage de composés solubles dans des mailles de macromolécules réticulées ou pontées (crosslinking ou ponts méthylène). C'est le mode d'action des aldéhydes (formaldéhyde, glutaraldéhyde) et des agents oxydants (tétraoxyde d'osmium, permanganate de potassium) ;
- La dénaturation des protéines. C'est le mode d'action des alcools ;
- La formation de précipités insolubles. C'est notamment le mode d'action de certains fixateurs métalliques (comme le chlorure de mercure ou les picrates)

(Afsset 2009, Thavarajah *et al.* 2012)

2.1.5 Le formaldéhyde, fixateur de référence actuel

Le formaldéhyde possède un grand nombre de propriétés intéressantes pour fixer les échantillons. Le formaldéhyde est un puissant agent de couplage qui induit la formation de ponts intra ou intermoléculaires entre les protéines. La substance durcit les tissus sans les rétracter. La substance n'hydrolyse pas, non plus, les acides nucléiques (ADN, ARN) et fixe les lipides sans les solubiliser contrairement aux fixateurs alcooliques. C'est également un biocide puissant qui permet une décontamination tissulaire pendant la phase de fixation.

Auparavant, les laboratoires pouvaient utiliser divers fixateurs comme, par exemple, le liquide de Bouin ou l'Alcool Formolé Acétique (AFA). Seulement, ces fixateurs se sont révélés être incompatibles avec le développement des techniques d'IHC, d'HIS et les techniques de biologie moléculaire pour

lesquelles le formaldéhyde donne les meilleurs résultats. A titre d'exemple, le liquide de Bouin coupait les brins d'ADN contrairement au formaldéhyde.

Aujourd'hui globalement pour la profession, le formaldéhyde reste la substance qui donne les meilleurs résultats. En effet, c'est la substance qui convient non seulement pour la qualité de la morphologie mais aussi pour la qualité de coloration des lames avec l'Hématoxyline-Eosine-Safran (HES). La mise en œuvre de cette substance est compatible avec les techniques d'IHC puisqu'elle ne dénature pas les protéines, ainsi qu'avec les techniques de biologie moléculaire puisqu'elle conserve parfaitement les ADN et ARN. Le formaldéhyde reste la référence de la profession. Ainsi aujourd'hui les colorations, les protocoles d'IHC, les protocoles d'HIS et la biologie moléculaire ont été mis au point avec un usage du formaldéhyde, jusqu'aux automates qui ont été calibrés en fonction de la fixation à cette substance.

De plus, le formaldéhyde est la référence de la fixation pour les études internationales et permet la validation des marqueurs de facteurs prédictifs et pronostics par les techniques d'IHC et de biologie moléculaire. Les résultats produits par les laboratoires autant en IHC qu'en biologie moléculaire à destination des cliniciens, vont avoir des impacts importants sur les facteurs pronostiques et prédictifs et décisionnels dans le choix de la future thérapie (radiothérapie, chimiothérapie...) à mettre en œuvre. Aujourd'hui, de nombreux résultats des techniques d'anatomie pathologique sont l'objet d'échanges internationaux, ainsi utiliser le même fixateur est essentiel pour pouvoir comparer des éléments équivalents entre eux (CCAP 2016, MM France 2016).

2.1.6 Les limites de l'utilisation du formaldéhyde

Il convient toutefois de signaler que le formaldéhyde n'est pas un fixateur idéal permettant de satisfaire tous les besoins analytiques.

D'autres fixateurs ou mélanges fixateurs sont utilisés dans des applications particulières : le glutaraldéhyde et l'acide osmique pour la microscopie électronique, des fixateurs à base d'éthanol, de méthanol, d'alcool isopropylique pour la cytologie. Les techniques de biologie moléculaire sont au mieux réalisées à partir d'échantillons congelés mais peuvent être également pratiquées avec succès après fixation à base de fixateurs non aldéhydiques (Afsset 2009).

2.2 Les expositions au formaldéhyde

2.2.1 La répartition des effectifs

La spécialité d'anatomie et cytologie pathologiques en France se distingue de ses voisins européens par l'importance de son secteur libéral (Ministère du travail de l'emploi et de la santé et Direction générale de l'offre de soins 2012).

Les données du Conseil National des ordres des médecins (CNOM) comme celles issues du fichier¹ « Automatisation Des Listes » (ADELI) indiquent une répartition à part quasi-égale entre les secteurs hospitalier et libéral en France.

Le CNOM recense 1423 pathologistes en 2010, répartis ainsi : 51 % de pathologistes salariés exerçant en secteur hospitalier, 39 % de pathologistes libéraux et 10 % de pathologistes en exercice mixte. Cette répartition des effectifs entre le secteur libéral et le secteur hospitalier ne connaît pas de changement significatif depuis 2007. Par ailleurs, une part très marginale des pathologistes exerce en industrie (pharmaceutique, cosmétique) (Ministère du travail de l'emploi et de la santé et Direction générale de l'offre de soins 2012).

Des techniciens et aides de laboratoire sont également présents au côté des médecins dans les laboratoires d'anatomie et cytologie pathologiques humaines. Leur nombre n'a pu être déterminé.

¹ Système d'information national sur les professionnels relevant du code de la santé publique, du code de l'action sociale et des personnes autorisées à faire usage du titre de psychologue.

2.2.2 Les quantités utilisées

Un rapport fait état des résultats d'une enquête conduite auprès de 57 laboratoires d'Anatomie et de cytologie pathologiques (ACP) de l'AP-HP et hors AP-HP inscrits au « Club des cadres des services d'ACP » en février 2007. Les réponses obtenues sont exclusivement déclaratives, aucun audit sur site n'a été effectué. Parmi les 42 laboratoires ayant répondu, tous déclarent utiliser du formaldéhyde ou des préparations à base de formaldéhyde. La consommation moyenne mensuelle de formol à 4% est de 400 litres. Parmi les 42 laboratoires ayant répondu, 14 laboratoires (soit 33%) ont déclaré acheter uniquement du formaldéhyde à 37% ; 16 laboratoires (soit 38%) ont déclaré acheter uniquement du formaldéhyde à 4% et enfin 12 laboratoires (soit 29%) ont déclaré acheter du formaldéhyde à 37% et à 4% (AP-HP 2008).

Les résultats de cette enquête ont été remis à jour en mars 2016. Cette nouvelle enquête a été conduite sur les 79 sites des membres inscrits au « Club des cadres des services d'ACP ». Les résultats montrent que sur 52 répondants (soit 66%), tous déclarent utiliser du formaldéhyde. Sur les 52 répondants, 49 sites (soit 94%) utilisent du formaldéhyde à 4% et 3 sites (soit 6%) l'achètent encore à 37% pour réaliser eux-mêmes leurs dilutions à 4%. Ce premier résultat montre une évolution des pratiques de la profession au cours de la dernière décennie. En 2007, le formaldéhyde était acheté majoritairement à 37% et les opérations de dilution s'effectuaient dans les laboratoires à l'aide d'un diluteur. En 2016, seuls 3 sites achètent encore du formaldéhyde à 37% pour réaliser leurs dilutions (CCAP 2016).

2.2.3 Les postes les plus exposés

L'exposition au formaldéhyde dépend de l'organisation de chaque laboratoire d'ACP. Il est toutefois possible d'identifier les postes de travail à risque. Ces derniers sont listés ci-dessous.

2.2.3.1 La phase pré-analytique

Les blocs opératoires restent encore des lieux où les pièces anatomiques sont fixées au formaldéhyde à 4% avant d'être envoyées aux laboratoires pour analyses (CCAP 2016).

Lors des consultations médicales en cabinet libéral, le médecin (dermatologue, gynécologue...) peut effectuer un prélèvement, le fixer avant que le patient ne l'envoie par la poste au laboratoire d'analyses.

2.2.3.2 La phase analytique

Au cours de la phase analytique, plusieurs postes exposant au formaldéhyde ont été identifiés (Afsset 2009, INRS 2014a) :

- Le poste de dilution : la préparation du fixateur consiste dans la plupart des cas en une dilution dans l'eau ; certaines analyses nécessitent néanmoins la préparation de mélanges spécifiques. L'exposition au formaldéhyde peut être réduite à cette étape-là en achetant, soit directement une solution de formaldéhyde à 4% dite prête à l'emploi ou soit des récipients de fixation pré-remplis avec une solution de formaldéhyde à 4% (CCAP 2016);
- La salle de réception / tri des échantillons : un contact avec le formaldéhyde est possible si la pièce a été fixée sur le lieu de prélèvement. Cependant, l'exposition devrait y être mineure, sous réserve que les emballages soient parfaitement étanches et non souillés et qu'aucune manipulation des pièces ne soit réalisée par le personnel ;
- Le poste de reconditionnement du formaldéhyde (sous forme de solution diluée) : pour des pièces volumineuses, la quantité de formaldéhyde mise en œuvre peut s'élever à plusieurs litres. Dans ce cas, la pièce anatomique doit être de nouveau entaillée puis placée dans le formaldéhyde, afin de faciliter la pénétration du fixateur dans les tissus. Lors de cette opération, le personnel peut être exposé potentiellement à la substance par voie inhalée et cutanée ;
- La salle de macroscopie : la macroscopie implique une manipulation de la pièce anatomique et peut exposer le personnel aux vapeurs de formaldéhyde et à des projections de formol en solution. Ces salles sont en général équipées de tables de macroscopie à aspiration,

notamment frontale, et/ou placées sous sorbonnes. C'est également dans ces salles que sont éventuellement réalisées les dilutions des solutions de formaldéhyde ;

- La salle d'automates à inclusion : dans la plupart des laboratoires, les phases de déshydratation et d'inclusion sont automatisées. Ainsi, l'exposition au formaldéhyde peut se faire lors des premières étapes techniques avant inclusion (ouverture des automates, renouvellement des réactifs mais les automates modernes sont conçus pour limiter au maximum l'exposition à ce stade) et lors de l'entretien des automates ;
- Le stockage des pièces fixées : bien que les pièces fixées soient peu ou pas manipulées lors de cette phase, le risque d'exposition aux produits de fixation ne doit pas être négligé en cas de défaut d'étanchéité ou de souillure des récipients ;
- Le circuit d'acheminement des pièces : l'exposition devrait être mineure à condition que les emballages soient parfaitement étanches et non souillés et qu'aucune manipulation des pièces ne soit réalisée par le personnel ;
- Le local de stockage des produits : le stockage des solutions de formaldéhyde dépend de l'organisation des laboratoires d'ACP. Certains disposent d'une salle dédiée munie d'une ventilation permettant de réduire les expositions ;
- L'élimination du formaldéhyde usagé.

2.2.3.3 La phase post-analytique

La phase post-analytique correspond à l'élimination et au traitement des déchets ainsi qu'au stockage des pièces préalablement fixées au formaldéhyde. Aucune manipulation de cette substance n'a lieu à cette phase-ci.

2.2.4 L'application de la méthode de comparaison des substituts

Les experts de l'Anses ont décidé d'appliquer la méthode de comparaison des substituts sur les 2 phases dans lesquelles le formaldéhyde peut être utilisé, c'est-à-dire au cours de la phase pré-analytique et au cours de la phase analytique.

Sont concernés dans le cadre des travaux du GT, les techniques anatomo-pathologiques appliquées à des prélèvements de tissus effectués pendant la vie du malade. Ainsi, les experts de l'Anses ont décidé d'étudier la substitution du formaldéhyde dans les cas où la substance est directement utilisée pour fixer soit des pièces opératoires prélevées au bloc opératoire soit des biopsies prélevées au bloc opératoire ou en cabinet libéral.

Sont exclus les pièces opératoires donnant lieu à un examen extemporané (examen histologique ou cytologique faisant appel à des techniques particulières qui permettent de fournir un résultat en quelques minutes) ainsi que les prélèvements réalisés sur défunt dans le cadre d'une autopsie.

Sont exclus également des travaux du GT les prélèvements cytologiques (cellules isolées ou petits amas cellulaires). Ceux-ci sont obtenus soit par recueil des liquides spontanément émis (urine...), soit par raclage, brossage, écouvillonnage, aspiration de cellules desquamant spontanément (col utérin...), soit par ponction à l'aiguille d'un liquide (épanchement de séreuse ou articulaire, liquide céphalo-rachidien), soit par ponction d'un organe ou d'une tumeur (ganglion...) soit par apposition d'un tissu (pièce opératoire, biopsie) sur une lame. Ces modes de prélèvements ainsi que les techniques de fixation utilisées n'ont pas été étudiés dans le cadre de cette saisine (Collège Français des Pathologistes 2011).

Enfin, dans les évaluations des alternatives au travers des modules de la méthode de comparaison de substituts, les termes « pièces » ou « pièces anatomiques » sont employés pour englober les pièces opératoires et les biopsies.

3 Présentation de la méthode de comparaison de substituts

Les experts de l'Anses ont élaboré une méthode générale permettant de comparer/évaluer des substituts à une substance dangereuse. Les travaux ayant mené à la méthode de comparaison des alternatives ainsi que la méthode en elle-même sont détaillés dans le rapport de l'Anses intitulé « Document méthodologique de comparaison des alternatives à une substance chimique » (Anses 2018).

Dans cette méthode, le terme « substitut » est utilisé pour désigner une substance, un mélange ou un procédé à considérer en remplacement de la substance à substituer. Le terme « alternative » prend en considération deux volets, à la fois le substitut lui-même et les modifications à apporter au procédé de travail lors de la mise en œuvre.

3.1 Description générale de la méthode

La méthode de comparaison des substituts est une méthode « mixte » dans la mesure où elle se décompose en 2 grandes étapes : une première étape dite « séquentielle » et une seconde dite « simultanée » :

- La première étape séquentielle consiste à étudier les différentes alternatives au travers de 3 modules successifs contenant chacun des critères d'exclusion.
- La deuxième phase dite « simultanée » repose sur une démarche comparative. Les alternatives restantes sont étudiées en parallèle au travers de 4 modules. Cette deuxième étape permet de comparer les alternatives sélectionnées et de déterminer leurs capacités de substitution.

3.2 Présentation des 3 modules de l'étape séquentielle

Une identification, au préalable de l'application de la méthode, des alternatives potentielles à la substance à substituer est réalisée par une recherche dans la littérature scientifique et par une consultation des parties prenantes de la profession.

3.2.1 Le module « Capacités techniques »

L'objectif de ce module est d'attribuer à chacune des alternatives l'une des 5 classes décrites dans le tableau ci-dessous afin d'exclure celles qui n'assurent pas les fonctions essentielles et recherchées par l'utilisation de la substance à substituer.

Tableau 1 : Assignation des classes du module « Capacités techniques »

| | |
|------------|------------------------------------|
| Classe 1 | Capacités techniques insuffisantes |
| Classe 2 | Capacités techniques inférieures |
| Classe 3 | Capacités techniques équivalentes |
| Classe 4 | Capacités techniques supérieures |
| Non classé | Non classé par manque de données |

Les alternatives assignées « non classé » ou « classe 1 » ne sont pas étudiées dans la suite de la méthode

3.2.2 Le module « Réglementation »

L'objectif de ce module est d'identifier des substances interdites pour des raisons santé/environnement/sécurité par une réglementation sectorielle qui concerne le secteur d'activité dans lequel s'effectue la recherche de substituts. Ainsi, un substitut interdit dans la réglementation sera exclu de la méthode.

3.2.3 Le module « Danger »

L'objectif de ce module consiste à étudier les substituts par l'outil QCAT et à leur attribuer l'une des 4 classes de danger décrites dans le tableau ci-dessous :

Tableau 2 : Assignation des classes de danger selon l'outil QCAT

| | |
|----------------------------------|---|
| Classe de danger F | Substance chimique extrêmement dangereuse |
| Classe de danger F _{DG} | Substance chimique extrêmement dangereuse par manque de données |
| Classe de danger C | Substance chimique très dangereuse |
| Classe de danger C _{DG} | Substance chimique très dangereuse par manque de données |
| Classe de danger B | Substance chimique dangereuse |
| Classe de danger B _{DG} | Substance chimique dangereuse par manque de données |
| Classe de danger A | Substance chimique peu dangereuse |

Les alternatives assignées classe F ne sont pas étudiées dans la suite de la méthode.

3.3 Présentation des 4 modules de l'étape simultanée

L'ensemble des alternatives non exclues à ce stade de la méthode sont ensuite toutes étudiées au travers de 4 modules.

3.3.1 Le module « Danger »

L'objectif de ce module consiste à étudier les substituts par l'outil GreenScreen et à leur attribuer l'une des 5 classes de danger décrites dans le tableau ci-dessous :

Tableau 3 : Assignation des classes de danger selon l'outil GreenScreen

| | |
|----------------------------------|--|
| Classe de danger 1 | Substance chimique extrêmement dangereuse |
| Classe de danger 2 | Substance chimique très dangereuse |
| Classe de danger 2 _{DG} | Substance chimique très dangereuse par manque de données |
| Classe de danger 3 | Substance chimique dangereuse |
| Classe de danger 3 _{DG} | Substance chimique dangereuse par manque de données |
| Classe de danger 4 | Substance chimique peu dangereuse |
| Non classé | Non classé par manque de données |

3.3.2 Le module « Estimation des coûts de substitution »

Le module porte sur les coûts de substitution et évalue l'importance des ressources économiques sollicitées.

L'objectif de ce module est d'attribuer à chacune des alternatives l'une des 5 classes décrites dans le tableau ci-dessous :

Tableau 4 : Assignment des classes du module « Estimation des coûts de substitution »

| | |
|------------|-----------------------------------|
| Classe 1 | Coûts relatifs les plus élevés |
| Classe 2 | Coûts relatifs moyennement élevés |
| Classe 3 | Coûts relatifs faiblement élevés |
| Classe 4 | Coûts relatifs les moins élevés |
| Non classé | Non classé par manque de données |

3.3.3 Le module « Conditions d'exposition »

L'objectif de ce module consiste à déterminer les conditions d'exposition aux substituts et d'attribuer à chacune des alternatives l'une des 5 classes décrites dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5 : Assignment des classes du module « Conditions d'exposition »

| | |
|------------|---|
| Classe 1 | Conditions d'exposition fortes |
| Classe 2 | Conditions d'exposition moyennes |
| Classe 3 | Conditions d'exposition faibles |
| Classe 4 | Conditions d'exposition estimées négligeables |
| Non classé | Non classé par manque de données |

3.3.4 Le module « Autres impacts »

Ce module permet d'apporter des éléments d'informations supplémentaires pour pouvoir comparer les alternatives entre elles.

Ce module ne sera pas renseigné de manière systématique mais les experts souhaitent pouvoir l'utiliser le cas échéant pour prendre en compte d'autres types d'informations dont ils auraient connaissance.

L'objectif de ce module est d'identifier d'autres impacts relatifs à la substitution et de les illustrer dans la mesure du possible par des exemples concrets à partir de pratiques professionnelles.

3.4 Présentation finale des résultats

Les résultats et conclusions apportées seront présentés sous la forme de deux tableaux finaux présentant les différentes alternatives avec leurs avantages et leurs inconvénients de manière à permettre aux décideurs de retenir la meilleure option, en toute connaissance de cause, au regard des critères qu'ils jugeront comme prioritaires et acceptables.

4 La substitution du formaldéhyde lors de la phase pré-analytique

4.1 L'identification des alternatives au formaldéhyde

Une identification des alternatives potentielles à la substance à substituer a été réalisée par une recherche dans la littérature scientifique et par une consultation de parties prenantes de la profession.

4.1.1 L'identification des alternatives à travers l'examen de la littérature scientifique

4.1.1.1 La méthode d'identification des études bibliographiques

Les bases de données PubMed et Scopus ont été utilisées afin de déterminer les articles pertinents concernant la substitution du formaldéhyde utilisé dans les blocs opératoires (hospitaliers ou cliniques) et dans les cabinets lors des consultations médicales.

La stratégie de recherche a porté spécifiquement sur les lieux de prélèvements des pièces anatomiques en intégrant les mots clés relatifs à la substitution du formaldéhyde.

Au final, 4 publications ont été jugées pertinentes après lecture des titres et résumés.

La substance a été recherchée par son numéro CAS (50-00-0) ainsi que par les termes suivants : *Formaldehyde* et ses synonymes *Formalin* et *Formol*. Les autres termes recherchés sont : *Operating Room*, *Operating Theatre*, *Office Visits*, *Physicians' Offices*, *Physician's Office*, *Surgical Theatre*, *Substitute* et *Alternative*.

La recherche bibliographique a été effectuée jusqu'à décembre 2016.

4.1.1.2 La description des études retenues

Les 4 études retenues examinent le transport de pièces opératoires prélevées sur un patient dans un bloc opératoire jusqu'au laboratoire d'anatomie et cytologie pathologiques humaines. Aucune publication n'aborde le transport de prélèvements depuis un cabinet de consultations médicales en cabinet libéral jusqu'au laboratoire d'analyses.

Les 3 premières études retenues soulignent l'importance de la phase pré-analytique et la nécessité de standardiser les pratiques afin de pouvoir préserver la morphologie, les antigènes et les acides nucléiques des prélèvements avant leurs analyses. Les études soulignent que la fixation systématique au formaldéhyde des pièces dans les blocs pose un certain nombre de difficultés : la mauvaise préservation des ARN des pièces formolées et les expositions élevées pour le personnel et notamment pour les infirmières travaillant dans les blocs. Face à ces difficultés, la technologie de mise sous vide couplée au froid (4°C) est présentée comme une alternative à l'utilisation du formaldéhyde. Cette technologie consiste à placer le prélèvement dans un sac en plastique puis à le mettre sous vide et à le conserver à 4°C au réfrigérateur avant de le transférer au laboratoire d'analyses (Comanescu *et al.* 2012, Bussolati, Annaratone, et Maletta 2015, Bellisario *et al.* 2016). Deux publications évoquent également le transfert de la pièce opératoire « fraîche » directement du lieu du prélèvement au laboratoire d'analyses sans utiliser de fixateur (Comanescu *et al.* 2012, Bussolati, Annaratone, et Maletta 2015).

La dernière étude indique que le refroidissement à 4°C d'une pièce est connu pour retarder la dégradation des échantillons biologiques. Cette étude souligne que la technologie de mise sous vide suivie d'une conservation à 4°C est décrite comme une alternative au formaldéhyde mais elle s'interroge sur l'impact de la seule mise sous vide sur la préservation des tissus et son bénéfice par rapport à la simple conservation à 4°C (Kristensen *et al.* 2011).

4.1.1.3 Les alternatives potentielles identifiées

Le tableau ci-dessous récapitule les alternatives potentielles identifiées dans la littérature scientifique. A noter que les alternatives identifiées sont décrites uniquement dans le cas d'un prélèvement effectué en bloc opératoire.

Tableau 6 : Alternatives potentielles identifiées dans la littérature scientifique

| Alternatives potentielles identifiées | Lieu où l'alternative est utilisée | Références bibliographiques |
|--|------------------------------------|--|
| Le transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante au laboratoire avant analyses | Blocs opératoires | (Comanescu <i>et al.</i> 2012, Bussolati, Annaratone, et Maletta 2015, Kristensen <i>et al.</i> 2011) |
| La conservation de la pièce fraîche à 4°C | Blocs opératoires | (Kristensen <i>et al.</i> 2011) |
| La technologie de mise sous vide couplée au froid (4°C) | Blocs opératoires | (Comanescu <i>et al.</i> 2012, Bussolati, Annaratone, et Maletta 2015, Kristensen <i>et al.</i> 2011, Bellisario <i>et al.</i> 2016) |

4.1.2 **L'identification des alternatives à travers l'audition de professionnels**

(CCAP 2016, MM France 2016, SMPF et IHP 2015)

4 parties prenantes ont été auditionnées par l'Anses, à savoir le Syndicat des Médecins Pathologistes Français (SMPF), l'Institut d'histopathologie de Nantes (IHP), le club des Cadres d'Anatomie et Cytologie Pathologiques (CCAP) et la société Microm Microtech France (MM France).

Celles-ci ont communiqué à l'Agence des précisions techniques, des retours d'expériences sur certaines alternatives identifiées dans la littérature scientifique ainsi que d'autres procédés alternatifs permettant de réduire l'exposition au formaldéhyde.

Ainsi, le transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante au laboratoire avant analyses, la technologie de mise sous vide couplée ou non avec l'utilisation de fixateur, le flaconnage avec insertion automatique de fixateur et le distributeur automatique de fixateur ont été décrits et illustrés comme des techniques permettant de conserver les prélèvements tout en supprimant ou réduisant les expositions au formaldéhyde sur les lieux de prélèvements.

4.1.2.1 Le transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante au laboratoire avant analyses

Un retour d'expérience illustre cette pratique.

Ainsi en 2016, 80% des prélèvements (hors biopsies) arrivent frais au laboratoire d'ACP de l'Hôpital européen Georges-Pompidou (HEGP) (CCAP 2016).

4.1.2.2 La technologie de mise sous vide couplée au froid (4°C)

Cette technologie, disponible sur le marché, permet de mettre sous vide les prélèvements effectués au bloc opératoire sans utiliser de fixateurs chimiques. Ainsi, le prélèvement est directement déposé dans une poche étanche en polyamide et polyéthylène avant d'être mise sous vide et entreposée à 4°C au réfrigérateur. Le prélèvement peut être ensuite envoyé au laboratoire dans une glacière (CCAP 2016, MM France 2016).

Deux retours d'expériences illustrent cette technologie.

Une enquête déclarative conduite en mars 2016 auprès de 79 sites membres du « Club des cadres des services d'ACP » indique que, sur les 52 laboratoires ayant répondu, 5 laboratoires (soit 10%)

utilisent la technologie de mise sous vide pour conserver leurs prélèvements frais avant de les envoyer au laboratoire (CCAP 2016).

Le comité d'hygiène, de sécurité et des conditions de travail (CHSCT) de l'Hôpital Diaconesses-La Croix-St Simon a exigé l'abandon et la substitution du formaldéhyde lors de prélèvements anatomo-pathologiques. Cette étape, réalisée à l'hôpital, est désormais réalisée à l'aide de la technologie de mise sous vide. La fixation au formaldéhyde est réalisée par la suite, lors de la réception du prélèvement au centre de pathologie (SMPF et IHP 2015).

4.1.2.3 La technologie de mise sous vide couplée avec l'utilisation de fixateur

Cette technologie, disponible sur le marché, permet de mettre sous vide les prélèvements effectués au bloc opératoire tout en assurant un remplissage sécurisé de formaldéhyde du sachet contenant la pièce. Cette technologie peut calculer automatiquement le volume de formaldéhyde à ajouter en fonction du poids de la pièce. Le ratio préconisé est celui de 1 / 2 (poids prélèvement / poids de formaldéhyde) mais il peut être modifié (MM France 2016). Cette technologie permet de diminuer les volumes de formaldéhyde utilisés par rapport à une fixation traditionnelle.

En 2016, seule la technologie de mise sous vide couplée avec l'utilisation de formaldéhyde est disponible sur le marché français. Elle n'existe pas avec l'utilisation d'un autre fixateur chimique.

4.1.2.4 Le flaconnage avec insertion automatique de fixateur

Cette technologie, disponible sur le marché, permet de conserver les biopsies effectuées par les médecins au cours de consultations médicales. Il s'agit d'un flacon de 20mL contenant 10mL de formaldéhyde tamponné à 4% enfermé dans une capsule à vis. L'opérateur ouvre le flacon, dépose la biopsie, referme le couvercle et déclenche par pression sur le couvercle la libération de formaldéhyde (MM France 2016).

En 2016, cette technologie n'existe qu'avec le formaldéhyde sur le marché français.

4.1.2.5 Le distributeur automatique de fixateur

Cette technologie, disponible sur le marché, est un système permettant le remplissage en formaldéhyde de sachets spécifiques contenant le prélèvement. Ce système assure un transfert automatique et sécurisé du fixateur sans exposer l'opérateur à la substance (MM France 2016).

4.1.2.6 Bilan des alternatives recensées via les auditions

Le tableau ci-dessous recense les alternatives identifiées à travers les auditions des professionnels. A noter que les alternatives identifiées sont décrites uniquement dans le cas d'un prélèvement effectué à l'hôpital ou lors d'une consultation médicale en cabinet libéral.

Tableau 7 : Alternatives potentielles identifiées à travers les auditions de professionnels

| Alternatives potentielles identifiées | Lieu où l'alternative est utilisée | Sources |
|--|--|---|
| Le transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante au laboratoire avant analyses | Hôpital | (CCAP 2016) |
| La technologie de mise sous vide couplée au froid (4°C) | Hôpital | (CCAP 2016, MM France 2016, SMPF et IHP 2015) |
| La technologie de mise sous vide couplée avec l'utilisation de fixateur | Non renseigné | (MM France 2016) |
| Le flaconnage avec insertion automatique de fixateur | Consultations médicales en cabinet libéral | (MM France 2016) |
| Le distributeur automatique de fixateur | Non renseigné | (MM France 2016) |

4.1.3 Bilan des alternatives retenues pour l'application de la méthode

La technologie de mise sous vide couplée avec l'utilisation de fixateur, le flaconnage avec insertion automatique de fixateur et le distributeur automatique de fixateur utilisent toutes les 3 du formaldéhyde. Le GT a considéré qu'il s'agissait de procédés permettant de réduire les expositions au formaldéhyde sans toutefois s'y substituer. Par conséquent, ils ne seront pas étudiés dans la suite de la méthode.

Le tableau ci-dessous récapitule l'ensemble des alternatives retenues pour la suite des travaux ainsi que les sources ayant permis de les identifier.

Tableau 8 : Alternatives potentielles identifiées dans la littérature scientifique

| Alternatives potentielles identifiées | Bibliographie | Auditions |
|--|---------------|-----------|
| Le transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante au laboratoire avant analyses | X | X |
| La conservation de la pièce fraîche à 4°C | X | |
| La technologie de mise sous vide couplée au froid (4°C) | X | X |

4.2 Les modules de la phase séquentielle

4.2.1 Le module « Capacités techniques »

4.2.1.1 Choix des critères du module « Capacités techniques »

L'objectif de l'utilisation du fixateur à cette étape-ci est de maintenir l'intégrité des prélèvements et de les conserver sans modification quelle que soit leur taille, jusqu'à la réception en laboratoire pour réaliser la phase analytique.

Ainsi, les experts de l'Anses ont retenu pour le module « Capacités techniques » les 3 critères suivants : la préservation de la morphologie des tissus, des protéines et des acides nucléiques de la pièce jusqu'à son arrivée dans le laboratoire d'analyses.

4.2.1.2 Evaluation du formaldéhyde

Conformément à la méthode, il est attribué la classe finale de 3 au module « capacités techniques » pour le formaldéhyde afin de pouvoir comparer ses capacités techniques avec celles des alternatives.

4.2.1.3 Evaluation des alternatives

Le transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante au laboratoire avant analyses

La littérature scientifique retenue dans le cadre de cette étude décrit très brièvement les conditions dans lesquelles un prélèvement peut être transmis au laboratoire d'analyses sans utiliser de fixateur. Ce transfert direct est décrit dans les deux publications comme la situation idéale dans la mesure où le laboratoire d'analyses est très proche du bloc opératoire (Bussolati, Annaratone, et Maletta 2015, Comanescu *et al.* 2012).

Le temps d'ischémie, c'est dire le temps entre l'exérèse de la pièce et sa mise en contact avec le fixateur est cruciale car l'ischémie permet l'activation d'enzymes tissulaires, l'autolyse et la dégradation des protéines et des acides nucléiques. Pendant cet intervalle de temps, une dégradation substantielle de l'ARN peut se produire. Il est recommandé que **ce temps reste en dessous d'1 heure** pour permettre un traitement approprié des échantillons de cancer du sein et permettre une évaluation correcte des paramètres morphologiques et thérapeutiques (Bussolati, Annaratone, et Maletta 2015).

Ce temps d'une heure a été recommandé par la Société Américaine d'Oncologie Clinique (ASCO) et le Collège des pathologistes américains (CAP) (Hammond *et al.* 2010, Wolff *et al.* 2013).

Certains protocoles peuvent imposer au sein de leur structure un temps d'ischémie plus court. Par exemple, le temps d'ischémie a été fixé à 40 minutes à l'HEGP dans leurs modes opératoires. Les professionnels auditionnés indiquent qu'une pièce fraîche peut être conservée à température ambiante pendant 40 minutes (CCAP 2016).

Si le temps d'ischémie est bien respecté, alors les pathologistes peuvent ensuite réaliser l'ensemble des examens analytiques sur la pièce opératoire. De plus, les professionnels de l'HEGP ont indiqué à l'Anses que la pièce peut être congelée lors de son arrivée au laboratoire afin de permettre des analyses ultérieures en biologie moléculaire (CCAP 2016).

Contrairement à la fixation des tissus dans le formaldéhyde qui peut dégrader et fragmenter les ARN, le transfert de la pièce fraîche directement au laboratoire permet de mieux préserver cet acide nucléique. C'est la raison pour laquelle, le procédé de transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante avant analyses a été classé 4 « capacités techniques supérieures » lorsque la pièce est transférée au laboratoire et fixée en **moins d'une heure**.

La conservation de la pièce fraîche à 4°C

La littérature scientifique retenue dans le cadre de cette étude indique que la conservation d'une pièce fraîche à 4°C préserve davantage la morphologie des tissus, les protéines et les acides nucléiques qu'une conservation à température ambiante (Kristensen *et al.* 2011).

Le fait de placer la pièce opératoire dans une atmosphère froide (4°C) permet de doubler la durée de transport (AFAQAP 2015).

Contrairement à la fixation des tissus dans le formaldéhyde qui peut dégrader et fragmenter les ARN, la conservation de la pièce fraîche à 4°C permet de mieux préserver ces acides nucléiques. C'est la raison pour laquelle, la conservation de la pièce fraîche à 4°C a été classée 4 « capacités techniques supérieures » lorsque la pièce est transférée au laboratoire et fixée **en moins de 2 heures**.

La technologie de mise sous vide couplée au froid (4°C)

En éliminant l'air, la technologie de mise sous vide empêche la déshydratation des prélèvements et favorise leur refroidissement à 4°C. L'étude montre que le refroidissement à 4°C des tissus est plus rapide lorsqu'ils sont mis sous vide (Bussolati, Annaratone, et Maletta 2015).

La technologie de mise sous vide couplée au froid (4°C) conserve très bien les propriétés anatomiques et immunohistochimiques. Elle renforce à la fois la préservation de la structure et des composants tissulaires (protéines et acides nucléiques) (Bellisario *et al.* 2016, Comanescu *et al.* 2012).

La technologie de mise sous vide permet le maintien de l'intégrité du prélèvement **pendant 72 heures si celui-ci est stocké au froid à 4°C**. En effet, la mise sous vide n'affecte pas la morphologie des tissus et n'a pas d'impact, ni sur les techniques d'IHC, ni sur les techniques de biologie moléculaire. De plus, un prélèvement effectué le vendredi soir par exemple peut être stocké à 4°C sous vide pendant le week-end avant d'être fixé le lundi matin (CCAP 2016, MM France 2016).

Contrairement à la fixation des tissus dans le formaldéhyde qui peut dégrader et fragmenter les ARN, l'utilisation de la technologie de mise sous vide couplée au froid (4°C) permet de mieux préserver cet acide nucléique (Bellisario *et al.* 2016, Comanescu *et al.* 2012). C'est la raison pour laquelle, la technologie de mise sous vide couplée au froid à 4°C a été classé 4 « capacités techniques supérieures » lorsque la pièce est transférée au laboratoire et fixée **dans les 72 heures**.

Tableau 9 : Comparaison des alternatives selon le module « Capacités techniques »

| Alternatives potentielles | Critères du module « Capacités techniques » | | | Classe finale |
|--|---|----------------------------|------------------------------------|---------------|
| | Préservation de la morphologie des tissus | Préservation des protéines | Préservation des acides nucléiques | |
| Le transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante au laboratoire avant analyses | eq | eq | sup | Classe 4 |
| La conservation de la pièce fraîche à 4°C | eq | eq | sup | Classe 4 |
| La technologie de mise sous vide couplée au froid (4°C) | eq | eq | sup | Classe 4 |

Légende : eq : équivalent ; sup : supérieur

4.2.1.4 Conclusions du module « capacités techniques »

En conclusion, le transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante au laboratoire avant analyses, la conservation de la pièce fraîche à 4°C ainsi que la technologie de mise sous vide couplée au froid à 4°C peuvent être étudiées dans le module suivant.

4.2.2 Le module « réglementation »

4.2.2.1 Identification des réglementations

Aucune réglementation nationale ou internationale interdisant l'utilisation de ces alternatives pour cet usage n'a été trouvé.

4.2.2.2 Conclusions du module « Réglementation »

En conclusion, le transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante au laboratoire avant analyses, la conservation de la pièce fraîche à 4°C ainsi que la technologie de mise sous vide couplée au froid à 4°C peuvent être étudiées dans le module suivant.

4.2.3 Le module danger « QCAT »

4.2.3.1 Evaluation du mélange à base de formaldéhyde

Identification et catégorisation des dangers du formaldéhyde (n° CAS 50-00-0)

Selon le règlement CLP, le formaldéhyde est classé cancérogène de catégorie 1B. D'après l'outil QCAT, le niveau de danger attribué à l'effet cancérogénicité est fort « H ».

Ayant un niveau de danger « fort » en santé humaine, la classe de danger finale attribuée au formaldéhyde est la classe F (substance chimique extrêmement dangereuse) d'après l'outil QCAT.

Il n'a donc pas été nécessaire d'étudier les autres effets.

Assignment de la classe de danger finale du mélange à base de formaldéhyde

Comme le formaldéhyde est classé F (classe la plus pénalisante), les autres composés du mélange n'ont pas été évalués au travers de l'outil QCAT puisque le produit se voit attribuer la classe de la substance la plus pénalisante contenue dans le mélange, c'est-à-dire la classe F.

Tableau 10 : Evaluation du mélange à base de formaldéhyde selon l'outil QCAT

| Mélanges | Compositions | Classes de danger selon QCAT des composants | Classes de danger selon QCAT du mélange |
|--------------------------------|-----------------|---|---|
| Mélange à base de formaldéhyde | Formaldéhyde | F | F |
| | Autres composés | Non évalué | |

4.2.3.2 Evaluation des alternatives

L'outil QCAT ne peut être directement appliqué dans ce cas-ci puisque les trois alternatives proposées n'utilisent pas de fixateur chimique.

En conclusion, aucun danger n'ayant été identifié, les 3 alternatives se voient attribuer la classe finale de A.

Tableau 11 : Comparaison des alternatives selon le module « danger » (outil QCAT)

| Critères d'évaluation des dangers | Formaldéhyde | Alternatives | | |
|-----------------------------------|--------------|--|---|---|
| | | Le transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante au laboratoire avant analyses | La conservation de la pièce fraîche à 4°C | La technologie de mise sous vide couplée au froid à 4°C |
| Classes de dangers selon QCAT | Classe F | Classe A | Classe A | Classe A |

4.2.3.3 Conclusions du module danger « QCAT »

N'étant pas classées F, le transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante au laboratoire avant analyses, la conservation de la pièce fraîche à 4°C ainsi que la technologie de mise sous vide couplée au froid à 4°C peuvent être étudiées dans les modules de la phase simultanée.

4.2.4 Conclusions de la phase séquentielle

Le prélèvement de l'échantillon peut s'effectuer en bloc opératoire (hôpital ou clinique) ou lors d'une consultation médicale en cabinet libéral. Les 3 alternatives identifiées dans la phase séquentielle peuvent être proposées dans toutes les situations de la phase pré-analytique. Cependant, le temps d'ischémie est un facteur essentiel à prendre en compte puisque chaque alternative possède une contrainte temporelle au-delà de laquelle elle n'est plus viable. Ainsi le transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante au laboratoire avant analyses peut être possible si le temps d'ischémie reste inférieur à **1 heure**. Une conservation de la pièce fraîche à 4°C peut être également envisagée si le temps d'ischémie reste inférieur à **2 heures**. Enfin, une conservation par la technologie de mise sous vide couplée au froid à 4°C peut être envisagée si le temps d'ischémie reste inférieur à **72 heures**.

4.3 Les modules de la phase simultanée

Les experts de l'Anses ont souhaité appliquer les modules de la phase simultanée à chacune des alternatives identifiées.

4.3.1 Le module de danger « GreenScreen »

4.3.1.1 Evaluation du mélange à base de formaldéhyde

Identification et catégorisation des dangers du formaldéhyde (n° CAS 50-00-0)

Selon le règlement CLP, le formaldéhyde est classé cancérogène de catégorie 1B. D'après l'outil GreenScreen, le niveau de danger attribué à l'effet cancérogénicité est fort « H ».

Ayant un niveau de danger « fort » en santé humaine, la classe de danger finale attribuée au formaldéhyde est la classe 1 (substance chimique extrêmement dangereuse) d'après l'outil GreenScreen. Il n'a donc pas été nécessaire d'étudier les autres effets.

Assignation de la classe de danger finale des mélanges à base de formaldéhyde

Comme le formaldéhyde est classé 1 (classe la plus pénalisante), les autres composés du mélange n'ont pas été évalués au travers de l'outil GreenScreen puisque le produit se voit attribuer la classe de la substance la plus pénalisante contenue dans le mélange, c'est-à-dire la classe 1.

Tableau 12 : Evaluation du mélange à base de formaldéhyde selon l'outil GreenScreen

| Mélanges | Compositions | Classes de danger selon GreenScreen des composants | Classes de danger selon GreenScreen du mélange |
|--------------------------------|-----------------|--|--|
| Mélange à base de formaldéhyde | Formaldéhyde | 1 | 1 |
| | Autres composés | Non évalués | |

4.3.1.2 Evaluation des alternatives

L'outil GreenScreen ne peut être directement appliqué dans ce cas-ci puisque les trois alternatives proposées n'utilisent pas de fixateur chimique.

En conclusion, aucun danger n'ayant été identifié, les 3 alternatives se voient attribuer la classe finale de 4.

Tableau 13 : comparaison des alternatives selon le module « danger » GreenScreen

| Critères d'évaluation des dangers | Formaldéhyde | Alternatives | | |
|--------------------------------------|--------------|--|---|---|
| | | Le transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante au laboratoire avant analyses | La conservation de la pièce fraîche à 4°C | La technologie de mise sous vide couplée au froid à 4°C |
| Classes de dangers selon GreenScreen | Classe 1 | Classe 4 | Classe 4 | Classe 4 |

4.3.2 Le module « Estimations des coûts de substitution »

La nécessité du transport des pièces anatomiques, qui existe seulement dans le cas d'un établissement ne possédant pas un laboratoire d'analyses, a conduit à distinguer deux types de scénarios pour le calcul du coût des alternatives au formaldéhyde.

Le premier scénario concerne les établissements possédant un laboratoire *in situ*. Le second concerne les établissements ne possédant pas de laboratoire au sein de leur structure.

4.3.2.1 Scénarios de substitution et données pour un établissement possédant un laboratoire *in situ*

Dans cette catégorie, sont considérés les établissements possédant leur propre laboratoire d'analyses.

Il est considéré dans la suite un hôpital et un bloc ayant les mêmes caractéristiques en termes d'activité et celles-ci ont été fixées par le GT pour représenter une structure d'activité « typique ».

L'activité (en nombre de pièces et prélèvements effectués) d'une structure « typique » n'est pas connue et a en fait été déduite de la consommation en formaldéhyde (connue) et d'hypothèses sur la taille des flacons et la quantité de formaldéhyde utilisée par prélèvement.

Les prix et les coûts sont exprimés en € 2017. Le coût d'un scénario est estimé par sa Valeur Actuelle Nette, calculée en prenant un taux d'actualisation de 4%, avec distinction de coûts d'investissements initiaux et de coûts d'exploitation annuels constants (avant actualisation).

Pour les consommations énergétiques, le prix du kWh est supposé égal à 0,13€ et constant sur la période (simplification mais l'impact de toute variation réaliste serait négligeable). Les prix des consommables, des contrats de maintenance, etc... sont également supposés constants sur la période.

Les experts du GT ont, sur la base des informations trouvées dans la littérature et des auditions, sélectionné 3 scénarios de substitution au formaldéhyde :

- Le transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante au laboratoire avant analyses (dans un délai inférieur à 1h)
- Le transport de la pièce anatomique fraîche au laboratoire sans traitement mais avec stockage temporaire à 4°C (dans un délai inférieur à 2 heures).
- La technologie de mise sous vide couplée au froid à 4°C (dans un délai inférieur à 72h).

Les coûts du scénario de référence (pratique actuelle avec le formaldéhyde) ont été également calculés car les coûts des scénarios de substitution sont évalués en termes de différence avec le coût du scénario de référence.

Pour tous les scénarios, une durée de 7 ans (correspondant à la durée de vie attendue de la machine de mise sous vide) a été considérée, et l'achat de la technologie de mise sous vide est le seul investissement significatif dans l'ensemble des scénarios.

Données et hypothèses pour le scénario de référence (formaldéhyde)

Tous les coûts sont des coûts d'exploitation et les principales données et hypothèses les concernant sont les suivantes :

- Prix du formaldéhyde à 4% : 2€/L (MM France 2016)
- Volume des flacons : 10 mL (hypothèse)
- Quantité de formaldéhyde consommée : 10L par mois (AP-HP 2008)
- Le nombre de flacons est déduit des deux données précédentes
- Prix unitaire des consommables (flacons) : 1€ (AP-HP 2017)

Données et hypothèses pour le scénario du transfert de la pièce fraîche au laboratoire d'analyses avec ou sans conservation à 4°C

Les principales données et hypothèses sont les suivantes :

- Coût initial de la réorganisation du service pour permettre le transfert : 8 journées de travail de 8 heures d'un logisticien au coût de 100€/h (avec charges)
- Prix unitaire des consommables (flacons) : 1 € (AP-HP 2017)
- Le nombre et la contenance des flacons sont égaux au nombre et à la contenance des flacons utilisés dans le scénario de référence

Dans le cas du **scénario de conservation de la pièce fraîche à 4°C**, le coût d'acquisition d'un réfrigérateur (1000€) et sa consommation énergétique annuelle en coût d'exploitation (80 kWh/an²) sont rajoutés au scénario.

Données et hypothèses pour le scénario de la technologie de mise sous vide couplée au froid (4°C)

Les informations relatives aux coûts liés à la technologie de mise sous vide ont été transmises par le seul fournisseur identifié par l'Anses.

