

Formol et fixation: nouvelle donne, nouvelles approches...

André Clique, Jena-François Ponge, Yves Le Gal et Dominique Especel*

Mots clés : *formol, formalin, fixation, fixative, muséologie, museology, ichthyologie, ichthyology, museum, techniques, technics, poissons, fishes*

La nouvelle réglementation européenne sur les produits cancérogènes, mutagènes et repro-toxiques ou CMR (INRS 2006) impose, si un produit ne peut être remplacé par un substitut, de réduire les quantités manipulées et d'assurer au mieux la protection des travailleurs exposés. Cette problématique intéresse a priori tous les muséums dans la mesure où ils sont concernés par la conservation, le stockage et la présentation d'animaux ou de pièces anatomiques. Cette logique peut aussi être poussée plus en avant: en effet la logistique de transport d'animaux préparés provenant de contrées parfois très lointaines est amenée à évoluer avec les nouvelles mesures concernant le transport aérien entre autres (produits potentiellement explosifs ou classés inflammables).

Nous avons travaillé en ce sens pour la fixation de poissons de taille petite à moyenne, cette méthode étant aussi applicable à des petits mammifères ou des pièces anatomiques diverses. Le principe de base retenu est celui d'une saturation des tissus sous pression afin d'assurer la fixation des échantillons à cœur. La désaturation s'effectue avec un protocole de type «paliers de décompression» par assimilation à ceux mis en pratique lors des remontées en plongée sous-marine. La neutralisation du formaldéhyde s'effectue en phase finale. Le conditionnement a aussi fait l'objet de notre attention ainsi que la possibilité de traitement et de conditionnement *in situ* des échantillons récoltés avant leur transport définitif vers les muséums concernés.

Le principe de fixation de tissus au formaldéhyde sous pression (hyperbarie)

Le formaldéhyde ou aldéhyde formique est un gaz commercialisé sous forme de solution dissoute aux environs de 40%, appelée communément formol. Il est généralement utilisé à raison de quelques % de la solution mère dans l'eau. Le principe de fixation retenu est une saturation directe des tissus par le gaz formaldéhyde dissous mis sous pression.

Du point de vue physiologique, (modèle Haldane) on considère qu'il existe des groupes de «tissus» différents, allant de la chair à l'os appelés «compartiments» (Juvensen et Thomas, 1997). Cette classification est basée sur le fait que les tissus sont plus ou moins facilement en contact avec les gaz (cas des poumons par exemple) ou le sang circulant. Les tissus qui sont saturés en dernier sont donc les os et les graisses.

D'après les données des tables de plongée, qu'elles soient américaines (US Navy, 2005) ou françaises (FFESSM 2000), la saturation de tous les groupes de tissus est complète au bout de 7 périodes soit 720 minutes ou encore 12 heures. Dans le cas présent il convient de ne pas perdre de vue que nous avons affaire à des tissus morts, c'est-à-dire ni ventilés ni irrigués. Les valeurs à prendre en compte sont donc bien celles des deux derniers groupes de tissus (os et graisse), même si nous avons affaire à des tissus musculaires.

Au bout de ce séjour à 2 bars (soit l'équivalent d'une plongée de 12 heures à -20 m), les tissus sont donc saturés en formaldéhyde sur toute leur épaisseur.

Commence alors le processus de dépressurisation par paliers (comme une remontée vers la surface dans une plongée classique longue). Des paliers de plusieurs heures à différentes pressions intermédiaires sont alors effectués jusqu'à désaturer l'ensemble des tissus. Les protocoles de paliers ont pour origine les tables de la marine nationale dites MN90 (plongée prolongée à -60 m), soit une marge de sécurité d'un facteur 3 (FFESSM 2000). Ces paliers pris en compte à partir de -20 m ont cependant été modifiés et adaptés à nos besoins.

Comment déterminer les constantes de temps et de pression des paliers de désaturation?

