

Risques sanitaires liés à l'utilisation de l'azote liquide

Risques liés à l'utilisation de l'azote liquide dans le cadre des activités d'assistance médicale à la procréation

● **Rapport d'expertise et recommandations**



agence française de **sécurité sanitaire**
de l'environnement et du travail

Avril 2008



La Directrice générale

Maisons-Alfort, le 10/04/2008

AVIS**de l'Agence française de sécurité sanitaire de
l'environnement et du travail****Relatif aux «Risques liés à l'utilisation de l'azote liquide dans le cadre des
activités d'Assistance Médicale à la Procréation »**

Saisine Afsset n° « 2006/AC006 »

L'Afsset a pour mission de contribuer à assurer la sécurité sanitaire dans le domaine de l'environnement et du travail et d'évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter. Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque.

Présentation de la question posée

L'Afsset a été saisie le 11 avril 2006 par l'Agence de la Biomédecine afin de procéder à l'évaluation des risques liés à l'utilisation de l'azote liquide dans le cadre des activités d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) et de formuler des orientations de recommandations pour la prévention de ces risques.

Contexte

A ce jour, il n'existe pas de réglementation française spécifique relative à la prévention des risques lors de l'utilisation de l'azote liquide dans les laboratoires d'AMP. Deux arrêtés, non applicables aux laboratoires d'AMP et qui concernent les bonnes pratiques lors du prélèvement, du transport, de la transformation, de la conservation des cellules souches hématopoïétiques issues du corps humain, des cellules mononuclées sanguines et des tissus d'origine humaine utilisés à des fins thérapeutiques, apportent toutefois des éléments d'encadrement de la sécurité des locaux (système de ventilation, détecteur d'oxygène et alarme, matériaux, consignes de sécurité).

A l'échelle nationale comme internationale, les règles de sécurité sont développées par les fournisseurs et les « grands consommateurs », sous la forme de recommandations.

1 / 3

D'après une enquête conduite en 2006 par l'Agence de la Biomédecine, la France compte 98 laboratoires d'assistance médicale à la procréation déclarant utiliser de l'azote liquide. D'après cette enquête, seuls 60% des locaux sont équipés d'un système de ventilation (mécanique) continue, 45% d'un dispositif de mesure du taux d'oxygène, et 27% d'un système de ventilation asservi au dispositif de mesure. En dehors de toutes considérations sur le débit de ventilation, 37% des locaux ne sont pas pourvus d'un système de ventilation mécanique alors que le volume d'azote liquide qui y est stocké par rapport au volume du local nécessiterait une telle installation. La description des installations, des locaux et des activités de travail dans les salles renfermant de l'azote liquide montre que les risques au sein des laboratoires d'AMP français doivent être mieux maîtrisés.

Aucun accident du travail ou pathologie professionnelle liés à l'utilisation de l'azote liquide en AMP n'a été retrouvé dans la base des accidents Epicéa de l'INRS et dans la base du Réseau National de Vigilance et de prévention des Pathologies Professionnelles.

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) » avec pour objectif de respecter les points suivants : compétence, indépendance, transparence, traçabilité.

L'Afsset a confié au Comité d'Experts Spécialisés (CES) « Evaluation des risques liés aux milieux aériens » l'instruction de cette saisine. Ce dernier a mandaté le groupe de travail « Prévention des risques liés à l'azote liquide dans les laboratoires d'AMP » pour la réalisation des travaux d'expertise.

Les travaux d'expertise du groupe de travail ont été soumis régulièrement au CES « Evaluation des risques liés aux milieux aériens » (tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques) lors des séances du 6 octobre 2006, du 29 mars 2007 et du 5 décembre 2007. Le rapport produit par le groupe de travail tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES.

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

Cet avis se base pour les aspects scientifiques sur le rapport final issu de cette expertise collective « Prévention des risques liés à l'azote liquide dans les laboratoires d'AMP » dont la synthèse a été adoptée par le CES lors de sa séance du 27 mars 2008.

Avis et recommandations

L'Afsset est en accord avec l'ensemble des conclusions et recommandations présentées dans le rapport du groupe de travail. Elle en préconise la mise en œuvre au sein des laboratoires d'AMP.

Outre ses recommandations en matière d'aménagement, d'équipement de protection collective et individuelle, de procédures de travail et de formation du personnel, le groupe de travail a porté une attention particulière à la question de la ventilation des locaux. L'Afsset souligne le rôle central de la question du renouvellement d'air dans le dispositif de prévention des situations d'hypoxie. Ceci, en particulier au vu de la disparité des conditions de stockage dans les locaux d'AMP (ventilation, volume de local, quantités d'azote liquide) mise en évidence par l'enquête de l'Agence de la Biomédecine.

Enfin, l'Afsset souhaite attirer l'attention de l'Agence de la Biomédecine sur deux problématiques, à la marge du champ de la saisine proprement dite, identifiées à l'occasion des travaux d'expertise :

■ **Les risques liés au transport d'azote liquide par des particuliers**

L'examen des pratiques de terrain montre que le transport des gamètes congelées entre les centres de conservation et les structures effectuant la manipulation des gamètes peut être assurée par des particuliers. En effet, lorsque ces deux activités sont géographiquement éloignées ou administrativement distinctes, il peut être demandé aux patients d'acheminer les échantillons congelés par leurs propres moyens. Cette situation est potentiellement dangereuse du fait du volume réduit des habitacles de véhicule de tourisme, dans lesquels l'évaporation d'une faible quantité d'azote peut baisser la teneur en oxygène de façon significative, et du possible éclatement du conteneur lorsque celui-ci n'est pas adapté au transport d'azote liquide (bouchon à fermeture hermétique par exemple). Le manque de connaissances du public des propriétés de l'azote liquide et l'usage potentiel de conteneurs inappropriés sont des facteurs favorisant l'émergence de ces situations dangereuses. Il est donc recommandé aux centres d'AMP :

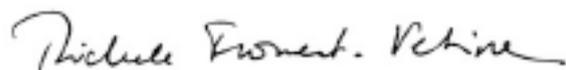
- d'informer les usagers sur les dangers de l'azote liquide et des bonnes pratiques de transport au moment de la prise en charge des échantillons ;
- de mettre ou faire mettre à disposition des usagers des conteneurs adaptés au transport de l'azote liquide.

■ **Les besoins en expertise et en développement sur les gants de protection contre l'azote liquide**

Il n'existe pas à l'heure actuelle de gants, adaptés à la manipulation des paillettes et autres matériels de faibles dimensions, protégeant efficacement contre l'azote liquide. Les gants de protection contre le froid sont d'une épaisseur incompatible avec la finesse des manipulations à réaliser et l'usage d'une pince de préhension est peu approprié du fait des risques d'adhésion de la pince aux parois des paillettes.