Les principales données et hypothèses sont les suivantes :

- Prix d'achat de la machine de mise sous vide 15 000 € (MM France 2016). Il s'agit plutôt d'un coût maximum ;
- Coût annuel de maintenance de la machine : 3 000 € (MM France 2016)
- Consommation énergétique annuelle de cette machine : 36 kWh (MM France 2016)
- Prix unitaire des consommables (sacs) : 2,5 € (MM France 2016)
- Le nombre et la contenance des sacs sont égaux au nombre et à la contenance des flacons utilisés dans le scénario de référence

Les experts de l'Anses considèrent qu'il n'y a pas de surcoût du temps personnel car ce dernier est jugé similaire au temps personnel pour la fixation au formaldéhyde.

Résultats et comparaison des scénarios pour un établissement possédant un laboratoire in situ

Le tableau ci-dessous résume les coûts de chacun des scénarios et présente les différences de chaque scénario de substitution avec le scénario de référence, en valeurs monétaires et en relatif (%). Les détails des calculs sont disponibles en annexe 2.

² Cas d'un réfrigérateur de classe A+++

Tableau 14 : Coût des scénarios de substitution pour un établissement possédant un laboratoire in situ

| | Coût total | Différence avec le scénario de référence (€) | Positionnement dans les quartiles (%) |
|--|------------|--|---------------------------------------|
| Scénario formaldéhyde | 63 670 € | | |
| Scénario "transfert direct pièce fraîche" (< 1h) | 68 575 € | 4 905 € | 4% |
| Scénario "pièce fraîche stockée à 4°C" (< 2h) | 69 599 € | 5 929 € | 5% |
| Scénario "pièce fraîche sous vide à 4°C" (< 72h) | 188 511 € | 124 841 € | 100% |

Conformément à la méthodologie mise au point (Anses 2018), les alternatives sont réparties en 4 classes en fonction de leurs quartiles dans la distribution des coûts de substitution.

Les coûts de substitution du transfert direct de la pièce fraîche au laboratoire d'analyses et de la conservation de la pièce fraîche à 4°C se situent entre 0% et 25% (premier quartile) du coût maximal observé et sont du même ordre de grandeur que le coût d'utilisation du formaldéhyde. La classe 4 « coût relatifs les moins élevés » leur est donc attribuée.

Le coût de substitution de la technologie de mise sous vide couplée au froid se situe entre 75% et 100% du coût maximal observé (dernier quartile). La classe 1 « coût relatifs les plus élevés » lui est attribuée.

Tableau 15 : Comparaison des alternatives selon le module « Estimation des coûts de substitution » - Etablissements ayant un laboratoire in situ

| | Formaldéhyde | Alternatives | | |
|--|--------------|--|---|---|
| | | Le transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante au laboratoire avant analyses | La conservation de la pièce fraîche à 4°C | La technologie de mise sous vide couplée au froid à 4°C |
| Classes finales « Estimation des coûts de substitution » | Classe 4 | Classe 4 | Classe 4 | Classe 1 |

4.3.2.2 Scénarios de substitution et données pour un établissement ne possédant pas un laboratoire in situ

Dans cette catégorie, sont considérés les établissements ne disposant pas de leur propre laboratoire d'analyses. Sont incluses également, les consultations médicales en cabinet libéral.

Pour illustrer les 3 scénarios, les experts ont considéré un établissement avec un bloc ayant les mêmes caractéristiques en termes d'activité et ces caractéristiques ont été fixées par le GT pour représenter une structure d'activité « typique ».

Afin de pouvoir décrire l'activité d'une structure « typique », les experts de l'Anses ont repris les mêmes hypothèses que celles utilisées pour un établissement possédant un laboratoire *in situ*. Cependant, dans ces scénarios, cette structure est supposée ne pas posséder de laboratoire et fait donc appel à un laboratoire d'analyses distant et à un transporteur d'échantillons biologiques.

L'activité (en nombre de pièces et prélèvements effectués) d'une structure « typique » n'est pas connue et a en fait été déduite de la consommation en formaldéhyde (connue) et d'hypothèses sur la taille des flacons et la quantité de formaldéhyde utilisée par prélèvement.

Les prix et les coûts sont exprimés en € 2017. Le coût d'un scénario est estimé par sa Valeur Actuelle Nette, calculée en prenant un taux d'actualisation de 4%, avec distinction de coûts d'investissements initiaux et de coûts d'exploitation annuels constants (avant actualisation).

Pour les consommations énergétiques, le prix du kWh est supposé égal à 0,13€ et constant sur la période (simplification mais l'impact de toute variation réaliste serait négligeable). Les prix des consommables, des contrats de maintenance, etc... sont également supposés constants sur la période.

Les experts du GT ont, sur la base des informations trouvées dans la littérature et des auditions, sélectionné les 3 mêmes scénarios de substitution au formaldéhyde que ceux sélectionnés pour les établissements possédant un laboratoire *in situ* :

- Le transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante au laboratoire avant analyses (dans un délai inférieur à 1h) ;
- Le transport de la pièce anatomique fraîche au laboratoire sans traitement mais avec stockage temporaire à 4°C (dans un délai inférieur à 2h) ;
- La technologie de mise sous vide couplée au froid à 4°C (dans un délai inférieur à 72h).

Les coûts du scénario de référence (pratique actuelle avec le formaldéhyde) ont été également calculés car les coûts des scénarios de substitution sont évalués en termes de différence avec le coût du scénario de référence.

Pour tous les scénarios, une durée de 7 ans (correspondant à la durée de vie attendue de la machine de mise sous vide) a été considérée, et l'achat de la technologie de mise sous vide est le seul investissement significatif dans l'ensemble des scénarios.

Données et hypothèses pour le scénario de référence (formaldéhyde)

Tous les coûts sont des coûts d'exploitation et les principales données et hypothèses les concernant sont les suivantes :

- Prix du formaldéhyde à 4% : 2€/L (MM France 2016)
- Volume des flaconnages : 10 mL (hypothèse)
- Quantité de formaldéhyde consommée : 10L par mois. En l'absence de données provenant des établissements ne possédant pas leur propre laboratoire d'analyses, le GT est reparti de l'hypothèse des 10l/mois provenant de la consommation moyenne de formaldéhyde dans un bloc opératoire en milieu hospitalier
- Le nombre de flacons est déduit des deux données précédentes
- Prix unitaire des consommables (flacons) : 1€ (AP-HP 2017)
- Transport vers le laboratoire par société spécialisée utilisant des contenants adaptés : 1 livraison par boîte de 2l par jour à environ 40 €HT/livraison (TSE 2017)

Données et hypothèses pour le scénario du transport de la pièce fraîche au laboratoire d'analyses avec ou sans conservation à 4°C préalable

Les principales données et hypothèses sont les suivantes :

- Prix unitaire des consommables (flacons) : 1 € (AP-HP 2017). Le nombre et la contenance des flacons sont égaux au nombre et à la contenance des flacons utilisés dans le scénario de référence
- Acquisition d'un réfrigérateur (1000€) et sa consommation énergétique annuelle en coût d'exploitation (80 kWh/an³) dans le cas de la conservation de la pièce fraîche à 4°C avant transport au laboratoire
- Transport vers le laboratoire extérieur par une société spécialisée utilisant des contenants adaptés : 2 livraisons par boîte de 2L par jour à environ 40 €HT/livraison (TSE 2017).

Données et hypothèses pour le scénario de la technologie de mise sous vide couplée au froid (4°C) puis transport vers le laboratoire

Les informations relatives aux coûts liés à la technologie de mise sous vide ont été transmises par le seul fournisseur identifié par l'Anses.

Les principales données et hypothèses sont les suivantes :

- Prix d'achat de la machine de mise sous vide 15 000 € (MM France 2016);
- Coût annuel de maintenance de la machine : 3 000 € (MM France 2016)
- Consommation énergétique annuelle de cette machine : 36 kWh (MM France 2016)
- Prix unitaire des consommables (sacs) : 2,5 € (MM France 2016)
- Le nombre et la contenance des sacs sont égaux au nombre et à la contenance des flacons utilisés dans le scénario de référence
- Transport vers le laboratoire par une société spécialisée utilisant des contenants adaptés : 1 livraison par boîte de 2L par jour à environ 40 €HT/livraison (TSE 2017).

Les experts de l'Anses considèrent qu'il n'y a pas de surcoût du temps personnel car ce dernier est jugé similaire au temps personnel pour la fixation au formaldéhyde.

Résultats et comparaison des scénarios pour un établissement ne possédant pas un laboratoire *in situ*

Le tableau ci-dessous résume les coûts de chacun des scénarios et présente les différences de chaque scénario de substitution avec le scénario de référence, en valeurs monétaires et en relatif (%). Les détails des calculs sont disponibles en annexe 3.

³ Cas d'un réfrigérateur de classe A+++

Tableau 16 : Coût des scénarios de substitution pour un établissement ne possédant pas de laboratoire *in situ*

| | Coût total | Différence avec le scénario de référence (€) | Positionnement dans les quartiles (%) |
|--|------------|--|---------------------------------------|
| Scénario formaldéhyde | 151 534 € | | |
| Scénario "transfert direct pièce fraîche" (< 1) | 238 150 € | 86 616 € | 69% |
| Scénario "pièce fraîche stockée à 4°C" (< 2h) | 239 174 € | 87 640 € | 70% |
| Scénario "pièce fraîche sous vide à 4°C" (< 72h) | 276 375 € | 124 841 € | 100% |

Conformément à la méthodologie mise au point (Anses 2018), les alternatives sont réparties en 4 classes en fonction de leurs quartiles dans la distribution des coûts de substitution.

Les coûts de substitution du transfert de la pièce à température ambiante ainsi que les coûts de transfert de la pièce fraîche à 4°C se situent entre 50% et 75% (troisième quartile) du coût maximal observé. La classe 2 « Coûts relatifs moyennement élevés » leur est donc attribuée.

Les coûts de substitution du transfert de la pièce fraîche à 4°C couplée avec la technologie de mise sous vide se situent entre 75% et 100% (dernier quartile) du coût maximal observé. La classe 1 « coût relatifs les plus élevés » leur est donc attribuée.

Tableau 17 : Comparaison des alternatives selon le module « Estimation des coûts de substitution » - Etablissements n'ayant pas de laboratoire *in situ*

| | Formaldéhyde | Alternatives | | |
|--|--------------|--|---|---|
| | | Le transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante au laboratoire avant analyses | La conservation de la pièce fraîche à 4°C | La technologie de mise sous vide couplée au froid à 4°C |
| Classes finales « Estimation des coûts de substitution » | Classe 4 | Classe 2 | Classe 2 | Classe 1 |

La température pendant le transport de la pièce n'a pas d'impact sur le coût final (TSE 2017).

Les scénarios du transfert de la pièce fraîche à température ambiante ou à 4°C ont été également testés avec 3 ou 4 livraisons par boîte de 2L par jour. Dans ces cas-là; les coûts de substitution se situeraient entre 75% et 100% (dernier quartile) du coût maximal observé. La classe 1 « coût relatifs les plus élevés » leur serait alors attribuée.

Comme mentionné plus haut, chacune des alternatives examinées présente des contraintes temporelles qui conditionnent leur faisabilité. De ce fait, pour les établissements ne possédant pas de laboratoire *in situ*, l'option d'une alternative ou l'autre dépendra de leur capacité à respecter ces contraintes.

De plus, bien que les établissements étudiés ici ne possèdent pas de laboratoire en leur sein, il ne peut être exclu, dans certains cas, que la distance de l'établissement au laboratoire soit suffisamment courte pour que l'établissement fasse le choix de ne pas faire appel à un transporteur pour y transférer ses échantillons biologiques (mais s'organise autrement et à moindre coût). Pour ces situations, les coûts présentés dans le tableau précédent sont probablement surestimés et susceptibles d'entraîner une classe finale inférieure.

4.3.3 Le module « Conditions d'exposition »

Les critères suivants définis dans la méthode à appliquer doivent être complétés pour chacune des alternatives.

Tableau 18 : Critères d'évaluation du module "Conditions d'exposition"

| Critères | | | | |
|---|---|--|---|---|
| Pression de vapeur | 0 – 5 Pa Très peu volatil | 5- 1000 Pa Modérément volatil | 1000-5000 Pa Volatil | > 5000 Pa Très volatil |
| Inflammabilité (Point éclair noté P_e et température d'ébullition notée T_{eb}) | $P_e > 60^\circ\text{C}$ Liquide et vapeurs non inflammables | $23^\circ\text{C} \leq P_e \leq 60^\circ\text{C}$ Liquide et vapeurs inflammables | $P_e < 23^\circ\text{C}$ $T_{eb} > 35^\circ\text{C}$ Liquide et vapeurs très inflammables | $P_e < 23^\circ\text{C}$ $T_{eb} \leq 35^\circ\text{C}$ Liquide et vapeurs extrêmement inflammables |
| Procédé | Clos | Clos mais ouvert régulièrement | Ouvert | Dispersif |
| Fréquence d'utilisation | Occasionnelle | Intermittente | Fréquente | Permanente |
| Quantité utilisée | Très faible | Faible | Intermédiaire | Elevée |

Conformément à la méthode, les critères « fréquences d'utilisation » et « quantités utilisées » sont d'abord à définir.

Plusieurs prélèvements peuvent être effectués au bloc opératoire pour analyses. Ainsi les experts ont retenu la classification suivante :

Tableau 19 : Définitions des classes du critère "Fréquence d'utilisation"

| Fréquence d'utilisation | Utilisation annuelle | Utilisation mensuelle | Utilisation hebdomadaire | Utilisation quotidienne |
|-------------------------|----------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------|
| | Occasionnelle | Intermittente | Fréquente | Permanente |

Tableau 20 : Définitions des classes du critère "Quantités utilisées"

| Quantités annuelles utilisées | Inférieur à 10L | Entre 10 et 100L | Entre 100 et 1000L | Supérieur à 1000L |
|-------------------------------|--------------------|------------------|----------------------|-------------------|
| | Très faible | Faible | Intermédiaire | Elevée |

4.3.3.1 Evaluation du formaldéhyde

Les critères définis dans la méthode sont complétés pour le formaldéhyde.

Lorsque les prélèvements sont fixés au bloc opératoire, la pièce anatomique est déposée dans un récipient dans lequel est versée une solution de formaldéhyde à 4%. Le procédé « clos mais ouvert une fois » a été retenu dans la mesure où le procédé est ouvert afin d'introduire le formaldéhyde dans le récipient. Ce dernier est ensuite fermé et ne sera rouvert qu'au laboratoire, lors de la phase analytique.

La fréquence d'utilisation « Permanente » a été retenue car les prélèvements destinés à être analysés au laboratoire sont quotidiens.

La quantité annuelle « Intermédiaire » a été retenue. En effet d'après l'enquête conduite sur l'utilisation du formaldéhyde aux blocs opératoires, la majorité des blocs utilisent entre 1 et 10 litres de formaldéhyde par mois (AP-HP 2008).

Tableau 21 : Evaluation des "conditions d'exposition" pour le formaldéhyde

| | |
|---|---|
| Critères d'évaluation des « conditions d'exposition » | Formaldéhyde |
| Pression de vapeur (Pa) | 440 000 Très volatil |
| Inflammabilité (°C) | Pe = 83°C Liquide et vapeurs non inflammables |
| Procédé utilisé | Clos mais ouvert une fois |
| Fréquence d'utilisation | Permanente |
| Quantité utilisée | Intermédiaire |
| Classes des « conditions d'exposition » | Classe 2 |

Au regard des grandes quantités de formaldéhyde utilisées dans les blocs opératoires de façon quotidienne et du procédé utilisé « clos mais ouvert une seule fois », les experts ont attribué une classe 2 « Conditions d'exposition moyennes » pour le formaldéhyde.

4.3.3.2 Evaluation des alternatives

Les critères définis dans la méthode sont complétés pour les 3 alternatives.

Tableau 22 : Comparaison des alternatives selon le module "Conditions d'exposition"

| Critères d'évaluation des dangers | Formaldéhyde | Alternatives | | |
|-----------------------------------|-------------------------------------|--|---|---|
| | | Le transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante au laboratoire avant analyses | La conservation de la pièce fraîche à 4°C | La technologie de mise sous vide couplée au froid à 4°C |
| Pression de vapeur (Pa) | Très volatil | Sans objet car il n'y a pas de substances chimiques dans les procédés alternatifs | | |
| Inflammabilité (°C) | Liquide et vapeurs non inflammables | | | |

| | | | | |
|---|---------------------------|----------|----------|----------|
| Procédé utilisé | Clos mais ouvert une fois | | | |
| Fréquence d'utilisation | Permanente | | | |
| Quantité utilisée | Intermédiaire | | | |
| Classes des « conditions d'exposition » | Classe 2 | Classe 4 | Classe 4 | Classe 4 |

Les 3 alternatives n'utilisent aucun fixateur chimique, par conséquent une classe finale de 4 « Conditions d'exposition estimées négligeables » leur est attribuée.

4.3.4 Le module « Autres impacts »

4.3.4.1 La réévaluation du risque biologique

Le formaldéhyde est un puissant biocide permettant une décontamination tissulaire.

Manipuler un prélèvement non-fixé et potentiellement contaminé par des agents infectieux (bactéries, virus, parasites, levures...), pourrait entraîner un déplacement de risque vers le risque biologique (Ministère du travail de l'emploi et de la santé et Direction générale de l'offre de soins 2012).

Les règles d'hygiène et de sécurité habituelles permettent de réduire les risques infectieux potentiels :

- le port des équipements de protections individuelles en particulier lors du prélèvement, et de sa préparation par ensachage solide et hermétiquement fermé permettant un confinement physique temporaire,
- des locaux présentant un système de traitement et de distribution de l'air permettant de réduire au maximum les risques biologiques ou/et l'utilisation d'équipements de protection collective à haut pouvoir de confinement,
- et le transport selon la réglementation en vigueur dans un véhicule et un dispositif de transport dédié.

4.3.4.1 L'organisation des flux lors du transport des prélèvements

Dans le meilleur des cas, le laboratoire d'analyse est à proximité du lieu de prélèvement.

Le processus allant du prélèvement jusqu'à l'arrivée au laboratoire d'ACP doit être amélioré, sans perte de chance pour le patient. Ainsi, le programme de prélèvement au niveau des blocs opératoires (hôpital ou clinique), ou au niveau des cabinets libéraux doit pouvoir être optimisé par des protocoles de collectes sur les lieux de prélèvements qui garantissent la réduction du temps des phases :

- de stockage à température ambiante sur le lieu de prélèvement des pièces fraîches. Entre le moment du prélèvement et sa fixation au laboratoire, il ne doit pas s'écouler plus **d'une heure** ;
- de stockage au froid (4°C) sur le lieu de prélèvement des pièces fraîches. Entre le moment du prélèvement et sa fixation au laboratoire, il ne doit pas s'écouler plus **deux heures** ;
- de stockage au froid (4°C) des pièces fraîches mais conditionnées sous vide. Entre le moment du prélèvement et sa fixation au laboratoire, il ne doit pas s'écouler plus de **72 heures** ;
- de transport : la logistique doit être pensée de manière à réduire le temps de trajet entre le lieu de prélèvement et le laboratoire. Ainsi, l'organisation des transferts doit permettre une rotation plus fréquente des courses pour répondre à cet impératif.

4.3.4.2 Le respect de la chaîne du froid lors du transport des prélèvements

La conservation des prélèvements frais ou mis sous vide et conservés à 4°C doivent rester à cette température jusqu'à l'arrivée au laboratoire d'analyses, sans interruption de la chaîne du froid.

Ainsi :

- la phase de stockage des pièces fraîches ou sous vide doit s'effectuer dans un réfrigérateur dédié équipé d'un dispositif de traçabilité de la température ;
- et la phase de transport des pièces fraîches ou sous vide doit s'effectuer dans une glacière électrique avec un dispositif de traçabilité de la température.

4.3.5 Présentation des résultats et conclusions

Les résultats finaux sont présentés dans les 3 tableaux ci-dessous.

**Tableau 23 : Comparaison des alternatives au formaldéhyde lors de la phase pré-analytique
Etablissements ayant un laboratoire *in situ***

| Conclusion des modules | Formaldéhyde | Alternatives | | |
|--|--------------|--|---|---|
| | | Le transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante au laboratoire avant analyses | La conservation de la pièce fraîche à 4°C | La technologie de mise sous vide couplée au froid à 4°C |
| Classe finale du module « capacités techniques » | Classe 3 | Classe 4 | Classe 4 | Classe 4 |
| Classe finale du module « dangers » (GreenScreen) | Classe 1 | Classe 4 | Classe 4 | Classe 4 |
| Classe finale du module « conditions d'exposition » | Classe 2 | Classe 4 | Classe 4 | Classe 4 |
| Classe finale du module « Estimation des coûts de substitution » | Classe 4 | Classe 4 | Classe 4 | Classe 1 |

**Tableau 24 : Comparaison des alternatives au formaldéhyde lors de la phase pré-analytique
Etablissements n'ayant pas de laboratoire *in situ***

| Conclusion des modules | Formaldéhyde | Alternatives | | |
|--|--------------|--|---|---|
| | | Le transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante au laboratoire avant analyses | La conservation de la pièce fraîche à 4°C | La technologie de mise sous vide couplée au froid à 4°C |
| Classe finale du module « capacités techniques » | Classe 3 | Classe 4 | Classe 4 | Classe 4 |

| | | | | |
|--|----------|----------|----------|----------|
| Classe finale du module « dangers » (GreenScreen) | Classe 1 | Classe 4 | Classe 4 | Classe 4 |
| Classe finale du module « conditions d'exposition » | Classe 2 | Classe 4 | Classe 4 | Classe 4 |
| Classe finale du module « Estimation des coûts de substitution » | Classe 4 | Classe 2 | Classe 2 | Classe 1 |

Tableau 25 : Identification des autres impacts liés à la substitution en bloc opératoire

| Conclusion des modules | Formaldéhyde | Alternatives | | |
|---------------------------------------|--------------|---|---|--|
| | | Le transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante au laboratoire avant analyses | La conservation de la pièce fraîche à 4°C | La technologie de mise sous vide couplée au froid à 4°C |
| Identification des « autres impacts » | Sans objet | Réévaluation du risque biologique Nouvelles contraintes Temps d'ischémie inférieur à 1 heure Organisation des flux | Réévaluation du risque biologique Nouvelles contraintes Temps d'ischémie inférieur à 2 heures Organisation des flux Respect de la chaîne du froid | Réévaluation du risque biologique Nouvelles contraintes Temps d'ischémie inférieur à 72 heures Organisation des flux Respect de la chaîne du froid |

5 La substitution du formaldéhyde lors de la phase analytique

5.1 L'identification des alternatives pour les besoins de fixation

Une identification des alternatives potentielles à la substance à substituer a été réalisée par une recherche dans la littérature scientifique et par une consultation des parties prenantes de la profession.

5.1.1 L'identification des alternatives au travers la littérature scientifique

5.1.1.1 La méthode d'identification des études bibliographiques

Les bases de données PubMed et Scopus ont été utilisées afin de déterminer les articles pertinents concernant la substitution du formaldéhyde en milieu d'anatomie et cytologie pathologiques humaines (ACP).

La stratégie de recherche a porté spécifiquement sur le secteur d'ACP en intégrant les mots clés relatifs aux techniques d'analyses utilisées dans les laboratoires ainsi que les mots clés décrivant les propriétés de fixation du formaldéhyde. Les requêtes relevaient également des publications relatant l'utilisation de substituts dans le secteur concerné. Le volet thanatopraxie étant traité dans un autre rapport, les mots clés relatifs à ce domaine ont été exclus de cette recherche.

Au final, 86 publications ont été jugées pertinentes après lecture des titres et résumés.

La substance a été recherchée par son numéro CAS (50-00-0) ainsi que par les termes MeSH, issus du thésaurus de Medline, suivants : *Formaldehyde* et ses synonymes *Formalin* et *Formol*, *Formaldehyde poisoning [supplementary Concept]*. Les autres termes MeSH recherchés sont : *Anatomical pathology*, *Clinical Laboratory Technique (Histological technique, Histochemistry, Immunohistochemistry, Histocytological Preparation Technique, Tissue Preservation, Tissue Fixation, Fixatives, Substitute et Alternative*.

La recherche bibliographique a été effectuée jusqu'à avril 2015.

5.1.1.2 La description des études retenues

Les études sélectionnées comparent les propriétés fixatrices du formaldéhyde à celles d'un ou plusieurs autres fixateurs dans des circonstances variées d'analyse.

L'étude la plus ancienne retrouvée remonte aux années 1970, date à laquelle la thématique de la substitution était abordée en raison de la conservation suboptimale des acides nucléiques par le formaldéhyde. À partir des années 1990 paraissent des études évoquant comme principal motif « l'inconfort du personnel » manipulant cette substance (Boon *et al.* 1992). Finalement, les premières études évoquant explicitement les effets sanitaires du formaldéhyde comme principale cause de la recherche d'un substitut n'apparaîtront qu'à la fin des années 2000.

Les articles sont majoritairement structurés de la même façon. L'introduction des articles évoque tout d'abord le contexte et la motivation de la recherche d'un substitut au formaldéhyde. La partie « matériel et méthodes » fait référence aux éléments suivants :

- Les fixateurs de choix pour l'étude, en précisant le nom commercial, la composition, la ou les dilutions testées et la forme de formaldéhyde utilisée comme référence (la plus courante étant la « non-buffered formalin (NBF) ») ;
- Les tissus et le circuit de fixation : les types de tissus utilisés (organe d'origine, origine humaine ou non), conformité aux règles d'éthique et accord des patients, lieu d'obtention, nombre de spécimens, temps et conditions de fixation ;
- Les méthodes d'analyse : inclusion en paraffine, colorations standards ou autres colorations utilisées pour l'analyse histochemique, marqueurs de choix pour l'analyse immunohistochemique ;

- Les analyses d'acides nucléiques : techniques d'extraction d'ADN ou ARN utilisées, modalités d'amplification, résultats de l'analyse quantitative et qualitative ;
- Les autres méthodes : utilisation de cryométrie de flux, microscopie électronique ;
- Des images de différentes coupes obtenues.

L'étendue de chaque étude est très variable. Dans le meilleur des cas, des comparaisons sont menées sur un nombre d'échantillons de l'ordre de la centaine, issus de tissus tumoraux et sains, d'origine humaine, correspondant à différents types d'organes, étudiés dans un laboratoire d'anatomocytopathologie hospitalier en pratique clinique courante, évaluant plusieurs substituts simultanément et fixant des échelles d'évaluation semi-quantitative pour la qualité des images obtenues grâce à chaque fixateur.

Les études les plus modestes évaluent 1 ou 2 substituts en fixant des tissus d'origine animale avec une analyse uniquement en microscopie optique classique. Leurs évaluations consistent essentiellement en une description qualitative.

5.1.1.3 Les principaux résultats issus des études bibliographiques

Les mélanges contenant du formaldéhyde n'ont pas été retenus dans le tableau suivant car, contenant toujours la substance cancérigène, ils ne peuvent pas être considérés comme des substituts.

Au total, **58 substituts potentiels** ont été identifiés. Cependant, tous les substituts ont été étudiés de manière très limitée. Pour un substitut donné, il y a au maximum 5 études qui évaluent ses performances. Ainsi les 6 substituts les plus étudiés dans la littérature (au moins 4 études comparatives avec le formaldéhyde) sont le PAXGene®, l'éthanol, le Finefix®, l'Histochoice®, le miel et le RCL2®.

Toutefois, ces études permettent uniquement de soutenir la validité d'un fixateur dans des conditions d'utilisation données. En effet, les substituts ont été étudiés sur des tissus spécifiques ou pour diagnostiquer une pathologie bien précise. Ainsi chaque substitut identifié n'est pas compatible pour toutes les situations. A titre d'exemple, le PAXgene® est défaillant pour la visualisation et/ou coloration des globules rouges (Kap *et al.* 2011).

En immunohistochimie, seuls quelques anticorps ont été pris en compte par étude alors que des bibliothèques entières d'anticorps existent. Leur utilisation est d'une importance capitale en matière diagnostique et thérapeutique. Ceci représente une limite supplémentaire des études bibliographiques consultées.

En conclusion, l'analyse de la littérature scientifique ne révèle **aucun substitut** capable de remplacer le formaldéhyde dans toutes ses utilisations.

5.1.1.4 La liste des alternatives identifiées

Le tableau ci-dessous liste l'ensemble des alternatives identifiées dans la littérature pour leur propriété de fixation.

Les noms des alternatives ont été retranscrits tels que trouvés dans la littérature. Dans certaines publications, ce sont des molécules parfaitement identifiées qui ont été étudiées alors que dans d'autres, seuls les noms commerciaux apparaissent sans autre information sur leur composition.

Tableau 26 : Liste des fixateurs alternatifs identifiés dans la littérature scientifique

| Substituts | Références | Nombre de références |
|---|--|----------------------|
| PAXgene® | (Belloni <i>et al.</i> 2013, Gündisch <i>et al.</i> 2013, Kap <i>et al.</i> 2011, Nietner, Jarutat, et Mertens 2012) | 4 |
| 1,3- dialcoxyméthylimidazolium bis(trifluorométhylsulfonyl)imides | (Pernak <i>et al.</i> 2005) | 1 |
| 1,3- dialcoxyméthylimidazolium tétrafluoroborates | (Pernak <i>et al.</i> 2005) | 1 |

| Substituts | Références | Nombre de références |
|--|---|----------------------|
| 1-Méthyl-3-octyloxyméthylimidazolium tétrafluoroborate | (Pernak <i>et al.</i> 2005) | 1 |
| Alcool polyvinylique | (Nace, Steurer, et Eberhard 1999) | 1 |
| Tissue-Tek Xpress® Molecular Fixative | (Li <i>et al.</i> 2014) | 1 |
| Boonfix® | (Van Essen <i>et al.</i> 2010) | 1 |
| Carnoy® | (Schutte <i>et al.</i> 1987, Souza <i>et al.</i> 2013) | 2 |
| Carnoy® (modified) | (Cox <i>et al.</i> 2006) | 1 |
| Cell-block® | (Zanini <i>et al.</i> 2012, Aydin <i>et al.</i> 2013) | 2 |
| Cymol® | (Benerini Gatta <i>et al.</i> 2012) | 1 |
| Diméthyladipimidate (DMA) | (Matthopoulos et Tzaphlidou 1987) | 1 |
| Diméthylsuberimidate (DMS) | (Matthopoulos et Tzaphlidou 1987) | 1 |
| Ecofix® | (Pietrzak-Johnston <i>et al.</i> 2000) | 1 |
| Ethanol | (Gedrange <i>et al.</i> 2008, Schutte <i>et al.</i> 1987, Cox <i>et al.</i> 2006, Souza <i>et al.</i> 2013) | 4 |
| Excell Plus® | (Lassalle <i>et al.</i> 2009) | 1 |
| Finefix® | (Acton, Harvey, et Grow 2005, Lassalle <i>et al.</i> 2009, Moelans <i>et al.</i> 2011, Aydin <i>et al.</i> 2013, Dotti <i>et al.</i> 2010) | 5 |
| F-Solv® (crosslinking) | (Moelans <i>et al.</i> 2011) | 1 |
| Glutaraldéhyde | (Schutte <i>et al.</i> 1987) | 1 |
| Glycérol | (Gedrange <i>et al.</i> 2008) | 1 |
| Glyo-Fixx® | (Titford et Horenstein 2005, Lassalle <i>et al.</i> 2009, Aydin <i>et al.</i> 2013) | 3 |
| Green-Fix® | (Aydin <i>et al.</i> 2013, Benerini Gatta <i>et al.</i> 2012) | 2 |
| GTF® | (Willmore-Payne, Metzger, et Layfield 2007) | 1 |
| Histochoice® | (Prento et Lyon 1997, Titford et Horenstein 2005, Willmore-Payne, Metzger, et Layfield 2007, Melrose <i>et al.</i> 2008, Kacena <i>et al.</i> 2004) | 5 |
| Histofixx® | (Titford et Horenstein 2005) | 1 |
| Hydrosafe® | (Lassalle <i>et al.</i> 2009) | 1 |
| Miel | (Ozkan <i>et al.</i> 2012, Patil <i>et al.</i> 2013, Patil <i>et al.</i> 2015, Sabarinath, Sivapathasundharam, et Sathyakumar 2014) | 4 |
| HOPE® | (Nietner, Jarutat, et Mertens 2012, Shevchuk <i>et al.</i> 2014, Vollmer <i>et al.</i> 2006) | 3 |
| Liquides ioniques (1-méthyl-3-octyloxyméthylimidazolium tétrafluoroborate) | (Majewski <i>et al.</i> 2003) | 1 |
| Kryofixx® | (Boon <i>et al.</i> 1992, Prento et Lyon 1997) | 2 |
| Alcool polyvinylique à faible viscosité à base de chlorure mercurique (LV-PVA) | (Pietrzak-Johnston <i>et al.</i> 2000) | 1 |
| Modified Methacarn® | (Cox <i>et al.</i> 2006) | 1 |
| Methacarnoy® | (Dotti <i>et al.</i> 2010) | 1 |
| Mirsky® | (Prento et Lyon 1997) | 1 |

| Substituts | Références | Nombre de références |
|---|--|----------------------|
| NOTOx® | (Meyer, Niedobitek, et Wenzelides 1996, Preto et Lyon 1997, Nissen <i>et al.</i> 1996) | 3 |
| Notoxhisto® | (Acton, Harvey, et Grow 2005) | 1 |
| O-Fix® | (Willmore-Payne, Metzger, et Layfield 2007) | 1 |
| Omnifix II® | (Preto et Lyon 1997, Tifford et Horenstein 2005) | 2 |
| PAGA | (Zanini <i>et al.</i> 2012) | 1 |
| Parasafe® | (Pietrzak-Johnston <i>et al.</i> 2000) | 1 |
| PBS® (solution saline tamponnée au phosphate) | (Cox <i>et al.</i> 2006) | 1 |
| Penfixx® | (Willmore-Payne, Metzger, et Layfield 2007) | 1 |
| Prefer® | (Wang <i>et al.</i> 2011) | 2 |
| Prives Method | (Wolff <i>et al.</i> 2012) | 1 |
| Proto-fix® | (Pietrzak-Johnston <i>et al.</i> 2000) | 1 |
| RCL2-CS100® | (Boissiere-Michot <i>et al.</i> 2013) | 1 |
| RCL2® | (Lassalle <i>et al.</i> 2009, Moelans <i>et al.</i> 2011, Masir <i>et al.</i> 2012, Van Essen <i>et al.</i> 2010, Zanini <i>et al.</i> 2012) | 5 |
| Solvanol® | (Panzacchi <i>et al.</i> 2013) | 1 |
| Statfix® | (Bostwick, al Annouf, et Choi 1994) | 1 |
| Streck tissue fixative® (STF) | (Pietrzak-Johnston <i>et al.</i> 2000, Nace, Steurer, et Eberhard 1999) | 2 |
| Jaggery sirup | (Patil <i>et al.</i> 2015) | 1 |
| Sucrose (30%) | (Cox <i>et al.</i> 2006) | 1 |
| UMFIX® | (Cox <i>et al.</i> 2006, Nadji <i>et al.</i> 2005, Nassiri <i>et al.</i> 2008) | 3 |
| Unifix® | (Willmore-Payne, Metzger, et Layfield 2007) | 1 |
| Weigner fixateur® | (Klopfleisch <i>et al.</i> 2013) | 1 |
| Z7 | (Zanini <i>et al.</i> 2012) | 1 |
| ZBF | (Zanini <i>et al.</i> 2012, Zhao <i>et al.</i> 2011, Wester <i>et al.</i> 2003) | 3 |
| ZSF (zinc salt fixation) | (Hicks <i>et al.</i> 2006) | 1 |

En conclusion, 58 alternatives ont été identifiées dans la littérature scientifique.

5.1.2 L'identification des alternatives à travers l'audition de professionnels

La consultation de parties prenantes de la profession a également apporté des éléments sur les essais menés avec l'Excell Plus® et le RCL2® et l'Hydrosafe® (MM France 2016, SMPF et IHP 2015).

Concernant les procédés alternatifs, les parties prenantes de la profession ont présenté le procédé de mise sous vide couplée avec l'utilisation de fixateur ainsi que la congélation à -80°C comme des alternatives possibles à l'utilisation du formaldéhyde.

5.1.2.1 La mise sous vide couplée avec l'utilisation de fixateur

Le procédé utilisé en phase pré-analytique peut également être utilisé en phase analytique dans les laboratoires d'anatomopathologie.

En effet, une fois la macroscopie réalisée, la pièce peut être mise à nouveau sous vide avec le fixateur afin d'être stockée dans le laboratoire jusqu'à l'édition du compte-rendu de l'anatomopathologiste.

En 2016, seule la technologie de mise sous vide couplée avec l'utilisation de formaldéhyde est disponible sur le marché français. Elle n'existe pas avec l'utilisation d'un autre fixateur chimique (MM France 2016, CCAP 2016).

5.1.2.2 La congélation

La congélation à -80°C est décrite comme un mode de conservation. L'échantillon congelé au laboratoire peut être conservé et décongelé si besoin est afin de pouvoir refaire des analyses sur la pièce native. Les techniques de biologie moléculaire, par exemple, peuvent être menées sur des échantillons qui ont été congelés. Il est alors possible de les stocker dans des congélateurs ou des cuves d'azote liquide.

Un retour d'expérience du laboratoire d'ACP de l'Hôpital européen Georges-Pompidou (HEGP) illustre l'utilisation de la congélation. Seulement, pour des raisons de capacités de stockage, seules les zones d'intérêts sont congelées. Ces morceaux d'échantillons ne dépassant pas 1 cm² sont congelés dans des cryotubes, le reste de l'échantillon étant fixé (CCAP 2016).

5.1.2.3 Conclusions

La technologie de mise sous vide couplée avec l'utilisation de fixateur n'existe actuellement qu'avec le formaldéhyde. Ce procédé n'est pas considéré comme un procédé alternatif dans la mesure où il utilise toujours la substance cancérogène.

La congélation à -80°C est un moyen de conserver les pièces et de ne pas utiliser le formaldéhyde. Cependant, une fois décongelées, les pièces doivent dans la plupart des cas être fixées afin d'être analysées. Ce procédé permet de limiter l'utilisation de fixateur mais ne le supprime pas totalement. Il ne peut donc pas être considéré comme une réelle alternative et ne sera donc pas étudié dans la suite de la méthode.

L'Hydrosafe®, l'Excell Plus® et le RCL2® sont les 3 mélanges de substitution identifiés via les auditions des parties prenantes qui sont retenus pour être étudiés dans la suite de la méthode.

5.1.3 Bilan des alternatives identifiées pour les besoins de fixation

Au final, **58 alternatives** à l'utilisation du formaldéhyde ont été identifiées à travers la littérature scientifique et à travers la consultation des parties prenantes de la profession.

5.2 Les modules de la phase séquentielle

5.2.1 Le module « Capacités techniques »

5.2.1.1 Choix des critères du module « Capacités techniques »

Un substitut au formaldéhyde doit être un agent de couplage puissant induisant la formation de ponts intra ou intermoléculaires. Il doit garantir la conservation des caractéristiques morphologiques et antigéniques des tissus tout en assurant une reproductibilité des résultats. Le substitut doit posséder un potentiel biocide et être compatible avec le fonctionnement de tous les automates, les colorations standards et spéciales, les techniques d'IHC, HIS et les analyses génomiques et protéomiques. L'objectif de l'utilisation du fixateur à cette étape-ci est de garantir la conservation des échantillons pendant 10 ans pour le suivi des patients (vérification de diagnostics en cas de rechute).

Ainsi, les experts de l'Anses ont retenu les 7 critères suivants pour le module « capacités techniques » :

- la qualité morphologique de la coupe en microscopie optique,
- la compatibilité avec les protocoles IHC,
- la compatibilité avec les protocoles HIS,
- la qualité et la quantité d'ADN extrait,

- la qualité et quantité d'ARN extrait,
- le potentiel biocide,
- le temps de conservation de 10 ans.

5.2.1.2 Evaluation du formaldéhyde

Conformément à la méthode, il est attribué la classe finale de 3 au module « capacités techniques » pour le formaldéhyde afin de pouvoir comparer ses capacités techniques avec celles des alternatives.

5.2.1.3 Evaluation des alternatives

La comparaison des alternatives au travers de la bibliographie

Les substances et mélanges de substitution

Un même fixateur peut, dans des conditions différentes, engendrer des fixations différentes. Dans une grande partie des études analysées, les conditions de fixation (temps de fixation, température, volume utilisé par rapport à la taille de la pièce anatomique) ainsi que les caractéristiques macroscopiques de la pièce fixée ne sont pas décrites. En l'absence d'une harmonisation des conditions d'utilisation d'un fixateur, il est difficile de comparer les études entre elles. Il est même constaté, pour un même fixateur, des divergences dans la littérature selon les auteurs quant à sa capacité à substituer le formaldéhyde, sans précisions sur l'origine de cette divergence (tissu différent, variabilité inter observateur, conditions de fixation différentes...).

La dilution à des concentrations différentes, dans différents solvants, l'application d'autres produits ou procédés afin d'appliquer des techniques d'immunohistochimie originellement non adaptées au fixateur peuvent conduire à des appréciations diverses.

Les fixateurs commerciaux retrouvés dans la littérature correspondent essentiellement à des mélanges. Toutefois, pour certaines formulations commerciales, aucune information n'est donnée sur la composition exacte. Dans ces conditions, la classification de l'ensemble des fixateurs, la caractérisation de leurs propriétés physico-chimiques et la comparaison des études entre elles restent problématiques.

Il ressort des études analysées que la seule famille de substituts bien caractérisée est celle des alcools. Ce sont des fixateurs rapides mais qui aboutissent au durcissement et au rétrécissement des tissus. Ils ont de bonnes performances en immunohistochimie (IHC) mais la conservation à long terme des échantillons n'a pas été étudiée. Pour les fixateurs métalliques, leur toxicité semble être la principale limite (ex : le chlorure de mercure).

Pour la conservation de l'ARN et de l'ADN, la référence reste la cryoconservation, méthode par laquelle aucune modification chimique n'est portée sur les acides nucléiques. Les performances du formaldéhyde sont moins bonnes et de ce fait de nombreux fixateurs substituts ont été développés pour ces techniques. En règle générale, les fixateurs non-réticulés, comme les alcools (coagulants) par exemple, apportent de meilleurs résultats que le formaldéhyde.

En suivant les critères retenus du module « capacités techniques », les substituts ont été comparés par rapport au formaldéhyde en suivant les conclusions de chacune des études.

La technique de fixation HOPE®

La technique (procédé) HOPE® (Hepes-Glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protection Effect) a été développée par Jürgen Olert et son équipe à la fin des années 1990 (Olert *et al.* 2001) et a fait l'objet d'une demande de brevet au niveau international en 2001 pour une publication en 2003 sous le n° WO2003029783 A1 (Olert 2003).

La technique comprend une solution de protection avec un tampon organique, l'acétone comme seul agent déshydratant et de la paraffine pure mise en œuvre à une température de fusion de 52-54 °C. La technique de fixation HOPE® commence par une incubation de spécimens de tissus frais dans une solution de protection aqueuse pendant une nuit à des températures basses de 0 à 4 °C, suivie

d'une déshydratation dans de l'acétone à 0-4 °C. Les tissus traités de cette manière peuvent être intégrés directement à la paraffine. Les différentes étapes de cette technique sont détaillées dans le graphique issu de la publication (Olert *et al.* 2001).

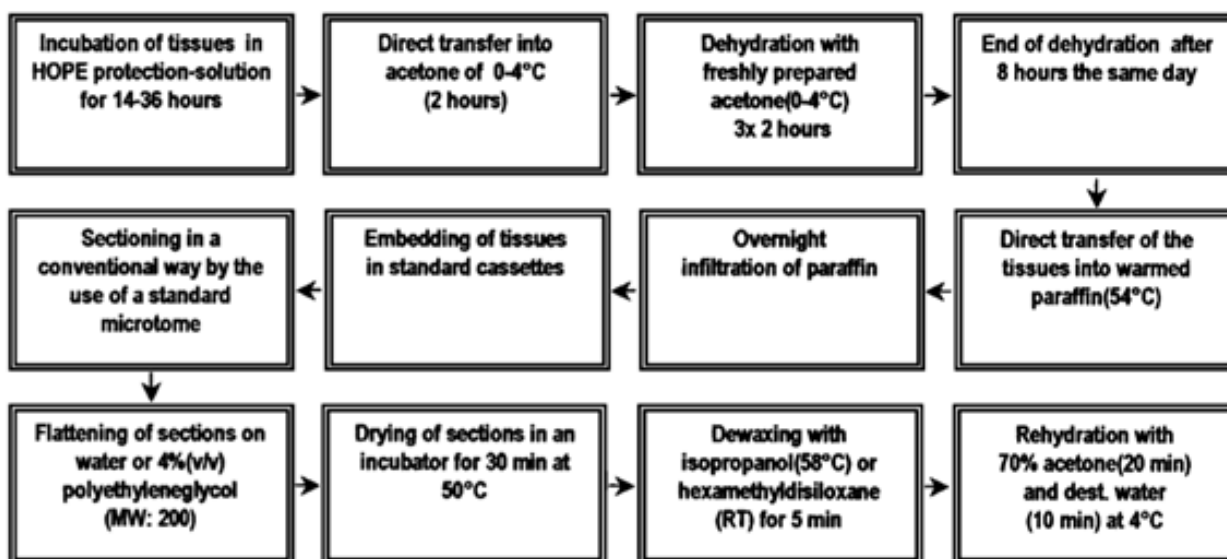


Figure 1 : Technique de fixation HOPE®

La solution de protection HOPE® hyperosmolaire, est une formulation à base d'HEPES (ou acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (n° CAS 7365-45-9), composé organique zwitterionique en solution dans un tampon contenant de l'acide glutamique et d'autres acides aminés (glycine, L-alanine, L-proline, L-sérine ; indications figurant dans le résumé du brevet) avec des concentrations de 10 à 100 mM pour un pH de 5,8 à 6,4 à température ambiante. Lorsque les spécimens sont immergés dans la solution de protection, la solution pénètre les tissus par diffusion. La procédure a été optimisée pour précipiter les composés de la solution de protection pendant l'infusion dans l'acétone lors de la deuxième étape. Un effet supplémentaire de la solution de protection est d'ouvrir des capillaires ce qui accélère la pénétration de l'acétone dans les tissus.

Après la déshydratation, les spécimens sont directement transférés dans la paraffine (point de fusion : 52-54 °C). Les résidus de la solution HOPE® agissent encore de manière protectrice sur la paraffine "dissolvante" flottante et sont finalement éliminés du tissu avec l'acétone. L'incubation dans la paraffine est effectuée à 54 °C pendant 12-16 h. Le traitement ultérieur des blocs est similaire à celui des spécimens standard fixés au formol et à la paraffine.