A l'origine nous souhaitions travailler directement en phase vapeur de formaldéhyde saturante et sous pression d'air. Le danger de l'expérimentation ainsi que le fait que le formaldéhyde se détruit en présence d'oxygène (Batista et Iwasita, 2006) nous en ont dissuadé. Cependant nous nous sommes servis d'un montage expérimental pour mettre au point les protocoles de paliers. Pour des raisons d'asepsie (les échantillons sont expérimentés sur plusieurs jours à température ambiante), nous avons opté pour le protocole suivant:

- Les échantillons sont placés dans une enceinte dite «gaz»
- L'enceinte dite «liquides» est remplie d'un peu de formol à 5%. Une pompe à vide/compresseur, dépressurise l'enceinte liquide, et fait passer le formaldéhyde sous forme vapeur et l'envoie dans l'enceinte «gaz» en quelques minutes.
- Un dispositif de barbotage d'air dans un bain de sulfite est alors mise en place afin d'éliminer l'oxygène de l'air pour la séquence de compression.
- La même pompe en position compresseur cette fois pressurise alors les échantillons à 2.0 bars pour environ 24 heures.
- Une vanne de micro débit permet ensuite de faire redescendre la pression par paliers (les vapeurs résiduelles sont piégées dans un filtre en sortie).

La présence d'une faible quantité de formol sous forme vapeur est insuffisante pour fixer les échantillons mais assure une stérilisation partielle des échantillons qui se décomposent alors plus lentement à température ambiante.

Différents protocoles de paliers ont été testés sur diverses espèces. Pour la pression des paliers intermédiaires nous avons retenu les valeurs suivantes:

1.7 bar, 1.4 bar, 1.0 bar, 0.6 bar, 0.3 bar.

Il ne nous est pas actuellement possible, dans le cadre de cet article, de communiquer les détails des paliers ainsi que ceux des vitesses de transit d'un palier à l'autre, l'ensemble du procédé ayant fait l'objet d'un dépôt de brevet à l'INPI.

Comment s'assurer de la bonne exécution des paliers et du respect du temps de passage d'un palier à l'autre?

Le test retenu pour s'assurer de la bonne exécution de la procédure de désaturation a été celui de la présence de bulles dans l'humeur vitrée de l'œil, en accord avec la médecine ophtalmique hyperbare (<http://www.snof.org/maladies/diving.html>).

Les espèces ayant été testées sont les suivantes : dorades, tacauds, chinchards, sardines. Chez les sardines fraîches, il n'a pas été observé de bulles dans les cavités oculaires sous loupe binoculaire (Encart 1). Par contre deux animaux avaient la peau abîmée. Il n'a pas été possible de savoir si cette dégradation était due au fait que les animaux avaient séjourné de nombreuses heures à température ambiante ou si ce phénomène était dû à un problème de désaturation, les sardines étant par nature fragiles à la manipulation. Pour les chinchards, tacauds ou dorades nous n'avons pas observé de lésions de surface ni de présence de bulles dans l'humeur vitrée.



Encart 1: Absence de bulles dans l'humeur vitrée (ici des sardines) en comparaison avec un accident d'hyperbarie chez le rat (bulles dans un oeil de rat ayant subi de hautes pressions puis une décompression brutale: il s'agit là de la visualisation d'un accident de décompression Cliché Docteur Lanphier).