- Dans un contexte où l'utilisation de fluides cryogéniques s'étend, il conviendrait d'encourager le développement d'équipements de protection des mains préservant contre le froid extrême tout en assurant un confort de manipulation.

La Directrice générale



Dr Michèle FROMENT-VEDRINE

**Risques liés à l'utilisation de l'azote liquide
dans le cadre des activités
d'Assistance Médicale à la Procréation**

Saisine n°« 2006/AC006 »

**RAPPORT
d'expertise collective
et RECOMMANDATIONS**

CES « Evaluation des risques liés aux milieux aériens »

Groupe de travail Afsset

« Prévention des risques liés à l'azote liquide
dans les laboratoires d'AMP »

Mars 2008

Mots clés

asphyxie, assistance médicale à la procréation, azote liquide, biologie de la reproduction, brûlure, CECOS, congélation, cryobiologie, éclatement, équipement cryogénique, explosion, gelure, hypoxie, laboratoires

Présentation des intervenants

GROUPE DE TRAVAIL :

Président :

Mme Isabella ANNESI-MAESANO – Responsable de l'équipe EPAR - UMR-S 707, INSERM ; compétences en épidémiologie respiratoire et allergique

Membres :

- M. René ALARY – Chef du Département Air, Laboratoire Central de la Préfecture de Police de Paris ; compétences sur le risque d'asphyxie, pollution atmosphérique, ventilation
- M. M.BARRIERE Paul – Chef du service de Biologie de la Reproduction, CHU de Nantes ; compétences en biologie de la reproduction
- M. Dave CAMPAGNA – Responsable de la cellule d'épidémiologie, RATP ; compétences en épidémiologie santé-travail et de l'environnement
- Mme Sylviane HENNEBICQ – Responsable du laboratoire de Biologie de la procréation-CECOS, CHU de Grenoble ; secrétaire général de la fédération française des CECOS ; compétences en biologie de la reproduction
- M. Henri HOELLINGER – Ancien directeur de recherche, INSERM ; compétences en toxicologie
- Mme Cynthia LE BON – Technicienne de laboratoire ; service d'Histologie, Embryologie, Biologie de la Reproduction et du Développement, CECOS, GH Cochin – Saint Vincent de Paul ; compétences en technique de laboratoire de biologie de la reproduction
- M. Goran PERINIC – Chef de section, Département AT, CERN ; compétences en sécurité cryogénique, physico-chimie
- Mme Nathalie RIVES – Responsable du laboratoire de Biologie de la Reproduction-CECOS, CHU de Rouen ; compétences en biologie de la reproduction
- M. Dominique ROYERE – Chef du service de Médecine et Biologie de la Reproduction, CHU de Tours ; Président de la fédération des Biologistes des laboratoires d'étude de la fécondation et de la conservation de l'œuf (BLEFCO)

Organismes :

- INRS, représenté par Jérôme TRIOLET – Chef du pôle Risques Chimiques, Département Expertise et Conseil Technique

PARTICIPATION AFSSET

Coordination scientifique :

Mme Isabelle DAGUET – Chef de projet scientifique, Afsset

M. Matteo REDAELLI – Chargé de projet scientifique, Afsset

Contribution scientifique :

M. Matteo REDAELLI – Chargé de projet scientifique, Afsset

M. David VERNEZ – Adjoint du chef du département DESET, Afsset

Secrétariat administratif :

Mme Agnès BRION – Afsset

Mme Véronique QUESNEL – Afsset

AUDITION DE PERSONNALITES EXTERIEURES :

Cryo Diffusion S.A.

M. Jean-Paul ALONSO – Directeur commercial

M. Michel LEVEILLIER – Responsable contrôle qualité

M. Didier SCHNEIDER – Responsable des Ventes France

M. Marco SMANIA – Directeur général

Air Liquide Santé International

M. Jean-Luc MONEIN – Coordinateur Corporate Hygiène, Sécurité, Environnement

M. Noël BARIGAULT – Pharmacien vigilance AIR LIQUIDE Santé International

M. Philippe CADE – Responsable des Audits Industriels, Business Unit gaz médicaux et matériel médical

CONTRIBUTIONS EXTERIEURES AU GROUPE :

- Enquête Azote organisée par l'Agence de la Biomédecine

- M. Christian REYMOND - Responsable du Service Technique et Développement, Air Liquide DMC (Division Matériel Cryogénique)

ADOPTION DES TRAVAUX PAR LE(S) COMITE(S) D'EXPERTS SPECIALISES

Les travaux du groupe de travail, et notamment le rapport intermédiaire de septembre 2007, ont été présentés au CES « Evaluation des risques liés aux milieux aériens » lors des séances plénières des :

- 29 mars 2007,

- 5 décembre 2007.

Le présent rapport a été soumis pour commentaires au CES « Evaluation des risques liés aux milieux aériens » à l'occasion de la séance plénière du 27 mars 2008.

Président

M Christian ELICHEGARAY - Chef du Département Air de l'Ademe ; Physico-chimie de l'atmosphère, QA

Membres

M René ALARY - Ancien Chef du département Air au LCPP ; pollution atmosphérique et chimie

Mme Isabella ANNESI MAESANO - Directeur de recherche INSERM, Responsable de l'équipe d'épidémiologie des maladies allergiques et respiratoires, INSERM ; épidémiologie respiratoire, pollution atmosphérique

M Olivier BLANCHARD - Ingénieur de recherche "qualité de l'air", Direction des risques chroniques, INERIS ; qualité de l'air

M Pierre-André CABANES - Médecin, adjoint du service médical d'EDF ; évaluation des risques sanitaires

M Dave CAMPAGNA - Responsable de la cellule d'épidémiologie, RATP, épidémiologie

Mme Véronique DELMAS - Directrice d'Air Normand ; pollution & chimie atmosphérique

Mme Véronique EZRATTY - Médecin évaluateur de risques EDF ; évaluation des risques, (risques professionnels)

M Robert GARNIER - Médecin toxicologue au CAP de Paris, maître de conférence Hôpital Fernand Widal ; toxicologie

M Philippe GLORENNEC - Enseignant chercheur ENSP ; épidémiologie, évaluation des risques sanitaires

Mme Séverine KIRCHNER - Responsable du secteur "qualité de l'air intérieur" au CSTB ; chimie et pollution de l'atmosphère, air intérieur

Mme Agnès LEFRANC - Coordinatrice programme PSAS 9 InVS ; épidémiologie, statistique, pollution atmosphérique