L'utilisation d'acides aminés, dans cette technique de fixation moléculaire permettrait de protéger les tissus des effets néfastes liés à l'acétone lors de la phase de déshydratation (Howat et Wilson 2014). En immunohistochimie, une caractéristique critique de la technique HOPE® est que les sections de tissus préparées ne doivent pas être stockées pendant plus de 7 jours (Meyer et Nina Hornickel 2010). Ces auteurs indiquent également que si le protocole HOPE® est correctement établi dans un laboratoire, la conservation de la structure est, dans une certaine mesure, comparable à celle des échantillons fixés dans la solution de Bouin. Dans une étude comparative, les auteurs indiquent que la plupart des fixateurs testés préservent l'histomorphologie des tissus alors que celle-ci est dégradée (réduite) pour les tissus fixés avec la technique HOPE® (Nietner, Jarutat, et Mertens 2012).

En suivant les critères retenus du module « capacités techniques », la technique de fixation HOPE® a été comparée au formaldéhyde en suivant les conclusions de chacune des études.

La comparaison des substituts identifiés au travers des auditions

La consultation de parties prenantes de la profession a permis d'apporter des retours d'expériences sur 3 fixateurs : L'Excell Plus®, le RCL2® et l'Hydrosafe®.

L'Excell Plus®

Les études des substituts aldéhydiques ont surtout été conduites avec l'Excell Plus®. Concernant la morphologie, les résultats obtenus avec l'Excell Plus® sont proches de ceux obtenus avec le formaldéhyde. Les blocs sont simplement plus mous et plus difficiles à couper pour l'étude macroscopique. Au niveau des colorations HE, HES et des colorations spéciales, les résultats obtenus sont les mêmes que ceux obtenus avec le formaldéhyde. Cependant, seulement 20% des protocoles d'IHC sont transférables avec l'Excell Plus®. Il est alors nécessaire de reprendre les protocoles voire même de changer les clones des anticorps. Enfin, les protocoles sont non transférables directement pour l'HIS pour laquelle des mises au point restent indispensables notamment sur les temps de démasquage. Enfin, les rendements pour les extractions des ADN/ARN sont faibles à mauvais (MM France 2016).

Un retour d'expérience illustre l'utilisation d'Excell Plus®.

L'Institut d'histopathologie (IHP) de Nantes compte parmi les plus gros laboratoires privés d'anatomie pathologique en France. En 2005, l'établissement a entamé une démarche de substitution du formaldéhyde par l'Excell Plus®. La directrice de l'IHP témoignait, à l'époque, que les résultats en histologie pure étaient strictement identiques à ceux du formaldéhyde. Les premiers diagnostics étaient réalisés en parallèle sur des échantillons fixés au formaldéhyde pour s'assurer de leurs justesses. Quelques difficultés ont été rencontrées en IHC. L'IHP a notamment dû faire appel à la société qui fabrique les automates d'immunologie afin de re-paramétrer les machines. Le laboratoire a pu cependant vérifier l'efficacité de la substitution par le nombre de cas traités sans qu'aucun dossier n'ait fait l'objet de contentieux avec les chirurgiens (INRS 2009, SMPF et IHP 2015).

Dans le cadre de ces travaux, l'Anses a ré-auditionné le directeur de l'IHP de Nantes qui a confirmé avoir substitué totalement le formaldéhyde par l'Excell Plus®, entre 2007 et 2014 et a pu traiter 90 000 dossiers par an. La substitution a été rendue possible en modifiant les temps d'incubation mais n'a pas nécessité de rééquiper ou de former à nouveau le personnel de l'institut. Le prix d'achat du substitut était plus élevé mais ce prix s'est amorti dans le temps comparé à la mise en œuvre nécessaire du Code du Travail dans le cas d'un confinement. Cependant la substitution a été abandonnée volontairement par l'institut au 1^{er} janvier 2015, les centres d'oncologie et les structures hospitalières refusant de travailler avec un fixateur autre que le formaldéhyde (SMPF et IHP 2015).

Le RCL2® et l'Hydrosafe®

Les études des substituts alcooliques ont surtout été conduites avec le RCL2® et l'HydroSafe®. La fixation avec un fixateur alcoolique donne un aspect « sous-fixé » et des morphologies de mauvaise qualité. En effet, les solutions alcooliques dissolvent les lipides. Les protocoles de coloration HE, HES et des colorations spéciales doivent être légèrement modifiés afin d'obtenir de bons résultats. Seulement 20% des protocoles d'IHC sont transférables à un substitut de type RCL2®. Reprendre tous les protocoles s'avère alors nécessaire. Concernant l'HIS, des mises au point sont indispensables (temps de dénaturation, concentration du substitut...) car les protocoles sont non transférables. Cependant, ce substitut donne de très bons résultats en HIS après adaptation des protocoles. Enfin, les substituts alcooliques sont qualifiés d'« excellents » par les auditionnés pour la biologie moléculaire car ils donnent des résultats de rendement pour les extractions des ADN/ARN très bons. Aujourd'hui, certains laboratoires fixent avec du RCL2® car ils savent qu'ils vont réaliser des extractions ADN et ARN de certains prélèvements (MM France 2016).

Un retour d'expérience illustre l'utilisation du RCL2®.

Le laboratoire d'ACP de l'Institut Claudius Regaud (CLCC Midi-Pyrénées) de Toulouse avait initié un essai de substitution du formaldéhyde par le RCL2®. En 2015, ce substitut a été abandonné par l'Institut. En effet, les résultats étaient trop variables et les standards internationaux restent tous basés sur le formaldéhyde. Pour cet institut qui est impliqué dans de nombreux essais cliniques et travaux

de recherche, ne pas utiliser le formaldéhyde revient à s'exclure des projets multi-centriques (Rochaix 2015).

En suivant les critères retenus du module « capacités techniques », les alternatives ont été comparées au formaldéhyde en prenant en compte les retours d'expériences des professionnels auditionnés par l'Anses.

Le tableau de comparaison des substituts

Le tableau ci-dessous, présente le bilan de l'évaluation des alternatives suivant les critères du module « capacités techniques ».

Les noms des substituts ont été retranscrits tels que trouvés dans la littérature. Dans certaines publications, ce sont des molécules parfaitement identifiées qui ont été étudiées alors que dans d'autres seuls les noms commerciaux apparaissaient sans autre information sur leur composition.

Tableau 27 : Légende des colonnes des tableaux 29 et 30

| | |
|---------------|---|
| Alternative | Nom de la substance, du mélange commercial ou du procédé alternatif au formaldéhyde |
| Entreprise | Fournisseur de l'alternative |
| Composition | Premiers éléments de composition du mélange disponibles |
| Référence | Source de l'information |
| Morph | Qualité morphologique de la coupe en microscopie optique |
| IHC | Immunohistochimie |
| ADN | Qualité et quantité d'ADN extrait |
| ARN | Qualité et quantité d'ARN extrait |
| Fish | Fluorescent <i>In situ</i> Hybridation (technique d'analyse par immunomarquage fluorescent) |
| Bioc | Le potentiel biocide |
| Cons 10 ans | Le temps de conservation de 10 ans. |
| Classe finale | Classe finale attribuée à l'alternative |

Tableau 28 : Signification des sigles utilisés dans les tableaux 29 et 30

| | |
|------------|--|
| Eq | Les résultats sont équivalents à ceux obtenus avec le formaldéhyde |
| Inf | Les résultats sont inférieurs à ceux obtenus avec le formaldéhyde |
| Sup | Les résultats sont supérieurs à ceux obtenus avec le formaldéhyde |
| ? | Absence d'information alors que l'étude aborde l'élément |
| Non évalué | L'étude ne porte pas sur l'élément |
| /var | Globalement équivalent, supérieur ou inférieur au formaldéhyde/ mais des exceptions de non équivalence sont retrouvées au sein de l'étude. |
| cong | La congélation de tissus (méthode de référence) |

Pour la classification finale des alternatives, les experts ont adopté les règles suivantes :

- Les alternatives ont été regroupées lorsque le nom, la composition et/ou le nom du fournisseur étaient similaires,
- Les alternatives pour lesquelles au moins 4 critères du module « Capacités techniques » n'ont pas été évalués ou comparés au formaldéhyde se sont vues attribuer la classe « Non classé »,
- Dans le cas où seulement 4 des 7 critères du module « capacités techniques » ont été évalués, lorsque les 4 critères sont évalués « eq » ou « sup » alors il a été attribué la classe 2 « capacités techniques inférieures » à l'alternative sinon une classe de 1 « Capacités techniques insuffisantes » est attribuée.
- Il a été attribué une classe 3 « capacités techniques équivalentes » lorsque tous les critères ont été comparés au formaldéhyde et ont été évalués comme équivalent au formaldéhyde.

Pour des raisons de simplicité dans la lecture des résultats des comparaisons des capacités techniques, ces derniers sont répartis en 2 tableaux : le premier contient les substituts classés et le second contient les substituts n'ayant pas pu être classés.

Tableau 29 : comparaison des capacités techniques des substituts identifiés dans la bibliographie ayant pu conduire à l'attribution d'une classe finale autre que « non classé »

| Alternative | Entreprise | Composition | Référence | Morph | IHC | ADN | ARN | Fish | Bioc | Cons 10 ans | Classe finale |
|--------------|---|---|-------------------------------------|------------|------------|----------------|------------|------------|------------|---------------|---------------|
| PAXgene® | PreAnalytix, Suisse | Mélange contenant du méthanol, acide acétique, éthanol et autres composés organiques solubles | (Belloni <i>et al.</i> 2013) | eq | inf | sup/var | sup | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Classe 2 |
| | | | (Gündisch <i>et al.</i> 2013) | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Sup (prot) | Non évalué | Inf (18 mois) | |
| | | | (Kap <i>et al.</i> 2011) | eq/inf | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | |
| | | | (Nietner, Jarutat, et Mertens 2012) | eq | sup | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | |
| Excell Plus® | Microm Microtech France ; France | Mélange à base de glyoxal | (Lassalle <i>et al.</i> 2009) | inf | inf | Sup (inf cong) | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Classe 2 |
| | | | (MM France 2016) | eq | eq | eq | eq | eq | Non évalué | Non évalué | |
| | | | (SMPF et IHP 2015) | eq | eq | eq | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | |
| FineFix® | Milestone, Italie | Mélange contenant de l'éthanol, de l'eau distillée, du propylène-glycol, de l'alcool polyvinylique et un monosaccharide | (Acton, Harvey, et Grow 2005) | Non évalué | eq | inf | inf | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Classe 2 |
| | | | (Lassalle <i>et al.</i> 2009) | inf | eq | sup (inf cong) | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | |
| | | | (Moelans <i>et al.</i> 2011) | inf | eq/var | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | |
| | | | (Aydin <i>et al.</i> 2013) | sup | eq | sup | sup | Non évalué | Non évalué | Non évalué | |
| | | | (Dotti <i>et al.</i> 2010) | Non évalué | Non évalué | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | |
| Glyo-Fixx® | Thermo Electron Corp, Etats-Unis/France | Ethanol, glyoxal, 2-propanol, methanol | (Titford et Horenstein 2005) | inf | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Classe 1 |
| | | | (Lassalle <i>et al.</i> 2009) | inf | inf | sup (inf cong) | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | |

| Alternative | Entreprise | Composition | Référence | Morph | IHC | ADN | ARN | Fish | Bioc | Cons 10 ans | Classe finale |
|-------------|------------------|--|---|------------|------------|----------------|------------|------------|------------|-------------|---------------|
| | | | (Aydin <i>et al.</i> 2013) | eq | inf | sup | sup | Non évalué | Non évalué | Non évalué | |
| Green-Fix® | Diapath, Italie | Ethanedial, éthanol | (Aydin <i>et al.</i> 2013) | eq | eq | sup | sup | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Classe 2 |
| | | | (Benerini Gatta <i>et al.</i> 2012) | inf | eq/var | sup | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | |
| HydroSafe® | Non renseigné | Alcool | (MM France 2016) | Inf/eq | Inf/eq | sup | sup | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Classe 2 |
| | | Mélange sans aldéhyde mais avec de l'acide acétique | (Lassalle <i>et al.</i> 2009) | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | |
| HOPE® | Non renseigné | Non renseigné | (Nietner, Jarutat, et Mertens 2012) | inf | inf | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Classe 2 |
| | | Non renseigné | (Shevchuk <i>et al.</i> 2014) | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Eq (prot) | Non évalué | Non évalué | |
| | | Mélanges d'acides aminés et de tampons organiques | (Vollmer <i>et al.</i> 2006) | Non évalué | sup | sup | sup | Non évalué | Non évalué | Non évalué | |
| | | Mélange sans aldéhyde et acide acétique | (Lassalle <i>et al.</i> 2009) | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | |
| RCL2-CS100® | Excilone, France | Mélange de Trehalose, éthanol, acide acétique et eau | (Boissiere-Michot <i>et al.</i> 2013)(Boissiere-Michot <i>et al.</i> 2013)(Boissiere-Michot <i>et al.</i> 2013) | eq | var | sup | sup | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Classe 1 |
| RCL2® | Alphelys, France | Mélange d'éthanol (70%), d'acide acétique (7%) et d'un carbohydrete complexe | (Lassalle <i>et al.</i> 2009) | inf | eq | sup(inf cong) | sup | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Classe 2 |
| | | | (Moelans <i>et al.</i> 2011) | eq/inf | eq/var | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | |
| | | | (Masir <i>et al.</i> 2012) | eq | eq/var | sup | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | |
| | | | (MM France 2016) | Inf/eq | Inf/eq | sup | sup | Non évalué | Non évalué | Non évalué | |

| Alternative | Entreprise | Composition | Référence | Morph | IHC | ADN | ARN | Fish | Bioc | Cons 10 ans | Classe finale |
|-------------------|-------------------------------|--|----------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|---------------|
| UMFIX® | Sakura Finetek Etats-Unis | Mélange de méthanol et de polyéthylène glycol | (Cox <i>et al.</i> 2006) | inf | Non évalué | Non évalué | inf | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Classe 2 |
| | | | (Nadji <i>et al.</i> 2005) | eq | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | |
| | | | (Nassiri <i>et al.</i> 2008) | ? | sup | eq | sup | eq | Non évalué | Non évalué | |
| Weigner fixateur® | Synthétisé au laboratoire | Mélange de sel de nitrite, d'éthanol (30%) et de Pluriol E400 (20%) | (Klopfleisch <i>et al.</i> 2013) | var | eq | sup | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Classe 1 |
| ZBF® | Sigma Chemical Co, Etats-Unis | Acétate de calcium (0.5%), acétate de zinc (0.5%), chlorure de zinc (0.5%) et 0.1M de Tris-HCL | (Zhao <i>et al.</i> 2011) | Non évalué | Non évalué | sup | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Classe 1 |
| | | | (Wester <i>et al.</i> 2003) | inf | sup | sup | sup | Non évalué | Non évalué | Non évalué | |

Tableau 30 : comparaison des « capacités techniques » des substituts identifiés dans la bibliographie ayant conduit à l'attribution de la classe finale « non classé »

| Alternative | Entreprise | Composition | Référence | Morph | IHC | ADN | ARN | Fish | Bioc | Cons 10 ans | Classe finale |
|---|-----------------------------------|---------------|-------------------------------------|--------|--------|------------|------------|------------|------------|-------------|---------------|
| PAXgene® | Non renseigné | Non renseigné | (Nietner, Jarutat, et Mertens 2012) | eq | sup | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| 1,3-dialkoxyméthylimidazolium bis(trifluorométhylsulfonyle)imides | Synthétisé au laboratoire | | (Pernak <i>et al.</i> 2005) | ? | ? | Non évalué | Non évalué | Non évalué | ? | Non évalué | Non classé |
| 1,3-Dialkoxyméthylimidazolium tétrafluoroborates | Synthétisé au laboratoire | | (Pernak <i>et al.</i> 2005) | ? | ? | Non évalué | Non évalué | Non évalué | ? | Non évalué | Non classé |
| 1-Méthyl-3-octyloxyméthylimidazolium tétrafluoroborate | Polish Chemical Reagents, Pologne | | (Pernak <i>et al.</i> 2005) | Eq/inf | Eq/inf | Non évalué | Non évalué | Non évalué | ? | Non évalué | Non classé |

| Alternative | Entreprise | Composition | Référence | Morph | IHC | ADN | ARN | Fish | Bioc | Cons 10 ans | Classe finale |
|---------------------------------------|----------------------------|--|--|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------|---------------|
| Alcool polyvinylique | | | (Nace, Steurer, et Eberhard 1999) | ? | ? | ? | ? | ? | Non évalué | Inf (3 mois) | Non classé |
| Tissue-Tek Xpress® Molecular Fixative | Sakura Finetek, Etats-Unis | Mélange à base de méthanol | (Li <i>et al.</i> 2014) | eq | eq | Non évalué | sup | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| Boonfix® | Finetec, Japon | Mélange à base d'alcool | (Van Essen <i>et al.</i> 2010) | Non évalué | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| Carnoy® | Synthétisé au laboratoire | Ethanol (60%), chloroforme (30%) et acide acétique glacial (10%) ; | (Schutte <i>et al.</i> 1987) | eq | sup | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| | | | (Souza <i>et al.</i> 2013) | eq/var | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| Carnoy® (modified) | Synthétisé au laboratoire | Ethanol (75%) et acide acétique glacial (15%) ; | (Cox <i>et al.</i> 2006) | sup | Non évalué | Non évalué | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| Cell-Block® | Bio-Optica, Italie | Mélange à base d'éthanol (50%) et de glyoxal. | (Zanini <i>et al.</i> 2012) | eq | ? | Non évalué | sup | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| | | | (Aydin <i>et al.</i> 2013) | eq | inf | sup | sup | Non évalué | Non évalué | Non évalué | |
| Cymol® | Copan Italia, Italie | Mélange à base d'éthanol, de méthanol et de 2-propanol | (Benerini Gatta <i>et al.</i> 2012) | eq | eq/var | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| Diméthyladipimidate (DMA) | Synthétisé au laboratoire | | (Matthopoulos et Tzaphlidou 1987) | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Sup (Fish) | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| Diméthylsuberimidate (DMS) | Synthétisé au laboratoire | | (Matthopoulos et Tzaphlidou 1987) | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Sup (Fish) | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| Ecofix® | Meridian Diagnostics | Non renseigné | (Pietrzak-Johnston <i>et al.</i> 2000) | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| Ethanol (70%) | | | (Gedrange <i>et al.</i> 2008) | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| | | | (Schutte <i>et al.</i> 1987) | eq | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | |
| | PolyScientific Etats Unis | | (Cox <i>et al.</i> 2006) | sup | Non évalué | Non évalué | sup | Non évalué | Non évalué | Non évalué | |

| Alternative | Entreprise | Composition | Référence | Morph | IHC | ADN | ARN | Fish | Bioc | Cons 10 ans | Classe finale |
|------------------------|---|---|---|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|---------------|
| | | | (Souza <i>et al.</i> 2013) | inf | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | |
| F-Solv® (crosslinking) | Yvsolab NV, Belgique | Mélange d'alcool et d'aldéhyde | (Moelans <i>et al.</i> 2011) | inf | eq/var | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| Glutaraldéhyde | | | (Schutte <i>et al.</i> 1987) | inf | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| Glycérol | | | (Gedrange <i>et al.</i> 2008) | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| GTF® | Statlab Medical, Etats-Unis | Non renseigné | (Willmore-Payne, Metzger, et Layfield 2007) | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Inf (FISH) | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| Histochoice® | Amresco, Etats-Unis | Mélange composé d'aldéhydes, tampons, sels et stabilisants | (Prento et Lyon 1997) | inf | Inf | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| | | Mélange de glyoxal, chlorure de sodium, butanedial, sulfate de zinc | (Titford et Horenstein 2005) | inf | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | |
| | | Non renseigné | (Willmore-Payne, Metzger, et Layfield 2007) | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | inf | Non évalué | Non évalué | |
| | | Non renseigné | (Melrose <i>et al.</i> 2008) | eq | eq/ inf | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | |
| | | Mélange dont le composé principal est le glyoxal | (Kacena <i>et al.</i> 2004) | sup | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | |
| Histofixx® | Trend Scientific, Etats-Unis | Mélange de 2-Pyrrolidinone, urée sels de zinc et de méthanol | (Titford et Horenstein 2005) | inf | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| Miel de pin | Principalement produit dans le sud-ouest de la Turquie, et dans plusieurs îles Grecques | | (Ozkan <i>et al.</i> 2012) | eq | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |

| Alternative | Entreprise | Composition | Référence | Morph | IHC | ADN | ARN | Fish | Bioc | Cons 10 ans | Classe finale |
|--|-----------------------------------|--|--|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------|---------------|
| | et en Nouvelle-Zélande | | | | | | | | | | |
| Miel | Non renseigné | | (Patil <i>et al.</i> 2013) | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| Miel | Non renseigné | | (Patil <i>et al.</i> 2015) | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Inf (6 mois) | Non classé |
| Miel | Non renseigné | | (Sabarinath, Sivapathasund haram, et Sathyakumar 2014) | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| Liquides ioniques (1-méthyl-3-octyloxyméthylimidazolium tétrafluoroborate) | Synthétisé au laboratoire | | (Majewski <i>et al.</i> 2003) | var | Non évalué | Non évalué | Non évalué | ? | ? | Non évalué | Non classé |
| Kryofixx® | Merck, Allemagne | Mélange d'éthanol et de polyéthylène glycols | (Boon <i>et al.</i> 1992) | Non évalué | sup | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Inf (6 ans) | Non classé |
| | | | (Prento et Lyon 1997) | inf | Inf | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | |
| Alcool polyvinylique à faible viscosité à base de chlorure mercurique (LV-PVA) | Meridian Diagnostics, Inc. | | (Pietrzak-Johnston <i>et al.</i> 2000) | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| Modified Methacarn® | Synthétisé au laboratoire | Méthanol (90%) et acide acétique glacial (10%) ; | (Cox <i>et al.</i> 2006) | sup | Non évalué | Non évalué | inf(var) | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| Methacarnoy® | Non renseigné | Alcool | (Dotti <i>et al.</i> 2010) | Non évalué | Non évalué | sup | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| Mirsky® | National Diagnostics, Angleterre | Non renseigné | (Prento et Lyon 1997) | inf | inf | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| NOTOx® | Earth Safe Industries, Etats-Unis | Mélange d'éthanol, de composés bis-carbonylés, de bactéricides, de | (Meyer, Niedobitek, et Wenzelides 1996) | eq | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |

| Alternative | Entreprise | Composition | Référence | Morph | IHC | ADN | ARN | Fish | Bioc | Cons 10 ans | Classe finale |
|---|--|---|---|------------|---------------------|------------|------------|------------|------------|-------------|---------------|
| | | virocides, de fongicides humectant | (Prento et Lyon 1997) | inf | Inf/ voir inadéquat | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | |
| | | | (Nissen <i>et al.</i> 1996) | Non évalué | inf | Non évalué | Non évalué | Non évalué | inf | Non évalué | |
| Notoxhisto® | Scientific Device Laboratory, Etats-Unis | Non renseigné | (Acton, Harvey, et Grow 2005) | Non évalué | eq | Non évalué | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| O-Fix® | Surgipath, Etats-Unis | Non renseigné | (Willmore-Payne, Metzger, et Layfield 2007) | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | eq | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| Omnifix® II | An-Con Genetics, Etats-Unis | Mélange d'éthanol (36%), d'éthylène glycol, d'acide acétique, de chlorure de sodium et chlorure de zinc | (Prento et Lyon 1997) | inf | inf | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| | FR Chemical Inc ; Etats-Unis | | (Titford et Horenstein 2005) | inf | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | |
| PAGA | Synthétisé au laboratoire | Mélange de polyethylene glycol, d'éthanol, de glycérol et d'acide acétique | (Zanini <i>et al.</i> 2012) | eq | ? | Non évalué | sup | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| Parasafe® | Alpha Tec Systems | Non renseigné | (Pietrzak-Johnston <i>et al.</i> 2000) | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| PBS® (solution saline tamponnée au phosphate) | Ambion, Etats-Unis | | (Cox <i>et al.</i> 2006) | inf | Non évalué | Non évalué | inf | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| Penfixx® | Richard-Allen Scientific, Etats-Unis | Non renseigné | (Willmore-Payne, Metzger, et Layfield 2007) | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | inf | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| Prefer® | Anatech LTD, Etats-Unis | Mélange contenant du glyoxal | (Wang <i>et al.</i> 2011) | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| | | | (Willmore-Payne, Metzger, et Layfield 2007) | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | inf | Non évalué | Non évalué | |

| Alternative | Entreprise | Composition | Référence | Morph | IHC | ADN | ARN | Fish | Bioc | Cons 10 ans | Classe finale |
|-------------------------------|---------------------------------|---|---|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|---------------|
| Prives Method | Non renseigné | Glycérine (45%), Acétate de potassium (10%), eau (40%) et Thymol (5%) | (Wolff <i>et al.</i> 2012) | sup | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| Proto-fix® | Alpha Tec Systems, Inc. | Non renseigné | (Pietrzak-Johnston <i>et al.</i> 2000) | eq (var) | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| RCL2® | Westburg, Pays-Bas | Mélange composé principalement d'éthanol | (Van Essen <i>et al.</i> 2010) | Non évalué | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| RCL2® | Celbio, Italie | Mélange à base d'acide acétique, d'éthanol et de carbohydrates non réducteurs | (Zanini <i>et al.</i> 2012) | eq | ? | Non évalué | sup | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| Solvanol® | Vital, Italie | Mélange contenant 70% d'alcool | (Panzacchi <i>et al.</i> 2013) | eq | eq/var | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| Statfix® | Stat Path, Etats-Unis | Ethanol (56%), polyéthylène glycol (20%), glycérol (4%), tampon (17.5%) et acide acétique (2.5%) | (Bostwick, al Annouf, et Choi 1994) | eq | eq/var | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| Streck tissue fixative® (STF) | Streck Laboratories, Etats-Unis | Mélange contenant de la diazolidinyl urée, du 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol, du sulfate de zinc et du citrate de sodium | (Pietrzak-Johnston <i>et al.</i> 2000) | eq/var | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| | | | (Nace, Steurer, et Eberhard 1999) | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | |
| Jaggery sirup | Non renseigné | Produit naturel | (Patil <i>et al.</i> 2015) | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| Sucrose (30%) | Synthétisé au laboratoire | Eau traitée au pyrocarbonate d'éthyle | (Cox <i>et al.</i> 2006) | inf | Non évalué | Non évalué | inf | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| Unifix® | BBC Biochemical, Etats-Unis | Non renseigné | (Willmore-Payne, Metzger, et Layfield 2007) | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | inf | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| Z7 | Synthétisé au laboratoire | Chlorure de zinc (0.5%), | (Zanini <i>et al.</i> 2012) | eq | ? | Non évalué | eq | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |

| Alternative | Entreprise | Composition | Référence | Morph | IHC | ADN | ARN | Fish | Bioc | Cons 10 ans | Classe finale |
|--------------------------|---------------------------|--|--|-------|-----|------------|------------|------------|------------|-------------|---------------|
| | | trifluoroacétate de zinc (0.5%) et un tampon de Tris-HCL | | | | | | | | | |
| ZBF | Synthétisé au laboratoire | Chlorure de zinc (0.5%), acétate de zinc (0.5%) et un tampon de Tris-HCL | (Zanini <i>et al.</i> 2012) | eq | ? | Non évalué | inf | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |
| ZSF (zinc salt fixation) | Synthétisé au laboratoire | Sels de zinc | (Hicks <i>et al.</i> 2006)(Hicks <i>et al.</i> 2006)(Hicks <i>et al.</i> 2006) | eq | sup | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Non classé |

Conclusions

Après analyse des informations disponibles, la grande majorité des alternatives se voient attribuer « Non classé » car au moins 4 critères du module « Capacités techniques » n'ont pas été évalués ou comparés au formaldéhyde. Ces alternatives ne seront pas étudiées dans la suite de la méthode.

Les 4 alternatives suivantes : Glyo-Fixx® ; RCL2-CS100® ; Weigner fixateur® et le ZBF® sont classées 1 « capacités techniques insuffisantes » et ne seront pas étudiées dans la suite de la méthode.

Au final, les 7 mélanges classés 2 « capacités techniques inférieures » à savoir le PAXgene® ; l'Excell Plus® ; le fineFix® ; le Green-Fix® ; l'HydroSafe® ; le RCL2® et l'UMFIX® sont étudiés dans la suite de la méthode.

Le procédé HOPE® est également classé 2 « capacités techniques inférieures » et sera étudié dans la suite de la méthode.

Le tableau ci-dessous récapitule les capacités techniques des alternatives qui seront étudiées dans la suite de la méthode. Il est à noter que d'une publication à l'autre, pour une même alternative testée, les conclusions des auteurs peuvent être différentes voire contradictoires selon les conditions dans lesquelles l'alternative a été utilisée. Les experts de l'Anses ont souhaité, lors de l'évaluation des critères du module « capacités techniques », retenir les évaluations donnant les meilleurs résultats pour chaque critère dans le but d'identifier des alternatives.

Tableau 31 : Bilan des capacités techniques des alternatives identifiées

| Alternative | Morph | IHC | ADN | ARN | Fish | Bioc | Cons 10 ans | Classe finale |
|--------------|-------|-----|----------------|-----|------------|------------|---------------|---------------|
| PAXgene® | eq | eq | sup/var | sup | Sup (prot) | Non évalué | Inf (18 mois) | Classe 2 |
| Excell Plus® | eq | eq | sup (inf cong) | eq | eq | Non évalué | Inf (18 mois) | Classe 2 |
| FineFix® | sup | eq | sup (inf cong) | sup | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Classe 2 |
| Green-Fix® | eq | eq | sup | sup | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Classe 2 |
| HydroSafe® | eq | eq | sup | sup | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Classe 2 |
| HOPE® | eq | sup | sup | sup | Eq (prot) | Non évalué | Non évalué | Classe 2 |
| RCL2® | eq | eq | sup (inf cong) | sup | Non évalué | Non évalué | Non évalué | Classe 2 |
| UMFIX® | eq | eq | eq | sup | eq | Non évalué | Non évalué | Classe 2 |

5.2.2 Le module « réglementation »

5.2.2.1 Identification des réglementations

Aucune réglementation nationale ou internationale interdisant l'utilisation de ces alternatives pour cet usage n'a été trouvée.

Cependant, il existe des protocoles standards internationaux permettant l'inter-comparaison des résultats à l'échelle mondiale. Dans tous les protocoles, les prélèvements sont fixés au

formaldéhyde. Ces protocoles correspondent à des pratiques professionnelles et non à une réglementation.

5.2.2.2 Conclusions du module « Réglementation »

En conclusion, l'ensemble des 8 alternatives identifiées peuvent être étudiées dans le module suivant.

5.2.3 Le module Danger « QCAT »

L'objectif de ce module est d'exclure de la suite des travaux à mener les substituts qui sont aussi ou plus dangereux que la substance à substituer.

5.2.3.1 Présentations des principes de l'outil QCAT

L'objectif de ce module « Danger » consiste à attribuer une classe finale de danger (parmi les classes suivantes : A ; B ; B_{DG} ; C ; C_{DG} ; F ou non classé) en appliquant l'outil QCAT à chacune des alternatives identifiées, c'est-à-dire soit à la substance de substitution soit à chacune des substances constituant le mélange de substitution. Toutes les substances présentes à plus de 0.1% dans le mélange sont étudiées selon QCAT, la classe de la substance la plus contraignante étant attribuée au mélange étudié.

Neuf effets sont à étudier pour ce module « Danger » et sont rappelés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 32 : Effets étudiés par l'outil QCAT

| Toxicité humaine (groupe 1) | Toxicité humaine (groupe 2) | Ecotoxicité et devenir dans l'environnement |
|--|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • cancérogénicité (C) • mutagénicité et génotoxicité (M) • toxicité pour la reproduction (R) • toxicité pour le développement (D) • activité endocrinienne (E) | <ul style="list-style-type: none"> • toxicité aiguë (AT) | <ul style="list-style-type: none"> • écotoxicité aquatique aiguë (AA) autres études d'écotoxicité (si disponibles) : <ul style="list-style-type: none"> • Persistance (P) • Bioaccumulation (B) |

L'application de l'outil QCAT permet d'attribuer des niveaux de danger pour chacun des effets à considérer parmi les six niveaux suivants (très fort (vH), fort (H), modéré (M), faible (L), très faible (vL) ou inconnu (DG)).

Pour pouvoir attribuer un niveau de danger à chacun des effets, des informations doivent d'abord être collectées. Ce travail est intégralement guidé par un tableau simplifié répertoriant les sources d'information à consulter. Cette collecte d'informations sur les dangers des substances peut nécessiter de passer par 2 étapes successives. Quelle que soit la substance, l'étape 1 de recherche est obligatoire. Les sources de l'étape 1 sont principalement des listes faisant « autorité ». L'évaluation de la substance dépend de son inclusion ou non dans une liste. Ces sources sont divisées en deux catégories : les sources prioritaires et les sources secondaires. Les sources prioritaires sont des listes d'organisations européennes ou internationales reconnues ayant examiné toutes les données de la substance. Les sources secondaires sont des listes provenant de gouvernements et d'autres organisations qui n'ont peut-être pas étudié toutes les données disponibles sur la substance.

Si des informations sont incomplètes à l'issue de l'étape 1 alors l'outil QCAT propose de les rechercher dans une liste de sources complémentaires. Ceci constitue l'étape 2 de collecte des

données. Les sources de l'étape 2 font référence à des données mesurées ou modélisées de la substance.

Les sources prioritaires de l'étape 1 sont considérées comme faisant autorité et peuvent être utilisées directement dans le processus de classement sans aucun autre examen ou recherche d'informations additionnelles. Les sources secondaires de l'étape 1 peuvent également être utilisées sans autre examen à moins que l'évaluateur décide d'examiner les sources de l'étape 2 pour obtenir des données supplémentaires.

Une fois les niveaux de danger attribués à chacun des effets, une classe finale peut être attribuée à la substance ou au mélange de substitution (Department of Ecology State of Washington 2016).

5.2.3.2 Adaptation de l'outil QCAT par les experts de l'Anses

Les experts de l'Anses ont souhaité modifier l'attribution d'un niveau de danger initialement prévu par l'outil QCAT.

Une substance présente dans la TEDX List (une des listes des potentiels perturbateurs endocriniens) entraîne d'après l'outil QCAT un niveau de danger « fort » (H) pour l'activité endocrinienne. Or, le but de cette liste est de présenter les substances chimiques pour lesquelles au moins une étude montrant un effet sur le système endocrinien a été publiée afin d'améliorer l'information des scientifiques, des gestionnaires et du public. En juin 2015, près de 1 000 substances étaient listées comme PE sur la liste TEDX. Dans cette liste, aucune classification de l'effet PE n'est proposée. Par conséquent, les experts de l'Anses ont préféré attribuer le niveau de danger « modéré » (M) pour l'activité endocrinienne lorsque la substance est présente dans cette liste plutôt que « fort » (H) qui sera réservé aux substances présentes sur des listes proposant une classification de l'effet PE, comme les listes de l'Union Européenne par exemple.

Une substance classée par la Commission MAK (Maximale Arbeitsplatz-Konzentration) de la DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) dans le groupe 5 pour la cancérogénicité (MAK Carcinogen Group 5 - Genotoxic carcinogen with very slight risk under MAK/BAT levels); ou dans le groupe 5 pour la mutagénicité ou la génotoxicité (Germ Cell Mutagen 5) ou dans le groupe C pour la toxicité sur le développement (Pregnancy Risk Group C) voit dans chaque cas attribué un niveau de danger « modéré » (M) par l'outil QCAT. Les experts de l'Anses ont considéré ces attributions trop sévères au regard de la définition de chacun des trois groupes. Par conséquent, les experts ont préféré attribuer le niveau de danger « faible » (L) pour chacun des 3 effets lorsque la substance est classée dans les 3 groupes précédemment décrits.

Une substance classée par le CIRC (Centre international de recherche sur le cancer) dans le groupe 3 « agent inclassable quant à sa cancérogénicité » se voit attribuer un niveau de danger « modéré » pour la cancérogénicité par l'outil QCAT. Les experts de l'Anses ont considéré cette attribution trop sévère au regard de la définition de ce groupe. Par conséquent, les experts ont préféré attribuer le niveau de danger « faible » (L) pour cet effet lorsque la substance est classée dans le groupe 3 par le CIRC.

Une substance possédant la mention « Some Evidence of no Adverse Effects - Reproductive Toxicity » dans une monographie de l'US NIH (National Institutes of Health) se voit attribuer un niveau de danger « modéré » (M) par l'outil QCAT. Les experts de l'Anses ont considéré cette attribution trop sévère au regard de la définition de cette mention. Par conséquent, les experts ont préféré attribuer le niveau de danger « faible » (L) pour la toxicité pour la reproduction lorsque la substance possède cette mention.

Une substance présente dans la liste intérieure des substances (DSL List) d'Environnement et Changement climatique entraîne d'après l'outil QCAT un niveau de danger « très fort » (vH) pour la persistance. Les experts de l'Anses ont jugé ce niveau de danger trop élevé et ont préféré attribuer un niveau de danger « modéré » (M) à la persistance lorsque la substance est présente dans cette liste.

5.2.3.3 Attribution des niveaux de danger

Afin d'attribuer les différents niveaux de danger aux effets, les experts de l'Anses ont suivi les règles de l'outil QCAT en les adaptant pour certaines situations décrites ci-dessous.

Une donnée rapportée dans une source prioritaire de l'étape 1 permet d'attribuer directement un niveau de danger à l'effet.

Une donnée rapportée dans une source secondaire de l'étape 1 permet d'attribuer directement un niveau de danger à l'effet. Cependant, l'outil QCAT laisse le choix aux experts de consulter s'ils le souhaitent les autres sources de l'outil. Ainsi, les experts attribuent directement un niveau de danger aux effets lorsque des informations sont trouvées dans les sources secondaires de l'étape 1 sauf dans 1 situation. Les experts de l'Anses ont considéré que la présence de la substance sur la liste intérieure des substances (DSL List) d'Environnement et Changement climatique Canada est une source pénalisante. Cette source peut, en effet, générer des niveaux de danger élevés pour certains effets pour un grand nombre de substances. Les experts ont préféré, dans ce cas, compléter leurs analyses en étudiant les données expérimentales rapportées dans les sources de l'étape 2 pour confirmer ou moduler l'attribution du niveau de danger aux effets concernés.

Lorsqu'aucune information n'est trouvée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1, les experts analysent l'ensemble des sources bibliographiques de l'étape 2. Les experts attribuent un niveau de danger à un effet en utilisant en premier lieu les données expérimentales. Les experts ont donné la priorité aux données expérimentales décrites dans la littérature en utilisant en dernier recours les données expérimentales rapportées par les industriels dans les dossiers d'enregistrement des substances disponibles sur le site de l'ECHA. En l'absence de données expérimentales, les experts se sont alors basés sur les données modélisées ou estimées décrites dans la littérature. Lorsque qu'aucune information n'était disponible, les experts se sont alors basés sur des données modélisées qu'ils ont eux-mêmes générées par les outils de type PBT Profiler ou la base de données Danish QSAR.

5.2.3.4 Evaluation des solutions à base de formaldéhyde

Identification et catégorisation des dangers du formaldéhyde (n° CAS 50-00-0)

Selon le règlement CLP, le formaldéhyde est classé cancérigène de catégorie 1B. D'après l'outil QCAT, le niveau de danger attribué à l'effet cancérigénicité est fort « H ».

Ayant un niveau de danger « fort » en santé humaine, la classe de danger finale attribuée au formaldéhyde est la classe F (substance chimique extrêmement dangereuse) d'après l'outil QCAT.

Il n'a donc pas été nécessaire d'étudier les autres effets.

Assignation de la classe de danger finale des solutions à base de formaldéhyde

Comme le formaldéhyde est classé F (classe la plus pénalisante), les autres composés de la solution de formaldéhyde à 4% n'ont pas été évalués au travers de l'outil QCAT puisque le produit se voit attribuer la classe de la substance la plus pénalisante contenue dans le mélange, c'est-à-dire la classe F.

Tableau 33 : Evaluation des mélanges à base de formaldéhyde selon l'outil QCAT

| Mélanges | Compositions | Classes de danger selon QCAT des composants | Classes de danger selon QCAT du mélange |
|-------------------------------|-----------------|---|---|
| Solution de formaldéhyde à 4% | Formaldéhyde | F | F |
| | Autres composés | Non évalué | |

5.2.3.5 Evaluation du mélange PAXgene®

Le PAXgene Tissue Container® est un mélange de 2 produits : le PAXgene Tissue STABILIZER® et le PAGgene Tissue FIX®.

D'après la fiche de données de sécurité (FDS) disponible sur le site internet de la société Preanalytix GmbH, le mélange PAXgene Tissue Container® contient de l'éthanol (n° CAS 64-17-5) (≥ 30% et < 50%), du méthanol (n°67-56-1) (≥ 30% et < 50%) et de l'acide acétique (n° CAS 64-19-7) (≥ 5% et < 10%) (Preanalytix GmbH 2017).

Identification et catégorisation des dangers du méthanol (n° CAS 67-56-1)

Le tableau ci-dessous détaille la synthèse des informations permettant d'attribuer un niveau de danger à chacun des effets étudiés selon l'outil QCAT pour le méthanol (n° CAS 67-56-1).

Tableau 34 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil QCAT pour le méthanol

| | Toxicité humaine (groupe 1) | | | | |
|---------------------|--|--|---|---|----------------------------------|
| Effets | C | M | R | D | E |
| Données disponibles | (HSDB) Etudes négatives chez l'animal | (HSDB) Résultats négatifs in vitro (test AMES, analyse de micronoyaux) Résultats négatifs in vivo (analyse de micronoyaux) | (U.S. Department of Health and Human Services 2003) « Insufficient Evidence for a Conclusion - Reproductive Toxicity » | (Grandjean et Landrigan 2006) Substance listée | (Liste TEDX) Substance listée |
| | Toxicité humaine (groupe 2) | | Ecotoxicité | Devenir dans l'environnement | |
| Effets | AT | | AA | P | B |
| Données disponibles | (Règlement CLP) H301 – Toxique en cas d'ingestion H311 – Toxique par contact cutané H331 - Toxique par inhalation | | (OCDE 2004b) CL ₅₀ (poisson, 96h) : 15,4-29,4 g/L CE ₅₀ (daphnie, 48h) > 10g/L | (EC – CEPA DSL) Substance listée comme persistante | (HSDB) BCF < 10 |

Concernant la cancérogénicité, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. En se basant sur les résultats négatifs chez l'animal décrits dans HSDB (Hazardous Substances Data Bank), les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) à cet effet.

Concernant la mutagénicité et la génotoxicité, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. En se basant sur les résultats négatifs des essais in vitro et in vivo décrits dans HSDB, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) à cet effet.

Concernant la toxicité pour la reproduction, la substance fait l'objet d'une monographie de l'US NIH sur les effets sur les fonctions de reproduction et de développement. La substance se voit attribuer la mention : « Insufficient Evidence for a Conclusion - Reproductive Toxicity ». Cette classification fait partie des sources prioritaires de l'étape 1 de l'outil QCAT qui attribue un niveau de danger « modéré » (M) à cet effet.

Concernant la toxicité pour le développement (incluant le neurodéveloppement) la substance est présente dans la liste des 201 substances connues pour être neurotoxiques pour le développement. Cette classification fait partie des sources secondaires de l'étape 1 de l'outil QCAT qui attribue un niveau de danger « fort » (H) à cet effet.

Concernant l'activité endocrinienne, la substance est présente dans la TEDX List, la liste des potentiels perturbateurs endocriniens. Cette classification fait partie des sources secondaires de l'étape 1, les experts attribuent un niveau de danger « modéré » (M) à cet effet.

Concernant la toxicité aiguë, plusieurs classifications ont été trouvées dans les sources prioritaires de l'étape 1. La substance est classée « H301- Toxique en cas d'ingestion ; H311 - Toxique par contact cutané ; H331 - Toxique par inhalation » par le règlement CLP. Ces classifications font parties des sources prioritaires de l'étape 1 de l'outil QCAT qui attribue un niveau de danger « fort » (H) à cet effet.

Concernant la toxicité aquatique aiguë, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. Ainsi, les experts de l'Anses se sont appuyés sur les données expérimentales de CL₅₀ (poisson, 96h) : 15,4-29,4 g/L et de CE₅₀ (daphnie, 48h) > 10g/L décrites dans la fiche SIDS évaluant le méthanol pour attribuer un niveau de danger « faible » (L) puisque les valeurs sont toutes supérieures à 100 mg/L.

Concernant la persistance, la substance est décrite comme persistante dans la liste intérieure des substances (DSL List) d'Environnement et Changement climatique Canada. Cette classification fait partie des sources secondaires de l'étape 1, les experts attribuent un niveau de danger « modéré » (M) à cet effet.

Concernant la bioaccumulation, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Aucune donnée expérimentale n'ayant été trouvée, les experts de l'Anses se sont appuyés sur un BCF inférieur à 10 mesuré chez le poisson pour attribuer un niveau de danger « très faible » (vL) puisque cette valeur est inférieure à 100.

Le tableau ci-dessous décrit l'attribution des niveaux de danger au regard des données identifiées.

Tableau 35 : Niveaux de danger attribués aux effets du méthanol selon l'outil QCAT

| Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | | | | | | | Ecotoxicité | | Devenir dans l'environnement | | Propriétés physico-chimiques | |
|-----------------------------|---|---|---|---|-----------------------------|----|---|-----|-----|-----|-----|-------------|----|------------------------------|----|------------------------------|---|
| C | M | R | D | E | AT | ST | N | SnS | SnR | Irs | IrE | AA | CA | P | B | Rx | F |
| L | L | M | H | M | H | | | | | | | L | | M | vL | | |

Concernant la toxicité sur le développement, la substance possède un niveau de danger « élevé » (H). En appliquant l'outil QCAT, la substance est par conséquent classée F (substance chimique extrêmement dangereuse).

Evaluation du mélange PAXgene®

Dans la mesure où une des substances composant le mélange est classée F selon l'outil QCAT, le mélange PAXgene® se voit attribuer la classe de la substance la plus pénalisante contenue dans le mélange, c'est-à-dire la classe F « substance extrêmement dangereuse ».