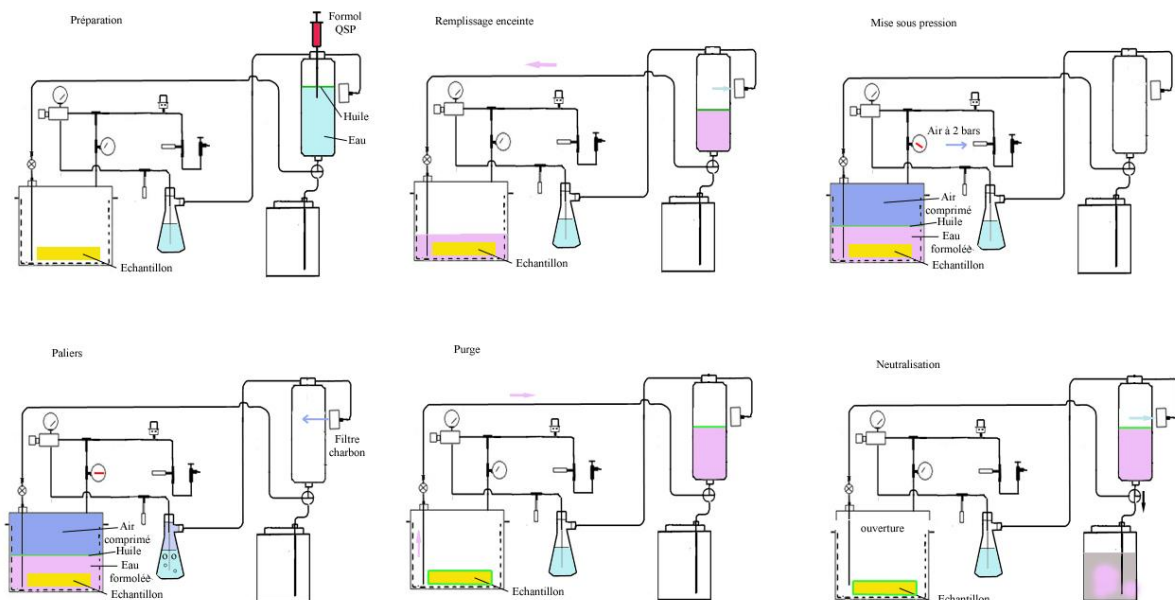
Nos expérimentations de fixation d'échantillons (poissons) sous hyperbarie

Plutôt que vous fournir un croquis détaillé des installations mises en service, nous vous proposons de suivre les étapes de mise en fonctionnement (synthétisées en Encart 2):

- Le réservoir de transit est rempli de 10 l d'eau et un film d'huile (50 ml) est déposé en surface
- Les échantillons sont disposés dans l'enceinte expérimentale
- Le robinet de purge du circuit d'air est ouvert, la vanne de vidange également. L'enceinte expérimentale se remplit par gravité. Vanne et robinet sont fermés
- Mise sous pression à l'aide d'un compresseur (2 bars)
- Fixation (24 ou 48 heures) à 2,0 bars

- Paliers, pour passer d'une pression à l'autre la vanne de micro débit est ouverte. Le débit est du type bulle à bulle. Une fois la pression requise atteinte, la vanne est fermée en attente du palier suivant
- Vidange après retour à la pression atmosphérique: la vanne de vidange est ouverte, environ 0,15 bars sont injectés dans l'enceinte. Le liquide et l'huile sont refoulés dans le réservoir de transit. La vanne trois voies isole le tout
- Ouverture de l'enceinte expérimentale. Sortie des échantillons sous film d'huile, rinçage, mise sous éthanol
- Si pas de nouveaux échantillons à traiter on peut neutraliser le formol par vidange dans la cuve de neutralisation contenant une solution aqueuse de bicarbonate ou de carbonate d'ammonium (Kawamata et Kodera, 2004).

Plusieurs essais ont été effectués en juillet 2007 sur des lots de 4 ou 5 maquereaux congelés ou non. Il n'a pas été rencontré de difficultés particulières. Les animaux semblent correctement fixés comparativement aux témoins traités de manière classique (séjour d'une semaine dans un bain à 5%).

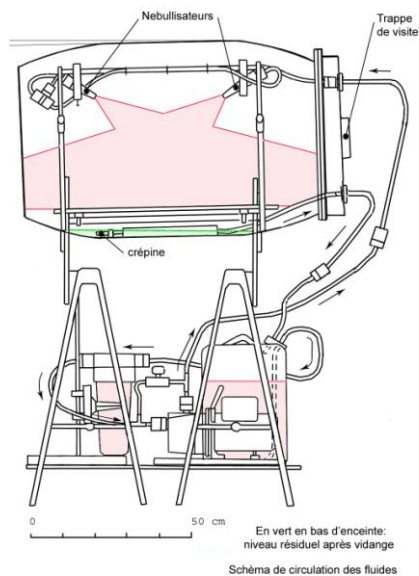


Encart 2: Résumé du processus de fixation

Poursuivre la logique de prévention sécuritaire jusqu'au bout:

Le rinçage:

Pour le rinçage des animaux après fixation et par souci d'économiser l'eau **autant que celui de soustraire l'expérimentateur aux vapeurs résiduelles de formol**, nous avons profité d'une machine à pulvérisation en vase clos que nous avons réalisée et dont le schéma et des photographies sont donnés en encart 3. Cette machine permet également de formoler des petites quantités d'animaux à pression atmosphérique et de façon totalement étanche.

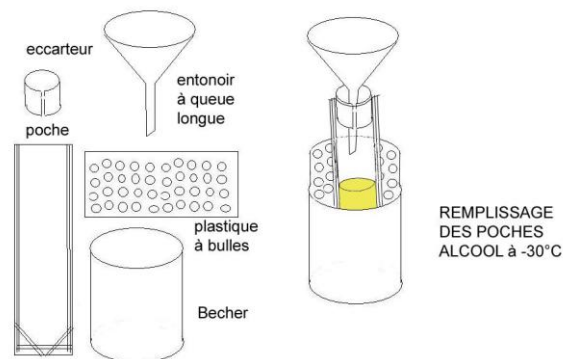


Encart 3 : machine à former et à rincer, pression du fluide circulant 3 bars: en mode dit de «fixation» la détente via les nébulisateurs assure la vaporisation du formol en vase clos

La mise sous alcool

Bien que l'alcool ait des effets secondaires euphorisants, il n'en reste pas moins un toxique et doit être à ce titre l'objet d'attentions particulières. Pour les échantillons de taille raisonnable (maxi 30 cm) nous avons développé une technique nouvelle **dans le souci également d'exposer le moins possible l'expérimentateur aux vapeurs d'alcool**. Nous fabriquons des poches plastique thermosoudées et stockons l'alcool à -30°C .

L'échantillon fixé est disposé dans la poche, l'alcool à -30°C est versé dessus. Le tout est scellé par thermosoudage et sans risques, la tension de vapeur de l'alcool étant très faible à cette température (Encarts 4 et 5). L'autre intérêt de la méthode consiste en une économie substantielle d'alcool allant jusqu'à -30% par rapport à un conditionnement en flûtes par exemple. Pour les animaux de taille plus conséquente le stockage en touque reste en usage (éventuellement sous glycérol, des essais en ce sens sont en cours au sein du MNHN).



Encart 4: Conditionnement sous alcool à basse température



Encart 5 : Echantillons de chinchards conditionnés en poches plastique et conditionnement classique en flûtes

Que conclure de cette nouvelle approche ?

Ce procédé nouveau répond à nos trois objectifs initiaux:

- Améliorer la sécurité de l'expérimentateur en supprimant l'exposition aux vapeurs de formol, en accord avec la nouvelle réglementation CMR de la Communauté Européenne (INRS 2006)
- Diminuer le temps de contact des échantillons avec le formol
- Obtenir un dispositif utilisable aussi bien au laboratoire que sur le terrain

Le problème de l'exposition aux vapeurs est résolu: le système est totalement étanche dans sa phase hyperbare. Le rinçage des échantillons expose peu le manipulateur: la fine couche d'huile qui recouvre les échantillons à leur sortie d'enceinte diminue fortement l'exposition aux vapeurs de formol. L'élimination de cette pellicule d'huile s'effectue pendant le rinçage effectué en milieu clos sans intervention du manipulateur. Le formol est neutralisé par le bicarbonate d'ammonium. Le procédé (gravité) est tel que l'huile se retrouve en surface en fin de neutralisation. Les vapeurs éventuelles sont ainsi très limitées. Le bicarbonate d'ammonium nous semble la solution la plus adaptée à la neutralisation: nous avons testé également l'ammoniaque (technique hospitalière) qui neutralise le formaldéhyde en formant de l'hexamine (Frosin et al., 1980) et l'hypochlorite de sodium ou eau de Javel. Ces deux derniers produits imposent l'usage d'un masque mais le bicarbonate d'ammonium, seulement irritant pour la peau, ne requiert que des gants. De plus l'eau de Javel peut dans certaines conditions réagir avec le formol en donnant des produits explosifs (Walker, 1975) et du bischlorométhyléther, un carcinogène puissant (<http://www.ch-aix.fr/pro/theme/anapath/prevrisques.html>). Nous n'avons pas testé la destruction des aldéhydes par le permanganate de potassium (Picot et Grenouillet, 1992).