M Maurice MILLET - Maître de conférence Université Louis Pasteur ; physique-chimie, spécialiste des phytosanitaires dans l'air

M Alain MORCHEOINE - Directeur Air et Transports à l'Ademe ; qualité de l'air, émissions dans l'air

M Yannick MOREL - Chef de département Détection biologique au Centre d'Etudes du Bouchet ; toxicologie moléculaire

M Jean-Paul MORIN - Chargé de recherche à l'INSERM ; spécialiste des émissions moteur

M Christophe PARIS - Médecin professeur des universités et praticien hospitalier au CHU de Nancy ; épidémiologie, pathologies professionnelles

M Vincent-Henri PEUCH - Chercheur en modélisation numérique de la composition chimique de l'atmosphère à METEO France ; modélisation atmosphérique

M Charles POINSOT - Directeur d'Atmo Nord pas de Calais ; qualité de l'air, pollution de l'air

Mme Martine RAMEL - Responsable du programme LCQA à l'INERIS ; qualité de l'air, polluants de l'air

M Rémy SLAMA - Chercheur à l'INSERM ; épidémiologie, pollution atmosphérique

M Fabien SQUINAZI - Médecin biologiste, directeur du LHVP Air intérieur, pathologies professionnelles induites par la QA, microbiologie

M Jacques VENDEL - Chef de laboratoire à l'IRSN ; aérosols, connaissances métrologie

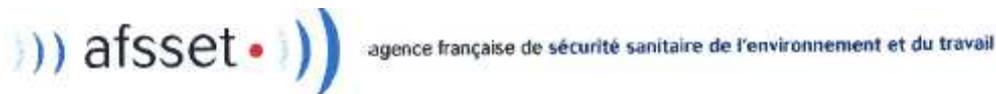
SOMMAIRE

Présentation des intervenants.....	3
Expertise collective : synthèse et conclusions.....	10
Abréviations	15
Liste des tableaux	17
Liste des figures	17
1 Introduction	19
1.1 Contexte.....	19
1.2 Objectifs de la saisine.....	19
1.3 Modalités de traitement de la saisine	20
2 Historique de la cryobiologie en AMP	22
3 Etat des lieux des réglementations et recommandations applicables à l'azote liquide.....	24
3.1 Synthèse de l'état des lieux des réglementations et recommandations applicables à l'azote liquide.....	24
3.2 Valeurs limites en milieu professionnel	26
4 L'azote liquide.....	27
4.1 Propriétés physico-chimiques, stabilité et réactivité.....	28
4.1.1 Propriétés physico-chimiques	28
4.1.2 Stabilité et réactivité	29
4.2 Accidents techniques liés aux propriétés physico-chimiques	30
4.2.1 Eclatement par surpression	30
4.2.2 Fragilisation des matériaux : Bris.....	30
4.2.3 Explosion et inflammation	31
4.3 Identification et évaluation des effets sanitaires	32
4.3.1 Effets sanitaires liés à une exposition aiguë (accidentelle)	32
4.3.2 Effets sanitaires liés à une exposition chronique – effets à long terme.....	38
5 Utilisation de l'azote liquide en AMP.....	40
5.1 Activités de cryobiologie en AMP au niveau national	40
5.2 Equipements utilisés	42
5.2.1 Conteneurs de stockage de fluide cryogénique autoprésurisé.....	42
5.2.2 Les conteneurs de stockage de fluide cryogénique à pression atmosphérique ou très légèrement pressurisés	42
5.2.3 Récipients de stockage de produits biologiques.....	42
5.2.4 Récipients de transport de produits biologiques.....	43
5.2.5 Lignes de transfert	43

5.3 Opérations liées à l'utilisation d'azote liquide en AMP – Identification des situations à risque	44
5.3.1 Remplissage d'azote liquide	45
5.3.2 Mise en froid d'une ligne d'alimentation.....	46
5.3.3 Stockage des échantillons biologiques	46
5.3.4 Congélation des échantillons	47
5.3.5 Déstockage des échantillons	47
5.3.6 Maintenance des cuves	48
5.3.7 Transport.....	48
5.4 Situations des laboratoires d'AMP en France : résultats de l'enquête de l'agence de la biomédecine	50
5.4.1 Caractéristiques générales des salles d'AMP renfermant de l'azote liquide	50
5.4.2 Caractéristiques des cuves et bonbonnes utilisées.....	52
5.4.3 Les dispositifs de sécurité existants	54
5.4.4 Les incidents déclarés dans l'enquête	56
6 Evaluation du risque hypoxique lié à l'utilisation d'azote liquide en AMP ..	57
6.1 Scénario 1 : Evaporation naturelle à partir des conteneurs.....	60
6.2 Scénario 2 : Mise à niveau d'un récipient.....	62
6.3 Scénario 3 : Mise en froid et remplissage d'un récipient de 660 litres dépourvu d'azote liquide.....	65
6.3.1 Méthode	65
6.3.2 Résultats	67
6.4 Scénario 4 : Renversement du contenu d'un récipient	69
6.5 Conclusions.....	71
7 Abaque déterminant le taux de renouvellement d'air recommandé pour la ventilation continue d'un local d'AMP	72
7.1 Méthode de construction de l'abaque	72
7.2 Présentation schématique de l'abaque	75
8 Recommandations pour la prévention des risques liés à l'utilisation de l'Azote Liquide dans des laboratoires d'AMP	76
8.1 Prévention	76
8.1.1 Protection collective - aménagement des locaux	76
8.1.2 Protection individuelle	81
8.1.3 Procédures de travail	81
8.1.4 Stockage, remplissage et installations de remplissage	82
8.1.5 Transport.....	82
8.1.6 Formation du personnel	83
8.2 Contrôles périodiques	84
8.2.1 Contrôles réglementaires.....	84
8.2.2 Autres dispositions.....	84
9 Conclusions	85
10 Bibliographie.....	88
10.1 Publications, Rapports, ouvrages, thèses.....	88
10.2 Textes réglementaires	91
10.3 Normes.....	91

10.4 Communications, actes de conférences, liens internet	92
ANNEXES	93
Annexe 1 : Lettre de saisine	94
Annexe 2 : Synthèse des déclarations d'intérêts par rapport au champ de la saisine suite à la réunion du 7 février 2008	101
Annexe 3 : Bilan des réglementations et recommandations applicables à l'azote liquide	106
Annexe 4 : Tableau des propriétés physico-chimiques détaillées de l'azote ..	135
Annexe 5 : Calcul de la réduction du taux d'oxygène par une fuite d'azote dans un local ventilé	136
Annexe 6 : Débits d'évaporation d'azote liquide au cours de la mise en froid d'un conteneur de 660L - Résultats de mesures DMC utilisés.....	139
Annexe 7 : Relation entre capacité de stockage d'un laboratoire et consommation annuelle d'azote liquide	140
Annexe 8 : Tableau de correspondances des normes applicables aux équipements cryogéniques.....	141
Annexe 9 : Liste thématique pour l'audition de fabricants/fournisseurs d'équipements cryogéniques et distributeurs gaziers	143