Tableau 36 : Evaluation du mélange PAXgene® selon l'outil QCAT

| Mélanges | Compositions | Classes de danger selon QCAT des composants | Classes de danger selon QCAT du mélange |
|----------|-----------------|---|---|
| Paxgene® | Méthanol | F | F |
| | Autres composés | Non évalués | |

5.2.3.6 Evaluation du mélange Excell Plus®

D'après la fiche de données de sécurité (FDS) disponible sur le site internet de la société American MasterTech, le mélange Excell Plus® contient du glyoxal (n° CAS 107-22-2) (< 25%), de l'éthylène-glycol (n° CAS 107-21-1) (< 10%) et de l'éthanol (n° CAS 64-17-5) (< 10%) (American MasterTech 2017).

L'Anses a demandé à l'INRS d'interroger les bases de données SEPIA et ORFILA afin d'obtenir des informations complémentaires sur la composition des mélanges. Aucune autre information supplémentaire à celles présentes dans la FDS n'a pu être transmise à l'Anses.

Identification et catégorisation des dangers du glyoxal (n° CAS 107-22-2)

Le tableau ci-dessous détaille la synthèse des informations permettant d'attribuer un niveau de danger à chacun des effets étudiés selon l'outil QCAT pour le glyoxal (n° CAS 107-22-2).

Tableau 37 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil QCAT pour le glyoxal

| | Toxicité humaine (groupe 1) | | | | |
|---------------------|--|---|---|---|----------------|
| Effets | C | M | R | D | E |
| Données disponibles | (MAK) Groupe 3B « Evidence of carcinogenic effects but not sufficient for classification » | (Règlement CLP) H341 - Susceptible d'induire des anomalies génétiques | (IUCLID-Echa) Pas d'effet rapporté sur la fertilité dans étude sur 2 générations | (OCDE 2003) Pas d'effet observé dans une étude de tératogénèse chez le rat | Pas de données |
| | Toxicité humaine (groupe 2) | Ecotoxicité | Devenir dans l'environnement | | |
| Effets | AT | AA | P | B | |
| Données disponibles | (Règlement CLP) H332 - Nocif par inhalation | (GHS Japon : NITE-CHIRP) « Hazardous to the aquatic environment (acute) - Category 3 » | (HSDB) $t_{1/2}$ (air) = 34h (PBT Profiler) de $t_{1/2}$ (eau) = 15 jours | (HSDB) BCF = 3 Log Kow = -1.66 | |

Concernant l'activité endocrinienne, aucune information n'a été trouvée dans l'ensemble des sources à consulter dans l'outil QCAT. Un « manque de données » (DG) est attribué à cet effet.

Concernant la cancérogénicité, la substance est classée par la MAK dans le Groupe 3B. Cette classification fait partie des sources prioritaires de l'étape 1 de l'outil QCAT qui attribue un niveau de danger « modéré » (M) à cet effet.

Concernant la mutagénicité et la génotoxicité, la substance est classée « H 341 - Susceptible d'induire des anomalies génétiques ». Cette classification fait partie des sources prioritaires de l'étape 1 de l'outil QCAT qui attribue un niveau de danger « modéré » (M) à cet effet.

Concernant la toxicité pour la reproduction, aucune information n'a été trouvée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. Les seules données expérimentales trouvées sur cet effet proviennent de la consultation du dossier d'enregistrement de la substance sur le site de l'Echa. Les experts de l'Anses se sont basés sur l'absence d'effet rapporté sur la fertilité dans une étude de 2 générations pour attribuer un niveau de danger « faible » (L) à cet effet.

Concernant la toxicité pour le développement, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. En se basant sur l'absence d'effet observé dans une étude de tératogénèse décrite dans la fiche SIDS évaluant le glyoxal, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) à cet effet.

Concernant la toxicité aiguë, la substance est classée « H332 – Nocif par inhalation » par le règlement CLP. Cette classification fait partie des sources prioritaires de l'étape 1 de l'outil QCAT qui attribue un niveau de danger « modéré » (M) à cet effet.

Concernant la toxicité aquatique aiguë, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires de l'étape 1. La substance est classée « Hazardous to the aquatic environment (acute) - Category 3 » par le GHS du Japon. Cette classification fait partie des sources secondaires de l'étape 1 de l'outil QCAT qui attribue un niveau de danger « modéré » (M) à cet effet.

Concernant la persistance, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. En se basant sur les données de $t_{1/2}$ (air) à 34 heures décrites dans HSDB et $t_{1/2}$ (eau) à 15 jours estimée par PBT profiler, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) à cet effet puisque ces valeurs sont respectivement inférieures à 2 jours et 16 jours.

Concernant la bioaccumulation, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Aucune donnée expérimentale n'ayant été trouvée, les experts de l'Anses se sont appuyés sur un BCF de 3 et un log Kow de 0,44 estimés pour attribuer un niveau de danger « très faible » (vL) puisque ces valeurs sont respectivement inférieures à 100 et 4.

Le tableau ci-dessous décrit l'attribution des niveaux de danger du glyoxal au regard des données identifiées.

Tableau 38 : Niveaux de danger attribués aux effets du glyoxal selon l'outil QCAT

| Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | | | | | | | Ecotoxicité | | Devenir dans l'environnement | | Propriétés physico-chimiques | |
|-----------------------------|---|---|---|----|-----------------------------|----|---|-----|-----|-----|-----|-------------|----|------------------------------|----|------------------------------|---|
| C | M | R | D | E | AT | ST | N | SnS | SnR | Irs | IrE | AA | CA | P | B | Rx | F |
| M | M | L | L | DG | M | | | | | | | M | | L | vL | | |

Concernant la mutagénicité et la génotoxicité, la substance possède un niveau de danger « modéré » (M). En appliquant l'outil QCAT, la substance est par conséquent classée B (substance chimique dangereuse).

Pour pouvoir attribuer une classe finale à la substance, les données manquantes doivent être analysées. Aucune des conditions décrites dans l'outil QCAT n'est remplie pour renforcer le classement de la substance. Par conséquent, la substance reste classée B.

Identification et catégorisation des dangers de l'éthylène-glycol (n° CAS 107-21-1)

Le tableau ci-dessous détaille la synthèse des informations permettant d'attribuer un niveau de danger à chacun des effets étudiés selon l'outil QCAT pour l'éthylène-glycol (n° CAS 107-21-1).

Tableau 39 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil QCAT pour l'éthylène glycol

| Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | |
|-----------------------------|--|--|---|--|----------------------------------|
| Effets | C | M | R | D | E |
| Données disponibles | (HSDB) Pas d'effets observés dans les études animales | (HSDB) Résultats négatifs in vitro et in vivo (certains tests équivoques) | (U.S. Department of Health and Human Services 2004a) « Some Evidence of no Adverse Effects - Reproductive Toxicity » | (MAK) Pregnancy Risk Group C (U.S. Department of Health and Human Services 2004a) « Negligible concern for adverse effects » (Evaluation pour l'Homme) | (Liste TEDX) Substance listée |
| Toxicité humaine (groupe 2) | | | | | |
| Effets | AT | AA | Devenir dans l'environnement | | |
| Données disponibles | (Règlement CLP) « H302 - Nocif en cas d'ingestion » | (OCDE 2004a) CE ₅₀ (fish) > 22800 mg/L CE ₅₀ (Daphnia) >20000 mg/L | (HSDB) t _{1/2} (air) = 2 jours (valeur estimée) | (HSDB) BCF = 190 (algues) | |

Concernant la cancérogénicité, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. En se basant sur l'absence d'effets observés dans les études animales décrites dans HSDB, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) à cet effet.

Concernant la mutagénicité et la génotoxicité, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. En se basant sur les résultats négatifs de tests in vitro et in vivo décrits dans HSDB, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) à cet effet.

Concernant la toxicité pour la reproduction, la substance fait l'objet d'une monographie de l'US NIH (National Institutes of Health) sur les effets sur les fonctions de reproduction et de développement. La substance se voit attribuer la mention : « Some Evidence of no Adverse Effects - Reproductive Toxicity ». Cette classification fait partie des sources prioritaires de l'étape 1, les experts attribuent un niveau de danger « faible » (L) à cet effet.

Concernant la toxicité pour le développement (incluant le neurodéveloppement), la substance fait l'objet d'une monographie de l'US NIH sur les effets sur les fonctions de reproduction et de développement. La substance se voit attribuer la mention : « Negligible concern for adverse effects ». De plus, la substance est classée par la MAK dans le groupe C pour la toxicité sur le développement. Les experts attribuent un niveau de danger « faible » (L) à cet effet.

Concernant l'activité endocrinienne, la substance est présente dans la TEDX List, la liste des potentiels perturbateurs endocriniens. Cette classification fait partie des sources secondaires de l'étape 1, les experts attribuent un niveau de danger « modéré » (M) à cet effet.

Concernant la toxicité aiguë, la substance est classée « H302 – Nocif en cas d'ingestion » par le règlement CLP. Cette classification fait partie des sources prioritaires de l'étape 1 de l'outil QCAT qui attribue un niveau de danger « modéré » (M) à cet effet.

Concernant la toxicité aquatique aiguë, aucune information n'a été trouvée dans les sources prioritaires et secondaires de l'étape 1. Les seules données expérimentales trouvées sur cet effet proviennent de la consultation de la fiche SIDS de la substance. Les experts de l'Anses se sont appuyés sur les valeurs de CE₅₀ pour attribuer un niveau de danger « faible » (L) à cet effet dans la mesure où les 2 valeurs sont supérieures à 100 mg/L.

Concernant la persistance, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. En se basant sur la donnée de t_{1/2} (air) à 2 jours décrite dans HSDB, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) à cet effet.

Concernant la bioaccumulation, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Les experts de l'Anses se sont appuyés sur un BCF de 190 mesuré dans les algues pour attribuer un niveau de danger « faible » (L) puisque cette valeur est comprise entre 100 et 500.

Le tableau ci-dessous décrit l'attribution des niveaux de danger de l'éthylène-glycol au regard des données identifiées.

Tableau 40 : Niveaux de danger attribués aux effets de l'éthylène glycol selon l'outil QCAT

| Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | | | | | | | Ecotoxicité | | Devenir dans l'environnement | | Propriétés physico-chimiques | |
|-----------------------------|---|---|---|---|-----------------------------|----|---|-----|-----|-----|-----|-------------|----|------------------------------|---|------------------------------|---|
| C | M | R | D | E | AT | ST | N | SnS | SnR | Irs | IrE | AA | CA | P | B | Rx | F |
| L | L | L | L | M | M | | | | | | | L | | L | L | | |

Concernant la perturbation endocrinienne, la substance possède un niveau de danger « modéré » (M). En appliquant l'outil QCAT, la substance est par conséquent classée B (substance chimique dangereuse).

Pour pouvoir attribuer une classe finale à la substance, les données manquantes doivent être analysées. Aucune des conditions décrites dans l'outil QCAT n'est remplie pour renforcer le classement de la substance. Par conséquent, la substance reste classée B (substance chimique dangereuse).

Identification et catégorisation des dangers de l'éthanol (n° CAS 64-17-5)

De nombreuses études évaluant les dangers de l'éthanol sont disponibles dans la littérature scientifique. Toutefois, la très grande majorité de ces études et leurs conclusions concernent des scénarios d'exposition par ingestion de boissons alcoolisées. Étant donné que ces études visent à examiner les effets de l'alcoolisme, les doses utilisées sont extrêmement élevées et ne peuvent pas être considérées comme représentatives de celles pouvant résulter d'une exposition par inhalation ou par voie cutanée lors de la manipulation d'éthanol ou de produits chimiques contenant de l'éthanol en milieu professionnel.

Ainsi, l'Afset a mené une évaluation des risques de l'éthanol en population professionnelle dans un rapport de 2010 (Anses 2010) et pour la population générale dans un rapport de 2011 (Anses 2011). Ces rapports, qui se sont intéressés à l'évaluation des effets de l'éthanol consécutifs à une exposition par inhalation, indiquent que de nombreuses études épidémiologiques et toxicologiques montrent que la consommation de boissons alcoolisées augmente le risque de cancer et que des effets délétères sur la reproduction et le développement, le foie ainsi que sur le système nerveux central et périphérique sont observés. Cependant, ces effets seraient liés à la survenue de pics d'éthanolémie consécutifs à l'ingestion de 10 g d'éthanol par jour (soit environ 10 cL de vin)⁴. En l'état actuel des connaissances, les effets toxiques de l'éthanol, liés à une exposition chronique par

⁴ Une éthanolémie maximale obtenue par l'ingestion de 8.5g d'alcool (soit 1 verre de vin standard) survient environ 20 min (estomac vide) à 1 heure (avec un repas) après et atteint la valeur de 150 mg/L (Inserm, 2001)

inhalation ou par contact cutané sont peu documentés chez l'Homme. Par ailleurs, les quelques études sur l'animal concernant l'absorption d'éthanol par voie respiratoire ne mettent pas en évidence d'effet sur la reproduction ou le développement.

L'extrapolation des relations dose-réponse obtenues par voie orale aux voies respiratoire ou cutanée n'est pas jugée pertinente, notamment au regard des différences des profils toxicocinétiques (Anses 2011).

Par inhalation, on n'observe pas de pic de l'éthanolémie. Une exposition à de très fortes concentrations atmosphériques d'éthanol ne correspondant pas aux situations rencontrées lors des expositions professionnelles serait nécessaire⁵. Aussi, les effets toxiques, comme observés suite à l'ingestion de boissons alcoolisées, ne peuvent être observés chez l'Homme suite à une exposition professionnelle par inhalation (Anses 2010).

Ainsi les résultats de ces travaux d'expertise (Anses 2010) n'ont pas permis de mettre en évidence de risque chronique pour la santé, spécifiquement lié à une exposition professionnelle par inhalation ou par contact cutané. En effet, les valeurs d'éthanolémie estimées pour les situations professionnelles les plus exposantes n'étaient pas discernables de l'éthanolémie basale (présente naturellement dans l'organisme en dehors de toute ingestion d'éthanol).

Une rapide revue de la littérature n'ayant pas apporté d'éléments de nature à remettre en cause ces travaux, les experts ont donc décidé de ne pas tenir compte des études se basant sur une exposition via l'ingestion de boissons alcoolisées pour l'attribution des niveaux de danger dans QCAT et en particulier pour les effets CMR. Les experts de l'Anses ont été attentifs à ce que les doses d'exposition utilisées dans les études retenues, quelles que soient les voies d'exposition, soient cohérentes avec les niveaux d'exposition professionnelle.

Le tableau ci-dessous détaille la synthèse des informations permettant d'attribuer un niveau de danger à chacun des effets étudiés selon l'outil QCAT pour l'éthanol (n° CAS 64-17-5).

⁵ l'annexe 11 du rapport Anses de 2010 indique que, pour atteindre une éthanolémie de 150 mg/L par inhalation, il faut une exposition continue de 8h à une concentration située entre 10 000 et 20 000 ppm (selon DECOS, 2006, p47)

Tableau 41 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil QCAT pour l'éthanol

| | Toxicité humaine (groupe 1) | | | | |
|---------------------|---|--|---|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Effets | C | M | R | D | E |
| Données disponibles | (MAK) « Carcinogen Group 5 - Genotoxic carcinogen with very slight risk under MAK/BAT levels » | (MAK) « Germ Cell Mutagen 5 » | (OCDE 2005) Pas d'effet rapporté à des doses pertinentes | (MAK) « Pregnancy Risk Group C » | (Liste TEDX) Substance listée |
| | Toxicité humaine (groupe 2) | Ecotoxicité | Devenir dans l'environnement | | |
| Effets | AT | AA | P | | B |
| Données disponibles | (HSDB) DL 50 (voie orale, rat) : 7000 mg/kg | (HSDB) EC 50 (algues vertes, 48h) : 9310 mg/L LC 50 (<i>Gammarus fasciatus</i> , 96h) >100 mg/L | (EC – CEPA DSL) Substance listée comme persistante (OCDE 2005) t _{1/2} air = 10 heures (photodégradation basée sur des constantes mesurées) (IUCLID – Echa) Test de biodégradation facile. Une dégradation de 74% de la substance est rapportée dans la fenêtre des 10 jours. Après 15 jours, la substance est dégradée à 95% | | (HSDB) BCF = 3 Log Kow = 0.44 |

Concernant la cancérogénicité, les classifications issues des sources prioritaires de l'étape 1 (OEHHA – proposition 65 ; CIRC Groupe 1) concernant l'éthanol *via* la consommation de boissons alcoolisées n'ont pas été retenues pour attribuer un niveau de danger à cet effet. La substance est classée « Carcinogen Group 5 » par la MAK. Cette classification fait partie des sources prioritaires de l'étape 1 de l'outil QCAT qui attribue un niveau de danger « Faible » (L) à cet effet.

Concernant la mutagénicité et la génotoxicité, la substance est classée « Germ Cell Mutagen 5 » par la MAK. Cette classification fait partie des sources prioritaires de l'étape 1 de l'outil QCAT qui attribue un niveau de danger « faible » (L) à cet effet.

Concernant la toxicité pour la reproduction, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires de l'étape 1. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. En se basant sur les résultats décrits à des doses pertinentes dans le rapport de l'OCDE, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) à cet effet.

Concernant la toxicité pour le développement, la classification issue de la source prioritaire de l'étape 1 (OEHHA – proposition 65) concernant l'éthanol *via* la consommation de boissons alcoolisées n'a pas été retenue pour attribuer un niveau de danger à cet effet. La substance est classée « Pregnancy Risk Group C » par la MAK. Cette classification fait partie des sources prioritaires de l'étape 1 de l'outil QCAT qui attribue un niveau de danger « faible » (L) à cet effet.

Concernant l'activité endocrinienne, la substance est présente dans la TEDX List, la liste des potentiels perturbateurs endocriniens. Cette classification fait partie des sources secondaires de l'étape 1, les experts attribuent un niveau de danger « modéré » (M) à cet effet.

Concernant la toxicité aiguë, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. En se basant sur les DL₅₀ décrites dans HSDB, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) à cet effet puisque ces valeurs sont supérieures à 2000 mg/kg.

Concernant la toxicité aquatique aiguë, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. Ainsi, les experts de l'Anses se sont appuyés sur les données de LC 50 (poisson, 96h) > 100 mg/L et de EC 50 (algues vertes, 48h) = 9310 mg/L décrites dans HSDB pour attribuer un niveau de danger « faible » (L) puisque les valeurs sont toutes supérieures à 100 mg/L.

Concernant la persistance, la substance est décrite comme persistante dans la liste intérieure des substances (DSL List) d'Environnement et Changement climatique Canada. Cette classification, issue d'une source secondaire de l'étape 1, permettrait d'attribuer un niveau de danger « très fort » (vH) à cet effet. Cependant, les experts de l'Anses ont souhaité examiner les sources de l'étape 2 pour obtenir des données supplémentaires. Des données expérimentales ont été identifiées lors de la consultation du dossier d'enregistrement de la substance sur le site de l'Echa. Plus de 70% de la substance est dégradée dans la fenêtre des 10 jours. De plus, un t_{1/2} air de 10 heures basé sur des constantes mesurées est rapporté dans le rapport de l'OCDE. Dans la mesure où ce t_{1/2} est inférieur à 2 jours et où un test de dégradation dans la fenêtre de 10 jours est rapporté, les experts de l'Anses ont préféré accorder plus de poids aux données expérimentales décrites dans la littérature pour attribuer un niveau de danger « très faible » (vL).

Concernant la bioaccumulation, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Aucune donnée expérimentale n'ayant été trouvée, les experts de l'Anses se sont appuyés sur un BCF de 3 et un log Kow de 0,44 estimés pour attribuer un niveau de danger « très faible » (vL) puisque ces valeurs sont respectivement inférieures à 100 et 4.

Le tableau ci-dessous décrit l'attribution des niveaux de danger au regard des données identifiées.

Tableau 42 : Niveaux de danger attribués aux effets de l'éthanol selon l'outil QCAT

| Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | | | | | | | | Ecotoxicité | | | Devenir dans l'environnement | | Propriétés physico-chimiques | |
|-----------------------------|---|---|---|---|-----------------------------|----|---|-----|-----|-----|-----|----|-------------|----|----|------------------------------|----|------------------------------|--|
| C | M | R | D | E | AT | ST | N | SnS | SnR | Irs | IrE | AA | CA | Eo | P | B | Ex | F | |
| L | L | L | L | M | L | | | | | | | L | | | vL | vL | | | |

La substance possède un niveau de danger modéré (M) sur l'activité endocrinienne. Selon l'outil QCAT, la substance se voit attribuer une classification initiale de B (substance chimique dangereuse).

Pour pouvoir attribuer une classe finale à la substance, les données manquantes doivent être analysées. Aucune des conditions décrites dans l'outil QCAT n'est remplie pour renforcer le classement de la substance. Par conséquent, la substance reste classée B (substance chimique dangereuse).

Evaluation du mélange Excell Plus®

Le mélange Excell Plus® se voit attribuer la classe de la substance la plus pénalisante contenue dans le mélange, c'est-à-dire la classe B « substance chimique dangereuse ».

Tableau 43 : Evaluation des produits Excell Plus® selon l'outil QCAT

| Alternatives potentielles | Compositions | Classes de danger selon QCAT des composants | Classes de danger selon QCAT du mélange |
|---------------------------|-----------------|---|---|
| Le mélange Excell Plus® | Glyoxal | B | B |
| | Ethylène-glycol | B | |
| | Ethanol | B | |

5.2.3.7 Evaluation du mélange FineFix®

D'après les informations décrites dans la littérature qui ont permis d'évaluer les capacités techniques de ce produit, le mélange FineFix® contient de l'éthanol (n° CAS 64-17-5), de l'eau distillée, du propylène-glycol (n° CAS 57-55-6), de l'alcool polyvinylique (n° CAS 9002-89-5) et un monosaccharide dont l'identité est inconnue.

D'après la fiche de données de sécurité (FDS) disponible sur le site internet de la société Milestone, le mélange FineFix concentré contient de l'alcool polyvinylique (n° CAS 9002-89-5) ; du propylène-glycol (n° CAS 57-55-6) et du sorbitol (n° CAS 50-70-4) et doit être dilué dans de l'éthanol (n° CAS 64-17-5) (Milestone 2015a).

L'Anses a demandé à l'INRS d'interroger les bases de données SEPIA et ORFILA afin d'obtenir des informations complémentaires sur la composition des mélanges. Les seules informations supplémentaires obtenues par rapport à celles figurant dans la FDS sont les pourcentages exacts de chacun des constituants du Finefix concentré.

Chacune des substances a été analysée au travers de l'outil QCAT.

Identification et catégorisation des dangers de l'éthanol (n° CAS 64-17-5)

L'éthanol a été déjà précédemment évalué au travers de l'outil QCAT. La substance est classée B (substance chimique dangereuse).

Identification et catégorisation des dangers de l'alcool polyvinylique (n° CAS 9002-89-5)

Le tableau ci-dessous détaille la synthèse des informations permettant d'attribuer un niveau de danger à chacun des effets étudiés selon l'outil QCAT pour l'alcool polyvinylique (n° CAS 9002-89-5).

Tableau 44 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil QCAT pour l'alcool polyvinylique

| | Toxicité humaine (groupe 1) | | | | |
|---------------------|--|----------------|---|--|----------------|
| Effets | C | M | R | D | E |
| Données disponibles | (CIRC) Groupe 3 « Agent inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'Homme » | Pas de données | (HSDB) Etude de 2 générations chez le rat NOAEL = 5000mg/kg/j | Pas de données | Pas de données |
| | Toxicité humaine (groupe 2) | Ecotoxicité | Devenir dans l'environnement | | |
| Effets | AT | AA | P | B | |
| Données disponibles | Pas de données | Pas de données | (HSDB) Test de Zahn-Wellens (microorganismes non adaptés) 20, 50, 90% de la substance dégradée respectivement en 17, 24, 28 jours | (HSDB) BCF < 7.5 (mesuré chez la carpe) | |

Concernant la mutagénicité et la génotoxicité, la toxicité pour le développement, l'activité endocrinienne, la toxicité aiguë et la toxicité aquatique aiguë, aucune information n'a été trouvée dans l'ensemble des sources à consulter dans l'outil QCAT. Un « manque de données » (DG) est attribué à chacun de ces effets.

Concernant la cancérogénicité, la substance est classée dans le Groupe 3 « Agent inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'Homme » par le CIRC. Cette classification fait partie des sources prioritaires de l'étape 1 de l'outil QCAT qui attribue un niveau de danger « faible » (L) à cet effet.

Concernant la toxicité pour la reproduction, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. Ainsi, les experts de l'Anses se sont appuyés sur la NOAEL établie dans une étude de 2 générations pour attribuer un niveau de danger « faible » (L) puisque la valeur est supérieure à 250 mg/kg/j.

Concernant la persistance, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. Les experts de l'Anses se sont appuyés sur le fait que la substance ne soit pas dégradée à 70% en 7 jours pour attribuer un niveau de danger « modéré » (M) à cet effet.

Concernant la bioaccumulation, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour

évaluer cet effet. Les experts de l'Anses se sont appuyés sur un BCF inférieur à 7,5 pour attribuer un niveau de danger « très faible » (vL) à cet effet puisque cette valeur est inférieure à 100.

Le tableau ci-dessous décrit l'attribution des niveaux de danger de l'alcool polyvinylique au regard des données identifiées.

Tableau 45 : Niveaux de danger attribués aux effets de l'alcool polyvinylique selon l'outil QCAT

| Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | | | | | | | Ecotoxicité | | Devenir dans l'environnement | | Propriétés physico-chimiques | |
|-----------------------------|----|---|----|----|-----------------------------|----|---|-----|-----|-----|-----|-------------|----|------------------------------|----|------------------------------|---|
| C | M | R | D | E | AT | ST | N | SnS | SnR | Irs | IrE | AA | CA | P | B | Rx | F |
| L | DG | L | DG | DG | DG | | | | | | | DG | | M | vL | | |

Concernant la persistance, la substance possède un niveau de danger « modéré » (M). Par conséquent, la substance se voit attribuer la classe initiale B (substance chimique dangereuse).

Pour pouvoir attribuer une classe finale à la substance, les données manquantes doivent être analysées. Des données sont manquantes pour au moins 3 effets relatifs à la santé humaine, la substance se voit donc attribuer la classe finale « non classé ».

Identification et catégorisation des dangers du propylène glycol (n° CAS 57-55-6)

Le tableau ci-dessous détaille la synthèse des informations permettant d'attribuer un niveau de danger à chacun des effets étudiés selon l'outil QCAT pour le propylène glycol (n° CAS 57-55-6).

Tableau 46 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil QCAT pour le propylène glycol

| Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | |
|-----------------------------|--|--|--|---|----------------|
| Effets | C | M | R | D | E |
| Données disponibles | (OCDE 2001) Les résultats des études disponibles indiquent que la substance n'est pas cancérigène | (OCDE 2001) Les résultats des études disponibles indiquent que la substance n'est ni mutagène, ni génotoxique | (U.S. Department of Health and Human Services 2004b) « Clear Evidence of no Adverse Effects - Reproductive Toxicity » | (U.S. Department of Health and Human Services 2004b) « Clear Evidence of no Adverse Effects - Developmental Toxicity » | Pas de données |
| Toxicité humaine (groupe 2) | | | | | |
| Effets | AT | AA | P | B | |
| Données disponibles | (HSDB) DL ₅₀ (rat, souris, lapin, chien, cochons d'inde, voie orale) entre 18 et 24,9 g/kg DL ₅₀ (lapin, voie cutanée) = 20,8 g/kg | (HSDB) CL ₅₀ (daphnies, 48h) > 18 g/L | (HSDB) t _{1/2} (air) = 32 heures (PBT Profiler) de t _{1/2} (eau) = 8,7 jours | (HSDB) BCF = 3 | |

Concernant l'activité endocrinienne, aucune information n'a été trouvée dans l'ensemble des sources à consulter dans l'outil QCAT. Un « manque de données » (DG) est attribué à cet effet.

Concernant la cancérogénicité, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. En se basant sur les résultats négatifs des études disponibles décrites dans HSDB et dans la fiche SIDS de la substance, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L).

Concernant la mutagénicité et la génotoxicité, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. En se basant sur les résultats négatifs des études disponibles décrites dans HSDB et dans la fiche SIDS de la substance, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L).

Concernant la toxicité pour la reproduction, la substance fait l'objet d'une monographie de l'US NIH sur les effets sur les fonctions de reproduction et de développement. La substance se voit attribuer la mention : « Clear Evidence of no Adverse Effects - Reproductive Toxicity ». Cette classification fait partie des sources prioritaires de l'étape 1 de l'outil QCAT qui attribue un niveau de danger « faible » (L) à cet effet.

Concernant la toxicité pour le développement, la substance fait l'objet d'une monographie de l'US NIH sur les effets sur les fonctions de reproduction et de développement. La substance se voit attribuer la mention : « Clear Evidence of no Adverse Effects - Developmental Toxicity ». Cette classification fait partie des sources prioritaires de l'étape 1 de l'outil QCAT qui attribue un niveau de danger « faible » (L) à cet effet.

Concernant la toxicité aiguë, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. En se basant sur les valeurs de DL₅₀ décrites dans HSDB, les experts ont attribué un niveau de danger « faible » (L) à cet effet puisque les valeurs sont toutes supérieures à 2000 mg/kg.

Concernant la toxicité aquatique aiguë, aucune information n'a été trouvée dans les sources prioritaires et secondaires de l'étape 1. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. Les experts de l'Anses se sont appuyés sur les valeurs de CL₅₀ décrites dans HSDB pour attribuer un niveau de danger « faible » (L) à cet effet puisque les valeurs sont supérieures à 100 mg/L.

Concernant la persistance, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. En se basant sur les données de t_{1/2} (air) à 32 heures estimée dans HSDB et t_{1/2} (eau) à 8,7 jours estimée par PBT profiler, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) à cet effet puisque ces valeurs sont respectivement inférieures à 2 jours et 16 jours.

Concernant la bioaccumulation, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. Les experts de l'Anses se sont appuyés sur un BCF estimé à 3 pour attribuer un niveau de danger « très faible » (vL) puisque cette valeur est inférieure 100.

Le tableau ci-dessous décrit l'attribution des niveaux de danger du propylène glycol au regard des données identifiées.

Tableau 47 : Niveaux de danger attribués aux effets du propylène glycol selon l'outil QCAT

| Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | | | | | | Ecotoxicité | | Devenir dans l'environnement | | Propriétés physico-chimiques | | |
|-----------------------------|---|---|---|----|-----------------------------|----|---|-----|-----|-----|-------------|----|------------------------------|---|------------------------------|----|---|
| C | M | R | D | E | AT | ST | N | SnS | SnR | Irs | IrE | AA | CA | P | B | Rx | F |
| L | L | L | L | DG | L | | | | | | | L | | L | vL | | |

La substance possède des niveaux de danger « faible » (L) ou « très faible » (vL) sur tous les effets documentés. Par conséquent, la substance se voit attribuer la classe initiale A (substance chimique peu dangereuse).

Pour pouvoir attribuer une classe finale à la substance, les données manquantes doivent être analysées. L'activité endocrinienne n'a pas été évaluée par manque de données. D'après l'outil QCAT, la substance se voit donc attribuer la classe finale B_{DG} (substance chimique dangereuse par manque de données).

Identification et catégorisation des dangers du sorbitol (n° CAS 50-70-4)

Le tableau ci-dessous détaille la synthèse des informations permettant d'attribuer un niveau de danger à chacun des effets étudiés selon l'outil QCAT pour le sorbitol (n° CAS 50-70-4).

Tableau 48 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil QCAT pour le sorbitol

| | Toxicité humaine (groupe 1) | | | | |
|---------------------|---|----------------|--|-------------------|----------------|
| Effets | C | M | R | D | E |
| Données disponibles | Pas de données | Pas de données | (HSDB) Pas d'effets observés dans une étude de 3 générations | Pas de données | Pas de données |
| | | | | | |
| | Toxicité humaine (groupe 2) | Ecotoxicité | Devenir dans l'environnement | | |
| Effets | AT | AA | P | B | |
| Données disponibles | (HSDB) DL ₅₀ (rat, voie orale) = 15,9 g/kg DL ₅₀ (souris, voie orale) = 17,8 g/kg | Pas de données | (PBT Profiler) t _{1/2} (eau) = 8,7 jours t _{1/2} (sol) = 4,7 jours | (HSDB) BCF = 3 | |

Concernant la cancérogénicité, la mutagénicité et la génotoxicité, la toxicité pour le développement, l'activité endocrinienne et la toxicité aquatique aiguë, aucune information n'a été trouvée dans l'ensemble des sources à consulter dans l'outil QCAT. Un « manque de données » (DG) est attribué à chacun de ces effets.

Concernant la toxicité pour la reproduction, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. En se basant sur l'absence d'effet observé dans une étude 3 générations décrite dans HSDB, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) à cet effet.

Concernant la toxicité aiguë, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. En se basant sur les valeurs de DL₅₀ décrites dans HSDB, les experts ont attribué un niveau de danger « faible » (L) à cet effet puisque ces valeurs sont supérieures à 2000 mg/kg.

Concernant la persistance, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. En se basant que les données estimées par PBT profiler de t_{1/2} (eau) à 8,7 jours et de t_{1/2} (sol) à 4,7 jours, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) à cet effet puisque ces valeurs sont inférieures à 16 jours.

Concernant la bioaccumulation, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. Les experts de l'Anses se sont appuyés sur un BCF estimé à 3 dans HSDB pour attribuer un niveau de danger « très faible » (vL) puisque cette valeur est inférieure 100.

Le tableau ci-dessous décrit l'attribution des niveaux de danger du sorbitol au regard des données identifiées.

Tableau 49 : Niveaux de danger attribués aux effets du sorbitol selon l'outil QCAT

| Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | | | | | | | Ecotoxicité | | Devenir dans l'environnement | | Propriétés physico-chimiques | |
|-----------------------------|----|---|----|----|-----------------------------|----|---|-----|-----|-----|-----|-------------|----|------------------------------|----|------------------------------|---|
| C | M | R | D | E | AT | ST | N | SnS | SnR | Irs | IrE | AA | CA | P | B | Rx | F |
| DG | DG | L | DG | DG | L | | | | | | | DG | | L | vL | | |

La substance possède des niveaux de danger « faible » (L) ou « très faible » sur les effets documentés. Par conséquent, la substance se voit attribuer la classe initiale A (substance chimique peu dangereuse).

Pour pouvoir attribuer une classe finale à la substance, les données manquantes doivent être analysées. Des données sont manquantes pour au moins 3 effets relatifs à la santé humaine, la substance se voit donc attribuer la classe finale « non classé ».

Evaluation du mélange FineFix

Le tableau ci-dessous récapitule l'évaluation des dangers selon l'outil QCAT du mélange FineFix.

Le mélange FineFix se voit attribuer la classe de la substance la plus pénalisante contenue dans le mélange, c'est-à-dire la classe « non classé ».

Tableau 50 : Evaluation des produits FineFix® selon l'outil QCAT

| Alternatives potentielles | Compositions | Classes de danger selon QCAT des composants | Classes de danger selon QCAT du mélange |
|---------------------------|----------------------|---|---|
| Le mélange FineFix® | Alcool polyvinylique | Non classé | Non classé |
| | Propylène-glycol | B _{DG} | |
| | Sorbitol | Non classé | |
| | Ethanol | B | |

5.2.3.8 Evaluation du mélange Green-Fix®

D'après les informations décrites dans la littérature qui ont permis d'évaluer les capacités techniques de ce produit, le mélange Green-Fix® contient du glyoxal (n° CAS 107-22-2) et de l'éthanol (n° CAS 64-17-5).

L'Anses a demandé à l'INRS d'interroger les bases de données SEPIA et ORFILA afin d'obtenir des informations complémentaires sur la composition des mélanges.

L'INRS a transmis à l'Anses la FDS du mélange et a indiqué que ce produit n'est plus aujourd'hui mis sur le marché par la société italienne DIAPATH SpA (DiaPath 2017). D'après la FDS, le mélange contient du méthanol, une substance classée F par l'outil QCAT.

Evaluation du mélange Green-Fix®

Dans la mesure où une des substances composant le mélange est classée F selon l'outil QCAT, le mélange Green-Fix® se voit attribuer la classe de la substance la plus pénalisante contenue dans le mélange, c'est-à-dire la classe F « substance extrêmement dangereuse ».

Tableau 51 : Evaluation du produit Green-Fix® selon l'outil QCAT

| Alternatives potentielles | Compositions | Classes de danger selon QCAT des composants | Classes de danger selon QCAT du mélange |
|---------------------------|-----------------|---|---|
| Le mélange Green-Fix® | Méthanol | F | F |
| | Autres composés | Non évalués | |

5.2.3.9 Evaluation du mélange RCL2®

D'après les informations décrites dans la littérature qui ont permis d'évaluer les capacités techniques de ce produit, le mélange RCL2® est un fixateur élaboré au laboratoire de pathologie de l'Institut Claudius Regaud de Toulouse. Il est composé d'éthanol (n° CAS 64-17-5) (70%) et d'acide acétique (n° CAS 64-19-7) (7%) et de tréhalose (n° CAS 99-20-7).

L'Anses a demandé à l'INRS d'interroger les bases de données SEPIA et ORFILA afin d'obtenir des informations complémentaires sur la composition de ce mélange. L'INRS a indiqué à l'Anses que ce mélange a été commercialisé par la société Alphelys qui a fermé le 22/09/2015 (radiation du Registre du Commerce et des Sociétés (RCS) le 22/09/2015). Aucune autre information n'a été transmise à l'Anses.

Les experts de l'Anses ont alors identifié le fait qu'un mélange similaire est toujours sur le marché mais commercialisé par la société Alphapath.

Les experts de l'Anses ont souhaité évaluer les dangers du mélange en se basant sur la composition décrite dans la littérature, c'est-à-dire le mélange qui a satisfait le module « capacités techniques ».

Identification et catégorisation des dangers de l'éthanol (n° CAS 64-17-5)

L'éthanol a été déjà précédemment évalué au travers de l'outil QCAT. La substance est classée B (substance chimique dangereuse).

Identification et catégorisation des dangers de l'acide acétique (n° CAS 64-19-7)

Le tableau ci-dessous détaille la synthèse des informations permettant d'attribuer un niveau de danger à chacun des effets étudiés selon l'outil QCAT pour l'acide acétique (n° CAS 64-19-7).

Tableau 52 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil QCAT pour l'acide acétique

| | Toxicité humaine (groupe 1) | | | | |
|---------------------|--|---------------------------------------|---|--|------------------------------------|
| Effets | C | M | R | D | E |
| Données disponibles | (HSDB) Effet irritant, Faible promoteur tumoral | (HSDB) Résultats négatifs in vitro | Pas de données | (MAK) Pregnancy Risk Group C | Pas de données |
| | Toxicité humaine (groupe 2) | | Ecotoxicité | Devenir dans l'environnement | |
| Effets | AT | | AA | P | B |
| Données disponibles | (GHS Nouvelle Zélande - CCID) 6.1D (dermal) – Acutely toxic 6.1D (inhalation) – Acutely toxic 6.1D (oral) – Acutely toxic | | (GHS – Japon : NITE-CHIRP) Hazardous to the aquatic environment (acute) - Category 3 | (HSDB) $t_{1/2}$ (sol) = 2 jours (valeur mesurée) (PBT Profiler) de $t_{1/2}$ (eau) = 8,7 jours | (HSDB) BCF = 3 (valeur estimée) |

Concernant la toxicité pour la reproduction et l'activité endocrinienne, aucune information n'a été trouvée dans l'ensemble des sources à consulter dans l'outil QCAT. Un « manque de données » (DG) est attribué à chacun de ces effets.

Concernant la cancérogénicité, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. En se basant sur les résultats chez l'animal décrits dans HSDB (Hazardous Substances Data Bank), les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) à cet effet puisque la substance est décrite comme un faible promoteur tumoral.

Concernant la mutagénicité et la génotoxicité, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. En se basant sur les résultats négatifs des essais in vitro décrits dans HSDB, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) à cet effet.

Concernant la toxicité pour le développement, la substance est classée par la MAK dans le groupe C (Pregnancy Risk Group C). Cette classification fait partie des sources prioritaires de l'étape 1 de l'outil QCAT qui attribue un niveau de danger « faible » (L) à cet effet.

Concernant la toxicité aiguë, une classification a été trouvée dans les sources prioritaires de l'étape 1. La substance est classée : « 6.1D (dermal) – Acutely toxic ; 6.1D (inhalation) – Acutely toxic ; 6.1D (oral) – Acutely toxic » par la Nouvelle-Zélande. Cette classification fait partie des sources secondaires de l'étape 1 de l'outil QCAT qui attribue un niveau de danger « modéré » (M) à cet effet.

Concernant la toxicité aquatique aiguë, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires de l'étape 1. La substance est classée : « Hazardous to the aquatic environment (acute) - Category 3 » par le Japon. Cette classification fait partie des sources secondaires de l'étape 1 de l'outil QCAT qui attribue un niveau de danger « modéré » (M) à cet effet.

Concernant la persistance, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. En se basant sur les résultats de $t_{1/2}$ (sol) à 2 jours (valeur mesurée décrite dans HSDB) et de $t_{1/2}$ (eau) à 8,7 jours (valeur estimée par PBT Profiler), les experts ont attribué un niveau de danger « faible » (L) à cet effet car ces valeurs sont inférieures à 16 jours.

Concernant la bioaccumulation, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Aucune donnée expérimentale n'ayant été trouvée, les experts de l'Anses se sont appuyés sur un BCF estimé à 3 décrit dans HSDB pour attribuer un niveau de danger « très faible » (vL) puisque cette valeur est inférieure à 100.

Le tableau ci-dessous décrit l'attribution des niveaux de danger de l'acide acétique au regard des données identifiées.

Tableau 53 : Niveaux de danger attribués aux effets de l'acide acétique selon l'outil QCAT

| Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | | | | | | | Ecotoxicité | | Devenir dans l'environnement | | Propriétés physico-chimiques | |
|-----------------------------|---|----|---|----|-----------------------------|----|---|-----|-----|-----|-----|-------------|----|------------------------------|----|------------------------------|---|
| C | M | R | D | E | AT | ST | N | SnS | SnR | Irs | IrE | AA | CA | P | B | Rx | F |
| L | L | DG | L | DG | M | | | | | | | M | | L | vL | | |

Concernant la toxicité aiguë, la substance possède un niveau de danger « modéré » (M). En appliquant l'outil QCAT, la substance est par conséquent classée B (substance chimique dangereuse).

Pour pouvoir attribuer une classe finale à la substance, les données manquantes doivent être analysées. Un « manque de données » a été attribué pour un effet relatif à la santé humaine autre que celui relatif à l'activité endocrinienne. Par conséquent, la substance se voit donc attribuer la classe finale de C_{DG} (substance chimique très dangereuse par manque de données).

Identification et catégorisation des dangers du tréhalose (n° CAS 99-20-7)

Le tableau ci-dessous détaille la synthèse des informations permettant d'attribuer un niveau de danger à chacun des effets étudiés selon l'outil QCAT pour le tréhalose (n° CAS 99-20-7).

Tableau 54 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil QCAT pour le tréhalose

| | Toxicité humaine (groupe 1) | | | | |
|---------------------|-----------------------------|----------------|--|-----------------------------|----------------|
| Effets | C | M | R | D | E |
| Données disponibles | Pas de données | Pas de données | Pas de données | Pas de données | Pas de données |
| | Toxicité humaine (groupe 2) | Ecotoxicité | Devenir dans l'environnement | | |
| Effets | AT | AA | P | B | |
| Données disponibles | Pas de données | Pas de données | (PBT Profiler) t _{1/2} (eau) = 8,7 jours | (PBT Profiler) BCF = 3,2 | |

Concernant la cancérogénicité, la mutagénicité et la génotoxicité, la toxicité pour la reproduction, la toxicité pour le développement, l'activité endocrinienne, la toxicité aiguë et la toxicité aquatique aiguë, aucune information n'a été trouvée dans l'ensemble des sources à consulter dans l'outil QCAT. Un « manque de données » (DG) est attribué à chacun de ces effets.

Concernant la persistance, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer

cet effet. En se basant sur la donnée estimée par PBT profiler de $t_{1/2}$ (eau) à 8,7 jours, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) à cet effet puisque cette valeur est inférieure à 16 jours.

Concernant la bioaccumulation, aucune classification n'a été identifiée dans les sources prioritaires ou secondaires de l'étape 1. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. Les experts de l'Anses se sont appuyés sur un BCF estimé à 3,2 par PBT profiler pour attribuer un niveau de danger « très faible » (vL) puisque cette valeur est inférieure 100.

Le tableau ci-dessous décrit l'attribution des niveaux de danger du tréhalose au regard des données identifiées.

Tableau 55 : Niveaux de danger attribués aux effets du tréhalose selon l'outil QCAT

| Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | | | | | | Ecotoxicité | | Devenir dans l'environnement | | Propriétés physico-chimiques | | |
|-----------------------------|---|---|---|---|-----------------------------|----|---|-----|-----|-----|-------------|----|------------------------------|---|------------------------------|----|---|
| C | M | R | D | E | AT | ST | N | SnS | SnR | Irs | IrE | AA | CA | P | B | Rx | F |
| DG | | | | | DG | | | | | | | DG | | L | vL | | |

La substance possède des niveaux de danger « faible » (L) ou « très faible » (vL) sur les effets documentés. Par conséquent, la substance se voit attribuer la classe initiale A (substance chimique peu dangereuse).

Pour pouvoir attribuer une classe finale à la substance, les données manquantes doivent être analysées. Des données sont manquantes pour au moins 3 effets relatifs à la santé humaine, la substance se voit donc attribuer la classe finale « non classé ».

Evaluation du mélange RCL2®

Le tableau ci-dessous récapitule l'évaluation des dangers selon l'outil QCAT du mélange RCL2®.

Le mélange RCL2® se voit attribuer la classe de la substance la plus pénalisante contenue dans le mélange, c'est-à-dire la classe « non classé ».

Tableau 56 : Evaluation du produit RCL2® selon l'outil QCAT

| Alternatives potentielles | Compositions | Classes de danger selon QCAT des composants | Classes de danger selon QCAT du mélange |
|---------------------------|----------------|---|---|
| Le mélange RCL2 | Ethanol | B | Non classé |
| | Acide acétique | C _{DG} | |
| | Tréhalose | Non classé | |

5.2.3.10 Evaluation du mélange Hydrosafe®

D'après les informations décrites dans la littérature qui ont permis d'évaluer les capacités techniques de ce produit, le mélange Hydrosafe® est un fixateur composé d'éthanol (n° CAS 64-17-5) et d'acide acétique (n° CAS 64-19-7) : deux substances déjà évaluées par l'outil QCAT précédemment.