La diminution du temps nécessaire pour la fixation des tissus fait également partie des objectifs d'origine. La saturation des tissus par hyperbarie y répond. Le temps de macération sous formol est sensiblement réduit par rapport à la méthode classique d'immersion. Par exemple des échantillons de grande taille nécessitant habituellement environ un mois de contact en bain de formol, auquel s'ajoute le temps de rinçage, peuvent être traités en 48-72 heures.

Le rinçage en vase clos est économique en eau: un rinçage habituel consomme environ 7200 litres d'eau (5 l/mn) contre 5 fois 10 litres pour notre méthode. Remarque: dans l'enceinte, le volume d'air comprimé est faible par rapport à celui du mélange eau/formol (c'est aussi un critère de sécurité d'explosion sous pression). Cependant la présence de micro-fuites sur des périodes longues peut mettre en péril l'expérimentation si elle n'est pas contrôlée par un automatisme. Par précaution, nous enduisons nos joints de Loctite 5923® dit «joint poisson».

La mise au point des paliers de décompression s'est avérée empirique en l'absence de données sur des tissus morts. On peut cependant considérer que la l'observation des bulles dans les yeux des animaux (<http://www.snof.org/maladies/diving.html>) reste un critère assez fiable de la réussite ou non de la procédure de décompression.

Toutes nos expérimentations ont été réalisées en laboratoire. Ce n'est pas pour autant que la mise au point d'une méthode utilisable sur le terrain a été négligée (pour de petits mammifères exotiques et à la demande d'utilisateurs). Dans le laboratoire certaines facilités nous ont été accordées (compresseur électrique par exemple). Sur le terrain on peut envisager une mise sous pression manuelle ou une alimentation en gaz sous pression à partir d'une bouteille de plongée par exemple. Tous nos paliers ont été réalisés de manière manuelle (immédiatement applicable sur le terrain). Rien m'empêche cependant d'envisager un pilotage

des paliers par un automate et des sondes de pression (que ce soit en laboratoire avec alimentation sur secteur ou sur le terrain avec une alimentation par batterie). L'avantage d'un système piloté serait double: d'une part il serait possible de compenser automatiquement d'éventuelles micro-fuites, d'autre part l'expérimentateur ne serait plus assujéti à un planning fortement lié aux périodicités des opérations de décompression à effectuer.

Il est à noter qu'il serait inconvenant de notre part de ne pas prendre en compte la mise sur le marché de produits de substitution (fixateurs ou conservateurs). Cependant, il semble qu'ils ne soient, en l'état actuel de nos connaissances, que susceptibles d'être appliqués à des coupes histologiques ou des échantillons de taille extrêmement réduite, ce qui les exclut de notre problématique actuelle.

En ce qui concerne les produits de substitution, nos réflexions sont les suivantes (basée sur une analyse de M. C. Yéprémian cf remerciements): En ce qui concerne les différents types de substituants, le substituant idéal serait un aldéhyde mais moins toxique et moins volatil que le formaldéhyde. La molécule se rapprochant le plus de cet idéal serait le glyoxal. Selon le fabricant du PREFER[®] (formulation avec du glyoxal) la tension de vapeur de cette molécule est très faible, ce qui est vrai par rapport au formaldéhyde mais faux dans l'absolu, le glyoxal étant aussi une molécule volatile. Le glyoxal est plus de 15 fois moins volatil que le formaldéhyde, l'équivalent américain de la valeur moyenne d'exposition (8 heures, VME) étant supérieur de 12 fois à celui du formaldéhyde Il est classé malheureusement Mutagène 3 par l'INRS, mais on n'a aucune information sur son action sur la cancérogénèse! Enfin, en se basant sur le prix au litre du PREFER[®], on peut envisager une augmentation par un facteur 5 du prix du litre de conservateur (comparaison avec une solution de formaldéhyde à 10 % (v/v), catalogue Aldrich 2007 En conclusion, le formaldéhyde est en fait une molécule à usage multiple: conservation, fixation histo-pathologique, action biocide, d'où la possible difficulté de trouver un substituant combinant l'ensemble de ses qualités.