Expertise collective : synthèse et conclusions



EXPERTISE COLLECTIVE : SYNTHÈSE ET CONCLUSIONS

Relatives aux « Risques liés à l'utilisation de l'azote liquide dans le cadre des activités d'Assistance Médicale à la Procréation »

Saisine Afsset n° « 2006/AC006 »

Ce document synthétise les travaux du groupe de travail et présente les éventuels compléments du Comité d'Experts Spécialisés « Evaluation des risques liés aux milieux aériens »

Présentation de la question posée

L'Afsset a été saisie le 11 avril 2006 par l'Agence de la Biomédecine afin de procéder à l'évaluation des risques liés à l'utilisation de l'azote liquide dans le cadre des activités d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) et de formuler des orientations de recommandations pour la prévention de ces risques. Parmi ces risques figurent plus particulièrement ceux liés à l'hypoxie et aux gelures.

Contexte scientifique et réglementaire

A ce jour, il n'existe pas de réglementation spécifique relative à la prévention des risques lors de l'utilisation de l'azote liquide dans les laboratoires d'AMP. L'état des lieux des réglementations en vigueur en France montre que la prévention des risques spécifiques relatifs à l'utilisation d'azote liquide est peu cadrée sur le plan réglementaire et sur celui des recommandations, en regard du nombre importants de centre d'AMP intéressés et des quantités d'azote liquide mises en œuvre. Deux arrêtés, non applicables aux laboratoires d'AMP et qui concernent les bonnes pratiques lors du prélèvement, du transport, de la transformation, de la conservation des cellules souches hématopoïétiques issues du corps humain, des cellules mononuclées sanguines et des tissus d'origine humaine utilisés à des fins thérapeutiques, apportent toutefois des éléments sur la sécurité des locaux (système de ventilation, détecteur d'oxygène et alarme, matériaux, consignes de sécurité).

A l'échelle nationale comme internationale, les règles de sécurité sont développées par les fournisseurs et les « grands consommateurs », sous la forme de recommandations.

D'après une enquête conduite en 2006 par l'Agence de la Biomédecine, la France compte 98 laboratoires d'assistance médicale à la procréation déclarant utiliser de l'azote liquide. D'après cette enquête, seuls 60 % de locaux (soit 70 sur les 116 locaux ayant répondu) sont équipés d'un système de ventilation (mécanique) continue, 55 % (soit 67 locaux sur 121) d'un dispositif de mesure du taux d'oxygène, et 27 % (soit 32 locaux sur 121) d'un système de ventilation asservi au dispositif de mesure. En dehors de toutes considérations sur le débit de ventilation, 37 % (soit 44 locaux sur 116) ne sont pas pourvus d'un système de ventilation mécanique alors que le volume d'azote liquide qui y est stocké par rapport au volume du local nécessiterait une telle installation afin de limiter le risque d'hypoxie. La description des installations, des locaux et des activités de travail dans les salles renfermant de l'azote liquide montre que les risques au sein des laboratoires d'AMP français doivent être mieux maîtrisés.

1 / 5

Organisation de l'expertise

L'Afsset a confié au Comité d'Experts Spécialisés (CES) « Evaluation des risques liés aux milieux aériens » l'instruction de cette saisine. Ce dernier a mandaté le groupe de travail « Prévention des risques liés à l'azote liquide dans les laboratoires d'AMP » pour la réalisation des travaux d'expertise.

Les travaux d'expertise du groupe de travail ont été soumis régulièrement au CES « Evaluation des risques liés aux milieux aériens » (tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques) lors des séances du 6 octobre 2006, du 29 mars 2007 et du 5 décembre 2007. Le rapport produit par le groupe de travail tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES.

Ces travaux d'expertise sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires. Ils ont été réalisés dans le respect de la norme NF X 50-110 « qualité en expertise » avec pour objectif de respecter les points suivants : compétence, indépendance, transparence, traçabilité.

Description de la méthode

Une revue de la littérature a été réalisée en vue de relever des données générales relatives à l'azote liquide (propriétés physico-chimiques, stabilité et réactivité), et d'identifier et évaluer ses effets sanitaires.

Le cadre de l'expertise demandée à l'Afsset se bordant aux activités d'AMP, le périmètre d'étude des risques s'est limité aux opérations de travail qui se déroulent dans les salles d'AMP contenant de l'azote liquide, ainsi qu'à la manutention des conteneurs dans les circulations internes au bâtiment et au service d'AMP, et au transport sur la voie publique de conteneurs de faibles volumes.

L'identification des situations de travail à risques a pu être réalisée en analysant les informations recueillies dans le cadre :

- de l'enquête de l'Agence de la Biomédecine portant sur la situation des laboratoires d'AMP en France,
- de l'audition d'industriels : fabricants/fournisseurs d'équipements cryogéniques, distributeur d'azote liquide,
- d'un relevé sur site des opérations d'AMP mettant en jeu l'azote liquide.

Afin d'évaluer le risque hypoxique, des taux d'oxygène résiduels dans l'air d'un local consécutifs à l'évaporation d'azote liquide dans des circonstances caractéristiques de l'activité de biologie de la reproduction, ont été estimés. Ces taux ont été confrontés aux effets sanitaires qui leur sont communément associés.

Ces travaux, enrichis d'un bilan des réglementations et recommandations applicables à l'azote liquide (confié à un prestataire), ont conduit à l'élaboration de recommandations visant à orienter les actions de prévention des risques liés à l'utilisation de l'azote liquide dans les laboratoires de biologie de la reproduction.

Résultat de l'expertise collective

Identification et caractérisation des dangers

Il y a lieu de rappeler que l'azote, constituant majeur de l'air, ne présente pas intrinsèquement de toxicité particulière.

Les principaux dangers de l'azote liquide sont les gelures et l'asphyxie (conséquence de l'hypoxie). Si le premier est bien connu du fait de la température extrêmement basse de l'azote à l'état liquide (-196°C), le second l'est beaucoup moins, bien qu'il puisse être fatal.