Les experts de l'Anses ont identifié le fait qu'il s'agissait d'une solution commerciale de Labonord. Cette société a été radiée du RCS le 27-11-2013 et est devenue la société VWR International. Le support technique de VWR a indiqué que le produit n'est plus disponible aujourd'hui sur le marché. L'Anses a demandé à l'INRS d'interroger les bases de données SEPIA et ORFILA afin d'obtenir des informations complémentaires sur la composition de ce mélange. L'INRS ne disposait pas d'information supplémentaire sur le mélange.

Les experts de l'Anses ont évalué les dangers du mélange en se basant sur les seules informations disponibles, c'est-à-dire celles décrites dans la littérature scientifique.

Evaluation du mélange Hydrosafe®

Le tableau ci-dessous récapitule l'évaluation des dangers selon l'outil QCAT du mélange Hydrosafe®.

Le mélange Hydrosafe® se voit attribuer la classe de la substance la plus pénalisante contenue dans le mélange, c'est-à-dire la classe C_{DG} « substance très dangereuse par manque de données ».

Tableau 57 : Evaluation du produit Hydrosafe® selon l'outil QCAT

| Alternatives potentielles | Compositions | Classes de danger selon QCAT des composants | Classes de danger selon QCAT du mélange |
|---------------------------|----------------|---|---|
| Le mélange Hydrosafe® | Ethanol | B | C _{DG} |
| | Acide acétique | C _{DG} | |

5.2.3.11 Evaluation du mélange UMFIX®

D'après les informations décrites dans la littérature qui ont permis d'évaluer les capacités techniques de ce produit, le mélange UMFIX est un fixateur composé de polyéthylène glycol (n° CAS 25322-68-3) et de méthanol (n° CAS 67-56-1).

Le méthanol a été déjà précédemment évalué au travers de l'outil QCAT. La substance est classée F (substance chimique extrêmement dangereuse).

Evaluation du mélange UMFIX®

Dans la mesure où une des substances composant le mélange est classée F selon l'outil QCAT, le mélange UMFIX se voit attribuer la classe de la substance la plus pénalisante contenue dans le mélange, c'est-à-dire la classe F « substance extrêmement dangereuse ».

Tableau 58 : Evaluation du produit UMFIX selon l'outil QCAT

| Alternatives potentielles | Compositions | Classes de danger selon QCAT des composants | Classes de danger selon QCAT du mélange |
|---------------------------|-----------------|---|---|
| Le mélange UMFIX | Méthanol | F | F |
| | Autres composés | Non évalués | |

5.2.3.12 Evaluation de la technique de fixation HOPE®

D'après les informations décrites dans la littérature qui ont permis d'évaluer les capacités techniques de ce produit, la technique fait intervenir les substances suivantes : l'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (n° CAS 7365-45-9), un composé organique zwitterionique, contenant de l'acide glutamique et d'autres acides aminés (glycine, L-alanine, L-proline, L-sérine) et de l'acétone.

L'Anses a demandé à l'INRS d'interroger les bases de données SEPIA et ORFILA afin d'obtenir des informations complémentaires sur la composition de ce mélange.

Les experts de l'Anses ont réalisé l'évaluation des dangers à travers l'outil QCAT de l'ensemble des substances identifiées comme composants de ce mélange (y compris ceux faisant l'objet d'une clause de confidentialité). Dans la mesure où une des substances composant le mélange est classée F « substance chimique extrêmement dangereuse » selon l'outil QCAT, le mélange se voit attribuer la classe de la substance la plus pénalisante contenue dans le mélange, c'est-à-dire la classe F « substance extrêmement dangereuse ».

5.2.3.13 Conclusions du module danger QCAT

Le tableau ci-dessous synthétise l'ensemble des classifications QCAT des alternatives identifiées.

Tableau 59 : Evaluation des mélanges selon l'outil QCAT

| Alternatives potentielles | Classes de danger selon QCAT |
|---------------------------|------------------------------|
| Le mélange PAXgene® | F |
| Le mélange Excell Plus® | C |
| Le mélange FineFix® | Non classé |
| Le mélange Green-Fix® | F |
| Le mélange RCL2® | Non classé |
| Le mélange HydroSafe® | C _{DG} |
| Le mélange UMFIX® | F |
| Le procédé HOPE® | F |

Les mélanges PAXgene®, Green-Fix®, UMFIX® et le procédé HOPE® sont classés F par l'outil QCAT et ne seront pas étudiés dans les modules de la phase simultanée.

En revanche, n'étant pas classés F, les mélanges Excell Plus®, FineFix®, RCL2® et Hydrosafe® seront étudiés dans les modules de la phase simultanée.

5.3 Les modules de la phase simultanée

5.3.1 Le module danger « GreenScreen »

5.3.1.1 Présentation des principes de l'outil GreenScreen

L'objectif de ce module « danger » consiste à attribuer une classe finale de danger (parmi les classes suivantes : 1 ; 2 ; 2_{DG} ; 3 ; 3_{DG} ; 4 ou non classé) en appliquant l'outil GreenScreen à chacune des

alternatives identifiées, c'est-à-dire soit à la substance de substitution soit à chacune des substances constituant le mélange de substitution.

Toutes les substances présentes à plus de 0.1% dans le mélange sont étudiées selon GreenScreen, la classe de la substance la plus contraignante étant attribuée au mélange étudié.

Dix-huit effets sont à étudier pour ce module et sont rappelés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 60 : Effets étudiés par l'outil GreenScreen

| Toxicité humaine (groupe I) | Toxicité humaine (groupe II) | Ecotoxicité et devenir dans l'environnement | Propriétés physico-chimiques |
|--|--|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • cancérogénicité (C) • mutagénicité et génotoxicité (M) • toxicité pour la reproduction (R) • toxicité pour le développement (D) • activité endocrinienne (E) | <ul style="list-style-type: none"> • toxicité aiguë (AT) • toxicité systémique et effets sur les organes (ST) • neurotoxicité (N) • sensibilisation cutanée (SnS) • sensibilisation respiratoire (SnR) • irritation cutanée (IrS) • irritation oculaire (IrE) | <ul style="list-style-type: none"> • écotoxicité aquatique aiguë (AA) • écotoxicité aquatique chronique (CA) <p>autres études d'écotoxicité (si disponibles) :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Persistance (P) • Bioaccumulation (B) | <ul style="list-style-type: none"> • réactivité (Rx) • inflammabilité (F) |

L'application de l'outil GreenScreen permet d'attribuer des niveaux de danger pour chacun des effets à considérer parmi les six niveaux suivants (très fort (vH), fort (H), modéré (M), faible (L), très faible (vL) ou inconnu (DG)).

Pour pouvoir attribuer un niveau de danger à chacun des effets, des informations doivent d'abord être collectées. L'outil GreenScreen décrit 4 types de sources distinctes pour collecter ces informations. Elles peuvent provenir :

1. d'une recherche de données toxicologiques dans une liste de sites ou de bases de données toxicologiques décrites dans un document intitulé « informations sources » disponible sur le site de GreenScreen (CPA 2016d);
2. d'une recherche dans 42 listes spécifiques qui proposent une classification des substances. Ces listes sont décrites dans un document intitulé « GreenScreen translator » disponible sur le site de GreenScreen (CPA 2016b);
3. d'une recherche de données toxicologiques mesurées pour un analogue structural pertinent de la substance d'intérêt ;
4. d'une modélisation des données afin de compléter les données mesurées manquantes.

L'outil GreenScreen laisse le choix à l'utilisateur de hiérarchiser sa recherche dans ces 4 types de sources selon ses préférences.

Concernant les 42 listes spécifiques proposant des classifications pour les substances, l'outil GreenScreen les classe dans 2 catégories :

- Les listes faisant « autorité » (Authoritative lists) qui sont des listes générées souvent dans le cadre de processus réglementaires pour identifier des substances dangereuses
- Les listes de « sélection » (Screening lists) qui sont des listes développées sur un examen moins complet de la littérature scientifique ou compilées par des organismes non considérés comme faisant autorité dans le domaine

Chacune de ces 2 listes peut être classée dans la sous-catégorie A ou B :

- La sous-catégorie A correspond à une liste associant une donnée à un seul et unique niveau de danger ;
- La sous-catégorie B correspond à une liste qui laisse le choix à l'utilisateur d'attribuer un niveau danger parmi plusieurs propositions pour une même donnée.

L'outil GreenScreen permet également d'attribuer un niveau de confiance à chacun des niveaux de danger attribué. Ainsi, les niveaux de danger provenant de sources d'informations avec un niveau de confiance élevé seront écrits en gras alors que ceux provenant d'une source d'information avec un niveau de confiance plus faible seront écrits en italique.

Une fois l'ensemble des niveaux de danger attribués à chacun des effets, une classe de danger initiale est attribuée à la substance. Une analyse des données manquantes est ensuite réalisée afin d'attribuer une classe finale à la substance (CPA 2016a, c)

5.3.1.2 Adaptation de l'outil GreenScreen par les experts de l'Anses

Prise en compte des évaluations selon l'outil QCAT

Les substances analysées au travers du module danger GreenScreen ont déjà été analysées au travers de l'outil QCAT.

Pour les effets déjà évalués en QCAT, les experts ont adopté la démarche suivante :

1. Vérifier que les données, ayant permis d'attribuer un niveau de danger selon QCAT, permettent d'attribuer le même niveau de danger selon GreenScreen. Si ce n'est pas le cas, les experts ont alors modifié le niveau de danger pour le faire correspondre aux critères d'évaluation de l'outil GreenScreen ;
2. Pour les effets dont les niveaux de danger ont été attribués selon QCAT à partir des sources secondaires de l'étape 1 ou des sources de l'étape 2, les experts se sont laissés la possibilité de réévaluer cet effet en recherchant des informations complémentaires dans les sources de l'outil GreenScreen ;
3. Les effets dont l'évaluation au travers de l'outil QCAT a conclu à un manque de données (DG) ont été systématiquement réévalués au travers de l'outil GreenScreen.

Les 9 nouveaux effets, non évalués dans QCAT, ont été évalués au travers de l'outil GreenScreen.

Hiérarchisation des sources d'informations

L'outil GreenScreen laisse à l'utilisateur le choix de hiérarchiser les sources d'informations nécessaires à la collecte des données. Ainsi, les experts de l'Anses ont adopté une démarche en 5 étapes. Chaque étape fait référence à des sources d'informations à consulter. Les experts commencent par chercher les informations dans les sources décrites dans l'étape 1. Si des informations sont collectées à cette étape alors elles sont utilisées pour attribuer un niveau de danger à l'effet considéré. Sinon, les experts cherchent dans les sources de l'étape 2. Ainsi de suite, les experts continuent la recherche d'informations étape par étape jusqu'à ce qu'ils trouvent des informations sur l'effet considéré. De manière générale, lorsque des informations sont trouvées dans une des sources décrites dans une étape, elles peuvent être utilisées pour attribuer un niveau de danger à l'effet considéré sans aller chercher des informations supplémentaires dans les sources décrites dans la ou les étapes suivantes.

Les experts ont adopté la démarche suivante en 5 étapes :

L'étape 1 consiste à collecter des informations de classification dans les listes faisant « autorité » qu'elles soient dans la sous-catégorie A ou B. Les experts ont utilisé le document intitulé « GreenScreen translator » (CPA 2016b) pour identifier ces listes.

L'étape 2 consiste à collecter des données mesurées dans les guides et les bases de données toxicologiques décrites dans le document intitulé « informations sources » (CPA 2016d).

L'étape 3 consiste à collecter des informations de classification dans les listes de « sélection » qu'elles soient dans la sous-catégorie A ou B. Les experts ont utilisé le document intitulé « GreenScreen translator » (CPA 2016b) pour identifier ces listes.

L'étape 4 consiste à collecter des données estimées ou modélisées dans les guides et les bases de données toxicologiques décrites dans le document intitulé « informations sources » (CPA 2016d).

L'étape 5 consiste à collecter des informations sur un ou plusieurs analogues structuraux pertinents de la substance d'intérêt afin d'attribuer un niveau de danger à l'effet considéré.

Si aucune information n'est trouvée à l'issue de cette dernière étape alors les experts ont entrepris une revue de la littérature plus large afin d'identifier des informations sur la substance.

Si aucune information n'est trouvée alors les experts ont attribué un « manque de données » à l'effet considéré.

Attribution des niveaux de danger pour une information trouvée dans une liste B

Les listes B laissent le choix à l'utilisateur d'attribuer un niveau de danger parmi plusieurs propositions décrites dans le document intitulé « hazard criteria » disponible sur le site de GreenScreen (CPA 2016c).

Le tableau ci-dessous référence l'ensemble des décisions prises par le GT dans ces cas-là.

Tableau 61 : Attribution des niveaux de danger à partir des données identifiées dans des listes B

| Effet | Donnée identifiée | Source de l'information | Proposition de l'outil GreenScreen | Choix des experts de l'Anses |
|-------------------------------|--|-------------------------|--|------------------------------|
| Sensibilisation cutanée (SnS) | H317 – Peut provoquer une allergie cutanée | (Règlement CLP) | <ul style="list-style-type: none"> Fort (H) Modéré (M) | Fort (H) |
| Sensibilisation respiratoire | Classification A (Rrs) (substance classée sensibilisante) | (AOEC Asthmagens) | <ul style="list-style-type: none"> Fort (H) Modéré (M) | Modéré (M) |

Attribution des niveaux de confiance des niveaux de danger

Les experts de l'Anses ont décidé d'attribuer :

- un niveau de confiance élevé au niveau de danger lorsque la donnée retenue pour attribuer un niveau de danger provient d'une source de l'étape 1 ou lorsque la donnée est mesurée et accessible dans une source de l'étape 2 ;
- Un niveau de confiance faible au niveau de danger lorsque la donnée retenue pour attribuer un niveau de danger provient d'une source de l'étape 3, 4 ou 5.

Cas particulier :

- La fiabilité des données de toxicité disponibles dans les dossiers d'enregistrement sur le site de l'Echa est évaluée à travers la cotation Klimisch. L'échelle se compose de 4 notes : 1 (fiable sans restrictions), 2 (fiable avec restrictions), 3 (non fiable) et 4 (non évaluable). Bien que les données mesurées disponibles sur le site de l'Echa appartiennent à une source de l'étape 2, les experts de l'Anses n'ont pas souhaité attribuer systématiquement un niveau de confiance élevé aux données disponibles. Les experts ont souhaité tenir compte de la cotation de Klimisch associée aux données pour pouvoir attribuer un niveau de confiance aux niveaux de danger. Ainsi, les données dont la fiabilité a été évaluée à 1 sont associées à un niveau de confiance élevé alors que celles dont la fiabilité a été évaluée à 2, 3 ou 4 sont associées à un niveau de confiance faible ;

- Lorsqu'une source d'information ne provient pas de l'outil GreenScreen, le jugement d'experts permet d'attribuer un niveau de confiance à la source.

5.3.1.3 Evaluation des solutions à base de formaldéhyde

Identification et catégorisation des dangers du formaldéhyde (n° CAS 50-00-0)

Selon le règlement CLP, le formaldéhyde est classé cancérogène de catégorie 1B. D'après l'outil GreenScreen, le niveau de danger attribué à l'effet cancérogénicité est fort « H ».

Ayant un niveau de danger « fort » en santé humaine, la classe de danger finale attribuée au formaldéhyde est la classe 1 (substance chimique extrêmement dangereuse) d'après l'outil GreenScreen. Il n'a donc pas été nécessaire d'étudier les autres effets.

Assignment de la classe de danger finale des solutions à base de formaldéhyde

Comme le formaldéhyde est classé 1 (classe la plus pénalisante), les autres composés de la solution de formaldéhyde à 4% n'ont pas été évalués au travers de l'outil GreenScreen puisque le produit se voit attribuer la classe de la substance la plus pénalisante contenue dans le mélange, c'est-à-dire la classe 1

Tableau 62 : Evaluation du formaldéhyde selon l'outil GreenScreen

| Mélanges | Compositions | Classes de danger des composants selon GreenScreen | Classes de danger du mélange selon GreenScreen |
|-------------------------------|-----------------|--|--|
| Solution de formaldéhyde à 4% | Formaldéhyde | 1 | 1 |
| | Autres composés | Non évalués | |

5.3.1.4 Evaluation du mélange Excell Plus®

D'après la fiche de données de sécurité (FDS) disponible sur le site internet de la société American MasterTech, le mélange Excell Plus® contient du glyoxal (n° CAS 107-22-2) (< 25%), de l'éthylène-glycol (n° CAS 107-21-1) (< 10%) et de l'éthanol (n° CAS 64-17-5) (< 10%) (American MasterTech 2016).

L'Anses a demandé à l'INRS d'interroger les bases de données SEPIA et ORFILA afin d'obtenir des informations complémentaires sur la composition des mélanges. Aucune autre information supplémentaire à celles présentes dans la FDS n'a pu être transmise à l'Anses.

Identification et catégorisation des dangers du glyoxal (n° CAS 107-22-2)

Le tableau ci-dessous décrit la correspondance entre les niveaux de danger attribués par les outils QCAT et GreenScreen.

Tableau 63 : Comparaison entre les niveaux de danger attribués aux effets du glyoxal selon les outils QCAT et GreenScreen

| | Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | Ecotoxicité | Devenir dans l'environnement | |
|---------------------|-----------------------------|---|---|---|-------------|-----------------------------|-------------|------------------------------|----|
| | C | M | R | D | E | AT | AA | P | B |
| Niveaux QCAT | M | M | L | L | DG | M | M | L | vL |
| Niveaux GreenScreen | M | M | L | L | A réévaluer | M | A réévaluer | L | vL |

L'ensemble des données utilisées pour attribuer un niveau de danger selon l'outil QCAT permet d'attribuer le même niveau de danger selon l'outil GreenScreen.

Les données permettant d'attribuer les niveaux de danger aux différents effets de santé humaine (groupe 1 et 2) s'appuient sur des sources de l'étape 1 ou 2. Ainsi, les experts ont décidé d'attribuer un niveau de confiance élevé à l'ensemble de ces niveaux de danger. En revanche, les données relatives au devenir de la substance dans l'environnement sont des données estimées provenant de sources de l'étape 4. Un niveau de confiance plus faible leur a été attribué.

Les données permettant d'attribuer le niveau de danger à la toxicité aquatique aiguë proviennent d'une source de l'étape 3. Les experts de l'Anses ont souhaité réévaluer ces effets au travers de l'outil GreenScreen pour pouvoir affiner leur évaluation en consultant d'autres sources d'informations disponibles à l'étape 2 de l'outil GreenScreen.

La perturbation endocrinienne pour laquelle l'utilisation de l'outil QCAT n'a pas permis d'attribuer un niveau de danger a été réévaluée selon l'outil GreenScreen.

Le tableau ci-dessous détaille la synthèse des informations permettant d'attribuer un niveau de danger à chacun des effets étudiés selon l'outil GreenScreen pour le glyoxal (n° CAS 107-22-2).

Tableau 64 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil GreenScreen pour le glyoxal

| Effets | Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | | | | |
|---------------------|-----------------------------|--|---|---|--|------------------------------|---|--|--|---|
| | C | M | R | D | E | AT | ST | | N | SnS |
| | | | | | | | Administration unique | Administration répétée | Administration unique et répétée | |
| Données disponibles | Effets évalués par QCAT | | | | Pas de données | Effet évalué par QCAT | (OCDE 2003) La substance présente une toxicité modérée par voie orale, une faible toxicité par voie cutanée et une toxicité par inhalation | (OCDE 2003) (Etude OCDE 407) Etude chez le rat par voie orale pendant 28 jours NOEL = 100 mg/kg/j (IUCLID – ECHA) (Etude OCDE 408) Etude chez le rat par voie orale pendant 90 jours NOEL = 290-350 mg/kg/j | (IUCLID-ECHA) (Etude OCDE 408) Pas d'effets observés sur les paramètres de neurotoxicité évalués | (Règlement CLP) H317 – Peut provoquer une allergie cutanée |
| Effets | Toxicité humaine (groupe 2) | | | Ecotoxicité | | Devenir dans l'environnement | | Propriétés physico-chimiques | | |
| | SnR | IrS | IrE | AA | CA | P | B | Ex | F | |
| | Pas de données | (Règlement CLP) H 315 – Provoque une irritation cutanée | (Règlement CLP) H319 – Provoque une sévère irritation des yeux | (OCDE 2003) CE ₅₀ (pimephales promelas, 96h) = 215 mg/L | (IUCLID-ECHA) NOEC (poisson) = 119 mg/L NOEC (daphnies) = 3.19 mg/L NOEC (algues) = 3.13 mg/L | Effets évalués par QCAT | | (INRS 2014b) Les solutions aqueuses sont stables | (INRS 2014b) Les solutions aqueuses ne sont pas inflammables | |

Concernant l'activité endocrinienne et la sensibilisation respiratoire, aucune information n'a été trouvée dans l'ensemble des sources à consulter selon l'outil GreenScreen. Un « manque de donnée » (DG) est attribué à ces effets.

Concernant la toxicité systémique (administration unique et administration répétée), aucune classification n'a été trouvée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. En s'appuyant sur le NOEL le plus faible décrit dans le rapport de l'OCDE sur la substance, les experts de l'Anses ont décidé d'attribuer un niveau de danger faible (L) avec un niveau de confiance élevé à cet effet puisque cette valeur est 100 mg/kg/j.

Concernant la neurotoxicité, aucune classification n'a été trouvée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. Le dossier d'enregistrement de la substance disponible sur le site de l'Echa rapporte une absence d'effet neurotoxique dans une étude de 90 jours chez le rat avec une fiabilité de 1 (fiable sans restriction). Ainsi, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Concernant la sensibilisation cutanée, la substance est classée « H317 - Peut provoquer une allergie cutanée » d'après le règlement CLP. Il s'agit d'une source de l'étape 1 qui permet d'attribuer un niveau de danger fort (H) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Concernant l'irritation cutanée, la substance est classée « H315 - Provoque une irritation cutanée » d'après le règlement CLP. Il s'agit d'une source de l'étape 1 qui permet d'attribuer un niveau de danger fort (H) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Concernant l'irritation oculaire, la substance est classée « H319 - Provoque une sévère irritation des yeux » d'après le règlement CLP. Il s'agit d'une source de l'étape 1 qui permet d'attribuer un niveau de danger fort (H) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Concernant la toxicité aiguë aquatique, aucune classification n'a été trouvée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. Les experts de l'Anses se sont appuyés sur la valeur de CE₅₀ décrite dans le rapport de l'OCDE de la substance pour attribuer un niveau de danger « faible » (L) à cet effet avec un niveau de confiance élevé dans la mesure où la valeur est supérieure à 100 mg/L.

Concernant la toxicité chronique aquatique, aucune classification n'a été trouvée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. Les experts de l'Anses se sont appuyés sur les valeurs des NOEC les plus faibles chez les daphnies et les algues décrites avec une fiabilité de 1 (fiable sans restriction) dans le dossier d'enregistrement de la substance disponible sur le site de l'ECHA pour attribuer un niveau de danger « modéré » (M) à cet effet avec un niveau de confiance élevé dans la mesure où les valeurs sont comprises entre 1 et 10 mg/L.

Concernant la réactivité, aucune information n'a été trouvée dans les sources listées par l'outil GreenScreen. Cependant les experts de l'Anses se sont appuyés sur les données recueillies dans la Fiche toxicologique de l'INRS de la substance pour évaluer cet effet. Les experts de l'Anses se sont appuyés sur le fait que la substance en solution aqueuse est décrite comme stable pour attribuer un niveau de danger faible (L) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Concernant l'inflammabilité, aucune information n'a été trouvée dans les sources listées par l'outil GreenScreen. Cependant les experts de l'Anses se sont appuyés sur les données recueillies dans la Fiche toxicologique de l'INRS de la substance pour évaluer cet effet. Les experts de l'Anses se sont appuyés sur le fait que la substance en solution aqueuse est décrite comme non inflammable pour attribuer un niveau de danger faible (L) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Le tableau ci-dessous décrit l'attribution des niveaux de danger au regard des données identifiées.

Tableau 65 : Niveaux de danger attribués aux effets du glyoxal selon l'outil GreenScreen

| Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | | | | | | | | Ecotoxicité | | Devenir dans l'environnement | | Propriétés physico-chimiques | |
|-----------------------------|---|---|---|----|-----------------------------|----|---|-----|-----|-----|-----|----|-------------|---|------------------------------|----|------------------------------|--|
| C | M | R | D | E | AT | ST | N | SnS | SnR | IrS | IrE | AA | CA | P | B | Rx | F | |
| M | M | L | L | DG | M | L | L | H | DG | H | H | L | M | L | vL | L | L | |

Concernant la mutagénicité, la substance possède un niveau de danger « modéré » (M). Par conséquent, la substance se voit attribuer la classe initiale de 2 (substance chimique très dangereuse).

Pour pouvoir attribuer une classe finale à la substance, les données manquantes doivent être analysées. Aucune des conditions décrites dans l'outil GreenScreen n'est remplie pour renforcer le classement de la substance. Par conséquent, la substance reste classée 2.

Identification et catégorisation des dangers de l'éthylène glycol (n° CAS 107-21-1)

Le tableau ci-dessous décrit la correspondance entre les niveaux de danger attribués par les outils QCAT et GreenScreen.

Tableau 66 : Comparaison entre les niveaux de danger attribués aux effets de l'éthylène glycol selon les outils QCAT et GreenScreen

| | Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | Ecotoxicité | Devenir dans l'environnement | |
|---------------------|-----------------------------|---|---|---|---|-----------------------------|-------------|------------------------------|---|
| | C | M | R | D | E | AT | AA | P | B |
| Niveaux QCAT | L | L | L | L | M | M | L | L | L |
| Niveaux GreenScreen | L | L | L | L | M | M | L | A réévaluer | L |

L'ensemble des données utilisées pour attribuer un niveau de danger selon l'outil QCAT permet d'attribuer le même niveau de danger selon l'outil GreenScreen.

A l'exception de la persistance, les données permettant d'attribuer les niveaux de danger aux différents effets s'appuient sur des sources de l'étape 1 ou 2. Ainsi, les experts ont décidé d'attribuer un niveau de confiance élevé à l'ensemble de ces niveaux de danger.

En revanche, les données relatives à la persistance sont des données estimées provenant d'une source de l'étape 4. Les experts de l'Anses ont souhaité réévaluer cet effet à travers l'outil GreenScreen pour pouvoir affiner leur évaluation en consultant d'autres sources d'informations disponibles à l'étape 2 et 3 de l'outil GreenScreen.

Le tableau ci-dessous détaille la synthèse des informations permettant d'attribuer un niveau de danger à chacun des effets étudiés selon l'outil GreenScreen pour l'éthylène glycol (n° CAS 107-21-1).

Tableau 67 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil GreenScreen pour l'éthylène glycol

| Effets | Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | | | | | |
|---------------------|-----------------------------|--|-----|----|-------------------------|-----------------------------|---|---|--|---|--|
| | C | M | R | D | E | AT | ST | | N | SnS | |
| | | | | | | | Administration unique | Administration répétée | Administration unique et répétée | | |
| Données disponibles | Effets évalués par QCAT | | | | | Effet évalué par QCAT | (CNESST) H335 – Peut irriter les voies respiratoires | (OCDE 2004a) Etude chez le rat par voie orale NOAEL = 71 à 1080 mg/kg/j (effets rénaux) (selon les études réalisées) | (INRS 2016) Des signes de dépression du système nerveux central, plusieurs cas de nystagmus et d'hyperlymphocytose ont été signalés chez des ouvrières exposées aux vapeurs de l'éthylène-glycol. | (CNESST) Le produit peut causer une sensibilisation de la peau | |
| | Toxicité humaine (groupe 2) | | | | | Ecotoxicité | | Devenir dans l'environnement | | Propriétés physico-chimiques | |
| Effets | SnR | IrS | IrE | AA | CA | P | B | Ex | F | | |
| Données disponibles | Pas de données | (CNESST) L'exposition à ce produit, à ses vapeurs ou à ses brouillards peut causer l'irritation des yeux et des voies respiratoires | | | Effets évalués par QCAT | Pas de données | (HSDB) $t_{1/2}$ (air) = 2 jours (valeur estimée) | Effets évalués par QCAT | (INRS 2016) Composé stable | (INRS 2016) Liquide peu inflammable | |

Concernant la sensibilisation respiratoire et la toxicité chronique aquatique, aucune information n'a été trouvée dans l'ensemble des sources à consulter selon l'outil GreenScreen. Un « manque de donnée » (DG) est attribué à ces effets.

Concernant la toxicité systémique (administration unique), la substance est classée « H335 – Peut irriter les voies respiratoires » par la CNESST. Il s'agit d'une source de l'étape 1 qui permet d'attribuer un niveau de danger modéré (M) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Concernant la toxicité systémique (administration répétée), aucune classification n'a été trouvée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. Les experts de l'Anses se sont appuyés sur la valeur de la NOAEL la plus basse pour attribuer un niveau de danger modéré (M) avec un niveau de confiance élevé à cet effet puisque cette valeur est comprise entre 10 et 100 mg/kg/j.

Concernant la neurotoxicité, aucune information n'a été trouvée dans les sources listées par l'outil GreenScreen. Cependant, les experts de l'Anses se sont appuyés sur les données décrites dans la fiche toxicologique de l'INRS de la substance pour évaluer cet effet. Les experts de l'Anses se sont appuyés sur le fait que « plusieurs cas de nystagmus et d'hyperlymphocytose ont été signalés chez des ouvrières exposées aux vapeurs de l'éthylène-glycol » pour attribuer un niveau de danger modéré (M) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Concernant la sensibilisation respiratoire, la substance peut causer une sensibilisation de la peau selon la CNESST. Il s'agit d'une source de l'étape 1. Ainsi, les experts de l'Anses attribuent un niveau de danger modéré (M) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Concernant l'irritation cutanée et oculaire, l'exposition à cette substance, à ses vapeurs ou à ses brouillards peut causer l'irritation des yeux et des voies respiratoires selon la CNESST. Il s'agit d'une source de l'étape 1. Ainsi, les experts de l'Anses attribuent un niveau de danger modéré (M) avec un niveau de confiance élevé à ces deux effets.

Concernant la persistance, aucune information n'a été identifiée dans les listes des étapes 1 ; 2 et 3. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 4 pour évaluer cet effet. En se basant sur la donnée de $t_{1/2}$ (air) à 2 jours (valeur estimée) décrite dans HSDB, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance faible à cet effet.

Concernant la réactivité, aucune information n'a été trouvée dans les sources listées par l'outil GreenScreen. Cependant, les experts de l'Anses se sont appuyés sur les données décrites dans la fiche toxicologique de l'INRS de la substance qui décrit le composé comme stable pour évaluer cet effet. Ainsi, les experts de l'Anses attribuent un niveau de danger faible (L) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Concernant l'inflammabilité, aucune information n'a été trouvée dans les sources listées par l'outil GreenScreen. Cependant, les experts de l'Anses se sont appuyés sur les données décrites dans la fiche toxicologique de l'INRS de la substance qui décrit le composé comme peu inflammable pour évaluer cet effet. Ainsi, les experts de l'Anses attribuent un niveau de danger faible (L) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Le tableau ci-dessous décrit l'attribution des niveaux de danger au regard des données identifiées.

Tableau 68 : Niveaux de danger attribués aux effets de l'éthylène glycol selon l'outil GreenScreen

| Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | | | | | | | Ecotoxicité | | Devenir dans l'environnement | | Propriétés physico-chimiques | |
|-----------------------------|---|---|---|---|-----------------------------|----|---|-----|-----|-----|-----|-------------|----|------------------------------|---|------------------------------|---|
| C | M | R | D | E | AT | ST | N | SnS | SnR | IrS | IrE | AA | CA | P | B | Rx | F |
| L | L | L | L | M | M | M | M | M | DG | M | M | L | DG | L | L | L | L |

Concernant l'activité endocrinienne, la substance possède un niveau de danger « modéré » (M). Par conséquent, la substance se voit attribuer la classe initiale de 2 (substance chimique très dangereuse).

Pour pouvoir attribuer une classe finale à la substance, les données manquantes doivent être analysées. Aucune des conditions décrites dans l'outil GreenScreen n'est remplie pour renforcer le classement de la substance. Par conséquent, la substance reste classée 2.

Identification et catégorisation des dangers de l'éthanol (n° CAS 64-17-5)

Le tableau ci-dessous décrit la correspondance entre les niveaux de danger attribués par les outils QCAT et GreenScreen.

Tableau 69 : Comparaison entre les niveaux de danger attribués aux effets de l'éthanol selon les outils QCAT et GreenScreen

| | Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | Ecotoxicité | Devenir dans l'environnement | |
|---------------------|-----------------------------|---|---|---|---|-----------------------------|-------------|------------------------------|---|
| | C | M | R | D | E | AT | AA | P | B |
| Niveaux QCAT | L | L | L | L | M | L | L | L | L |
| Niveaux GreenScreen | L | L | L | L | M | L | L | L | L |

L'ensemble des données utilisées pour attribuer un niveau de danger selon l'outil QCAT permet d'attribuer le même niveau de danger selon l'outil GreenScreen.

Les données permettant d'attribuer les niveaux de danger aux différents effets s'appuient sur des sources de l'étape 1 ou 2. Ainsi, les experts ont décidé d'attribuer un niveau de confiance élevé à l'ensemble de ces niveaux de danger.

Le tableau ci-dessous détaille la synthèse des informations permettant d'attribuer un niveau de danger à chacun des effets étudiés selon l'outil GreenScreen pour l'éthanol (n° CAS 64-17-5).

Tableau 70 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil GreenScreen pour l'éthanol

| Effets | Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | | | | | SnS |
|---------------------|-----------------------------|---|---|-----------------------|--|------------------------------|---|---|--|--|---|
| | C | M | R | D | E | AT | ST | | N | | |
| | | | | | | | Administration unique | Administration répétée | Administration unique | Administration répétée | |
| Données disponibles | Effets évalués par QCAT | | | | | Effet évalué par QCAT | (OCDE 2005) Chez l'Homme, une concentration de 5000 ppm de vapeur est citée comme irritante et inconfortable à respirer mais tolérable. Des concentrations beaucoup plus élevées induiraient larmolement et toux | (Chu <i>et al.</i> 2005) NOAEL (rat, voie inhalée, 28 jours) de 6130 ppm | (GHS Japon : NITE-CHIRP) H335 – Peut irriter les voies respiratoires (effets narcotiques) | (GHS Japon : NITE-CHIRP) H373 – Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée (système nerveux central) | (OCDE 2005) Non sensibilisant cutané |
| | | | | | | | | | | | |
| Effets | Toxicité humaine (groupe 2) | | | Ecotoxicité | | Devenir dans l'environnement | | Propriétés physico-chimiques | | | |
| | SnR | IrS | IrE | AA | CA | P | B | Ex | F | | |
| Données disponibles | Pas de données | (OCDE 2005) Substance non irritante pour la peau | (OCDE 2005) Substance modérément irritante pour les yeux | Effet évalué par QCAT | (OCDE 2005) La NOEC la plus basse rapportée concerne les invertébrés (9.6 mg/L ; reproduction sur 10 jours) | Effets évalués par QCAT | | (OCDE 2005) Substance stable dans l'eau | (Règlement CLP) H225 - Liquide et vapeurs très inflammables | | |

Concernant la sensibilisation respiratoire, aucune information n'a été trouvée dans l'ensemble des sources à consulter selon l'outil GreenScreen. Un « manque de donnée » (DG) est attribué à cet effet.

Concernant la toxicité systémique (administration unique et répétée), aucune classification n'a été trouvée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. Une étude de toxicité à dose répétée par inhalation sur 28 jours conduite chez le rat Sprague-Dawley n'a pas mis en évidence d'effet significatif (Chu *et al.* 2005). Les animaux ont été exposés à des vapeurs d'éthanol de 0 ou 6 130 ppm (+/- 11 750 mg/m³), 6 heures/jour, 5 jours/semaine, pendant 4 semaines (15 animaux par groupe par sexe). Après exposition, seuls de légers effets adaptatifs généralement revenus à la normale après 4 semaines ont été observés. Aucun signe clinique de toxicité n'a été observé, ni changement tissulaire macroscopique ou microscopique sur les différents organes examinés (incluant le cœur, le foie, la rate, les reins, le cerveau, les testicules et le thymus). La NOAEL dans cet essai a été considérée supérieure ou égale à 6 130 ppm (+/- 11 750 mg/m³). Les experts de l'Anses se sont appuyés sur la valeur de cette NOAEL pour attribuer un niveau de danger faible (L) avec un niveau de confiance élevé à cet effet puisque cette valeur de 11 750 mg/m³ (soit 11,75 mg/L) est supérieure à 1 mg/L.

Concernant la neurotoxicité (administration unique), aucune information n'a été trouvée dans les sources de l'étape 1 et 2. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 3 pour évaluer cet effet. La substance est classée par le Japon « H335 – Peut irriter les voies respiratoires (effets narcotiques) ». Cette classification entraîne l'attribution d'un niveau de danger modéré (M) avec un niveau de confiance faible.

Concernant la neurotoxicité (administration répétée), aucune information n'a été trouvée dans les sources de l'étape 1 et 2. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 3 pour évaluer cet effet. La substance est classée par le Japon « H373 – Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée (système nerveux central). » Cette classification entraîne l'attribution d'un niveau de danger modéré (M) avec un niveau de confiance faible à cet effet.

Concernant la sensibilisation cutanée, aucune classification n'a été trouvée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. La substance est décrite comme n'étant pas un sensibilisant cutané dans le rapport de l'OCDE. Par conséquent, les experts ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Concernant l'irritation cutanée, aucune classification n'a été trouvée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. La substance est décrite comme n'étant pas un irritant cutané dans le rapport de l'OCDE. Par conséquent, les experts ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Concernant l'irritation oculaire, aucune classification n'a été trouvée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. La substance est décrite comme modérément irritante pour les yeux dans le rapport de l'OCDE. Par conséquent, les experts ont attribué un niveau de danger « modéré » (M) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Concernant la toxicité chronique aquatique, aucune classification n'a été trouvée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. Les experts de l'Anses se sont appuyés sur la valeur de la NOEC la plus basse rapportée chez invertébrés décrite dans le rapport de l'OCDE pour attribuer un niveau de danger « modéré » (M) à cet effet avec un niveau de confiance élevé dans la mesure où les valeurs sont comprises entre 1 et 10 mg/L.

Concernant la réactivité, aucune classification n'a été trouvée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. La substance est décrite comme stable dans l'eau dans le rapport de l'OCDE. Par conséquent, les experts ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Concernant l'inflammabilité, la substance est classée « H225 – Liquide et vapeurs très inflammables » par le règlement CLP. Il s'agit d'une source de l'étape 1 qui permet d'attribuer un niveau de danger fort (H) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Le tableau ci-dessous décrit l'attribution des niveaux de danger au regard des données identifiées.

Tableau 71 : Niveaux de danger attribués aux effets de l'éthanol selon l'outil GreenScreen

| Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | | | | | | | | Ecotoxicité | | Devenir dans l'environnement | | Propriétés physico-chimiques | |
|-----------------------------|---|---|---|---|-----------------------------|----|---|-----|-----|-----|-----|----|-------------|---|------------------------------|----|------------------------------|--|
| C | M | R | D | E | AT | ST | N | SnS | SnR | IrS | IrE | AA | CA | P | B | Rx | F | |
| L | L | L | L | M | L | L | M | L | DG | L | M | L | M | L | L | L | H | |

Concernant l'inflammabilité, la substance possède un niveau de danger « fort » (H). Par conséquent, la substance se voit attribuer la classe initiale de 2 (substance chimique très dangereuse).

Pour pouvoir attribuer une classe finale à la substance, les données manquantes doivent être analysées. Aucune des conditions décrites dans l'outil GreenScreen n'est remplie pour renforcer le classement de la substance. Par conséquent, la substance reste classée 2.

Evaluation du mélange Excell Plus®

Le mélange Excell Plus® se voit attribuer la classe de la substance la plus pénalisante contenue dans le mélange, c'est-à-dire la classe 2 « substance chimique très dangereuse ».

Tableau 72 : Evaluation des produits Excell Plus® selon l'outil QCAT

| Alternatives potentielles | Compositions | Classes de danger selon QCAT des composants | Classes de danger selon QCAT du mélange |
|---------------------------|-----------------|---|---|
| Le mélange Excell Plus® | Glyoxal | 2 | 2 |
| | Ethylène-glycol | 2 | |
| | Ethanol | 2 | |

5.3.1.5 Evaluation du mélange FineFix®

D'après les informations décrites dans la littérature qui ont permis d'évaluer les capacités techniques de ce produit, le mélange FineFix® contient de l'éthanol (n° CAS 64-17-5), de l'eau distillée, du propylène-glycol (n° CAS 57-55-6), de l'alcool polyvinylique (n° CAS 9002-89-5) et un monosaccharide dont l'identité est inconnue.

D'après la fiche de données de sécurité (FDS) disponible sur le site internet de la société Milestone, le mélange FineFix concentré contient de l'alcool polyvinylique (n° CAS 9002-89-5) ; du propylène-glycol (n° CAS 57-55-6) et du sorbitol (n° CAS 50-70-4) et doit être dilué dans de l'éthanol (n° CAS 64-17-5) (Milestone 2015a).

L'Anses a demandé à l'INRS d'interroger les bases de données SEPIA et ORFILA afin d'obtenir des informations complémentaires sur la composition des mélanges. Les seules informations supplémentaires obtenues par rapport à celles figurant dans la FDS sont les pourcentages exacts de chacun des constituants du Finefix concentré.

Chacune des substances a été analysée au travers de l'outil GreenScreen.

Identification et catégorisation des dangers de l'éthanol (n° CAS 64-17-5)

L'éthanol a été déjà précédemment évalué au travers de l'outil GreenScreen. La substance est classée 2 « substance chimique très dangereuse ».

Identification et catégorisation des dangers de l'alcool polyvinylique (n° CAS 9002-89-5)

Le tableau ci-dessous décrit la correspondance entre les niveaux de danger attribués par les outils QCAT et GreenScreen.

Tableau 73 : Comparaison entre les niveaux de danger attribués aux effets de l'alcool polyvinylique selon les outils QCAT et GreenScreen

| | Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | Ecotoxicité | Devenir dans l'environnement | |
|---------------------|-----------------------------|-------------|---|-------------|-------------|-----------------------------|-------------|------------------------------|----|
| | C | M | R | D | E | AT | AA | P | B |
| Niveaux QCAT | L | DG | L | DG | DG | DG | DG | M | vL |
| Niveaux GreenScreen | L | A réévaluer | L | A réévaluer | A réévaluer | A réévaluer | A réévaluer | M | vL |

L'ensemble des données utilisées pour attribuer un niveau de danger selon l'outil QCAT permet d'attribuer le même niveau de danger selon l'outil GreenScreen.

Les données permettant d'attribuer l'ensemble des niveaux de danger s'appuient sur des sources de l'étape 1 ou 2. Ainsi, les experts ont décidé d'attribuer un niveau de confiance élevé à l'ensemble de ces niveaux de danger.

En revanche, tous les autres effets pour lesquels l'utilisation de l'outil QCAT n'a pas permis d'attribuer un niveau de danger ont été réévalués selon l'outil GreenScreen.

Le tableau ci-dessous détaille la synthèse des informations permettant d'attribuer un niveau de danger à chacun des effets étudiés selon l'outil GreenScreen pour l'alcool polyvinylique (n° CAS 9002-89-5).

Tableau 74 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil GreenScreen pour l'alcool polyvinylique

| Effets | Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | | | | |
|---------------------|--|---|-----------------------|--|---|---|---|------------------------------|--|--|
| | C | M | R | D | E | AT | ST | | N | SnR |
| | | | | | | | Administration unique et répétée | | | |
| Données disponibles | Effet évalué par QCAT | (EFSA 2006) Résultats négatifs <i>in vitro</i> (test d'Ames et test de mutation géniques) et <i>in vivo</i> (analyse de micronoyaux) | Effet évalué par QCAT | (EFSA 2006) Pas d'effet observé chez les petits dans une étude de 2 générations | Pas de données | (EFSA 2006) DL ₅₀ (rat, voie orale) de 1,5 à 22 g/kg | (EFSA 2006) Etude de 90 jours par voie orale chez le rat NOAEL (rat) = 5000 mg/kg/j (aucun effet) | | (EFSA 2006) Aucun effet observé dans les études de 90 jours (activité motrice, batterie d'observations fonctionnelles...) | Pas de données |
| Effets | Toxicité humaine (groupe 2) | | | Ecotoxicité | | Devenir dans l'environnement | | Propriétés physico-chimiques | | |
| | SnS | IrS | IrE | AA | CA | P | B | Ex | F | |
| | (EFSA 2006) Pas de préoccupation dans les études cliniques contrôlées chez l'Homme qui ont été limitées à la toxicité potentielle par voie cutanée (irritation et sensibilisation) de la substance associés à son utilisation dans une variété de produits cosmétiques. | | | (HSDB) Solution à 10% de la substance non irritante pour les yeux | (EnviChem) CL ₅₀ (Oryzias latipes, 48h) > 1000 mg/L | Pas de données | Effets évalués par QCAT | | (EFSA 2006) Substance stable en solution | (HSDB) Point éclair = 79°C Non inflammable |

Concernant la perturbation endocrinienne, la sensibilisation respiratoire et la toxicité chronique aquatique, aucune information n'a été trouvée dans l'ensemble des sources à consulter selon l'outil GreenScreen. Un « manque de donnée » (DG) est attribué à ces effets.

Concernant la mutagénicité et la génotoxicité, aucune classification n'a été identifiée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. En se basant sur les résultats négatifs des essais *in vitro* et *in vivo* décrits dans le document de l'EFSA, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Concernant la toxicité sur le développement, aucune classification n'a été identifiée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. En se basant sur l'absence d'effet observé chez les petits dans une étude de 2 générations décrits dans le document de l'EFSA, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Concernant la toxicité aiguë, aucune classification n'a été identifiée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. En se basant sur les valeurs de DL₅₀ décrites dans le document de l'EFSA, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance élevé à cet effet puisque ces valeurs sont supérieures à 2000 mg/kg.

Concernant la toxicité systémique (administration unique et répétée), aucune classification n'a été identifiée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. En se basant sur la valeur de la NOAEL décrite dans le document de l'EFSA, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance élevé à cet effet puisque cette valeur est supérieure à 100 mg/kg/j.