Le domaine d'application des solutions que nous proposons couvre, au moins partiellement, l'aspect de sauvegarde (formol, alcool) et de conditionnements (glycérol, alcool) des collections. Il nous semble que diverses institutions pourraient être concernées (musées des facultés de médecines, des écoles vétérinaires, muséums d'histoire naturelle) ainsi que leurs secteurs de recherche. Le conditionnement sous glycérol nous semble d'autre part une piste intéressante à deux titres dans une optique sécuritaire et hygiénique: le transport et la présentation au public.

Bibliographie:

Batista, E.A. et Iwasita, T. Adsorbed intermediates of formaldehyde oxidation and their role in the reaction mechanism. *Langmuir*, vol. 22, pp. 2006. 7912-7916.

FFEFFSM,. Table marine nationale 1990 MN90, version du 12/1/2000.
<http://plongee.asparis7.com/pdf/mn90.pdf>

Frosin, V.N., Tsibikov, V.B., Izvekova, G.I., Rabin'kii, B.Y., Pakhomov, S.V., Ramkova, N.V., Alekseeva, M.I., Kareev, N.V., Likhtman, T.V., Ryabov, P.I. et Komarkova, N.I. Selection of a mode for formaldehyde-gas sterilization. *Biomedical Engineering*, vol. 14, 1980, pp. 178-181.

INRS, Produits chimiques cancérogènes, mutagènes, toxiques pour la reproduction.
Classification règlementaire. Aide-mémoire Technique ED 976, 2006.

Juvenspan, H. et Thomas, C. Plonger aux mélanges. Eugen Ulmer, Paris, 1997, 186 pages

Kawamata, S. et Kodera, H. Reduction of formaldehyde concentrations in the air and
cadaveric tissues by ammonium carbonate. Anatomical Science International, vol. 79,
2004, pp. 152-157.

Picot, P. et Grenouillet, P. La sécurité en laboratoire de chimie et de biochimie. Lavoisier,
Paris, 1992, 424 pages.

US Navy,. Diving Manual, Revision 5, 2005.

<http://www.supsalv.org/manuals/diveman5/divManual5.htm>

Walker, J.F. Formaldehyde, 3rd ed. Krieger, Huntington, New York, 1975.

Remerciements

Nous tenons à remercier Mlle Elena Luchetti et Mr S. Iglésias de la Station de Biologie
Marine de Concarneau pour leur aide technique, ainsi que le Comité d'Hygiène et de Sécurité
du Muséum National d'Histoire Naturelle pour son soutien et ses encouragements. Nous
souhaitons également remercier Monsieur Claude Yéprémian, responsable de l'Algothèque
(souches non toxiques) au Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris.

Auteurs:

André Clique

Dr, ingénieur d'études CNRS
Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR5178
Station Marine de Concarneau
Place de la Croix, 29900 Concarneau

Jean-François Ponge

Professeur
Museum National d'Histoire Naturelle, CNRS UMR 7179
4 avenue du Petit-Chateau
91800 Brunoy

Yves Le Gal

Dr , Directeur honoraire de la Station de Concarneau
Muséum National d'Histoire Naturelle, Station Marine de Concarneau
Place de la Croix, 29900 Concarneau

Dominique Especel

Ingénieur Hygiène et Sécurité
Museum National d'Histoire Naturelle, Service d'Hygiène et Sécurité
43 rue Buffon
75005 Paris