L'hypoxie est liée à la capacité de l'azote liquide à générer rapidement, par évaporation, un important volume d'azote gazeux, provoquant ainsi une réduction du taux d'oxygène de l'air par déplacement et dilution de l'oxygène. Des effets apparaissent en dessous d'une teneur en oxygène de 18 %. Selon la réduction de cette teneur, les principaux effets vont de la diminution réversible des performances physiques et intellectuelles, à une altération ou une perte de conscience, voire des lésions cérébrales irréversibles et le décès. Ce risque est d'autant plus pernicieux que l'azote est un gaz incolore et inodore.

Les très basses températures de l'azote liquide et son important volume d'expansion en azote gazeux à température ambiante sont également sources de dommages sur les équipements et installations, et peuvent aboutir à des accidents tels que l'éclatement d'un récipient ou d'un conduit (augmentation rapide de pression), la fragilisation et le bris d'équipements, d'outils ou autres matériaux. Il peut provoquer une réaction explosive ou une inflammation suite à la concentration et condensation de l'oxygène de l'air.

Evaluation du risque hypoxique - Etudes de scénarii d'exposition

Les risques dus à l'utilisation de l'azote liquide sont difficilement quantifiables du fait de la grande hétérogénéité des situations de travail et des configurations de locaux.

Afin d'évaluer le risque lié à l'hypoxie pour le personnel, la quantité maximale d'azote liquide pouvant s'évaporer dans des circonstances caractéristiques de l'activité de biologie de la reproduction, a été estimée, pour ensuite calculer la baisse maximale d'oxygène dans l'air d'un local consécutive à cette évaporation. Les taux d'oxygène résiduels, calculés sous différentes conditions de ventilation (de 0,5 à 20 vol_{local}.h⁻¹) et de volume de local (de 10 à 150 m³), ont été confrontés aux effets sanitaires communément associés à ces taux d'oxygène :

- Evaporation naturelle à partir des conteneurs : les résultats montrent globalement un faible impact de l'évaporation naturelle du contenu des récipients stockés sur le taux d'oxygène de l'air d'un local, et par conséquent sur le risque hypoxique.
- Mise à niveau d'un récipient : pour la mise à niveau d'un récipient en azote liquide (remplissage pour garantir que les produits biologiques soient immergés en permanence), le risque hypoxique apparaît fortement conditionné par la ventilation et le volume du local. Ce risque est globalement écarté dès lors que le volume du local est important (150 m³), ou que la ventilation est forcée (20 vol_{local}.h⁻¹, sauf pour des locaux très réduits de 10 m³).
- Mise en froid d'un conteneur volumineux initialement dépourvu d'azote liquide : le remplissage de mise en froid d'un conteneur (opération peu fréquente en AMP) implique une évaporation d'azote liquide relativement forte au début du remplissage du fait de la différence de température entre les parois du conteneur et l'azote liquide. Les résultats issus d'une modélisation de mesures expérimentales (donc spécifiques aux conditions d'expérience) sur un conteneur volumineux de 660 l montrent effectivement une décroissance du taux d'oxygène dans les premières minutes. La pente de cette décroissance est conditionnée par la ventilation et le volume du local. Un risque d'hypoxie grave voire fatal apparaît dans un local très réduit de 10 m³, de possibles effets plus ou moins graves selon le taux de ventilation dans 30 m³, a priori pas de risque particulier dans un local de 150 m³ même avec un taux de renouvellement d'air de 0,5 vol_{local}.h⁻¹.
- Renversement du contenu d'un récipient : pour le scénario de renversement accidentel d'un récipient (5, 10 et 60 l) basé sur des hypothèses de calcul majorantes en termes de risque hypoxique, sont observés des taux d'oxygène particulièrement dangereux pouvant induire une diminution des performances physiques et intellectuelles, allant, pour les locaux de faible volume (moins de 30 m³), de la perte de connaissance jusqu'au décès. Le risque est minimisé dans des locaux de grand volume (150 m³).

Ces résultats confortent bien l'intérêt d'agir sur des paramètres tels que le volume des locaux et leur ventilation pour prévenir le risque hypoxique lié à l'utilisation d'azote liquide.

De fait, les travaux de cette expertise constituent les éléments de base ayant permis au groupe de travail de l'Afsset de proposer des recommandations de prévention des risques liés à l'utilisation de l'azote liquide en AMP.

Le Comité d'Experts Spécialisés « Evaluation des risques liés aux milieux aériens » adopte les travaux d'expertise collective lors de sa séance du 27 mars 2008 et fait part de cette adoption à la directrice générale de l'Afsset.

Conclusions et recommandations de l'expertise collective

Les recommandations techniques et organisationnelles du groupe de travail sont présentées dans leur totalité dans le rapport d'expertise. Les grandes lignes en sont présentées ci-après.

Il faut préciser que ces recommandations n'ont pas pour objet de fournir des modalités d'intervention en cas d'accident ou d'importants déversements d'azote liquide dans un local.

- ▶ **Mise en œuvre de protections collectives et aménagement des locaux** : il est notamment recommandé de veiller à maintenir un taux minimal de 19% d'oxygène en vue de prévenir l'apparition d'effets liés à l'hypoxie. Cette valeur est par ailleurs recommandée par la CNAMTS (R 276 Cuves et réservoirs). Il est aussi recommandé de ne pas manipuler et stocker de l'azote liquide dans des locaux de volume inférieur à 20 m³ (correspondant à une surface de 8 m² pour une hauteur sous plafond de 2,5 m).

Il est recommandé de ne pas utiliser de locaux souterrains ni pour le stockage ni pour le travail avec l'azote liquide. Il est important que les locaux ne communiquent pas par des trappes ou d'autres ouvertures (ex : gaine technique) avec des locaux situés à des niveaux inférieurs.

Les locaux doivent être équipés, en particulier, d'appareils de détection et de mesure du taux d'oxygène, d'un système d'alarme et d'une ventilation mécanique adaptée à deux vitesses. Le taux de renouvellement d'air minimal nécessaire en continu peut être estimé par l'utilisation de l'abaque figurant dans le rapport d'expertise collective.

Les locaux où est manipulé l'azote liquide devront être clairement identifiés. Ils devront en outre être dotés d'une signalisation des dangers et des équipements de protection individuelle requis, via les pictogrammes correspondants.