Concernant la neurotoxicité, aucune classification n'a été identifiée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. En se basant sur l'absence d'effet observé (sur l'activité motrice, après une batterie d'observations fonctionnelles...) dans une étude de 90 jours chez le rat décrite dans le document de l'EFSA, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Concernant l'irritation cutanée et la sensibilisation cutanée, aucune classification n'a été identifiée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. En se basant sur l'absence de toxicité par voie cutanée (irritation et sensibilisation) chez l'Homme lors de l'utilisation de la substance dans une variété de produits cosmétiques, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Concernant l'irritation oculaire, aucune classification n'a été identifiée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. La substance est décrite comme non irritante dans HSDB lorsqu'elle est utilisée à des concentrations inférieures à 10% dans un mélange. Ainsi, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Concernant la toxicité aquatique aiguë, aucune information n'a été trouvée dans les sources listées par l'outil GreenScreen. Cependant les experts de l'Anses se sont appuyés sur les données de CL₅₀ recueillies dans EnviChem pour attribuer un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance élevée à cet effet puisque la valeur est supérieure à 100 mg/L.

Concernant la réactivité, aucune classification n'a été identifiée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. La substance est décrite comme stable en solution dans le document de l'EFSA. Ainsi, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Concernant l'inflammabilité, aucune classification n'a été identifiée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet

effet. En se basant sur le point éclair décrit dans HSDB, les experts ont conclu que la substance est non inflammable et ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Le tableau ci-dessous décrit l'attribution des niveaux de danger au regard des données identifiées.

Tableau 75 : Niveaux de danger attribués aux effets de l'alcool polyvinylique selon l'outil GreenScreen

| Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | | | | | | | Ecotoxicité | | Devenir dans l'environnement | | Propriétés physico-chimiques | |
|-----------------------------|---|---|---|----|-----------------------------|----|---|-----|-----|-----|-----|-------------|----|------------------------------|----|------------------------------|---|
| C | M | R | D | E | AT | ST | N | SnS | SnR | IrS | IrE | AA | CA | P | B | Rx | F |
| L | L | L | L | DG | L | L | L | L | DG | L | L | L | DG | M | vL | L | L |

Concernant la persistance, la substance possède un niveau de danger « modéré ». Par conséquent, la substance se voit attribuer la classe initiale de 3 (substance chimique dangereuse).

Pour pouvoir attribuer une classe finale à la substance, les données manquantes doivent être analysées. Des données sont manquantes pour un effet relatif à l'écotoxicité. Par conséquent, la classification de la substance devient 2_{DG} (substance chimique très dangereuse par manque de données).

Identification et catégorisation des dangers du propylène glycol (n° CAS 57-55-6)

Le tableau ci-dessous décrit la correspondance entre les niveaux de danger attribués par les outils QCAT et GreenScreen.

Tableau 76 : Comparaison entre les niveaux de danger attribués aux effets du propylène glycol selon les outils QCAT et GreenScreen

| | Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | Ecotoxicité | Devenir dans l'environnement | |
|---------------------|-----------------------------|---|---|---|-------------|-----------------------------|-------------|------------------------------|----|
| | C | M | R | D | E | AT | AA | P | B |
| Niveaux QCAT | L | L | L | L | DG | L | L | L | vL |
| Niveaux GreenScreen | L | L | L | L | A réévaluer | L | L | L | vL |

L'ensemble des données utilisées pour attribuer un niveau de danger selon l'outil QCAT permet d'attribuer le même niveau de danger selon l'outil GreenScreen.

Les données permettant d'attribuer les niveaux de danger aux différents effets de toxicité humaine (groupes 1 et 2) et à l'écotoxicité, s'appuient sur des sources de l'étape 1 ou 2. Ainsi, les experts ont décidé d'attribuer un niveau de confiance élevé à l'ensemble de ces niveaux de danger. En revanche, les données relatives au devenir de la substance dans l'environnement sont des données estimées provenant d'une source de l'étape 4. Un niveau de confiance faible lui a été attribué.

L'activité endocrinienne pour laquelle l'utilisation de l'outil QCAT n'a pas permis d'attribuer un niveau de danger a été réévaluée selon l'outil GreenScreen.

Le tableau ci-dessous détaille la synthèse des informations permettant d'attribuer un niveau de danger à chacun des effets étudiés selon l'outil GreenScreen pour le propylène glycol (n° CAS 57-55-6).

Tableau 77 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil GreenScreen pour le propylène glycol

| Effets | Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | | | | | |
|---------------------|-----------------------------|--|---|-----------------------|--|------------------------------|---|-------------------------------|---|--|---|
| | C | M | R | D | E | AT | ST | | N | | SnS |
| | | | | | | | Administrations unique et répétée | | Administrations unique et répétée | | |
| Données disponibles | Effets évalués par QCAT | | | | (Publications scientifiques) Effet propre du propylène glycol suggéré dans des études <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> | Effet évalué par QCAT | (OCDE 2001) NOEL entre 2000 et 13200 mg/kg/j chez le rat et le chien | | (OCDE 2001) Narcose et dépression du système nerveux central après une exposition aiguë à fortes doses chez l'animal | | (OCDE 2001) Non sensibilisant cutané |
| | | | | | | | | | | | |
| Effets | Toxicité humaine (groupe 2) | | | Ecotoxicité | | Devenir dans l'environnement | | Propriétés physico-chimiques | | | |
| | SnR | IrS | IrE | AA | CA | P | B | Ex | F | | |
| Données disponibles | Pas de données | (OCDE 2001) Non irritant pour la peau | (OCDE 2001) (Etude OCDE 405) Non irritant pour les yeux | Effet évalué par QCAT | (OCDE 2001) NOEC (invertébrés) = 13020 mg/L | Effets évalués par QCAT | | (IUCLID-Echa) Non explosif | (OCDE 2001) Point éclair = 79°C Non inflammable | | |

Concernant la sensibilisation respiratoire, aucune information n'a été trouvée dans l'ensemble des sources à consulter selon l'outil GreenScreen. Un « manque de donnée » (DG) est attribué à cet effet.

Concernant l'activité endocrinienne, aucune information n'a été trouvée dans les sources de l'outil GreenScreen. Les experts de l'Anses ont souhaité chercher des informations sur cet effet dans d'autres sources d'informations. De nombreuses études issues de recherche sur l'optimisation de la reproduction et de la production chez le bétail suggèrent un effet propre du propylène glycol in vitro et in vivo. Cet effet passerait par une modification du taux d'insuline et du métabolisme (Ponsart *et al.* 2014, Miyoshi, Pate, et Palmquist 2001, Formigoni *et al.* 1996, Gamarra *et al.* 2014). Le propylène glycol est également capable d'améliorer la réponse à la FSH (Lopez-Sebastian *et al.* 1993), d'augmenter le taux d'œstrogène (Saleh, Pirestani, et Shahraki 2016) et de progestérone (Gamarra *et al.* 2014). Dans ces études, la dose de propylène glycol administrée par voie orale ou injection est difficilement estimable et aucun mode d'action n'est décrit. Chez l'Homme, malgré l'utilisation importante du polyéthylène glycol comme solvant ou excipient en pharmacologie, de tels effets n'ont pas été décrits. L'effet le plus souvent décrit est une augmentation du lactate. Chez les rongeurs, le propylène glycol ne modifie pas le cycle œstral. L'US EPA l'a inclus dans son programme *Endocrine Disruptor Screening Program (ESDP)*. Pour l'heure, selon l'"Endocrine Receptor (ER) Model", le propylène glycol ne présenterait pas d'activité agoniste ou antagoniste des récepteurs aux estrogènes. Les études sur l'activité androgénique et sur la thyroïde n'ont pas été conduites par l'US EPA. En dehors des études sur l'optimisation de la production agricole, dans la littérature, aucune étude ne vient appuyer un effet endocrinien du propylène glycol. Compte tenu des informations disponibles parcellaires, du caractère peu volatil du polyéthylène glycol, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « modéré » (M) avec un niveau de confiance faible, compte tenu de l'incertitude sur un possible effet endocrinien.

Concernant la toxicité systémique (administration unique et répétée), aucune classification n'a été trouvée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. Les études animales décrites dans le rapport de l'OCDE démontrent que la substance est bien tolérée par les rats et les chiens après une ingestion répétée, avec une NOAEL comprise en 2000 et 13200 mg/kg/jour. Les chats tolèrent relativement bien l'ingestion quotidienne de propylène glycol (plusieurs grammes) sans changement histopathologique indésirable, cependant des effets hématologiques spécifiques à l'espèce sont apparus à de faibles doses (NOAEL 80mg/kg/jour). Comme ces effets sont spécifiques de l'espèce, les experts de l'Anses n'ont pas retenu cette NOAEL dans leur évaluation et ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance élevé à cet effet puisque les NOAEL sont supérieures à 100 mg/kg/jour.

Concernant la neurotoxicité, aucune classification n'a été trouvée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. Des narcoses et des dépressions du système nerveux central après une exposition aiguë à fortes doses chez l'animal sont décrites dans le document de l'OCDE. Les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « modéré » (M) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Concernant la sensibilisation cutanée, aucune classification n'a été trouvée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. La substance est décrite comme n'étant pas un sensibilisant cutané dans le document de l'OCDE. Par conséquent, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Concernant l'irritation cutanée, aucune classification n'a été trouvée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. La substance est décrite comme n'étant pas un irritant cutané dans le document de l'OCDE. Par conséquent, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Concernant l'irritation oculaire, aucune classification n'a été trouvée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. La substance est décrite comme n'étant pas un irritant oculaire dans le document de l'OCDE.

Par conséquent, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Concernant la toxicité chronique aquatique, aucune classification n'a été trouvée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. Les experts de l'Anses se sont appuyés sur la valeur de la NOEC rapportée pour les invertébrés pour attribuer un niveau de danger « faible » (L) à cet effet dans la mesure où la valeur est supérieure à 10 mg/L. Cependant, dans le rapport de l'OCDE il n'y a pas d'information sur la gamme de concentrations testées et au vu de la valeur élevée de la NOEC, les experts de l'Anses émettent l'hypothèse que cette valeur a été extrapolée. Ainsi, les experts de l'Anses attribuent un niveau de confiance faible à ce niveau de danger.

Concernant la réactivité, aucune classification n'a été trouvée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. La substance est décrite comme non explosive dans le dossier d'enregistrement de la substance disponible sur le site de l'ECHA. Par conséquent, les experts ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Concernant l'inflammabilité, aucune classification n'a été trouvée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. Sur la base du point éclair décrit dans le rapport de l'OCDE de la substance, la substance est non inflammable. Par conséquent, les experts ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Le tableau ci-dessous décrit l'attribution des niveaux de danger au regard des données identifiées.

Tableau 78 : Niveaux de danger attribués aux effets du propylène glycol selon l'outil GreenScreen

| Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | | | | | | | Ecotoxicité | | Devenir dans l'environnement | | Propriétés physico-chimiques | |
|-----------------------------|---|---|---|---|-----------------------------|----|---|-----|-----|-----|-----|-------------|----|------------------------------|----|------------------------------|---|
| C | M | R | D | E | AT | ST | N | SnS | SnR | IrS | IrE | AA | CA | P | B | Rx | F |
| L | L | L | L | M | L | L | M | L | DG | L | L | L | L | L | vL | L | L |

Concernant l'activité endocrinienne, la substance possède un niveau de danger « modéré ». Par conséquent, la substance se voit attribuer la classe initiale de 2 (substance chimique très dangereuse).

Pour pouvoir attribuer une classe finale à la substance, les données manquantes doivent être analysées. Aucune des conditions décrites dans l'outil GreenScreen n'est remplie pour renforcer le classement de la substance. Par conséquent, la substance reste classée 2.

Identification et catégorisation des dangers du sorbitol (n° CAS 50-70-4)

Le tableau ci-dessous décrit la correspondance entre les niveaux de danger attribués par les outils QCAT et GreenScreen.

Tableau 79 : Comparaison entre les niveaux de danger attribués aux effets du sorbitol selon les outils QCAT et GreenScreen

| | Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | Ecotoxicité | Devenir dans l'environnement | |
|---------------------|-----------------------------|----|---|-------------|----|-----------------------------|-------------|------------------------------|----|
| | C | M | R | D | E | AT | AA | P | B |
| Niveaux QCAT | DG | DG | L | DG | DG | L | DG | L | vL |
| Niveaux GreenScreen | A réévaluer | | L | A réévaluer | | L | A réévaluer | L | vL |

L'ensemble des données utilisées pour attribuer un niveau de danger selon l'outil QCAT permet d'attribuer le même niveau de danger selon l'outil GreenScreen.

Les données permettant d'attribuer les niveaux de danger à la toxicité sur la reproduction et à la toxicité humaine aiguë s'appuient sur des sources de l'étape 2. Ainsi, les experts ont décidé d'attribuer un niveau de confiance élevé à l'ensemble de ces niveaux de danger. En revanche, les données relatives au devenir de la substance dans l'environnement sont des données estimées provenant d'une source de l'étape 4. Un niveau de confiance faible leur a été attribué.

Les autres effets pour lesquels l'utilisation de l'outil QCAT n'a pas permis d'attribuer un niveau de danger ont été réévalués selon l'outil GreenScreen.

Le tableau ci-dessous détaille la synthèse des informations permettant d'attribuer un niveau de danger à chacun des effets étudiés selon l'outil GreenScreen pour le sorbitol (n° CAS 50-70-4).

Tableau 80 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil GreenScreen pour le sorbitol

| | Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | | | |
|---------------------|--|--|--|--|---|------------------------------|--|--|--|
| Effets | C | M | R | D | E | AT | ST | N | SnS |
| | | | | | | | Administration unique et répétée | Administration unique et répétée | |
| Données disponibles | (Lu <i>et al.</i> 2014) Non cancérigène | (Ishidate <i>et al.</i> 1984) Non génotoxique | Effet évalué par QCAT | (HSDB) Pas d'effet sur la croissance des petits dans une étude de 3 générations chez le rat | Pas de données | Effet évalué par QCAT | (Molino <i>et al.</i> 1998) Pas d'effet toxique après un bolus intraveineux de 2g | | (VWR 2017) Non sensibilisant cutané |
| | Toxicité humaine (groupe 2) | | | Ecotoxicité | | Devenir dans l'environnement | | Propriétés physico-chimiques | |
| Effets | SnR | IrS | IrE | AA | CA | P | B | Ex | F |
| Données disponibles | (VWR 2017) Non sensibilisant respiratoire | (CNESST) Non irritant pour la peau | (CNESST) Non irritant pour les yeux | (EchemPortal) Donnée modélisée par Ecosar v0.99g CE ₅₀ (poissons, daphnies, algues) = 2460 mg/L | (EchemPortal) Donnée modélisée par Ecosar v0.99g CE ₅₀ (daphnies, algues) = 30039 mg/L | Effets évalués par QCAT | | (HSDB) Substance chimiquement inerte et stable dans l'air | (HSDB) Non inflammable |

Concernant la perturbation endocrinienne, aucune information n'a été trouvée dans l'ensemble des sources à consulter selon l'outil GreenScreen. Un « manque de donnée » (DG) est attribué à cet effet.

Concernant la cancérogénicité, aucune information n'a été trouvée dans les sources de l'outil GreenScreen. Les experts de l'Anses ont souhaité chercher des informations sur cet effet dans d'autres sources d'informations. Le sorbitol induit l'apoptose dans des cellules humaines de cancer colorectal via l'activation de MAPK et la substance a un intérêt possible comme agent chimiothérapeutique (Lu *et al.* 2014). Le sorbitol fait partie de complexes favorisant la biodisponibilité d'agents chimiothérapeutiques. Les experts ont attribué un niveau « faible » avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Concernant la mutagénicité et la génotoxicité, aucune information n'a été trouvée dans les sources de l'outil GreenScreen. Les experts de l'Anses ont souhaité chercher des informations sur cet effet dans d'autres sources d'informations. Une grande étude japonaise de génotoxicité d'additifs alimentaires conclut à un test d'Ames négatif et un test négatif d'aberration chromosomique (Ishidate *et al.* 1984). Ainsi, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Concernant la toxicité sur le développement, aucune classification n'a été identifiée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. En se basant sur l'absence d'effet sur la croissance des petits dans une étude de 3 générations chez le rat décrite dans HSDB, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Concernant la toxicité systémique et la neurotoxicité, aucune information n'a été trouvée dans les sources de l'outil GreenScreen. Les experts de l'Anses ont souhaité chercher des informations sur ces effets dans d'autres sources d'informations. En raison de son innocuité et de ses propriétés pharmacocinétiques, le D-sorbitol est utilisé comme moyen non invasif pour évaluer le flux de plasma hépatique, entre autres chez les patients cirrhotiques; un bolus de 2 g iv est réalisé, ce qui constitue une dose importante et confirme l'absence ou la très faible toxicité systémique (Molino *et al.* 1998). Ainsi les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance élevé à ces deux effets.

Concernant la sensibilisation respiratoire et cutanée, aucune information n'a été identifiée dans les sources listées par l'outil GreenScreen. Cependant, les experts de l'Anses se sont appuyés sur les données recueillies dans la Fiche de Données de Sécurité (FDS) de VWR de la substance pour attribuer un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance faible à chacun de ces effets puisqu'il est indiqué que la substance est non sensibilisante en cas de contact avec la peau ou en cas d'inhalation.

Concernant l'irritation cutanée et oculaire, la substance est décrite comme non irritante pour la peau et les yeux selon la CNESST. Il s'agit d'une source de l'étape 1. Ainsi, les experts de l'Anses attribuent un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance élevé à ces deux effets.

Concernant la toxicité aquatique aiguë, aucune information n'a été trouvée dans les sources de l'étape 1, 2 ou 3. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 4 pour évaluer cet effet. En se basant sur des données modélisées de CE₅₀, les experts ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance faible à cet effet car la valeur est supérieure à 100 mg/L.

Concernant la toxicité aquatique chronique, aucune information n'a été trouvée dans les sources de l'étape 1, 2 ou 3. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 4 pour évaluer cet effet. En se basant sur des données modélisées de CE₅₀, les experts ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance faible à cet effet car la valeur est supérieure à 100 mg/L.

Concernant la réactivité, aucune classification n'a été identifiée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. La substance est décrite comme inerte et stable dans l'air dans HSDB. Ainsi, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Concernant l'inflammabilité, aucune classification n'a été identifiée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. La substance est décrite comme non inflammable dans HSDB. Ainsi, les experts ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Le tableau ci-dessous décrit l'attribution des niveaux de danger au regard des données identifiées.

Tableau 81 : Niveaux de danger attribués aux effets du sorbitol selon l'outil GreenScreen

| Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | | | | | | | Ecotoxicité | | Devenir dans l'environnement | | Propriétés physico-chimiques | |
|-----------------------------|---|---|---|----|-----------------------------|----|---|-----|-----|-----|-----|-------------|----|------------------------------|----|------------------------------|---|
| C | M | R | D | E | AT | ST | N | SnS | SnR | Irs | IrE | AA | CA | P | B | Rx | F |
| L | L | L | L | DG | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | vL | L | L |

Tous les effets ont un niveau de danger « faible » (L) ou « très faible » (vL). Par conséquent, la substance se voit attribuer la classe initiale de 4 (substance chimique peu dangereuse).

Pour pouvoir attribuer une classe finale à la substance, les données manquantes doivent être analysées. Des données sont manquantes pour l'activité endocrinienne ainsi le classement de la substance devient 3_{DG} (substance chimique dangereuse par manque de données).

Evaluation du mélange FineFix

Le tableau ci-dessous récapitule l'évaluation des dangers selon l'outil GreenScreen du mélange FineFix.

Le mélange FineFix se voit attribuer la classe de la substance la plus pénalisante contenue dans le mélange, c'est-à-dire la classe 2 « substance chimique très dangereuse ».

Tableau 82 : Evaluation des produits FineFix® selon l'outil GreenScreen

| Alternatives potentielles | Compositions | Classes de danger selon GreenScreen des composants | Classes de danger selon GreenScreen du mélange |
|---------------------------|----------------------|--|--|
| Le mélange FineFix® | Alcool polyvinylique | 2 _{DG} | 2 |
| | Propylène-glycol | 2 | |
| | Sorbitol | 3 _{DG} | |
| | Ethanol | 2 | |

5.3.1.6 Evaluation du mélange RCL2®

D'après les informations décrites dans la littérature qui ont permis d'évaluer les capacités techniques de ce produit, le mélange RCL2® est un fixateur élaboré au laboratoire de pathologie de l'Institut Claudius Regaud de Toulouse. Il est composé d'éthanol (n° CAS 64-17-5) (70%) et d'acide acétique (n° CAS 64-19-7) (7%) et de tréhalose (n° CAS 99-20-7).

L'Anses a demandé à l'INRS d'interroger les bases de données SEPIA et ORFILA afin d'obtenir des informations complémentaires sur la composition de ce mélange. L'INRS a indiqué à l'Anses que ce mélange a été commercialisé par la société Alphelys qui a fermé le 22/09/2015 (radiation du Registre

du Commerce et des Sociétés (RCS) le 22/09/2015). Aucune autre information n'a pu être transmise à l'Anses.

Les experts de l'Anses ont alors identifié le fait qu'un mélange similaire est toujours sur le marché mais commercialisé par la société Alphapath.

Les experts de l'Anses ont souhaité évaluer les dangers du mélange en se basant sur la composition décrite dans la littérature, c'est-à-dire le mélange qui a satisfait le module « capacités techniques ».

Identification et catégorisation des dangers de l'éthanol (n° CAS 64-17-5)

L'éthanol a été déjà précédemment évalué au travers de l'outil GreenScreen. La substance est classée 2 « substance chimique très dangereuse ».

Identification et catégorisation des dangers de l'acide acétique (n° CAS 64-19-7)

Le tableau ci-dessous décrit la correspondance entre les niveaux de danger attribués par les outils QCAT et GreenScreen.

Tableau 83 : Comparaison entre les niveaux de danger attribués aux effets de l'acide acétique selon les outils QCAT et GreenScreen

| | Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | Ecotoxicité | Devenir dans l'environnement | |
|---------------------|-----------------------------|---|-------------|---|-------------|-----------------------------|-------------|------------------------------|----|
| | C | M | R | D | E | AT | AA | P | B |
| Niveaux QCAT | L | L | DG | L | DG | M | M | L | vL |
| Niveaux GreenScreen | L | L | A réévaluer | L | A réévaluer | A réévaluer | A réévaluer | L | vL |

L'ensemble des données utilisées pour attribuer un niveau de danger selon l'outil QCAT permet d'attribuer le même niveau de danger selon l'outil GreenScreen.

Les données permettant d'attribuer les niveaux de danger aux effets de toxicité humaine (groupe 1) et à la persistance s'appuient sur des sources de l'étape 1 ou 2. Ainsi, les experts ont décidé d'attribuer un niveau de confiance élevé à l'ensemble de ces niveaux de danger. En revanche, les données relatives à la bioaccumulation sont des données estimées provenant d'une source de l'étape 4. Un niveau de confiance faible lui a été attribué. La toxicité sur la reproduction et l'activité endocrinienne, pour lesquelles l'utilisation de l'outil QCAT n'a pas permis d'attribuer un niveau de danger ont été réévaluées selon l'outil GreenScreen.

Les données permettant d'attribuer le niveau de danger à la toxicité humaine aiguë (groupe 2) et la toxicité aquatique aiguë proviennent de sources de l'étape 3. Les experts ont souhaité réévaluer ces effets au travers de l'outil GreenScreen pour pouvoir affiner leur évaluation en consultant d'autres sources d'informations disponibles à l'étape 2 de l'outil GreenScreen.

Le tableau ci-dessous détaille la synthèse des informations permettant d'attribuer un niveau de danger à chacun des effets étudiés selon l'outil GreenScreen pour l'acide acétique (n° CAS 64-19-7).

Tableau 84 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil GreenScreen pour l'acide acétique

| Effets | Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | | | | |
|---------------------|--|--|---------------------------------|--|---|---|--|---|---|--|
| | C | M | R | D | E | AT | ST | N | SnS | |
| | | | | | | | Administration unique et répétée | Administration unique et répétée | | |
| Données disponibles | Effets évalués par QCAT | | Pas de données sur la fertilité | Effet évalué par QCAT | Pas de données | (HSDB) CL ₅₀ (rat, inhalation pendant 4h) = 11.4 mg/L | (HSDB) NOAEL 210 mg/kg/j (étude de 2 à 4 mois) 3600mg/kg/j (étude de 4 semaines sur un sel de sodium) | Pas de données | Pas de données | |
| | | | | | | | | | | |
| Effets | Toxicité humaine (groupe 2) | | | Ecotoxicité | | Devenir dans l'environnement | | Propriétés physico-chimiques | | |
| | SnR | IrS | IrE | AA | CA | P | B | Ex | F | |
| Données disponibles | (AOEC-Asthmagens) Substance A (Rrs) | (Règlement CLP) Lorsque la concentration en acide acétique est inférieure à 10% dans un mélange, celui-ci n'est classé ni irritant oculaire, ni irritant cutané | | (HSDB) CL ₅₀ (Pimephales promelas, 96h) = 88 mg/L | (IUCLID-ECHA) Oncorhynchus mykiss (21 jours) NOEC > 10 mg/L | Effets évalués par QCAT | | (HSDB) Stable dans des conditions normales de stockage | (Règlement CLP) H226 - Liquide et vapeurs inflammables | |

Concernant la toxicité sur la reproduction, la perturbation endocrinienne, la neurotoxicité et la sensibilisation cutanée, aucune information n'a été trouvée dans l'ensemble des sources à consulter selon l'outil GreenScreen. Un « manque de donnée » (DG) est attribué à ces effets.

Concernant la toxicité aiguë, aucune classification n'a été identifiée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. En se basant sur la valeur de la CL₅₀ décrite dans HSDB, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « modéré » (M) avec un niveau de confiance élevé à cet effet puisque la valeur est comprise entre 10 et 20 mg/L.

Concernant la toxicité systémique, aucune classification n'a été identifiée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. En se basant sur les NOAEL rapportées dans HSDB, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance élevé à cet effet puisque les valeurs sont supérieures à 100 mg/kg/j.

Concernant la sensibilisation respiratoire, la substance est classée « A (Rrs) » selon l'AOEC (Association of Occupational and Environmental Clinics). Il s'agit d'une source de l'étape 1 qui permet d'attribuer un niveau de danger « modéré » (M) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Concernant l'irritation cutanée et oculaire, d'après le règlement CLP, lorsque la concentration en acide acétique est inférieure à 10% dans un mélange, celui-ci n'est ni classé irritant oculaire, ni irritant cutané⁶. Il s'agit d'une source de l'étape 1 qui permet d'attribuer un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance élevé à ces deux effets.

Concernant la toxicité aquatique aiguë, aucune classification n'a été identifiée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. En se basant sur la valeur de la CL₅₀ décrite dans HSDB, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « modéré » (M) avec un niveau de confiance élevé à cet effet puisque la valeur est comprise entre 10 et 100 mg/L.

Concernant la toxicité aquatique chronique, aucune classification n'a été identifiée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. En se basant sur la valeur de la NOEC décrite dans le dossier d'enregistrement de la substance avec une fiabilité de 4 (non évaluable) disponible sur le site de l'ECHA, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance faible à cet effet puisque la valeur est supérieure 10 mg/L.

Concernant la réactivité, aucune classification n'a été identifiée dans la liste des sources de l'étape 1. Ainsi les experts de l'Anses se sont appuyés sur les sources de l'étape 2 pour évaluer cet effet. La substance est décrite stable dans les conditions normales dans HSDB. Ainsi, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Concernant l'inflammabilité, la substance est classée « H226 - Liquide et vapeurs inflammables » d'après le règlement CLP. Il s'agit d'une source de l'étape 1 qui permet d'attribuer un niveau de danger « modéré » (M) avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Le tableau ci-dessous décrit l'attribution des niveaux de danger au regard des données identifiées.

⁶ Les experts de l'Anses ont tenu compte de la limite de concentration décrite dans la classification CLP de l'acide acétique pour attribuer un niveau de danger à ces deux effets. Des concentrations supérieures à 10% ou 25% auraient entraîné des niveaux de danger plus élevés.

Tableau 85 : Niveaux de danger attribués aux effets de l'acide acétique selon l'outil GreenScreen

| Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | | | | | | | Ecotoxicité | | Devenir dans l'environnement | | Propriétés physico-chimiques | |
|-----------------------------|---|----|---|----|-----------------------------|----|----|-----|-----|-----|-----|-------------|----|------------------------------|----|------------------------------|---|
| C | M | R | D | E | AT | ST | N | SnS | SnR | IrS | IrE | AA | CA | P | B | Rx | F |
| L | L | DG | L | DG | M | L | DG | DG | M | L | L | M | L | L | vL | L | M |

Concernant l'inflammabilité, la substance possède un niveau de danger « modéré ». Par conséquent, la substance se voit attribuer la classe initiale de 3 (substance chimique dangereuse).

Pour pouvoir attribuer une classe finale à la substance, les données manquantes doivent être analysées. Des données sont manquantes pour évaluer la toxicité sur la reproduction de la substance, ainsi le classement de la substance devient 2_{DG} (substance chimique très dangereuse par manque de données).

Identification et catégorisation des dangers du tréhalose (n° CAS 99-20-7)

Le tableau ci-dessous décrit la correspondance entre les niveaux de danger attribués par les outils QCAT et GreenScreen.

Tableau 86 : Comparaison entre les niveaux de danger attribués aux effets du tréhalose selon les outils QCAT et GreenScreen

| | Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | Ecotoxicité | Devenir dans l'environnement | |
|---------------------|-----------------------------|----|----|----|----|-----------------------------|-------------|------------------------------|----|
| | C | M | R | D | E | AT | AA | P | B |
| Niveaux QCAT | DG | DG | DG | DG | DG | DG | DG | L | vL |
| Niveaux GreenScreen | A réévaluer | | | | | A réévaluer | A réévaluer | L | vL |

L'ensemble des données utilisées pour attribuer un niveau de danger selon l'outil QCAT permet d'attribuer le même niveau de danger selon l'outil GreenScreen.

Les données permettant d'attribuer les niveaux de danger relatifs au devenir de la substance dans l'environnement sont des données estimées provenant d'une source de l'étape 4. Un niveau de confiance faible leur a été attribué.

Tous les autres effets, pour lesquels l'utilisation de l'outil QCAT n'a pas permis d'attribuer un niveau de danger ont été réévalués selon l'outil GreenScreen.

Le tableau ci-dessous détaille la synthèse des informations permettant d'attribuer un niveau de danger à chacun des effets étudiés selon l'outil GreenScreen pour le tréhalose (n° CAS 99-20-7).

Tableau 87 : Synthèse des données ayant servi à la détermination des niveaux de danger en appliquant l'outil GreenScreen pour le tréhalose

| Effets | Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | | | |
|---------------------|--|--|---|---|---|--|---|---|---|
| | C | M | R | D | E | AT | ST | N | SnS |
| | | | | | | | Administration unique et répétée | Administration unique et répétée | |
| Données disponibles | (Richards <i>et al.</i> 2002) Non mutagène Non génotoxique Résultats négatifs <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> même à fortes doses | (Richards <i>et al.</i> 2002) Pas d'effet dans une étude 2 générations chez le rat Les NOAEL rapportées varient entre 6,16 et 14,09 g/kg/j | (Richards <i>et al.</i> 2002) Pas d'effet dans une étude de toxicité prénatale/ tératogénèse NOAEL (rat) = 6.94 g/kg/j NOAEL (lapin) = 1.99 g/kg/j | Pas de données | (Richards <i>et al.</i> 2002) DL ₅₀ (rat) > 16g/kg | (Richards <i>et al.</i> 2002) Pas d'effet dans une étude de 90 jours chez le rat même à de fortes doses NOAEL (rat femelle) = 9.3g/kg/j NOAEL (rat male) = 7,3 g/kg/j | (Richards <i>et al.</i> 2002) Sûr pour une utilisation en tant que composant dans les produits de consommation | | |
| | Toxicité humaine (groupe 2) | | | Ecotoxicité | | Devenir dans l'environnement | | Propriétés physico-chimiques | |
| Effets | SnR | IrS | IrE | AA | CA | P | B | Ex | F |
| Données disponibles | (INCI) ingrédient admis pour les cosmétiques | | | (EchemPortal) Donnée modélisée par Ecosar v0.99g CE ₅₀ (poissons, daphnies, algues) = 708 000 000 mg/L | (EchemPortal) Donnée modélisée par Ecosar v0.99g CE ₅₀ (daphnies, algues) = 3 390 000 mg/L | Effets évalués par QCAT | | (Richards <i>et al.</i> 2002) Disaccharide très stable | (Richards <i>et al.</i> 2002) Disaccharide non inflammable |

Information sur une source : La source d'information ayant permis d'attribuer l'essentiel des niveaux de danger des effets (Richards *et al.* 2002) est un article scientifique qui effectue une revue relatant notamment les effets de 8 études standardisés sur l'animal.

Concernant la cancérogénicité, la mutagénicité et la génotoxicité, aucune information n'a été trouvée dans les sources de l'outil GreenScreen. Les experts de l'Anses ont souhaité chercher des informations sur cet effet dans d'autres sources d'informations. Une publication sur les dangers de la substance conclut que la substance n'est pas génotoxique. Par conséquent, les experts ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance élevé à ces 2 effets.

Concernant la toxicité sur la reproduction, aucune information n'a été trouvée dans les sources de l'outil GreenScreen. Les experts de l'Anses ont souhaité chercher des informations sur cet effet dans d'autres sources d'informations. En se basant sur les valeurs de NOAEL décrites dans une publication sur les dangers de la substance, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger faible « L » avec un niveau de confiance élevé à cet effet car les valeurs sont supérieures à 100 mg/kg/j.

Concernant la toxicité sur développement, aucune information n'a été trouvée dans les sources de l'outil GreenScreen. Les experts de l'Anses ont souhaité chercher des informations sur cet effet dans d'autres sources d'informations. En se basant sur les valeurs de NOAEL décrites dans une publication sur les dangers de la substance, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger faible « L » avec un niveau de confiance élevé à cet effet car les valeurs sont supérieures à 100 mg/kg/j.

Concernant la toxicité aiguë, aucune information n'a été trouvée dans les sources de l'outil GreenScreen. Les experts de l'Anses ont souhaité chercher des informations sur cet effet dans d'autres sources d'informations. En se basant sur la valeur de DL₅₀ décrite dans une publication sur les dangers de la substance, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger faible « L » avec un niveau de confiance élevé à cet effet car la valeur est supérieure à 2000 mg/kg.

Concernant la toxicité systémique et la neurotoxicité, aucune information n'a été trouvée dans les sources de l'outil GreenScreen. Les experts de l'Anses ont souhaité chercher des informations sur cet effet dans d'autres sources d'informations. En se basant sur les valeurs de NOAEL décrites dans une publication sur les dangers de la substance, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger faible « L » avec un niveau de confiance élevé à ces effets car les valeurs sont supérieures à 100 mg/kg/j.

Concernant la sensibilisation cutanée et respiratoire, l'irritation cutanée et oculaire, aucune information n'a été trouvée dans les sources de l'outil GreenScreen. Les experts de l'Anses ont souhaité chercher des informations sur cet effet dans d'autres sources d'informations. Le tréhalose fait partie de la liste INCI (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients), il peut être incorporé sans limite de concentration dans des produits cosmétiques. Les experts ont attribué un niveau de danger faible « L » avec un niveau de confiance élevé à ces 4 effets.

Concernant la toxicité aquatique aiguë, aucune information n'a été trouvée dans les sources de l'étape 1, 2 ou 3. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 4 pour évaluer cet effet. En se basant sur des données modélisées de CE₅₀, les experts ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance faible à cet effet car la valeur est supérieure à 100 mg/L.

Concernant la toxicité aquatique chronique, aucune information n'a été trouvée dans les sources de l'étape 1, 2 ou 3. Ainsi, les experts se sont appuyés sur les sources de l'étape 4 pour évaluer cet effet. En se basant sur des données modélisées de CE₅₀, les experts ont attribué un niveau de danger « faible » (L) avec un niveau de confiance faible à cet effet car la valeur est supérieure à 100 mg/L.

Concernant la réactivité, aucune information n'a été trouvée dans les sources de l'outil GreenScreen. Les experts de l'Anses ont souhaité chercher des informations sur cet effet dans d'autres sources d'informations. En se basant sur le fait que la substance est un disaccharide très stable, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger faible « L » avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Concernant l'inflammabilité, aucune information n'a été trouvée dans les sources de l'outil GreenScreen. Les experts de l'Anses ont souhaité chercher des informations sur cet effet dans d'autres sources d'informations. En se basant sur le fait que la substance soit un disaccharide non

inflammable, les experts de l'Anses ont attribué un niveau de danger faible « L » avec un niveau de confiance élevé à cet effet.

Le tableau ci-dessous décrit l'attribution des niveaux de danger au regard des données identifiées.

Tableau 88 : Niveaux de danger attribués aux effets du tréhalose selon l'outil GreenScreen

| Toxicité humaine (groupe 1) | | | | | Toxicité humaine (groupe 2) | | | | | | | Ecotoxicité | | Devenir dans l'environnement | | Propriétés physico-chimiques | |
|-----------------------------|---|---|---|----|-----------------------------|----|---|-----|-----|-----|-----|-------------|----|------------------------------|----|------------------------------|---|
| C | M | R | D | E | AT | ST | N | SnS | SnR | IrS | IrE | AA | CA | P | B | Rx | F |
| L | L | L | L | DG | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | vL | L | L |

Tous les effets évalués ont un niveau de danger « faible » (L) ou « très faible » (vL). Par conséquent, la substance se voit attribuer la classe initiale de 4 (substance chimique peu dangereuse).

Pour pouvoir attribuer une classe finale à la substance, les données manquantes doivent être analysées. Des données sont manquantes pour évaluer l'activité endocrinienne de la substance, ainsi le classement de la substance devient 3_{DG} (substance chimique dangereuse par manque de données).

Evaluation du mélange RCL2®

Le tableau ci-dessous récapitule l'évaluation des dangers selon l'outil GreenScreen du mélange RCL2®.

Le mélange RCL2® se voit attribuer la classe de la substance la plus pénalisante contenue dans le mélange, c'est-à-dire la classe 2 « substance chimique très dangereuse ».

Tableau 89 : Evaluation du produit RCL2® selon l'outil QCAT

| Alternatives potentielles | Compositions | Classes de danger selon QCAT des composants | Classes de danger selon QCAT du mélange |
|---------------------------|----------------|---|---|
| Le mélange RCL2® | Ethanol | 2 | 2 |
| | Acide acétique | 2 _{DG} | |
| | Tréhalose | 3 _{DG} | |

5.3.1.7 Evaluation du mélange Hydrosafe®

D'après les informations décrites dans la littérature qui ont permis d'évaluer les capacités techniques de ce produit, le mélange Hydrosafe® est un fixateur composé d'éthanol (n° CAS 64-17-5) et d'acide acétique (n° CAS 64-19-7) : deux substances déjà évaluées par l'outil QCAT précédemment.

Les experts de l'Anses ont identifié le fait qu'il s'agissait d'une solution commerciale de Labonord. Cette société a été radiée du RCS le 27-11-2013 et est devenue la société VWR International. Le support technique de VWR a indiqué que le produit n'est plus disponible aujourd'hui sur le marché.

L'Anses a demandé à l'INRS d'interroger les bases de données SEPIA et ORFILA afin d'obtenir des informations complémentaires sur la composition de ce mélange. L'INRS ne disposait pas d'information supplémentaire sur le mélange.

Les experts de l'Anses ont évalué les dangers du mélange en se basant sur les seules informations disponibles, c'est-à-dire celles décrites dans la littérature scientifique.

Identification et catégorisation des dangers de l'éthanol (n° CAS 64-17-5)

L'éthanol a été déjà précédemment évalué au travers de l'outil GreenScreen. La substance est classée 2 « substance chimique très dangereuse ».

Identification et catégorisation des dangers de l'acide acétique (n° CAS 64-19-7)

L'acide acétique a été déjà précédemment évalué au travers de l'outil GreenScreen. La substance est classée 2_{DG} « substance chimique très dangereuse par manque de données ».

Evaluation du mélange Hydrosafe®

Le tableau ci-dessous récapitule l'évaluation des dangers selon l'outil GreenScreen du mélange Hydrosafe®.

Le mélange Hydrosafe® se voit attribuer la classe de la substance la plus pénalisante contenue dans le mélange, c'est-à-dire la classe 2 « substance très dangereuse ».

Tableau 90 : Evaluation du produit Hydrosafe® selon l'outil QCAT

| Alternatives potentielles | Compositions | Classes de danger selon QCAT des composants | Classes de danger selon QCAT du mélange |
|---------------------------|----------------|---|---|
| Le mélange Hydrosafe® | Ethanol | 2 | 2 |
| | Acide acétique | 2 _{DG} | |

5.3.1.8 Conclusions du module danger GreenScreen

Le tableau ci-dessous synthétise l'ensemble des classifications GreenScreen des alternatives identifiées.

Tableau 91 : Evaluation des mélanges selon l'outil GreenScreen

| Alternatives potentielles | Classes de danger selon GreenScreen |
|---------------------------|-------------------------------------|
| Le mélange Excell Plus® | 2 |
| Le mélange FineFix® | 2 |
| Le mélange RCL2® | 2 |
| Le mélange HydroSafe® | 2 |

5.3.2 Le module « Estimation des coûts de substitution »

5.3.2.1 Les hypothèses retenues pour comparer les alternatives

Les experts de l'Anses ont d'abord défini les hypothèses à prendre en compte pour évaluer les 4 alternatives au travers du module « Estimation des coûts de substitution ».

L'adaptation des protocoles d'analyses

Les protocoles d'analyses sont aujourd'hui essentiellement tous basés sur l'utilisation du formaldéhyde. Utiliser un fixateur alternatif va nécessiter de réajuster les protocoles de l'ensemble des techniques analytiques. A titre d'exemple, la substitution du formaldéhyde par l'Excell Plus® menée par l'IHP de Nantes a été rendue possible dans le laboratoire en modifiant les temps d'incubation mais sans nécessité de rééquiper ou de former le personnel de l'institut (SMPF et IHP 2015).

Concernant les coûts liés aux réajustements des protocoles, les experts de l'Anses considèrent que les laboratoires d'ACP possèdent déjà au sein de leur structure des techniciens dont le métier est d'optimiser les protocoles d'analyses. Les experts de l'Anses considèrent par conséquent que ce coût est de second ordre et négligeable dans la mesure où il correspond seulement à la perte marginale de productivité par rapport aux tâches que le technicien aurait pu faire pendant ce temps-là.

De plus, les experts de l'Anses considèrent que ce coût sera du même ordre de grandeur quel que soit le fixateur alternatif utilisé. Les alternatives étant comparées entre elles, ce coût commun ne saurait être finalement un coût influençant l'attribution des classes finales au travers du module « Estimation des coûts ».

Pour ces raisons, ce coût n'a pas été pris en compte dans l'évaluation des 4 alternatives.

La vérification de l'efficacité des fixateurs alternatifs

Les premiers diagnostics avec le nouveau fixateur devront être réalisés en parallèle sur des échantillons fixés au formaldéhyde afin de vérifier son efficacité. Les laboratoires possèdent déjà du matériel biologique pour la recherche. Ce matériel peut aider à mettre en place, un protocole de double fixation avec un fixateur autre que le formaldéhyde (CCAP 2016).

Les experts de l'Anses considèrent que le dédoublement des fixations est une étape transitoire qui prendra fin lorsque la substitution sera reconnue par l'ensemble du milieu de la profession. Ce coût est donc crucial au début de la mise en place de la substitution mais finalement négligeable sur le long terme.

De plus, les experts de l'Anses considèrent que ce coût sera du même ordre de grandeur quel que soit le fixateur alternatif utilisé. Les alternatives étant comparées entre elles, ce coût commun ne saurait être finalement un coût influençant l'attribution des classes finales au travers du module « Estimation des coûts ».

Pour ces raisons, ce coût n'a pas été pris en compte dans l'évaluation des 4 alternatives.

Le prix des fixateurs alternatifs

Les experts de l'Anses ont retenu comme critère pour estimer les coûts liés à la substitution : le prix de l'alternative ainsi que les quantités utilisées lors de l'étape de fixation. En effet, pour être le plus précis possible dans l'estimation des coûts liés à la substitution, les experts de l'Anses ont souhaité rapporter le prix de l'alternative à la quantité utilisée pour fixer un même échantillon.

5.3.2.2 Les données collectées pour comparer les alternatives

Le formaldéhyde prêt à l'emploi à 4%

Un fournisseur de formaldéhyde à 4% destiné aux laboratoires d'anatomie et cytologie pathologiques a indiqué que 10L d'une solution prête à l'emploi coûte 13€ HT soit 1,3€ HT/L (MM France 2018).

L'Excell Plus®

Le protocole d'utilisation du mélange Excell Plus® transmis par le fournisseur de la substance indique que le mélange doit être utilisé de la même façon qu'une solution de formaldéhyde à 4% (American MasterTech 2016). Les experts de l'Anses ont donc pris l'hypothèse que pour fixer un même échantillon, la quantité du mélange Excell Plus® à utiliser est la même que celle d'une solution de formaldéhyde à 4%.

Par ailleurs, l'Excell Plus® n'est plus commercialisé par la société MM France depuis le début de l'année 2018 et coûtait à ce moment-là 55 € HT/gal (soit 3.8L) (MM France 2018).

Les experts de l'Anses ont souhaité tout de même utiliser le prix d'achat de ce mélange à la date de retrait de mise sur le marché pour évaluer le mélange à travers le module.

Les experts de l'Anses ont déduit qu'un litre de solution coûte 14,5 € HT.

Le FineFix®

Les protocoles de fixation avec les FineFix® décrits dans la littérature ne mettent pas en évidence de différence avec ceux utilisant le formaldéhyde (Lassalle *et al.* 2009, Moelans *et al.* 2011). Les experts de l'Anses ont donc pris l'hypothèse que pour fixer un même échantillon, la quantité du mélange FineFix® à utiliser est la même que celle d'une solution de formaldéhyde à 4%.

De plus, le protocole d'utilisation du FineFix® transmis par MM France souligne que les temps de fixation sont similaires à ceux du formaldéhyde (Milestone 2015b).

Le FineFix® est toujours vendu sous forme concentrée. Le laboratoire doit reconstituer la solution de fixation par dilution avec de l'éthanol. Avec 5 Litres de FineFix®, il faut ajouter 12,9 L d'éthanol pour préparer une solution finale de FineFix® alcoolique d'un volume total de 17,9 L. Le prix de 5 L de solution concentrée est de 38€ HT et le prix de 10 L d'éthanol est de 30 € HT (MM France 2018).

Les experts de l'Anses ont déduit que les 17,9 L de la solution coûtent 76,7€ HT soit 4,3€ HT/L.