- ▶ **Mise à disposition et port de protections individuelles** : la manipulation d'azote liquide ou de matériaux refroidis par l'azote liquide requiert le port de gants (à manchette longue de préférence), lunettes ou visière de protection, chaussures fermées et tablier en matière non-tissée. Le groupe de travail note qu'il n'existe aucun gant adapté à la manipulation des paillettes.
- ▶ **Procédures de travail** : il est recommandé à chaque laboratoire de définir et de formaliser les règles de sécurité relatives à l'accès aux locaux (y compris pour les intervenants extérieurs) et aux opérations exposant potentiellement à l'azote liquide. Le travail d'une personne isolée dans un laboratoire ne peut être autorisé que dans le cadre d'un dispositif de sécurité adapté.
- ▶ **Stockage, remplissage et installations de remplissage** : Il est notamment recommandé de n'utiliser que des récipients conçus pour contenir de l'azote liquide avec leurs propres dispositifs d'obturation. L'utilisation de tout autre conteneur non adapté, notamment les bouteilles isothermes du commerce avec leur bouchon hermétique (risque d'éclatement...), est à proscrire. Des mesures de prévention sont proposées pour limiter l'évaporation d'azote gazeux dans les locaux de travail.

- ▶ **Transport** : des règles de sécurité sont recommandées pour le transport d'azote liquide à l'intérieur du laboratoire et de l'établissement. Le transport en ascenseur ne doit être autorisé que non-accompagné et seulement dans des ascenseurs pouvant être verrouillés pour le transport. Pour les faibles quantités (quelques litres), l'utilisation de conteneurs de transport avec absorption de l'azote liquide en paroi poreuse est recommandée.

Des recommandations relatives au transport d'azote liquide en faible quantité dans un véhicule léger sont précisées dans le rapport.

- ▶ **Formation du personnel** : le CES insiste sur l'importance de la formation du personnel. Le rapport précise les principaux domaines de connaissances et de compétences.
- ▶ **Contrôles périodiques** : l'attention est attirée sur le respect des règles de contrôle et de maintenance des équipements et des installations.

Le CES souhaite que ces recommandations destinées aux gestionnaires et aux professionnels de l'assistance médicale à la procréation soient prises en compte et adaptées dans d'autres domaines d'utilisation de l'azote liquide.

Maisons-Alfort, le 27 mars 2008,

Au nom des experts du CES « Evaluation des risques liés aux milieux aériens »,



le président du CES,
M. Christian Elicégaray

Abréviations

ACGIH : American Conference of Governmental Industrial Hygienist

ADNR : Accord européen relatif au transport international des marchandises dangereuses par les voies d'eau

ADR : Accord européen relatif au transport international des marchandises dangereuses par route

AMP : Assistance Médicale à la Procréation

ANAES : Agence Nationale d'accréditation et d'évaluation en santé

APHP : Assistance Publique – Hôpitaux de Paris

BCC : British Cryogenic Council

BCGA : British Compressed Gases Association

BIT : Bureau International du Travail

BLEFCO : Biologistes pour L'Etude de la Fécondation et de la Conservation des Œufs

BLEVE : Boiling Liquid Expanding Vapor Explosion

BS : British Standard

CAS : Chemical Abstracts Service

CCOHS : Canadian Centre for Occupational Health and Safety

CE : Commission Européenne

CECOS : Centre d'Etude et de Conservation des Œufs et du Sperme humain

CERN : Centre Européen de Recherche Nucléaire

CES : Comités d'Experts Spécialisés

CGA : Compressed gas association

CIV : Contrat de transport International ferroviaire des Voyageurs

COTIF : Convention Relative aux Transports Internationaux Ferroviaires

COV : Composés Organiques Volatils

CRAM : Caisse Régionale d'Assurance Maladie

DFG : Deutsche Forschungsgemeinschaft, agence des moyens pour la recherche allemande

EIGA : European Industrial Gases Association

EINECS : European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances

EPA : Environmental Protection Agency (US)

ESHRE : European Society for Human Reproduction & Embryology

GT : Groupe de Travail

IARC : International Agency for Research on Cancer

IATA : International Air Transport Association

IDLH : Immediately Dangerous to Life or Health

IGC : International Gas Code

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

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

INSERM : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

IRIS : Integrated Risk Information System (US EPA)

IRM : Imagerie à Résonance Magnétique

LN₂ : Liquid Nitrogen (azote liquide)

MAK : Maximale Arbeitsplatz Konzentration
(Concentration maximale autorisée sur un poste de travail)

N₂ : azote (gaz)

NFPA : National Fire Protection Association

NIOSH : National Institute for Occupational Safety and Health

NSPP : Ne Se Prononce Pas

NTP : National Toxicity Program (NL)

OIT : Organisation Internationale du Travail

OSHA : Occupational Safety & Health Administration Agence Européenne pour la Sécurité et la Santé au Travail

PEL-TWA : Permissible Exposure Limit - Time-weighted average
(Niveau d'exposition admissible - Moyenne pondérée en fonction du temps)

REL : Recommended Exposure Limit

RID : Règlement concernant le transport international ferroviaire des marchandises dangereuses

TLV : Threshold Limit Value

UN : United Nations

US CSB : US Chemical Safety and hazard investigation Board

VLEP : Valeur Limite d'Exposition Professionnelle

Liste des tableaux

Tableau I : Valeurs limites en milieu professionnel, azote	26
Tableau II: Valeurs limites professionnelles réglementaires, oxygène (Non exhaustif)	26
Tableau III : Numéros d'enregistrement de l'azote liquide	27
Tableau IV : Propriétés physico-chimiques de l'azote	28
Tableau V : Stabilité et réactivité de l'azote	29
Tableau VI : Manifestations cliniques de l'hypoxie (Santé Canada, 2006).....	36
Tableau VII : Symptômes décrits en fonction des taux d'oxygène de l'air	37
Tableau VIII : Données de surface des salles de stockage	50
Tableau IX : Volume d'azote liquide stocké dans le volume des salles d'AMP	51
Tableau X : Types d'activités pratiquées aux postes de travail.....	52
Tableau XI : Caractéristiques physiques des conteneurs	52
Tableau XII : Aménagement des salles contenant de l'azote liquide dans les laboratoires d'AMP..	54
Tableau XIII : Taux d'oxygène résiduel (%) lié à l'évaporation naturelle à partir des conteneurs, n = 0,5 vol.h ⁻¹	61
Tableau XIV : Taux d'oxygène résiduel (%) lié à l'évaporation naturelle à partir des conteneurs, n = 6 vol.h ⁻¹	61
Tableau XV : Taux d'oxygène résiduel (%) lié à la mise à niveau d'un conteneur, n = 0,5 vol.h ⁻¹ ..	64
Tableau XVI : Taux d'oxygène résiduel (%) lié à la mise à niveau d'un conteneur, n = 6 vol.h ⁻¹	64
Tableau XVII : Taux d'oxygène résiduel (%) lié à la mise à niveau d'un conteneur, n = 20 vol.h ⁻¹ .	64
Tableau XVIII : Taux d'oxygène résiduel (%) lié au renversement d'un conteneur	70

Liste des figures

Figure 1 : Rupture de fragilité d'un raccord inadapté aux basses températures.....	31
Figure 2 : Phlyctènes claires et œdèmes aux mains consécutives à des gelures.....	34
Figure 3: Schéma d'un réservoir pressurisé à tête démontable.....	42
Figure 4: Photographie des différents types de récipients de stockage de produits biologiques en immersion dans l'azote liquide	43
Figure 5: Schéma de principe du procédé de conservation des échantillons biologiques	44
Figure 6: Répartition du nombre de salles renfermant de l'azote liquide par laboratoire d'AMP	50
Figure 7: Distribution des surfaces des locaux	51
Figure 8 : Répartition du nombre de cuves par salle.....	53
Figure 9: Répartition du nombre de litres de LN ₂ stockés dans les salles.....	53

Figure 10 : Répartition du nombre de cuves selon leur capacité nominale.....	54
Figure 11 : Répartition des salles en fonction du taux d'extraction continue.....	55
Figure 12 : Répartition du volume d'azote liquide stocké en fonction du volume et de la présence d'une ventilation mécanique dans les salles	55
Figure 13 : Evolution du débit d'évaporation d'azote liquide pour la mise en froid d'un conteneur de 660L.....	65
Figure 14 : Taux d'oxygène d'un local de 10m ³ au cours de la mise en froid d'un conteneur de 660L	67
Figure 15 : Taux d'oxygène d'un local de 30m ³ au cours de la mise en froid d'un conteneur de 660L	67
Figure 16 : Taux d'oxygène d'un local de 150m ³ au cours de la mise en froid d'un conteneur de 660L.....	68
Figure 17 Représentation schématique du profil d'évaporation d'azote liquide au cours d'une journée.....	74
Figure 18 : Taux de renouvellement d'air recommandés pour la ventilation continue d'un local d'AMP (Abaque simplifié)	75
Figure 19 Concept d'utilisation des deux vitesses de ventilation	78

1 Introduction

1.1 Contexte

L'azote liquide résulte de la liquéfaction du gaz azote en dessous de son point d'ébullition (-195,8°C). C'est un liquide cryogénique dont les utilisations sont de plus en plus nombreuses et diversifiées :

- Alimentaire (surgélation rapide)
- Industrie (refroidissement de procédés et de l'air ventilé, supra conductivité, découpage, broyage, décapage)
- Informatique (overclocking)
- Enseignement et recherche (physique, conservation de cellules animales ou végétales)
- Vétérinaire (conservation de cellules animales)
- Médical (cryochirurgie, cryothérapie, conservation de cellules et tissus humains).

Dans le cadre de la préparation d'un arrêté sur les bonnes pratiques dans les laboratoires de biologie de la reproduction, l'Agence de la Biomédecine prévoit d'intégrer des recommandations de prévention des risques liés à l'utilisation de l'azote liquide, substance non classée comme dangereuse par ailleurs.

Aussi, l'Agence de la Biomédecine a saisi l'Afsset le 11 avril 2006 pour procéder à l'évaluation des risques liés à l'utilisation de l'azote liquide dans le cadre des activités d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) et formuler des orientations de recommandations pour la prévention de ces risques.

1.2 Objectifs de la saisine

L'objectif de la saisine est de formuler des recommandations de prévention des risques professionnels liés à l'utilisation d'azote liquide dans le cadre des activités d'AMP.

Pour ce faire, suite à l'analyse de la demande, l'Afsset a identifié trois axes de travail :

- Dresser un état des lieux de la réglementation applicable à l'utilisation d'azote liquide, à l'exception de la production et de la distribution industrielle d'azote liquide ;
- Evaluer les risques liés à l'utilisation de l'azote liquide dans les activités de biologie de la reproduction ;
- Proposer des orientations de recommandation en termes de prévention des risques.

1.3 Modalités de traitement de la saisine

L'Afsset a confié au Comité d'Experts Spécialisés (CES) « Evaluation des risques liés aux milieux aériens » l'instruction de cette saisine. Ce dernier a mandaté le groupe de travail « Evaluation des risques liés à l'utilisation d'azote liquide dans les laboratoires d'assistance médicale à la procréation » pour la réalisation des travaux d'expertise.

Les travaux d'expertise du groupe de travail ont été soumis régulièrement au CES (tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques). Le rapport produit par le groupe de travail tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES.

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 » avec pour objectif de se conformer aux points suivants : compétence, indépendance, transparence, traçabilité.

Le groupe de travail rattaché au Comité d'Experts Spécialisé « Evaluation des risques liés aux milieux aériens » a été constitué par décision de la Directrice générale de l'Afsset, en date du 18 janvier 2007. La création du groupe de travail « Evaluation des risques liés à l'utilisation d'azote liquide dans les laboratoires d'assistance médicale à la procréation » a fait l'objet d'une large consultation :

- Appel à candidature d'experts du CES « Evaluation des risques liés aux milieux aériens », dans sa séance du 6 octobre 2006,
- Appel à candidature d'experts du CES « Evaluation des risques liés aux substances chimiques », dans sa séance du 29 septembre 2006,
- Appel à candidature d'experts du CES « Evaluation des risques liés aux substances et produits biocides » et du CES « Evaluation des risques liés aux agents physiques, aux nouvelles technologies et aux grands aménagements », entre le 20 octobre et le 10 novembre 2006
- Appel à candidature d'experts extérieurs aux CES, publié sur le site internet de l'Afsset du 20 octobre au 10 novembre 2006

L'examen des candidatures s'est déroulé le 17 novembre 2006 au regard des compétences scientifiques et techniques, mais également de l'indépendance vis-à-vis des questions posées et de la probité des candidats.

La création du groupe de travail a été soumise à l'accord du président du CES « Evaluation des risques liés aux milieux aériens », le 15 décembre 2006.

Le mandat du groupe de travail est de :

- 1- Synthétiser les données scientifiques disponibles sur l'azote liquide ;
- 2- Evaluer les effets sur la santé des atmosphères chargées en azote gazeux et des expositions cutanées,
- 3- Proposer des orientations de recommandations pour la prévention des risques identifiés.