Le fixateur RCL2®

Les notices d'utilisation du formaldéhyde à 4% et du RCL2® prêts à l'emploi sont accessibles sur le site internet du fournisseur Alphapath. La comparaison des notices d'utilisation des deux mélanges ne fait pas ressortir de différence dans leurs utilisations. Pour chacun d'entre eux, les modes opératoires sont identiques. Il est ainsi indiqué que le liquide doit être versé jusqu'à immersion totale de la pièce et que pour obtenir le meilleur résultat, le prélèvement doit être immergé dans un volume équivalent à 5 fois la taille du prélèvement.

Le fournisseur a indiqué également qu'un litre d'une solution de RCL2® coûte 16€ HT (Alphapath 2018).

L'Hydrosafe®

Aucune information sur les volumes utilisés pour fixer une pièce n'a été identifiée dans la littérature scientifique. Les seules informations sur cette alternative proviennent de l'audition des professionnels qui ont décrit l'Hydrosafe® exactement de la même manière que le RCL2® en raison de leur composition chimique similaire (MM France 2016).

L'Hydrosafe® n'est plus aujourd'hui commercialisé par la société VWR International et aucune information sur le coût de cette alternative n'a été identifiée.

Le tableau ci-dessous récapitule l'ensemble des informations collectées par l'Anses sur les prix des fixateurs.

Tableau 92 : Comparaisons des prix des différents fixateurs

| Mélange | Prix (€ HT/L) | Fournisseur |
|-------------------|---------------|-------------------|
| Formaldéhyde à 4% | 1,3 | MM France |
| Excell Plus® | 14,5 | MM France |
| FineFix® | 4,3 | MM France |
| RCL2® | 16 | Alphapath |
| Hydrosafe® | Sans objet | VWR International |

5.3.2.3 L'attribution des classes finales du module

Conformément à la méthodologie mise au point (Anses 2018), les alternatives sont réparties en 4 classes en fonction de leurs quartiles dans la distribution des coûts de substitution.

De toutes les alternatives retenues, l'Excell Plus® et le RCL2® présentent les coûts les plus élevés. Ainsi, le coût de substitution de ces 2 alternatives se situe entre 75% et 100% (dernier quartile) du coût maximal observé. La classe 1 « coûts relatifs les plus élevés » leur est donc attribuée.

Le coût de substitution du FineFix® se situe entre 0% et 25% (premier quartile) du coût maximal observé. La classe 4 « coûts relatifs les moins élevés » lui est donc attribuée.

En l'absence de données, les experts ont décidé d'attribuer la classe « non spécifiée en raison du manque de données » à l'Hydrosafe®.

Tableau 93 : Comparaison des alternatives selon le module « Estimation des coûts de substitution »

| | Formaldéhyde à 4% | Alternatives | | | |
|--|-------------------|--------------|----------|----------|------------------------------------|
| | | Excell Plus® | FineFix® | RCL2® | Hydrosafe® |
| Classes finales « Estimation des coûts de substitution » | Classe 4 | Classe 1 | Classe 4 | Classe 1 | Non spécifié par manque de données |

5.3.3 Le module « Conditions d'exposition »

Les critères suivants définis dans la méthode à appliquer doivent être complétés pour chacune des alternatives.

Tableau 94 : Critères d'évaluation du module « Conditions d'exposition »

| Critères | | | | |
|--|--|---|-------------------------|---------------------------|
| Pression de vapeur | 0 – 5 Pa Très peu volatil | 5- 1000 Pa Modérément volatil | 1000-5000 Pa Volatil | > 5000 Pa Très volatil |
| Inflammabilité (Point éclair noté Pe et température) | Pe > 60°C Liquide et vapeurs non inflammables | 23°C ≤ Pe ≤ 60°C Liquide et vapeurs inflammables | Pe < 23°C Teb > 35°C | Pe < 23°C Teb ≤ 35°C |

| | | | | |
|-------------------------|---------------|--------------------------------|--------------------------------------|---|
| d'ébullition notée Teb) | | | Liquide et vapeurs très inflammables | Liquide et vapeurs extrêmement inflammables |
| Procédé | Clos | Clos mais ouvert régulièrement | Ouvert | Dispersif |
| Fréquence d'utilisation | Occasionnelle | Intermittente | Fréquente | Permanente |
| Quantité utilisée | Très faible | Faible | Intermédiaire | Elevée |

Conformément à la méthode, les critères « fréquences d'utilisation » et « quantités utilisées » sont d'abord à définir.

Les experts ont retenu la classification suivante :

Tableau 95 : Définitions des classes du critère "Fréquence d'utilisation"

| | | | | |
|-------------------------|----------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------|
| Fréquence d'utilisation | Utilisation annuelle | Utilisation mensuelle | Utilisation hebdomadaire | Utilisation quotidienne |
| | Occasionnelle | Intermittente | Fréquente | Permanente |

Tableau 96 : Définitions des classes du critère "Quantités utilisées"

| | | | | |
|-------------------------------|--------------------|------------------|----------------------|---------------------|
| Quantités annuelles utilisées | Inférieures à 10L | Entre 10 et 100L | Entre 100 et 1000L | Supérieures à 1000L |
| | Très faible | Faible | Intermédiaire | Elevée |

5.3.3.1 Evaluation de la solution de formaldéhyde

Les critères définis dans la méthode sont complétés pour le formaldéhyde.

Une enquête déclarative conduite en mars 2016 auprès des 79 sites des membres inscrits au « Club des cadres des services d'ACP » montrent que sur 52 répondants (soit 66%), tous déclarent utiliser du formaldéhyde. Sur les 52 répondants, 49 sites (soit 94%) utilisent du formaldéhyde à 4% et 3 sites (soit 6%) l'achètent encore à 37% pour réaliser eux-mêmes leurs dilutions à 4%. De plus, les résultats montrent également que 45 sites (soit 86%) utilisent plus de 100 L de formaldéhyde à 4% par mois (CCAP 2016).

Lorsque les prélèvements arrivent au laboratoire, plusieurs postes exposants au formaldéhyde ont été identifiés : la préparation de la solution de formaldéhyde à 4% si le laboratoire n'utilise pas de formaldéhyde prêt à l'emploi ; la fixation si le prélèvement arrive frais et doit être fixé au laboratoire ; la réception des prélèvements si les emballages sont souillés ou encore la macroscopie qui implique la manipulation de la pièce à analyser. Par conséquent, le procédé « Clos mais ouvert régulièrement » a été retenu dans la mesure où tout au long du cheminement de la pièce à analyser, des expositions au formaldéhyde peuvent se produire.

La fréquence d'utilisation « Permanente » a été retenue car des prélèvements sont analysés tous les jours dans les laboratoires.

La quantité annuelle « Elevée » a été retenue sur la base des quantités de formaldéhyde utilisées dans les laboratoires.

Tableau 97 : Evaluation des "conditions d'exposition" pour le formaldéhyde

| | |
|---|---|
| Critères d'évaluation des « conditions d'exposition » | Formaldéhyde |
| Pression de vapeur (Pa) | 440 000 Très volatil |
| Inflammabilité (°C) | Pe = 83°C Liquide et vapeurs non inflammables |
| Procédé utilisé | Clos mais ouvert régulièrement |
| Fréquence d'utilisation | Permanente |
| Quantité utilisée | Elevée |
| Classes des « conditions d'exposition » | Classe 1 |

Au regard des quantités annuelles de formaldéhyde qui sont utilisées de façon quotidienne et du procédé utilisé, à savoir « clos mais ouvert régulièrement », les experts ont attribué une classe 1 « Conditions d'exposition fortes » pour le formaldéhyde.

5.3.3.2 Evaluation de l'Excell Plus®

Les critères définis dans la méthode sont complétés pour l'Excell Plus®.

Le procédé, les fréquences d'utilisation ainsi que les quantités de fixateur étant inchangées, les critères « Procédé utilisé », « Fréquence d'utilisation » et « Quantité utilisée » sont les mêmes que ceux du fixateur à base de formaldéhyde.

Tableau 98 : Evaluation des "conditions d'exposition" pour l'Excell Plus®

| Critères d'évaluation des « conditions d'exposition » | Glyoxal (n° CAS 107-22-2) | Ethylène Glycol (n° CAS 107-21-1) | Ethanol (n° CAS 64-17-5) |
|---|---|---|--|
| Pression de vapeur (Pa) | 33997 Pa à 25°C (PubChem) Très volatil | 7 Pa à 20°C (PubChem) Modérément volatil | 7905 Pa à 25°C (PubChem) Très volatil |
| Inflammabilité (°C) | Pe > 100°C (PubChem) Liquide et vapeurs non inflammables | Pe = 111°C (PubChem) Liquide et vapeurs non inflammables | Pe = 13°C Teb = 79°C (PubChem) Liquides et vapeurs très inflammables |
| Procédé utilisé | Clos mais ouvert régulièrement | | |
| Fréquence d'utilisation | Permanente | | |
| Quantité utilisée | Elevée | | |
| Classes des « conditions d'exposition » | Classe 3 | | |

D'après la fiche de données de sécurité (FDS) disponible sur le site internet de la société American MasterTech, le mélange Excell Plus® contient du glyoxal (n° CAS 107-22-2) (< 25%), de l'éthylène-glycol (n° CAS 107-21-1) (< 10%) et de l'éthanol (n° CAS 64-17-5) (< 10%) (American MasterTech 2017).

Bien que le glyoxal soit « très volatil », il est beaucoup moins volatil que le formaldéhyde. Les experts se sont basés sur la présence dans le mélange d'éthanol (< 10 %) qui est une substance très inflammable pour attribuer une classe 3 « Conditions d'exposition faibles » au mélange Excell Plus®.

5.3.3.3 Evaluation du FineFix®

Les critères définis dans la méthode sont complétés pour le FineFix®.

Le procédé, les fréquences d'utilisation ainsi que les quantités de fixateur étant inchangées, les critères « Procédé utilisé », « Fréquence d'utilisation » et « Quantité utilisée » sont les mêmes que ceux du fixateur à base de formaldéhyde.

Tableau 99 : Evaluation des "conditions d'exposition" pour le FineFix®

| Critères d'évaluation des « conditions d'exposition » | Alcool polyvinylique (n° CAS 9002-89-5) | Propylène glycol (n° CAS 57-55-6) | Sorbitol (n° CAS 50-70-4) | Ethanol (n° CAS 64-17-5) |
|---|--|--|--|---|
| Pression de vapeur (Pa) | Négligeable (PubChem) Très peu volatil | 10.6 Pa à 20°C (PubChem) Modérément volatil | 1.32 x 10 ⁻⁶ Pa à 25°C (PubChem) Très peu volatil | 7905 Pa à 25°C (PubChem) Très volatil |
| Inflammabilité (°C) | Pe = 79°C (PubChem) Liquides et vapeurs non inflammables | Pe = 99°C (PubChem) Liquides et vapeurs non inflammables | Pe = 283°C (PubChem) Liquides et vapeurs non inflammables | Pe = 13°C (PubChem) Teb = 79°C (PubChem) Liquides et vapeurs très inflammables |
| Procédé utilisé | Clos mais ouvert régulièrement | | | |
| Fréquence d'utilisation | Permanente | | | |
| Quantité utilisée | Elevée | | | |
| Classes des « conditions d'exposition » | Classe 2 | | | |

Le protocole d'utilisation du FineFix® transmis par MM France indique que la solution finale d'éthanol contient approximativement 70% d'éthanol (Milestone 2015b).

Les experts se sont basés sur la présence dans le mélange d'éthanol (70%) qui est une substance très inflammable pour attribuer une classe 2 « Conditions d'exposition moyennes » au mélange FineFix®.

5.3.3.4 Evaluation du RCL2®

Les critères définis dans la méthode sont complétés pour le RCL2®.

Le procédé, les fréquences d'utilisation ainsi que les quantités de fixateur étant inchangées, les critères « Procédé utilisé », « Fréquence d'utilisation » et « Quantité utilisée » sont les mêmes que ceux du fixateur à base de formaldéhyde.

Tableau 100 : Evaluation des "conditions d'exposition" pour le RCL2®

| Critères d'évaluation des « conditions d'exposition » | Acide acétique (n° CAS 64-19-7) | Tréhalose (n° CAS 99-20-7) | Ethanol (n° CAS 64-17-5) |
|---|--|-------------------------------|--|
| Pression de vapeur (Pa) | 1500 Pa à 20°C (PubChem) Volatil | Non documenté | 7905 Pa à 25°C (PubChem) Très volatil |
| Inflammabilité (°C) | Pe = 39°C (PubChem) Liquide et vapeurs inflammables | Non documenté | Pe = 13°C Teb = 79°C (PubChem) Liquides et vapeurs très inflammables |
| Procédé utilisé | Clos mais ouvert régulièrement | | |
| Fréquence d'utilisation | Permanente | | |
| Quantité utilisée | Elevée | | |
| Classes des « conditions d'exposition » | Classe 2 | | |

D'après les informations décrites dans la littérature qui ont permis d'évaluer les capacités techniques de ce produit, le mélange RCL2® est un fixateur élaboré au laboratoire de pathologie de l'Institut Claudius Regaud de Toulouse. Il est composé d'éthanol (n° CAS 64-17-5) (70%) et d'acide acétique (n° CAS 64-19-7) (7%) et de tréhalose (n° CAS 99-20-7).

Concernant le tréhalose, aucune information n'est disponible sur les caractéristiques physico-chimiques de la substance. Comme il s'agit d'un disaccharide décrit comme stable, les experts de l'Anses ont considéré qu'il n'y avait pas de préoccupation sur la volatilité et l'inflammabilité de la substance.

Les experts se sont basés sur la présence dans le mélange d'éthanol (70%) qui est une substance très inflammable pour attribuer une classe 2 « Conditions d'exposition moyennes » au mélange RCL2®.

5.3.3.5 Evaluation de l'Hydrosafe®

Les critères définis dans la méthode sont complétés pour l'Hydrosafe®.

Le procédé, les fréquences d'utilisation ainsi que les quantités de fixateur étant inchangées, les critères « Procédé utilisé », « Fréquence d'utilisation » et « Quantité utilisée » sont les mêmes que ceux du fixateur à base de formaldéhyde.

Tableau 101 : Evaluation des "conditions d'exposition" pour le l'Hydrosafe®

| Critères d'évaluation des « conditions d'exposition » | Acide acétique (n° CAS 64-19-7) | Ethanol (n° CAS 64-17-5) |
|---|---|--|
| Pression de vapeur (Pa) | 1500 Pa à 20°C (PubChem) Volatil | 7905 Pa à 25°C (PubChem) Très volatil |
| Inflammabilité (°C) | Pe = 39°C | Pe = 13°C |

| | | |
|---|---|---|
| | (PubChem) Liquide et vapeurs inflammables | Teb = 79°C (PubChem) Liquides et vapeurs très inflammables |
| Procédé utilisé | Clos mais ouvert régulièrement | |
| Fréquence d'utilisation | Permanente | |
| Quantité utilisée | Elevée | |
| Classes des « conditions d'exposition » | Classe 2 | |

D'après les informations décrites dans la littérature qui ont permis d'évaluer les capacités techniques de ce produit, le mélange Hydrosafe® est un fixateur composé d'éthanol (n° CAS 64-17-5) et d'acide acétique (n° CAS 64-19-7). Comme le RCL2® et l'Hydrosafe® sont présentés par les professionnels comme des alternatives alcooliques et similaires, les experts ont émis l'hypothèse que le mélange Hydrosafe® contient comme le RCL2® 70% d'éthanol.

Les experts se sont basés sur la présence dans le mélange d'éthanol (70%) qui est une substance très inflammable pour attribuer une classe 2 « Conditions d'exposition moyennes » au mélange Hydrosafe®.

5.3.3.6 Bilan des évaluations des alternatives

Au final, ce sont les quantités d'éthanol présentes dans les mélanges qui justifient l'attribution des classes finales.

Le tableau ci-dessous compare les évaluations de l'ensemble des produits.

Tableau 102 : Comparaison des alternatives selon le module "Conditions d'exposition"

| Critères d'évaluation des « conditions d'exposition » | Solution de formaldéhyde à 4% | Excell Plus® (30% d'éthanol) | FineFix® (70% d'éthanol) | RCL2® (70% d'éthanol) | Hydrosafe® (70% d'éthanol) |
|---|--|---|---|---|---|
| Pression de vapeur (Pa) | 440 000 Très volatil | Très volatil (glyoxal) | Très volatil (éthanol) | Très volatil (éthanol) | Très volatil (éthanol) |
| Inflammabilité (°C) | Pe = 83°C Liquide et vapeurs non inflammables | Liquides et vapeurs très inflammables (éthanol) | Liquides et vapeurs très inflammables (éthanol) | Liquides et vapeurs très inflammables (éthanol) | Liquides et vapeurs très inflammables (éthanol) |
| Procédé utilisé | Clos mais ouvert régulièrement | Clos mais ouvert régulièrement | Clos mais ouvert régulièrement | Clos mais ouvert régulièrement | Clos mais ouvert régulièrement |
| Fréquence d'utilisation | Permanente | Permanente | Permanente | Permanente | Permanente |
| Quantité utilisée | Elevée | Elevée | Elevée | Elevée | Elevée |
| Classes des « conditions d'exposition » | Classe 1 | Classe 3 | Classe 2 | Classe 2 | Classe 2 |

5.3.4 Le module « Autres impacts »

5.3.4.1 Le développement d'un nouveau standard international

La renommée des centres hospitalo-universitaires (CHU) se mesure par le nombre de publications internationales et de participation à des protocoles internationaux. Aujourd'hui, les prélèvements doivent être fixés dans le formaldéhyde afin de permettre une inter-comparaison avec l'ensemble des structures participantes, qui utilisent toutes le formaldéhyde. En cas de substitution du formaldéhyde, les CHU et les centres de Lutte contre le Cancer (CLCC) ne pourraient plus participer à ces essais cliniques multicentriques.

Les structures libérales ne participent pas directement aux protocoles thérapeutiques, mais sont également contraintes de fixer leur prélèvement dans le formaldéhyde au risque d'induire une perte de chance pour le patient qui ne pourrait pas bénéficier d'une inclusion dans un essai thérapeutique (SMPF et IHP 2015).

Par conséquent, la substitution du formaldéhyde va nécessiter la mise en place d'un nouveau standard international.

5.3.4.1 Le respect de la chaîne du froid au sein du laboratoire

Dans le cas où les prélèvements arrivent à 4°C au laboratoire, ce dernier devra être équipé de réfrigérateurs ou de chambres froides à 4°C pour pouvoir réceptionner les prélèvements sans interrompre la chaîne du froid.

5.3.4.2 L'organisation des flux au sein du laboratoire

Dans le cas où les prélèvements arrivent frais à température ambiante ou à 4°C ou sous-vide à 4°C dans le laboratoire, il sera alors nécessaire d'organiser le flux de traitement des échantillons afin d'organiser leur fixation en respectant le temps d'ischémie.

5.3.4.3 La réévaluation du risque biologique

Le formaldéhyde est un puissant biocide permettant une décontamination tissulaire.

Si le prélèvement arrive non fixé au laboratoire, il devra l'être sur place avant d'être analysé. Manipuler un prélèvement non fixé et potentiellement infectieux (bactéries, virus, parasites, levures...) pourrait entraîner un déplacement du risque vers le risque biologique (Ministère du travail de l'emploi et de la santé et Direction générale de l'offre de soins 2012) qui doit faire l'objet d'une attention particulière dans l'évaluation des risques.

Cependant les experts de l'Anses estiment que le risque biologique en laboratoire n'est pas majoré, puisque le personnel des laboratoires peut être déjà amené à manipuler des prélèvements biologiques non fixés et suit déjà les règles d'hygiène et de sécurité relatives à ce risque.

5.3.4.4 La disponibilité des alternatives

A ce jour, d'après les informations transmises aux experts de l'Anses, l'Excell Plus® et l'Hydrosafe® ne sont plus commercialisés et ne peuvent être aujourd'hui utilisés comme alternatives au formaldéhyde.

5.3.5 Présentation des résultats

Conformément à la méthodologie de comparaison des substituts élaborée par le GT, les résultats finaux sont présentés dans des tableaux qui présentent les différentes alternatives avec leurs avantages et leurs inconvénients de manière à laisser le décideur retenir la meilleure option en toute connaissance de cause, au regard des critères qu'il jugera comme prioritaires et acceptables.

Les résultats finaux sont donc présentés dans les 2 tableaux ci-dessous.

Tableau 103 : Comparaison des alternatives au formaldéhyde

| Conclusion des modules | Formaldéhyde à 4% | Alternatives | | | |
|--|-------------------|--------------|----------|----------|------------------------------------|
| | | Excell Plus® | FineFix® | RCL2® | Hydrosafe® |
| Classe finale du module « capacités techniques » | Classe 3 | Classe 2 | Classe 2 | Classe 2 | Classe 2 |
| Classe finale du module « danger » (GreenScreen) | Classe 1 | Classe 2 | Classe 2 | Classe 2 | Classe 2 |
| Classe finale du module « Estimation des coûts de substitution » | Classe 4 | Classe 1 | Classe 4 | Classe 1 | Non spécifié par manque de données |
| Classe finale du module « Conditions d'exposition » | Classe 1 | Classe 3 | Classe 2 | Classe 2 | Classe 2 |

Tableau 104 : Identification des autres impacts liés à la substitution

| Conclusion des modules | Formaldéhyde à 4% | Alternatives | | | |
|---------------------------------------|-------------------|--|--|--|--|
| | | Excell Plus® | FineFix® | RCL2® | Hydrosafe® |
| Identification des « autres impacts » | Sans objet | Réévaluation du risque biologique Nouvelles contraintes Développement d'un nouveau standard international Disponibilité de l'alternative | Réévaluation du risque biologique Nouvelles contraintes Développement d'un nouveau standard international | Réévaluation du risque biologique Nouvelles contraintes Développement d'un nouveau standard international | Réévaluation du risque biologique Nouvelles contraintes Développement d'un nouveau standard international Disponibilité de l'alternative |

6 Conclusions du groupe de travail

Le groupe de travail a identifié 3 phases d'activité distinctes permettant de décrire les différentes étapes suivies par un échantillon de son prélèvement jusqu'à son élimination :

- la phase pré-analytique qui consiste à collecter et à transporter le prélèvement vers les laboratoires d'analyses ;
- la phase analytique qui consiste à préparer les échantillons et à mener des analyses de type tissulaire, cellulaire et moléculaire à des fins de diagnostic ;
- la phase post-analytique qui correspond à l'élimination des déchets et à la conservation par archivage des échantillons.

Le groupe de travail de l'Anses a développé une méthode permettant de comparer des alternatives entre elles et par rapport à la substance à substituer. Cette méthode n'a été appliquée que sur les 2 phases dans lesquelles le formaldéhyde est potentiellement utilisé, c'est-à-dire au cours de la phase pré-analytique et au cours de la phase analytique.

La substitution du formaldéhyde dans la phase pré-analytique

Le prélèvement est réalisé principalement dans des blocs opératoires (hôpital ou clinique) ou lors de consultations médicales en cabinet libéral. Les échantillons tissulaires (pièces opératoires ou biopsies) ou cellulaires sont potentiellement fixés et conservés dans une solution de formaldéhyde à 4% avant d'être transportés vers les laboratoires pour être analysés.

La méthode de comparaison des alternatives a été appliquée à la phase pré-analytique.

L'identification des alternatives

Au regard des données collectées, trois procédés alternatifs ont été étudiés : le transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante au laboratoire avant analyses ; la conservation de la pièce fraîche à 4°C ainsi que la technologie de mise sous vide couplée au froid à 4°C.

La technologie de mise sous vide couplée avec l'utilisation de fixateur, de flaconnage avec insertion automatique de fixateur ou encore de distribution automatique de fixateur utilisent toutes les trois du formaldéhyde. Le GT a considéré qu'il s'agissait de procédés permettant de réduire les expositions au formaldéhyde sans toutefois s'y substituer. Par conséquent, ils n'ont pas été étudiés dans la suite de la méthode comme alternatives.

Mise en œuvre de l'étape séquentielle

La première étape séquentielle de la méthode consiste à étudier les différentes alternatives au travers de 3 modules successifs contenant chacun des critères d'exclusion.

Le premier module « **capacités techniques** » consiste à exclure les alternatives qui n'assurent pas les fonctions essentielles recherchées par l'utilisation de la substance à substituer, c'est-à-dire maintenir l'intégrité des prélèvements et leur conservation jusqu'à leur fixation. Ainsi, la préservation de la morphologie des tissus, des protéines et des acides nucléiques sont les 3 critères retenus pour comparer les capacités techniques des alternatives à celles du formaldéhyde.

Pour pouvoir comparer les capacités techniques des 3 procédés alternatifs, les experts de l'Anses ont associé à chacun d'entre eux une durée au-delà de laquelle la préservation de l'échantillon ne peut plus être garantie. Ainsi, le procédé de transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante avant analyse a été classé 4 « capacités techniques supérieures » lorsque la pièce est transférée au laboratoire et fixée en moins d'une heure. La conservation de la pièce fraîche à 4°C a été classée 4 « capacités techniques supérieures » lorsque la pièce est transférée au laboratoire et fixée en moins de 2 heures. La technologie de mise sous vide couplée au froid à 4°C a également été classée 4 « capacités techniques supérieures » lorsque la pièce est transférée au laboratoire et fixée dans les 72 heures.

Ainsi les 3 procédés alternatifs ont été évalués comme ayant des capacités techniques supérieures à celle du formaldéhyde. En effet, contrairement à la fixation des tissus qui peut dégrader et fragmenter les ARN, ces 3 alternatives permettent de préserver les acides nucléiques lorsqu'elles sont utilisées dans les délais impartis.

Le second module « **réglementation** » consiste à exclure des alternatives interdites par une réglementation nationale ou internationale. Aucune réglementation interdisant ces trois alternatives n'ayant été identifiée, elles ont pu être étudiées au travers du module suivant.

Le troisième module « **danger** » consiste ensuite à exclure les alternatives qui sont autant ou plus dangereuses que le formaldéhyde par l'utilisation de l'outil QCAT. Cet outil n'a pas été appliqué puisque les 3 alternatives n'utilisent pas de fixateur chimique.

Au final, les 3 alternatives ont pu être étudiées dans l'étape suivante dite étape simultanée.

Mise en œuvre de l'étape simultanée

La seconde étape de la méthode consiste à comparer en parallèle les 3 alternatives au travers de 4 modules.

Concernant le module « **danger** », l'outil GreenScreen n'a pas pu être directement appliqué à l'ensemble des alternatives car ce sont des procédés n'utilisant pas d'agents chimiques. Aucun danger de nature chimique n'étant identifié, ces alternatives se voient attribuer la classe finale de 4 « substance chimique peu dangereuse ».

Concernant le module « **estimation des coûts de substitution** », les experts de l'Anses soulignent que le transport des prélèvements va être un enjeu majeur dans l'estimation des coûts de substitution. La nécessité de transporter les pièces existe majoritairement dans le cas d'un établissement ne possédant pas de laboratoire d'analyse au sein de sa structure. Ainsi, les experts de l'Anses ont distingué deux types de scénarios pour estimer le coût des alternatives au formaldéhyde. Le premier scénario concerne les établissements possédant un laboratoire *in situ* et le second concerne les établissements ne possédant pas de laboratoire au sein de leur structure. Dans les deux scénarios, la technologie de mise sous vide couplée à 4°C est classée 1 « coûts relatifs les plus élevés ». Le transfert de la pièce fraîche à température ambiante avant analyses ainsi que la conservation de la pièce à 4°C restent classées de la même manière dans les deux scénarios. C'est à dire soit dans la classe 4 : « coût relatif les moins élevés » dans le cas où les établissements possèdent leur laboratoire *in situ* ou soit dans la classe 2 « coût relatif moyennement élevés » dans le cas où les établissements doivent organiser un transport journalier à 4°C des échantillons vers le laboratoire d'analyses.

Concernant le module « **conditions d'exposition** », les critères du module n'ont pas pu être directement appliqués aux alternatives car il n'y a pas de substances chimiques mises en œuvre dans les procédés alternatifs. Une classe 4 « conditions d'exposition estimées négligeables » a été attribuée à l'ensemble des procédés alternatifs.

Le module « **autres impacts** » souligne que, quelle que soit la solution de substitution retenue, elle aura des impacts sur l'organisation des flux et notamment sur l'organisation des transports et des programmes de prélèvements qui devront être optimisés pour préserver les échantillons. Par ailleurs, la chaîne du froid devra être respectée jusqu'au laboratoire d'analyses dès lors qu'une alternative mettant en œuvre une conservation à 4°C est choisie. Enfin, le module souligne que la problématique du risque biologique semble être le risque le plus important à prendre en compte en cas de substitution du formaldéhyde à cette étape. L'absence de propriété biocide des alternatives conduit à un risque biologique qui doit faire l'objet d'une attention particulière dans le cadre de l'évaluation des risques. Cependant, les experts de l'Anses estiment que le risque biologique n'est pas majoré en raison de la mise en œuvre des règles d'hygiène et de sécurité du personnel et des contraintes réglementaires relatives à l'emballage multiple et aux transports (transport par route, Arrêté TMD ADR).

En **conclusion**, des alternatives à l'utilisation du formaldéhyde existent aujourd'hui pour l'ensemble des phases pré-analytiques dès lors que le temps entre le moment de l'exérèse et la mise en contact avec le fixateur (temps d'ischémie) ne dépasse pas 72 heures.

L'application de la méthode de comparaison des alternatives à la phase analytique

Le prélèvement arrive au laboratoire déjà fixé au formaldéhyde ou non fixé. Dans ce dernier cas, la fixation de la pièce dans du formaldéhyde à 4% se déroule au laboratoire avant analyses. La pièce fixée est ensuite analysée à travers diverses techniques.

La méthode de comparaison des alternatives a été appliquée à la phase analytique.

L'identification des alternatives

L'analyse de la littérature scientifique a permis d'identifier 58 alternatives potentielles à l'utilisation du formaldéhyde comme fixateur lors de la phase analytique.

En ce qui concerne la technologie de mise sous vide couplée avec l'utilisation de formaldéhyde, le GT a considéré qu'il s'agissait d'un procédé permettant de réduire les quantités de formaldéhyde lors du stockage des pièces dans les laboratoires sans toutefois le substituer. Par conséquent, il n'a pas été étudié dans la suite de la méthode.

La congélation à -80°C qui a été présentée par les parties prenantes de la profession comme une alternative possible à l'utilisation du formaldéhyde, n'a pas été retenue en tant que telle par le GT. En effet, une fois décongelées, les pièces doivent dans la plupart des cas être fixées au formaldéhyde avant d'être analysées. Le GT a conclu que ce procédé permet de stocker les échantillons sans fixateur mais ne supprime pas l'étape de fixation utilisant le formaldéhyde. Par conséquent, il n'a pas été étudié dans la suite de la méthode.

Mise en œuvre de l'étape séquentielle

La première étape séquentielle de la méthode consiste à étudier les différentes alternatives au travers de 3 modules successifs contenant chacun des critères d'exclusion.

Le premier module « **capacités techniques** » consiste à exclure les alternatives qui n'assurent pas les fonctions essentielles recherchées par l'utilisation de la substance à substituer. Un substitut au formaldéhyde doit :

- garantir la conservation des caractéristiques morphologiques et être compatible avec le fonctionnement de tous les automates, les colorations standards et spéciales ;
- être compatible avec le fonctionnement des techniques d'IHC ;
- être compatible avec le fonctionnement des techniques HIS ;
- être compatible avec le fonctionnement des techniques d'extraction d'ADN ;
- être compatible avec le fonctionnement des techniques d'extraction d'ARN ;
- posséder un potentiel biocide
- garantir la conservation des échantillons pendant 10 ans pour le suivi des patients

L'évaluation des capacités techniques des 58 alternatives, au travers de 7 critères jugés essentiels a conduit à ne pouvoir classer que 12 d'entre elles. En effet, bien souvent pour une même alternative, la majorité des critères techniques retenus par les experts de l'Anses n'ont pas été évalués par les auteurs.

4 alternatives (Glyo-Fixx®, RCL2-CS100®, Weigner fixateur® et ZBF®) ont été classées 1 « capacités techniques insuffisantes » et n'ont donc pas été étudiées dans la suite de la méthode. Au final, 7 mélanges, à savoir le PAXgene®, l'Excell Plus®, le FineFix®, le Green-Fix®, l'HydroSafe®, le RCL2® et l'UMFIX® ont été classés 2 « capacités techniques inférieures » et ont pu être étudiés dans la suite de la méthode. Le procédé HOPE® a également été classé 2 « capacités techniques inférieures » et a pu être étudié dans la suite de la méthode.

Le second module « **réglementation** » consiste à exclure des alternatives interdites par une réglementation nationale ou internationale. Aucune réglementation interdisant pour des raisons sanitaires ces 8 alternatives n'ayant été identifiée, elles ont pu être étudiées au travers du module suivant.

Le troisième module « **danger** » consiste à exclure les alternatives qui sont autant ou plus dangereuses que le formaldéhyde. Les mélanges PAXgene®; Green-Fix® et UMFIX® ont été classés selon l'outil QCAT dans la même classe de danger que celle du formaldéhyde cancérigène sur la base des propriétés neurotoxiques du méthanol présent dans les mélanges. Le procédé HOPE® a été également classé dans la même classe de danger que celle du formaldéhyde dans la mesure où l'une des substances du mélange est classée cancérigène de catégorie 1B par le règlement CLP.

Au final, l'Excell Plus®, l'Hydrosafe®, le FineFix® et le RCL2® ont été identifiés comme des alternatives pouvant être étudiées dans la phase simultanée de la méthode.

Mise en œuvre de l'étape simultanée

La seconde étape de la méthode consiste à comparer les 4 alternatives au travers de 4 modules.

En ce qui concerne le module « **danger** », l'outil GreenScreen a permis d'attribuer une classe finale à chacune des alternatives. L'Hydrosafe® ; le FineFix® et le RCL2® ont été classés 2 « substance chimique très dangereuse »⁷ en raison de la classification « H225 – Liquide et vapeurs très inflammables » de l'éthanol. L'Excell Plus® a également été classé 2 « substance chimique très dangereuse » en raison de la classification « H341 - mutagène de catégorie 2 » du glyoxal et de la présence d'éthanol dans le mélange.

Concernant le module « **estimation des coûts de substitution** », les experts de l'Anses ont été confrontés au fait que l'Excell Plus® et l'Hydrosafe® ne sont plus actuellement disponibles sur le marché. Cependant, la commercialisation de l'Excell Plus® a été arrêtée au début de l'année 2018 et les experts de l'Anses ont utilisé le prix d'achat du mélange à cette date pour attribuer une classe finale au mélange. Sans aucune information réaliste sur le coût d'achat de l'Hydrosafe®, il n'a pas été possible de comparer ce mélange au formaldéhyde à travers ce module. La classe « Non spécifié par manque de données » lui a été attribuée. Au final, l'Excell Plus® et le RCL2® présenteraient les coûts relatifs de substitution les plus élevés (classe 1) et le FineFix® présenterait des coûts relatifs peu élevés (classe 4).

Concernant le module « **conditions d'exposition** », les experts se sont basés sur le fait que tous les mélanges contiennent de l'éthanol, une substance très inflammable, pour leur attribuer une classe finale. Ainsi, les experts ont attribué la classe 3 « conditions d'exposition faibles » à l'Excell Plus® dans la mesure où le mélange contient moins de 10% d'éthanol. Par ailleurs, les experts ont attribué la classe 2 « conditions d'exposition moyennes » au FineFix®, à l'Hydrosafe® et au RCL2® dans la mesure où les trois mélanges contiennent 70 % d'éthanol.

Enfin le module « **autres impacts** » souligne d'abord que deux des alternatives identifiées (l'Excell Plus® et l'Hydrosafe®) ne sont plus disponibles sur le marché. Ensuite, il est indiqué que la substitution du formaldéhyde va nécessiter le développement d'un nouveau standard international afin de permettre une inter-comparaison des prélèvements avec l'ensemble des structures participant à des protocoles internationaux. Enfin, la problématique du risque biologique doit être prise en compte en cas de substitution du formaldéhyde. L'absence de propriété biocide conduit à un risque biologique qui doit faire l'objet d'une attention particulière dans le cadre de l'évaluation des risques. Cependant, les experts de l'Anses estiment que le risque biologique en laboratoire n'est pas majoré puisque le personnel des laboratoires peut déjà être amené à manipuler des prélèvements biologiques non fixés et suit déjà les règles d'hygiène et de sécurité relatives à ce risque.

⁷ pour mémoire, le formaldéhyde est en classe 1, classe correspondant aux substances chimiques extrêmement dangereuses.

Les experts de l'Anses soulignent le fait que dans le cas où les prélèvements arrivent frais à température ambiante ou à 4°C ou sous-vide à 4°C dans le laboratoire, il sera alors nécessaire d'équiper le laboratoire de réfrigérateurs ou de chambres froides à 4 °C pour pouvoir réceptionner les prélèvements sans interrompre la chaîne du froid et d'organiser le flux de traitement des échantillons afin d'organiser leur fixation en respectant le temps d'ischémie.

En **conclusion**, en l'état actuel des connaissances, aucun substitut ne satisfait l'ensemble des critères techniques retenus par les experts de l'Anses. En effet, certaines alternatives étudiées ont pu montrer de bons résultats uniquement sur certaines techniques analytiques mais jamais sur l'ensemble d'entre elles et les critères « potentiel biocide » et « conservation d'un échantillon sur 10 ans » n'ont pu être évalués par manque de données.

Limites des outils utilisés dans le cadre de la méthode de comparaison des alternatives

Au regard de la construction très protectrice de la méthode de comparaison utilisée (qui peut classer dans une même classe de danger un cancérogène avéré et un neurotoxique avéré et classer dans une même classe de danger un suspecté mutagène et un liquide très inflammable), la méthode peut conduire à n'identifier qu'une liste d'alternatives potentielles très réduite.

De plus, la méthodologie compare uniquement les dangers de chacun des constituants connus des mélanges de façon individuelle sans que ne soit réalisée une évaluation des risques pour l'Homme et l'environnement des mélanges dans leur globalité.

7 Recommandations du Groupe de Travail

Pour la phase pré-analytique, au regard de l'évaluation des alternatives à l'utilisation du formaldéhyde, il existe des alternatives possibles dès lors que le temps d'ischémie ne dépasse pas 72h. Le GT recommande la mise en œuvre d'un des trois procédés alternatifs suivants :

- le transfert direct de la pièce fraîche à température ambiante au laboratoire avant analyses à condition que le temps d'ischémie reste inférieur à 1 heure ;
- la conservation de la pièce fraîche à 4°C à condition que le temps d'ischémie reste inférieur à 2 heures ;
- la technologie de mise sous vide couplée au froid à 4°C à condition que le temps d'ischémie reste inférieur à 72 heures.

Le groupe de travail recommande également que la fixation des pièces à analyser soit réalisée systématiquement dans les laboratoires d'analyses.

Pour la phase analytique, compte tenu qu'aucun substitut ne satisfait l'ensemble des critères techniques, le groupe de travail recommande :

- d'utiliser un ou plusieurs fixateurs alternatifs donnant de bons résultats sur des techniques analytiques bien spécifiques. Le groupe de travail souhaite rappeler, qu'indépendamment du fait que le décideur devra retenir en toute connaissance de cause la meilleure option au regard des critères qu'il jugera comme prioritaires et acceptables, que les alternatives ayant pu être évaluées au travers de l'ensemble des modules de la méthode sont toutes moins dangereuses que le formaldéhyde, cancérigène avéré.

Dans un objectif de réduction des expositions au formaldéhyde lors de la phase analytique pour les opérations de stockage des pièces fraîches lorsqu'elles sont reçues au laboratoire, le groupe de travail recommande de recourir aux techniques du froid (selon les cas, 4°C ou - 80°C).

Dans la mesure où le risque biologique lié à l'utilisation des alternatives n'a pas été évalué dans le cadre de ces travaux, les experts rappellent que les règles d'hygiène et de sécurité relatives à ce risque doivent continuer à être mises en œuvre dans les laboratoires.

Dans une perspective de développement de substituts, le GT recommande :

- de développer des techniques de mise sous vide couplées avec un fixateur autre que le formaldéhyde ;
- de développer des techniques de flaconnage prêt à l'emploi avec un fixateur autre que le formaldéhyde ;
- d'encourager les travaux de recherches complémentaires sur les fixateurs ayant démontré de très bons résultats pour certaines techniques analytiques uniquement ;
- de mener une veille sur les fixateurs sans formaldéhyde. Les 46 mélanges identifiés comme des alternatives potentielles qui n'ont pas pu être évalués par les experts de l'Anses faute de données pourraient constituer une liste de départ.

8 Bibliographie

8.1 Publications

Acton, A., T. Harvey, et M. W. Grow. 2005. "An examination of non-formalin-based fixation methods for *Xenopus* embryos." *Dev Dyn* 233 (4):1464-9. doi: 10.1002/dvdy.20448.

AFAQAP. 2015. "Gestion des tissus inclus en paraffine." *Annales de Pathologie* 35 (3):203-205. doi: <https://doi.org/10.1016/j.annpat.2015.04.001>.

Afsset. 2009. "Évaluation des risques sanitaires pour la population générale liés à la présence de formaldéhyde dans les environnements intérieurs et extérieurs." Maisons-Alfort: Anses; Rapport N°: 1165-0001. 397.

Alphapath. 2018. Echanges avec le dirigeant de la société Alphapath.

American MasterTech. 2016. Excell Plus - Fixateur histologique de tissus prêt à l'emploi.

American MasterTech. 2017. Fiche de données de sécurité du produit Excell Plus®.

Anses. 2010. "L'éthanol en population professionnelle - Evaluation des risques de l'éthanol en population professionnelle." ; . 1-336.

Anses. 2011. "Evaluation des risques de l'éthanol pour la population générale." ; . 1-102.

Anses. 2018. "Document méthodologique de comparaisons des alternatives à une substance dangereuse." ; . 1-92.

AP-HP. 2008. "Le formol à l'hôpital, utilisation, risques, recommandations. Groupe de travail AP-HP, PAPRIACT, thème n°5 « Prévention des risques chimiques et biologiques »." Paris. 84p.

AP-HP. 2017. Echanges avec l'Assistance publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP).

Aydin, I., K. Yorukoglu, S. Cingoz, et S. Agilkaya. 2013. "The effect of the alternative solutions to formaldehyde and xylene on tissue processing." *Indian J Pathol Microbiol* 56 (3):221-30. doi: 10.4103/0377-4929.120371.

Bellisario, V., G. Mengozzi, E. Grignani, M. Bugiani, A. Sapino, G. Bussolati, et R. Bono. 2016. "Towards a formalin-free hospital. Levels of 15-F2t-isoprostane and malondialdehyde to monitor exposure to formaldehyde in nurses from operating theatres." *Toxicology Research* 5 (4):1122-1129. doi: 10.1039/c6tx00068a.

Belloni, B., C. Lambertini, P. Nuciforo, J. Phillips, E. Bruening, S. Wong, et R. Dummer. 2013. "Will PAXgene substitute formalin? A morphological and molecular comparative study using a new fixative system." *J Clin Pathol* 66 (2):124-35. doi: 10.1136/jclinpath-2012-200983.

Benerini Gatta, L., M. Cadei, P. Balzarini, S. Castriciano, R. Paroni, A. Verzeletti, V. Cortellini, F. De Ferrari, et P. Grigolato. 2012. "Application of alternative fixatives to formalin in diagnostic pathology." *Eur J Histochem* 56 (2):e12. doi: 10.4081/ejh.2012.12.

Boissiere-Michot, F., A. Denouel, N. Boulle, C. Guillaume, B. Orsetti, E. Lopez-Crapez, M. C. Chateau, et F. Bibeau. 2013. "The non-crosslinking fixative RCL2(R)-CS100 is compatible with both pathology diagnosis and molecular analyses." *Pathol Oncol Res* 19 (1):41-53. doi: 10.1007/s12253-012-9556-2.

Boon, M. E., U. Schmidt, G. I. Cramer-Knijenburg, et J. H. van Krieken. 1992. "Using Kryofix as alternative for formalin results in more optimal and standardized immunostaining of paraffin sections." *Pathol Res Pract* 188 (7):832-5. doi: 10.1016/s0344-0338(11)80240-2.

Bostwick, D. G., N. al Annouf, et C. Choi. 1994. "Establishment of the formalin-free surgical pathology laboratory. Utility of an alcohol-based fixative." *Arch Pathol Lab Med* 118 (3):298-302.

- Bussolati, G., L. Annaratone, et F. Maletta. 2015. "The pre-analytical phase in surgical pathology." *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progrès dans les recherches sur le cancer* 199:1-13. doi: 10.1007/978-3-319-13957-9_1.
- CCAP. 2016. Compte rendu de l'audition du Club des Cadres de Santé d'Anatomie et cytologie Pathologiques. édité par Club des Cadres de Santé d'Anatomie et cytologie Pathologiques (CCAP).
- Chu, I., R. Poon, V. Valli, A. Yagminas, W. J. Bowers, R. Seegal, et R. Vincent. 2005. "Effects of an ethanol-gasoline mixture: results of a 4-week inhalation study in rats." *J Appl Toxicol* 25 (3):193-9. doi: 10.1002/jat.1051.
- Collège Français des Pathologistes (CoPath). 2011. Enseignement d'Anatomie pathologiques : Moyens et objectifs de l'anatomie pathologique en médecine. 1-272.
- Comanescu, M., L. Annaratone, G. D'Armento, G. Cardos, A. Sapino, et G. Bussolati. 2012. "Critical steps in tissue processing in histopathology." *Recent Patents on DNA and Gene Sequences* 6 (1):22-32. doi: 10.2174/187221512799303190.
- Cox, M. L., C. L. Schray, C. N. Luster, Z. S. Stewart, P. J. Korytko, M. Khan KN, J. D. Paulauskis, et R. W. Dunstan. 2006. "Assessment of fixatives, fixation, and tissue processing on morphology and RNA integrity." *Exp Mol Pathol* 80 (2):183-91. doi: 10.1016/j.yexmp.2005.10.002.
- CPA. 2016a. "GreenScreen for safer chemicals hazard assessment guidance (Version 1.3, Last Updated: March 2016)." Somerville, MA: Clean Production Action; Contract No.: version 1.3. 1-54.
- CPA. 2016b. GreenScreen list translator version 1.3 specified lists (Last Updated: March 2016). Somerville, MA: Clean Production Action.
- CPA. 2016c. GreenScreen version 1.3 hazard criteria (Last Updated: March 2016). Somerville, MA: Clean Production Action.
- CPA. 2016d. GreenScreen® for Safer Chemicals Version 1.3 Information Sources (Last Updated: January 14, 2016). Somerville, MA: Clean Production Action.
- Department of Ecology State of Washington. 2016. "Quick Chemical Assessment Tool (version 2.0)." Olympia, Washington: Department of Ecology State of Washington; Contract No.: 14-04-033. 1-117.
- DiaPath. 2017. Fiche de données de sécurité du produit GREENFIX PLUS Fixateur universel®.
- Dotti, I., S. Bonin, G. Basili, E. Nardon, A. Balani, S. Siracusano, F. Zanconati, S. Palmisano, N. De Manzini, et G. Stanta. 2010. "Effects of formalin, methacarn, and fineFIX fixatives on RNA preservation." *Diagn Mol Pathol* 19 (2):112-22. doi: 10.1097/PDM.0b013e3181b520f8.
- EFSA. 2006. "Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to the use of polyvinyl alcohol as a coating agent for food supplements." *EFSA Journal* 4 (2):294. doi: doi:10.2903/j.efsa.2006.294.
- Formigoni, A., M. C. Cornil, A. Prandi, A. Mordenti, A. Rossi, D. Portetelle, et R. Renaville. 1996. "Effect of propylene glycol supplementation around parturition on milk yield, reproduction performance and some hormonal and metabolic characteristics in dairy cows." *J Dairy Res* 63 (1):11-24.
- Fox, C. H., F. B. Johnson, J. Whiting, et P. P. Roller. 1985. "Formaldehyde fixation." *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 33 (8):845-853.
- Gamarra, Giselle, Claire Ponsart, S Lacaze, Brigitte Le Guienne, Marie-Christine Deloche, Danielle Monniaux, et Andrew Ponter. 2014. "Short term dietary propylene glycol supplementation affects circulating metabolic hormones, progesterone concentrations and follicular growth in dairy heifers." *Livestock Science* 162:240-251. doi: 10.1016/j.livsci.2014.01.015.
- Gedrange, T., R. Mai, F. Mack, M. Zietek, G. Borsos, A. Vegh, A. Spassov, et T. Gredes. 2008. "Evaluation of shape and size changes of bone and remodelled bone substitute after different fixation methods." *J Physiol Pharmacol* 59 Suppl 5:87-94.
- Grandjean, P., et P. J. Landrigan. 2006. "Developmental neurotoxicity of industrial chemicals." *The Lancet* 368 (9553):2167-2178. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69665-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69665-7).

- Gündisch, S., C. Schott, C. Wolff, K. Tran, C. Beese, C. Viertler, K. Zatloukal, et K. F. Becker. 2013. "The PAXgene® Tissue System Preserves Phosphoproteins in Human Tissue Specimens and Enables Comprehensive Protein Biomarker Research." *PLoS ONE* 8 (3). doi: 10.1371/journal.pone.0060638.
- Hammond, M. E., D. F. Hayes, M. Dowsett, D. C. Allred, K. L. Hagerty, S. Badve, P. L. Fitzgibbons, G. Francis, N. S. Goldstein, M. Hayes, D. G. Hicks, S. Lester, R. Love, P. B. Mangu, L. McShane, K. Miller, C. K. Osborne, S. Paik, J. Perlmutter, A. Rhodes, H. Sasano, J. N. Schwartz, F. C. Sweep, S. Taube, E. E. Torlakovic, P. Valenstein, G. Viale, D. Visscher, T. Wheeler, R. B. Williams, J. L. Wittliff, et A. C. Wolff. 2010. "American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer." *J Clin Oncol* 28 (16):2784-95. doi: 10.1200/jco.2009.25.6529.
- Hicks, D. J., L. Johnson, S. M. Mitchell, J. Gough, W. A. Cooley, R. M. La Ragione, Y. I. Spencer, et A. Wangoo. 2006. "Evaluation of zinc salt based fixatives for preserving antigenic determinants for immunohistochemical demonstration of murine immune system cell markers." *Biotech Histochem* 81 (1):23-30. doi: 10.1080/10520290600725375.
- Howat, William J., et Beverley A. Wilson. 2014. "Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures." *Methods* 70 (1):12-19. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.01.022>.
- INRS. 2009. "Anatomopathologie - Substitution du formol : on peut le faire." *Travail & sécurité*, Novembre 2009, 24-25.
- INRS. 2014a. "ED 6185 Laboratoires d'anatomie et de cytologie pathologiques - Guide pratique de ventilation." ; .
- INRS. 2014b. Fiche toxicologique n°229 - Glyoxal et solutions aqueuses.
- INRS. 2016. Fiche toxicologique n°25 - Éthylène-glycol.
- Ishidate, M., Jr., T. Sofuni, K. Yoshikawa, M. Hayashi, T. Nohmi, M. Sawada, et A. Matsuoka. 1984. "Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan." *Food Chem Toxicol* 22 (8):623-36.
- Kacena, M. A., N. W. Troiano, C. E. Coady, et M. C. Horowitz. 2004. "HistoChoice as an alternative to formalin fixation of undecalcified bone specimens." *Biotech Histochem* 79 (5-6):185-90. doi: 10.1080/10520290400015506.
- Kap, M., F. Smedts, W. Oosterhuis, R. Winther, N. Christensen, B. Reischauer, C. Viertler, D. Groelz, K. F. Becker, K. Zatloukal, R. Langer, J. Slotta-Huspenina, K. Bodo, B. de Jong, U. Oelmüller, et P. Riegman. 2011. "Histological assessment of paxgene tissue fixation and stabilization reagents." *PLoS ONE* 6 (11). doi: 10.1371/journal.pone.0027704.
- Klopfleisch, R., M. von Deetzen, A. T. Weiss, J. Weigner, F. Weigner, J. Plendl, et A. D. Gruber. 2013. "Weigners fixative-an alternative to formalin fixation for histology with improved preservation of nucleic acids." *Vet Pathol* 50 (1):191-9. doi: 10.1177/0300985812441031.
- Kristensen, T., B. Engvad, O. Nielsen, T. Pless, S. Walter, et M. Bak. 2011. "Vacuum sealing and cooling as methods to preserve surgical specimens." *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology* 19 (5):460-469. doi: 10.1097/PAI.0b013e318214e523.
- Lassalle, S., V. Hofman, I. Marius, V. Gavric-Tanga, P. Brest, K. Havet, C. Butori, E. Selva, J. Santini, B. Mograbi, et P. Hofman. 2009. "Assessment of morphology, antigenicity, and nucleic acid integrity for diagnostic thyroid pathology using formalin substitute fixatives." *Thyroid* 19 (11):1239-48. doi: 10.1089/thy.2009.0095.
- Li, G., D. van Niekerk, D. Miller, T. Ehlen, C. Garnis, M. Follen, M. Guillaud, et C. Macaulay. 2014. "Molecular fixative enables expression microarray analysis of microdissected clinical cervical specimens." *Exp Mol Pathol* 96 (2):168-77. doi: 10.1016/j.yexmp.2013.12.007.

- Lopez-Sebastian, A., A. Gomez-Brunet, A. W. Lishman, S. K. Johnson, et E. K. Inskeep. 1993. "Modification by propylene glycol of ovulation rate in ewes in response to a single injection of FSH." *J Reprod Fertil* 99 (2):437-42.
- Lu, Xue, Chun Li, Yong-Kun Wang, Kun Jiang, et Xiao-Dong Gai. 2014. "Sorbitol induces apoptosis of human colorectal cancer cells via p38 MAPK signal transduction." *Oncology letters* 7 (6):1992-1996. doi: 10.3892/ol.2014.1994.
- Majewski, P., A. Pernak, M. Grzymislowski, K. Iwanik, et J. Pernak. 2003. "Ionic liquids in embalming and tissue preservation. Can traditional formalin-fixation be replaced safely?" *Acta Histochem* 105 (2):135-42. doi: 10.1078/0065-1281-00707.
- Masir, N., M. Ghoddoosi, S. Mansor, F. Abdul-Rahman, C. S. Florence, N. A. Mohamed-Ismail, M. R. Tamby, et N. H. Md-Latar. 2012. "RCL2, a potential formalin substitute for tissue fixation in routine pathological specimens." *Histopathology* 60 (5):804-15. doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.04127.x.
- Matthopoulos, D. P., et M. Tzaphlidou. 1987. "Tissue culture fixation with diimidoesters-I. comparison of structure obtained with diimidoesters and formaldehyde." *Micron And Microscopica Acta* 18 (4):273-279. doi: 10.1016/0739-6260(87)90026-8.
- Melrose, J., S. M. Smith, M. M. Smith, et C. B. Little. 2008. "The use of Histochoice™® for histological examination of articular and growth plate cartilages, intervertebral disc and meniscus." *Biotechnic and Histochemistry* 83 (1):47-53. doi: 10.1080/10520290801990414.
- Meyer, R., F. Niedobitek, et K. Wenzelides. 1996. "[Experiences with the NoToX formalin substitute solution]." *Pathologie* 17 (2):130-2.
- Meyer, Wilfried, et Isabelle Nina Hornickel. 2010. "Tissue fixation—the most underestimated methodical feature of immunohistochemistry." *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education* 2:953-959.
- Milestone. 2015a. Fiche de données de sécurité du produit FineFIX Concentrate®.
- Milestone. 2015b. FineFix (Formalin Substitute) - Handbook of Protocols for : fixation & Immunohistochemistry. Italy.
- Ministère du travail de l'emploi et de la santé, et Direction générale de l'offre de soins. 2012. "Rapport Anatomie et cytologie pathologiques." Paris: SMPF. 216p.
- Miyoshi, S., J. L. Pate, et D. L. Palmquist. 2001. "Effects of propylene glycol drenching on energy balance, plasma glucose, plasma insulin, ovarian function and conception in dairy cows." *Animal Reproduction Science* 68 (1):29-43. doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00137-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00137-3).
- MM France. 2016. Compte rendu de l'audition de Microm Microtech France. édité par Microm Microtech France (MM France).
- MM France. 2018. Echanges avec Virginie Lafargue, chef de produits Consommables de l'entreprise MM France.
- Moelans, C. B., N. ter Hoeve, J. W. van Ginkel, F. J. ten Kate, et P. J. van Diest. 2011. "Formaldehyde substitute fixatives. Analysis of macroscopy, morphologic analysis, and immunohistochemical analysis." *Am J Clin Pathol* 136 (4):548-56. doi: 10.1309/ajcphh1b0cocbgom.
- Molino, G., P. Avagnina, G. Belforte, et J. Bircher. 1998. "Assessment of the hepatic circulation in humans: new concepts based on evidence derived from a D-sorbitol clearance method." *J Lab Clin Med* 131 (5):393-405.
- Nace, E. K., F. J. Steurer, et M. L. Eberhard. 1999. "Evaluation of Streck tissue fixative, a nonformalin fixative for preservation of stool samples and subsequent parasitologic examination." *J Clin Microbiol* 37 (12):4113-9.
- Nadji, M., M. Nassiri, V. Vincek, R. Kanhoush, et A. R. Morales. 2005. "Immunohistochemistry of tissue prepared by a molecular-friendly fixation and processing system." *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 13 (3):277-82.

- Nassiri, M., S. Ramos, H. Zohourian, V. Vincek, A. R. Morales, et M. Nadji. 2008. "Preservation of biomolecules in breast cancer tissue by a formalin-free histology system." *BMC Clinical Pathology* 8 (1). doi: 10.1186/1472-6890-8-1.
- Nietner, T., T. Jarutat, et A. Mertens. 2012. "Systematic comparison of tissue fixation with alternative fixatives to conventional tissue fixation with buffered formalin in a xenograft-based model." *Virchows Arch* 461 (3):259-69. doi: 10.1007/s00428-012-1248-5.
- Nissen, E., R. Blesken, G. Kulins, et G. Pauli. 1996. "NoToX - A general alternative to formaldehyde?" *Laboratoriums Medizin* 20 (1):51-53.
- OCDE. 2001. "SIDS Initial Assessment Profile, 1,2-dihydroxypropane." ; . 1-166.
- OCDE. 2003. "SIDS Initial Assessment Profile, Glyoxal." ; . 124-178.
- OCDE. 2004a. "SIDS Initial Assessment Profile, Ethylene glycol." ; . 1-4.
- OCDE. 2004b. "SIDS Initial Assessment Profile, Methanol." ; . 1-5.
- OCDE. 2005. "SIDS Initial Assessment Profile, Ethanol." ; . 1-341.
- Olert, Jürgen. 2003. Tissue fixative composition. : google patents.
- Olert, Jürgen, Klaus-Hermann Wiedorn, Torsten Goldmann, Heike Kühl, Yasmin Mehraein, Harry Scherthan, Fataneh Niketeghad, Ekkehard Vollmer, Annette Margarete Müller, et Jutta Müller-Navia. 2001. "HOPE Fixation: A Novel Fixing Method and Paraffin-embedding Technique for Human Soft Tissues11Dedicated to Prof. Dr. H. Müntefering on the occasion of his 65th birthday." *Pathology - Research and Practice* 197 (12):823-826. doi: <https://doi.org/10.1078/0344-0338-00166>.
- Ozkan, N., E. Salva, F. Cakalagaoglu, et B. Tuzuner. 2012. "Honey as a substitute for formalin?" *Biotech Histochem* 87 (2):148-53. doi: 10.3109/10520295.2011.590155.
- Panzacchi, S., S. Boiani, D. Mandrioli, M. Piccioli, et F. Belpoggi. 2013. "Applying immunohistochemistry to alcohol-fixed paraffinembedded tissues: An innovative technique to reduce use of formaldehyde." *European Journal of Oncology* 18 (2):75-83.
- Patil, S., B. Premalatha, R. S. Rao, et B. Ganavi. 2013. "Revelation in the field of tissue preservation - a preliminary study on natural formalin substitutes." *J Int Oral Health* 5 (1):31-8.
- Patil, S., R. S. Rao, B. S. Ganavi, et B. Majumdar. 2015. "Natural sweeteners as fixatives in histopathology: A longitudinal study." *Journal of Natural Science, Biology and Medicine* 6 (1):67-70. doi: 10.4103/0976-9668.149089.
- Pernak, A., K. Iwanik, P. Majewski, M. Grzymislawski, et J. Pernak. 2005. "Ionic liquids as an alternative to formalin in histopathological diagnosis." *Acta Histochem* 107 (2):149-56. doi: 10.1016/j.acthis.2005.02.003.
- Pietrzak-Johnston, S. M., H. Bishop, S. Wahlquist, H. Moura, N. D. Da Silva, S. P. Da Silva, et P. Nguyen-Dinh. 2000. "Evaluation of commercially available preservatives for laboratory detection of helminths and protozoa in human fecal specimens." *J Clin Microbiol* 38 (5):1959-64.
- Ponsart, Claire, Giselle Gamarra Lazo, Serge Lacaze, et Andrew Ponter. 2014. "Nutritional status of donor cows: Insulin related strategies to enhance embryo development." *Animal Reproduction* 11 (3):195-198.
- Preanalytix GmbH. 2017. Fiche de données de sécurité du produit PAXgene Tissue Container®.
- Prento, P., et H. Lyon. 1997. "Commercial formalin substitutes for histopathology." *Biotech Histochem* 72 (5):273-82.
- Richards, A. B., S. Krakowka, L. B. Dexter, H. Schmid, A. P. Wolterbeek, D. H. Waalkens-Berendsen, A. Shigoyuki, et M. Kurimoto. 2002. "Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies." *Food Chem Toxicol* 40 (7):871-98.
- Rochaix, P. 2015. Echanges avec Philippe Rochaix, directeur Adjoint du département de pathologie, sur la substitution du formaldéhyde par le RCL2 dans les laboratoires d'ACP.

- Sabarinath, B., B. Sivapathasundharam, et M. Sathyakumar. 2014. "Fixative properties of honey in comparison with formalin." *Journal of Histotechnology* 37 (1):21-25. doi: 10.1179/2046023613Y.0000000037.
- Saleh, E, A Pirestani, et A Shahraki. 2016. "The Effect of Increase in Ration Energy by Propylene Glycol on Estrogen and Progesterone Hormones of Holstein Cows in Period of Transition." *Turkish Journal of Engineering and Technology* 3 (4):140-143.
- Schutte, B., M. M. Reynders, F. T. Bosman, et G. H. Blijham. 1987. "Effect of tissue fixation on anti-bromodeoxyuridine immunohistochemistry." *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 35 (11):1343-5.
- Shevchuk, O., N. Abidi, F. Klawonn, J. Wissing, M. Nimtz, C. Kugler, M. Steinert, T. Goldmann, et L. Jänsch. 2014. "HOPE-fixation of lung tissue allows retrospective proteome and phosphoproteome studies." *Journal of Proteome Research* 13 (11):5230-5239. doi: 10.1021/pr500096a.
- SMPF, et IHP. 2015. Audition du Syndicat des Médecins Pathologistes Français (SMPF) et du directeur de la gérance de l'Institut d'Histopathologie de Nantes (IHP).
- Souza, C. M., C. G. Lima, M. J. Alves, Jr., W. W. Arrais-Silva, S. Giorgio, A. X. Linhares, et P. J. Thyssen. 2013. "Standardization of histological procedures for the detection of toxic substances by immunohistochemistry in Dipteran larvae of forensic importance." *J Forensic Sci* 58 (4):1015-21. doi: 10.1111/1556-4029.12140.
- Thavarajah, R., V. K. Mudimbaimannar, J. Elizabeth, U. K. Rao, et K. Ranganathan. 2012. "Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation." *J Oral Maxillofac Pathol* 16 (3):400-5. doi: 10.4103/0973-029x.102496.
- Titford, M. E., et M. G. Horenstein. 2005. "Histomorphologic assessment of formalin substitute fixatives for diagnostic surgical pathology." *Arch Pathol Lab Med* 129 (4):502-6. doi: 10.1043/1543-2165(2005)129<502:haofsf>2.0.co;2.
- TSE. 2017. Devis de la société TSE Express Médical.
- U.S. Department of Health and Human Services. 2003. "National Toxicology Program, Center For The Evaluation Of Risks To Human Reproduction (NTP-CERHR) Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Methanol." : U.S. Department of Health and Human Services; Contract No.: NIH Publication N° 03-4478.
- U.S. Department of Health and Human Services. 2004a. "National Toxicology Program, Center For The Evaluation Of Risks To Human Reproduction (NTP-CERHR) Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Ethylene Glycol." : U.S. Department of Health and Human Services; Contract No.: NIH Publication N° 04-4481.
- U.S. Department of Health and Human Services. 2004b. "National Toxicology Program, Center For The Evaluation Of Risks To Human Reproduction (NTP-CERHR) Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Propylene Glycol." : U.S. Department of Health and Human Services; Contract No.: NIH Publication N° 04-4482.
- Van Essen, H. F., M. A. M. Verdaasdonk, S. M. Elshof, R. A. De Weger, et P. J. Van Diest. 2010. "Alcohol based tissue fixation as an alternative for formaldehyde: Influence on immunohistochemistry." *J Clin Pathol* 63 (12):1090-1094. doi: 10.1136/jcp.2010.079905.
- Vollmer, E., J. Galle, D. S. Lang, S. Loeschke, H. Schultz, et T. Goldmann. 2006. "The HOPE technique opens up a multitude of new possibilities in pathology." *Rom J Morphol Embryol* 47 (1):15-9.
- VWR. 2017. Fiche de données de sécurité du produit D(-)-Sorbitol GPR RECTAPUR®.
- Wang, Y. N., K. Lee, S. Pai, et W. R. Ledoux. 2011. "Histomorphometric comparison after fixation with formaldehyde or glyoxal." *Biotech Histochem* 86 (5):359-65. doi: 10.3109/10520295.2010.520275.
- Wester, K., A. Asplund, H. Backvall, P. Micke, A. Derveniece, I. Hartmane, P. U. Malmstrom, et F. Ponten. 2003. "Zinc-based fixative improves preservation of genomic DNA and proteins in histoprocessing of human tissues." *Lab Invest* 83 (6):889-99.

- Willmore-Payne, C., K. Metzger, et L. J. Layfield. 2007. "Effects of fixative and fixation protocols on assessment of Her-2/neu oncogene amplification status by fluorescence in situ hybridization." *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 15 (1):84-7.
- Wolff, A. C., M. E. Hammond, D. G. Hicks, M. Dowsett, L. M. McShane, K. H. Allison, D. C. Allred, J. M. Bartlett, M. Bilous, P. Fitzgibbons, W. Hanna, R. B. Jenkins, P. B. Mangu, S. Paik, E. A. Perez, M. F. Press, P. A. Spears, G. H. Vance, G. Viale, et D. F. Hayes. 2013. "Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update." *J Clin Oncol* 31 (31):3997-4013. doi: 10.1200/jco.2013.50.9984.
- Wolff, D., P. Villa, A. V. Neirreitter, C. Ruibal, G. A. Ugon, G. Salgado, et M. Cantín. 2012. "Comparative study between conservative solutions with and without formaldehyde in human placenta." *International Journal of Morphology* 30 (2):432-438.
- Zanini, C., E. Gerbaudo, E. Ercole, A. Vendramin, et M. Forni. 2012. "Evaluation of two commercial and three home-made fixatives for the substitution of formalin: a formaldehyde-free laboratory is possible." *Environ Health* 11:59. doi: 10.1186/1476-069x-11-59.
- Zhao, H., J. Li, F. Traganos, H. D. Halicka, M. Zarebski, J. Dobrucki, et Z. Darzynkiewicz. 2011. "Cell fixation in zinc salt solution is compatible with DNA damage response detection by phospho-specific antibodies." *Cytometry A* 79 (6):470-6. doi: 10.1002/cyto.a.21060.

8.2 Législation et réglementation

Commission Européenne. 2014. Règlement (UE) n° 605/2014 du 05/06/2014 modifiant aux fins d'ajouts de mentions de danger et de conseils de prudence en langue croate et aux fins de son adaptation au progrès scientifique et technique, le règlement N°1272/2008 du parlement européen et du conseil relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges. ed. Union Européenne: Journal officiel de l'Union Européenne.

Ministère de l'énergie, de l'économie, du développement durable et de l'aménagement du territoire, and de l'industrie et de l'emploi Ministère de l'économie. 2009. Arrêté du 29 mai 2009 relatif aux transports de marchandises dangereuses par voies terrestres (dit « arrêté TMD ») ed. Journal officiel de la République Française. Paris: Journaux officiels.

Ministère de la santé, de la famille et des personnes handicapées, du travail et de la solidarité Ministère des affaires sociales, Ministère de l'énergie et du développement durable, and de l'alimentation Ministère de l'agriculture, de la pêche et des affaires rurales. 2003. Arrêté du 24 novembre 2003 relatif aux emballages des déchets d'activités de soins à risques infectieux et assimilés et des pièces anatomiques d'origine humaine ed. Journal officiel de la République Française. Paris: Journaux officiels.

Ministère délégué à l'emploi, au travail et à l'insertion professionnelle des jeunes, and Ministère de l'agriculture et de la pêche. 2006. Arrêté du 13 juillet 2006 modifiant l'arrêté du 5 janvier 1993 fixant la liste des substances, préparations et procédés cancérigènes au sens du deuxième alinéa de l'article R. 231-56 du code du travail ed. Journal officiel de la République Française. Paris: Journaux officiels.

Ministère de l'emploi et de la solidarité, and Ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement. 1999. Arrêté du 7 septembre 1999 relatif aux modalités d'entreposage des déchets d'activités de soins à risques infectieux et assimilés et des pièces anatomiques ed. Journal officiel de la République Française. Paris: Journaux officiels.

8.3 Bases de données

AOEC. "Exposure Code List." Association of Occupational and Environmental Clinics (AOEC) Consulté le 18/10/2018. <http://www.aoecdata.org/ExpCodeLookup.aspx>.

CNESST. "List of products according to Workplace Hazardous Materials Information System (WHMIS) 1988." Commission des normes, de l'équité, de la santé et de la sécurité du travail Consulté le 18/10/2018. <http://www.csst.qc.ca/en/prevention/reptox/Pages/list-whmis-1988-a.aspx>.

ECHA. "Base de données des substances enregistrées ". Agence européenne des produits chimiques (ECHA) Consulté le 18/10/2018. <https://echa.europa.eu/fr/home>.

EchemPortal. "The Global Portal to Information on Chemical Substances." OCDE Consulté le 18/10/2018. <https://www.echemportal.org/echemportal/index.action>.

EnviChem. "Data bank of Environmental Properties of Chemicals (EnviChem)." Finnish Environment Institute Consulté le 18/10/2018. <https://www.ymparisto.fi/scripts/Kemrek/Kemrek.asp?Method=MAKECHEMSEARCHFORM>.

Environment and Climate Change Canada. "Canadian Categorization Decisions for Substances on the Domestic Substance List (DSL)." Environment and Climate Change Canada Consulté le 18/10/2018. <https://www.ec.gc.ca/lcpe-cepa/default.asp?lang=En&n=5F213FA8-1&wsdoc=D031CB30-B31B-D54C-0E46-37E32D526A1F>.

EPA. "Chemical Classification and Information Database (CCID)." Environmental Protection Authority Consulté le 18/10/2018. <https://www.epa.govt.nz/database-search/>.

EPA. "Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) - Estrogen Receptor Bioactivity." United States Environmental Protection Agency Consulté le 18/10/2018. <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/endocrine-disruptor-screening-program-edsp-estrogen-receptor-bioactivity>.

IARC. "Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans." International Agency for Research on Cancer Consulté le 18/10/2018. <https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/>.

INCI. "International Nomenclature of Cosmetic Ingredients." The Personal Care Products Council Consulté le 18/10/2018. <https://www.personalcarecouncil.org/resources/inci/>.

MAK Commission of Germany. "Occupational Toxicants and MAK Values: Annual Thresholds and Classifications for the Workplace." The German Research Foundation's (DFG) Permanent Senate Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area ("MAK Commission") Consulté le 18/10/2018. <https://onlinelibrary.wiley.com/browse/book/10.1002/3527600418/toc>.

NITE. "Chemical Risk Information Platform (NITE-CHRIP)." National Institute of Technology and Evaluation Consulté le 18/10/2018. https://www.nite.go.jp/en/chem/chrip/chrip_search/srhInput.

OEHHA. "The Proposition 65 List." The Office of Environmental Health Hazard Assessment Consulté le 18/10/2018. <https://oehha.ca.gov/proposition-65/proposition-65-list>.

TEDX. "The Endocrine Disruption Exchange (TEDX) List." TEDX Consulté le 18/10/2018. <https://endocrinedisruption.org/interactive-tools/tedx-list-of-potential-endocrine-disruptors/search-the-tedx-list>.

U.S. National Library of Medicine. "Hazardous Substances Data Bank (HSDB), Toxnet Database." NIH U.S. National Library of Medicine Consulté le 18/10/2018. <https://toxnet.nlm.nih.gov/>.

U.S. National Library of Medicine. "PubChem Database." NIH U.S. National Library of Medicine Consulté le 18/10/2018. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

US EPA. "PBT Profiler." U.S. Environmental Protection Agency Consulté le 18/10/2018. <http://www.pbtprofiler.net/>.

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre de saisine



2014 -SA- 0 2 3 6

MINISTÈRE DU TRAVAIL, DE L'EMPLOI, DE LA FORMATION PROFESSIONNELLE ET DU DIALOGUE SOCIAL

MINISTÈRE DES AFFAIRES SOCIALES, DE LA SANTÉ ET DES DROITS DES FEMMES

MINISTÈRE DE L'ÉCOLOGIE, DU DÉVELOPPEMENT DURABLE ET DE L'ÉNERGIE

MINISTÈRE DE L'ÉCONOMIE, DE L'INDUSTRIE ET DU NUMÉRIQUE

COURRIER ARRIVE

22 JAN. 2015

DIRECTION GÉNÉRALE

Paris le 09 OCT. 2014

Le Directeur général du travail

Le Directeur général de la santé

La Directrice générale de la concurrence de la consommation et de la répression des fraudes

La Directrice générale de la prévention des risques

à

**Monsieur le Directeur général
de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de
l'alimentation, de l'environnement et du travail**
27-31 avenue du Général Leclerc
94701 Maisons-Alfort cedex

Objet : Utilisation de substituts au formaldéhyde dans différents domaines

Contexte de la demande

Le formaldéhyde a été classé en 2004 par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) dans le groupe 1 des cancérogènes avérés pour l'espèce humaine, sur la base d'études épidémiologiques en milieu de travail portant sur la survenue de cancer du nasopharynx par inhalation. En outre, au niveau européen, une évolution du classement de cancérogène de catégorie 2 à cancérogène de catégorie 1B a été adoptée par le règlement (UE) N° 605/2014 de la Commission du 5 juin 2014 modifiant aux fins de son adaptation au progrès scientifique et technique le règlement CLP.

Les mesures de prévention des risques professionnels liés aux agents chimiques dangereux (ACD) CMR¹ de catégorie 1A ou 1B sont précisées aux articles R. 4412-1 à R. 4412-93 du code du travail qui visent à systématiser - sous la responsabilité de chaque employeur - l'évaluation du risque chimique, en vue de permettre la mise en place de mesures de prévention adaptées à chaque situation de travail et au niveau des risques constatés. Elles prévoient éventuellement une

¹ Cancérogènes Mutagènes, toxiques pour la Reproduction.

obligation de substitution des ACD par des substances, préparations ou procédés non dangereux ou moins dangereux. Cette obligation est plus affirmée encore pour les agents CMR de catégorie 1A ou 1B pour lesquels la substitution est impérative lorsque cela est techniquement possible.

Lorsque l'application du principe de substitution s'avère impossible, l'employeur doit mettre en œuvre tous les moyens permettant de réduire l'exposition en utilisant des mesures de prévention et de protection adaptées (système clos, ventilation générale, autres moyens de protection collective, puis moyens de protection individuelle, formation et information du personnel, surveillance médicale).

Compte-tenu de ces nouvelles informations sur les propriétés dangereuses du formaldéhyde et de la hiérarchie des mesures de gestion des risques y afférant, il est demandé à l'Anses d'éclairer les pouvoirs publics sur les risques pour les travailleurs et la population générale de l'utilisation du formaldéhyde dans les trois domaines ci-après, où il paraît être d'utilité fondamentale.

Activité d'anatomie et cytologie pathologiques

Les médecins spécialisés en anatomie et cytologie pathologiques (ACP) ont alerté nos services sur les difficultés qu'ils rencontrent à appliquer la réglementation française issue du code du travail en matière d'utilisation du formaldéhyde (« formol ») dans les laboratoires d'anatomie et cytologie pathologiques, et notamment l'obligation de substitution.

Le formaldéhyde est le fixateur chimique de référence utilisé en anatomie et cytologie pathologiques notamment à l'étranger. Ces travaux exposant au formaldéhyde étant classés dans la liste des procédés cancérigènes, ils sont soumis à ce titre, aux mesures particulières de prévention des risques cancérigènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction (CMR) de catégorie 1A et 1B.

Les conditions de préservation des tissus constituent une étape critique conditionnant la qualité des résultats des techniques et des diagnostics.

Les publications les plus récentes, qu'elles soient françaises, européennes ou nord-américaines, considèrent en effet le formol comme le fixateur de référence. Le développement des techniques d'immunohistochimie, puis de biologie moléculaire depuis le milieu des années 80, ont conduit à un processus de standardisation des pratiques de fixation en faveur du formaldéhyde, avec l'abandon progressif d'autres fixateurs traditionnels (liquide de Bouin, AFA, etc.) et la mise sur le marché de réactifs de biologie moléculaire adaptés aux tissus fixés au formol.

Le pathologiste français s'estime ainsi soumis à une double obligation contradictoire : assurer une activité d'anatomie et cytologie pathologiques en lien avec les publications scientifiques internationales qui crédibilisent l'utilisation du formol et, en tant qu'employeur, protéger ses collaborateurs des risques liés au formol en le substituant par un autre produit.

Activité de thanatopraxie

La thanatopraxie consiste aux soins de conservation pratiqués sur le corps des personnes défuntes, ayant pour finalité de retarder la thanatomorphose et la dégradation du corps.

Les thanatopracteurs sont amenés à manipuler du formol et il importe ainsi que ces professionnels disposent de l'ensemble des informations nécessaires à l'utilisation de cette substance et qu'il puisse leur être apporté des réponses en termes de solutions alternatives.

L'exposition éventuelle des familles est également à prendre en compte.

Activité de production et d'utilisation de produits alimentaires

En alimentation animale

Le formaldéhyde est à l'heure actuelle utilisé en alimentation animale pour les usages suivants :

- 1) En tant qu'auxiliaire technologique pour le procédé de « protection contre la dégradation ruminale » (tannage des tourteaux) :

Cet usage est autorisé par le règlement (CE) n°68/2013 de la Commission du 16 janvier 2013 relatif au catalogue des matières premières pour aliments des animaux. Ce règlement fixe une teneur en aldéhydes libres inférieure ou égale à 0,12%

Lors des négociations précédant le vote du règlement (CE) n°68/2013, les professionnels ont indiqué ne pas disposer de produits de substitution au formaldéhyde pour cet usage.

- 2) En tant qu'additif technologique (ensilage et conservateur) :

Le formaldéhyde est par ailleurs également autorisé comme additif pour l'alimentation animale pour deux usages : en tant qu'agent d'ensilage et comme conservateur pour les porcs de moins de 6 mois et pour le lait écrémé avec une teneur maximale de 600 mg/kg.

Il a fait l'objet d'une demande de réautorisation comme additif conservateur pour toutes les espèces. L'Agence Européenne de la Sécurité Alimentaire (AESA) a émis un avis sur cette demande le 18 février 2014. Dans son avis, l'AESA considère que des mesures devraient être prises pour éviter que le système respiratoire, la peau et les yeux de toute personne manipulant le produit ne soit pas exposé à toute forme de poussière ou vapeur générée par l'utilisation du formaldéhyde (« *Formaldehyde is a strong irritant, a potent skin and respiratory sensitizer. Measures should be taken to ensure that the respiratory tract, skin and eyes of any person handling the product are not exposed to any dust, mist or vapour generated by the use of formaldehyde* ») mais ne s'oppose pas formellement à l'autorisation du formaldéhyde en raison d'un risque pour la santé du travailleur.

Enfin, une demande pour un nouvel usage du formaldéhyde en tant qu'additif technologique ayant une fonction de réduction de la charge microbienne des organismes pathogènes ("*feed hygiene*") a par ailleurs été déposée. Elle est en cours d'évaluation auprès de l'AESA. L'utilisation est demandée pour toutes les espèces animales, avec une teneur maximale de 1000 mg/kg pour les aliments composés et 2000 mg/kg pour les matières premières. Cette autorisation nécessiterait au préalable la création d'un nouveau groupe fonctionnel d'additif par règlement, suivant la procédure de règlement avec contrôle (PRAC).

Dans son rapport de mai 2009 sur les risques sanitaires liés à la présence de formaldéhyde, l'Afsset n'a pas relevé de données spécifiques relatives aux possibilités de substitution pour le secteur de l'alimentation animale lors de ses recherches.

En alimentation humaine :

Le formaldéhyde est actuellement autorisé comme auxiliaire technologique pour la fabrication de certains alginates.

Par ailleurs, les professionnels du secteur du sucre ont demandé le maintien de l'utilisation du formaldéhyde (autorisé jusqu'au 31 décembre 2014). Cette requête a reçu un avis favorable de l'Anses le 21 novembre 2013. Le formaldéhyde a été présenté par ces professionnels comme le « bactériostatique universel utilisé en sucrerie ». Néanmoins, l'arrêté du 19 octobre 2006 relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires autorise également les extraits de houblon comme produit de substitution du formol pour cet usage.

Objet de la demande

Au regard de ces éléments, nous souhaitons donc recueillir votre avis :

- 1- Sur l'intérêt du formol par rapport aux autres substituts pour le diagnostic en matière d'anatomie et cytologie pathologiques dans les situations de routine et dans des situations particulières pour lesquelles le formol reste indispensable et qu'il conviendra de préciser ;
- 2- Sur l'intérêt du formol par rapport aux autres substituts pour les actes de thanatopraxie. Aussi, nous souhaitons également disposer d'un l'état des lieux sur les travaux en cours au niveau européen dans le cadre du règlement biocides en matière d'évaluation de la substance active formaldéhyde (TP 2, 3, 20 et 22). Par ailleurs, nous souhaiterions disposer, dans le cadre des travaux menés sur les substituts au formol en anatomie et cytologie pathologique, d'une analyse sur les possibilités d'utilisation de ces substituts dans certains types de produits biocides, et notamment en TP22, et sur les conséquences éventuelles en termes de toxicité et d'écotoxicité.
- 3- Sur l'intérêt du formol par rapport aux autres substituts pour l'utilisation en alimentation animale en tant qu'auxiliaire technologique pour la protection contre la dégradation ruminale, en tant qu'additif conservateur, en tant qu'additif d'ensilage et en tant qu'additif visant à limiter ou à réduire la charge microbienne des organismes pathogènes présents dans les aliments pour animaux.
- 4- Sur l'intérêt du formol par rapport aux autres substituts pour l'utilisation en alimentation humaine en tant qu'auxiliaire technologique pour d'une part la fabrication de certains alginates et d'autre part l'utilisation comme bactériostatique dans la filière du secteur du sucre.
- 5- Si des substituts au formol peuvent être utilisés, nous souhaitons que vous étudiez leur toxicité pour les professionnels et la population générale.

Nos services sont à votre disposition pour tout renseignement complémentaire.

En ce qui concerne l'évaluation de l'intérêt du formol par rapport aux autres substituts pour une utilisation en tant qu'additif pour l'alimentation animale, compte tenu des demandes d'autorisation actuellement en cours, il serait souhaitable que l'Anses puisse se prononcer rapidement (d'ici fin novembre 2014). Pour les autres questions, l'avis est attendu dans un délai de 6 mois.


Le Directeur général
de la santé



Benoît VALLET

La Directrice générale de la
consommation, de la concurrence et de
la répression des fraudes

P.O.



Nathalie HOMOBONO

La Directrice générale
de la prévention des risques



Patricia BLANC

Le Directeur général du travail



Yves STRUILLOU

Copie : Direction générale de l'alimentation (DGAL)

Annexe 2 : Calcul du module « estimation des coûts » pour un établissement possédant un laboratoire in situ

Formaldéhyde au bloc

| | Investissement | Fonctionnement | Invt + Fct |
|---------|----------------|----------------|-------------|
| Année 1 | 0 | 10 608,00 € | 10 608,00 € |
| Année 2 | 0 | 10608 | 10608 |
| Année 3 | 0 | 10608 | 10608 |
| Année 4 | 0 | 10608 | 10608 |
| Année 5 | 0 | 10608 | 10608 |
| Année 6 | 0 | 10608 | 10608 |
| Année 7 | 0 | 10608 | 10608 |

Coût total actualisé sur 7 ans **63 669,80 €**

Prix du formaldéhyde /l (TTC) 2

Description du bloc hypothétique :

| | |
|------------------------|------------------------------|
| Consommation /j en l | 0,33 |
| Nombre de jours par an | 312 |
| Consommables (bocaux) | Capacité d'un flacon (ml) 10 |
| | Prix d'un flacon (€) 1 |

Sous/vide froid (72h)

| Investissement | Fonctionnement | Invt + Fct |
|----------------|----------------|------------|
| 15000 | 29004,68 | 44004,68 |
| 0 | 29004,68 | 29004,68 |
| 0 | 29004,68 | 29004,68 |
| 0 | 29004,68 | 29004,68 |
| 0 | 29004,68 | 29004,68 |
| 0 | 29004,68 | 29004,68 |
| 0 | 29004,68 | 29004,68 |
| 0 | 29004,68 | 29004,68 |

188 510,75 €

Fonctionnement :

| | | |
|----------------------------------|-------------------|-------|
| Entretien | 3000 par an | |
| Consommation énergétique kWh /an | 36 Prix kWh | 0,13 |
| Consommables (sacs) | Nombre par an | 10400 |
| | prix unitaire (€) | 2,5 |

Pièce fraîche transfert direct (<1h)

| Investissement | Fonctionnement | Invt + Fct |
|----------------|----------------|------------|
| 6400 | 10400 | 16800 |
| 0 | 10400 | 10400 |
| 0 | 10400 | 10400 |
| 0 | 10400 | 10400 |
| 0 | 10400 | 10400 |
| 0 | 10400 | 10400 |
| 0 | 10400 | 10400 |
| 0 | 10400 | 10400 |

68 575,21 €

investissement : Temps passé pour concevoir et roder le changement d'organisation

| Consommables (contenant pour le transport) | Nombre par an | 10400 |
|--|-------------------|-------|
| | prix unitaire (€) | 1 |

Solution parfois non réalisable si éloignement excessif du laboratoire

Pièce stockée au frais (2h)

| Investissement | Fonctionnement | Invt + Fct |
|----------------|----------------|------------|
| 7400 | 10410,4 | 17810,4 |
| 0 | 10410,4 | 10410,4 |
| 0 | 10410,4 | 10410,4 |
| 0 | 10410,4 | 10410,4 |
| 0 | 10410,4 | 10410,4 |
| 0 | 10410,4 | 10410,4 |
| 0 | 10410,4 | 10410,4 |
| 0 | 10410,4 | 10410,4 |

69 599,17 €

Investissement : réorganisation comme pour pièce fraîche sans délai + frigo = 1000 €

Fonctionnement : énergie frigo + consommables

| | | | |
|--|------|----------------------------------|-------|
| Prix kwh | 0,13 | Consommation frigo par an en kwh | 80 |
| Consommables (contenant pour le transport) | | Nombre par an | 10400 |
| | | prix unitaire (€) | 1 |

Annexe 3 : Calcul du module « estimation des coûts » pour un établissement ne possédant pas un laboratoire in situ

| Formaldéhyde au bloc | | | |
|----------------------|----------------|----------------|------------|
| | Investissement | Fonctionnement | Invt + Fct |
| Année 1 | 0 | 25247,04 | 25247,04 |
| Année 2 | 0 | 25247,04 | 25247,04 |
| Année 3 | 0 | 25247,04 | 25247,04 |
| Année 4 | 0 | 25247,04 | 25247,04 |
| Année 5 | 0 | 25247,04 | 25247,04 |
| Année 6 | 0 | 25247,04 | 25247,04 |
| Année 7 | 0 | 25247,04 | 25247,04 |

Coût total actualisé sur 7 ans 151 534,11 €

| | | |
|---------------------------------------|---------------------------|----|
| Prix du formaldéhyde /l (TTC) | 2 | |
| Coût du transport vers le laboratoire | 46,92 | |
| Description du bloc hypothétique : | | |
| Consommation /j en l | 0,33 | |
| Nombre de jours par an | 312 | |
| Consommables (bocaux) | Capacité d'un flacon (ml) | 10 |
| | Prix d'un flacon (€) | 1 |

Sous/vide froid (72h)

| Investissement | Fonctionnement | Invt + Fct |
|----------------|----------------|------------|
| 15000 | 43643,72 | 58643,72 |
| 0 | 43643,72 | 43643,72 |
| 0 | 43643,72 | 43643,72 |
| 0 | 43643,72 | 43643,72 |
| 0 | 43643,72 | 43643,72 |
| 0 | 43643,72 | 43643,72 |
| 0 | 43643,72 | 43643,72 |

276 375,07 €

Fonctionnement :

| | | |
|---------------------------------------|-------------------|-------|
| Coût du transport vers le laboratoire | 46,92 | |
| Entretien | 3000 par an | |
| Consommation énergétique kWh /an | 36 Prix kWh | 0,13 |
| Consommables (sacs) | Nombre par an | 10400 |
| | prix unitaire (€) | 2,5 |

pièce fraîche transfert direct (<1h)

| Investissement | Fonctionnement | Invt + Fct |
|----------------|----------------|------------|
| 0 | 39 678,08 € | 39678,08 |
| 0 | 39 678,08 € | 39678,08 |
| 0 | 39 678,08 € | 39678,08 |
| 0 | 39 678,08 € | 39678,08 |
| 0 | 39 678,08 € | 39678,08 |
| 0 | 39 678,08 € | 39678,08 |
| 0 | 39 678,08 € | 39678,08 |

238 150,01 €

| | | |
|--|-------------------|-------|
| Coût du transport vers le laboratoire | 93,84 € | |
| Consommables (contenant pour le transport) | Nombre par an | 10400 |
| | prix unitaire (€) | 1 |

Pièce stockée au frais (2h)

| Investissement | Fonctionnement | Invt + Fct |
|----------------|----------------|------------|
| 1000 | 39 688,48 € | 40688,48 |
| 0 | 39 688,48 € | 39688,48 |
| 0 | 39 688,48 € | 39688,48 |
| 0 | 39 688,48 € | 39688,48 |
| 0 | 39 688,48 € | 39688,48 |
| 0 | 39 688,48 € | 39688,48 |
| 0 | 39 688,48 € | 39688,48 |

239 173,97 €

| | | |
|---|----------------------------------|-------|
| | Consommation frigo par an en kwh | 80 |
| frigo = 1000 € | | |
| Fonctionnement : énergie frigo + consommables | | |
| Coût du transport vers le laboratoire | 93,84 € | |
| Prix kwh | 0,13 | |
| Consommables (contenant pour le transport) | Nombre par an | 10400 |
| | prix unitaire (€) | 1 |

Annexe 4 : Consultation publique

Ce rapport et les conclusions ont fait l'objet d'une consultation publique du 11/03/2019 au 11/05/2019.

Les personnes ou organismes suivants ont fait parvenir leurs commentaires lors de la phase de consultation :

- L'Assurance Française d'Assurance Qualité en Anatomie Pathologique (AFAQAP)
- Le Syndicat des Médecins Pathologistes Français (SMPF)
- Le Conseil National Professionnel des Pathologistes (CNPath)
- Microm Microtech France (MM France)

Annexe 5 : Suivi des actualisations du rapport

| Date | Version | Description de la modification |
|--------------|---------|---|
| janvier 2018 | 01 | Première version pour consultation publique |
| octobre 2019 | 02 | Version finale après consultation publique : Ajout pour signaler la procédure de consultation publique ; Ajout d'un paragraphe pour décrire les matériels étudiés en anatomie et cytologie pathologiques humaines et concernés par la saisine. Identification dans le module « Autres impacts » de la phase analytique de deux nouveaux impacts liés à l'arrivée au sein du laboratoire de prélèvements frais à température ambiante (ou à 4°C) ou sous-vide à 4°C Ajout de précisions dans le module « estimation des coûts de substitution» |



Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
14 rue Pierre et Marie Curie
F94701 Maisons-Alfort cedex
www.anses.fr
[@Anses_fr](https://twitter.com/Anses_fr)