Le groupe de travail s'est réuni à 10 reprises en formation plénière¹ entre les mois de février 2007 et février 2008. Les travaux du groupe ont été éclairés par :

- l'enquête menée auprès des professionnels de l'AMP par l'Agence de la Biomédecine,
- un bilan des réglementations et recommandations applicables à l'azote liquide, confié à la société Alcimed, attributaire du marché public engagé sur proposition de l'Afsset,
- l'audition de deux industriels fabricants/fournisseurs d'équipements cryogéniques (Air Liquide le 15 juin 2007, CryoDiffusion le 10 mai 2007), Air Liquide étant également un distributeur d'azote liquide,
- la visite du Centre Européen de Recherche Nucléaire (CERN), grand utilisateur d'azote liquide,
- la visite sur site du laboratoire d'AMP du groupe hospitalier Cochin-Saint Vincent-de-Paul (CECOS).

Un espace de travail informatique sécurisé a été mis à la disposition des membres du groupe de travail.

¹ 15 février 2007, 20 mars 2007, 16 mai 2007, 15 juin 2007, 11 juillet 2007, 27 septembre 2007, 26 octobre 2007, 13 novembre 2007, 6 décembre 2007, 21 décembre 2007, 28 février 2008

2 Historique de la cryobiologie en AMP

Spallanzani décrit en 1776 les effets du refroidissement dans la neige sur les spermatozoïdes humains qu'il appelait « les animalcules ». Il faut attendre le milieu du XX^{ème} siècle pour que Smith et Polge (1950) découvrent le pouvoir cryoprotecteur de la glycérine sur la semence bovine, également rapporté par Jean Rostand sur les spermatozoïdes de la grenouille (Empéaire et al., 1973). Le conditionnement des échantillons était réalisé tout d'abord sous forme d'ampoules de verre. Dès les années 50, le conditionnement des échantillons en paillettes de matière plastique connaît un essor important et le stockage s'effectue à partir de cette date dans l'azote liquide. La congélation des spermatozoïdes est d'abord pratiquée en zootechnie chez les bovins (Empéaire et al., 1973). En 1953, Shermann et Bunge rapportent la première congélation de sperme humain et parviennent quelques mois plus tard, à obtenir la première grossesse à l'aide de tels échantillons (Empéaire et al., 1973).

Cette possibilité de pouvoir congeler et conserver des spermatozoïdes va permettre le développement des banques de sperme dans différents pays grâce au stockage des paillettes de spermatozoïdes dans l'azote liquide (David, 2004).

En France, en 1973, le premier Centre d'Etude et de Conservation des Œufs et du Sperme humains (CECOS) est créé par Georges David au Kremlin Bicêtre. Après la création des deux premiers CECOS en 1973, leur nombre dépassait la dizaine en 1977 pour se stabiliser en 2002 à 23 centres publics et un centre privé non CECOS, l'IFREARES à Toulouse. Le rôle des CECOS ne se limitait pas à la congélation du sperme en vue de don mais également à la congélation et la conservation des spermatozoïdes avant un traitement susceptible d'altérer la spermatogenèse de manière irréversible, encore appelée autoconservation de sperme (Hennebicq, 2004).

Le premier enfant conçu par fécondation *in vitro* naît au Royaume-Uni en 1978 et en France en 1982. L'utilisation des traitements d'hyperstimulation de l'ovulation dans le cadre de la fécondation *in vitro* entraîne la conception d'un nombre d'embryons supérieur au nombre d'embryons transférables au cours d'une tentative. De ce fait, la congélation des embryons dits surnuméraires s'est développée en parallèle et le premier enfant né après transfert d'embryons congelés voit le jour en 1984. Ce nombre d'embryons transférés s'est considérablement réduit ces dernières années, entre 1 et 2 embryons transférés par tentative.

Depuis les années 90, se développe une autre activité de cryobiologie en AMP : la cryoconservation du tissu ovarien. En effet, les progrès réalisés dans la prise en charge diagnostique et thérapeutique des cancers de l'enfant ont transformé une maladie fatale en maladie curable pour la majorité d'entre eux. Ainsi, les taux de survie se sont considérablement améliorés et la guérison est aujourd'hui devenue un objectif réaliste. Cependant, l'amélioration de l'efficacité thérapeutique s'associe à une augmentation des effets indésirables, parmi lesquels la toxicité sur le tissu gonadique est la plus fréquemment rencontrée pouvant entraîner une stérilité définitive à l'âge adulte.

Chez l'adolescente, la congélation du gamète mature n'est pas envisageable puisque produit à raison d'un ovocyte par cycle menstruel. L'obtention de plusieurs ovocytes matures doit faire appel à l'induction de l'ovulation par traitement hormonal, cette procédure a un rendement variable et nécessite plusieurs jours de traitement souvent incompatibles avec un traitement anticancéreux. Chez la petite fille avant la puberté, l'induction de l'ovulation n'est pas envisageable. Ainsi, la congélation du cortex ovarien apparaît une solution adaptée chez la petite fille et l'adolescente. Cette activité se développe de manière significative depuis ces cinq dernières années.

La congélation du tissu testiculaire immature prélevé chez des jeunes garçons s'initie lentement au niveau national et international. Cependant, cette procédure nouvelle devrait se développer dans les prochaines années.

Porcu et al. (2000) ont ouvert des perspectives nouvelles en ce qui concerne la congélation des ovocytes et leur aptitude à être fécondés et transférés. Cependant, bien que cette procédure se développe dans certains pays européens limitrophes dont la législation limite le nombre d'embryons conçus *in vitro* et oblige à envisager des stratégies différentes de gestion des ovocytes qui ne seront pas mis en fécondation (en Italie) ou des zygotes (ovocytes fécondés, en Allemagne et Suisse) à qui on ne permettra pas d'atteindre le stade embryonnaire, la congélation ovocytaire reste peu efficace et n'est pas développée en France.

3 Etat des lieux des réglementations et recommandations applicables à l'azote liquide

3.1 Synthèse de l'état des lieux des réglementations et recommandations applicables à l'azote liquide

Un bilan des réglementations et recommandations a été dressé par la société Alcimed dans les 13 pays où l'utilisation de l'azote liquide, et notamment en AMP, est réputée développée. Cette prestation exclut la recherche des réglementations et des sources normatives relatives à la conception des équipements cryogéniques, qui est assurée par le groupe de travail.

La méthode de travail a consisté en une étude bibliographique (textes réglementaires, fiches de données de sécurité) complétée par environ 80 entretiens téléphoniques auprès d'acteurs institutionnels (Ministères, Organismes publics liés à la santé, ...), de laboratoires de conservation de cellules humaines ou animales, et de fournisseurs d'azote liquide (services réglementation, service sécurité).

Le bilan détaillé des réglementations et recommandations applicables à l'azote liquide, réalisé par la société Alcimed, est joint en annexe 3 du présent rapport.

Les réglementations identifiées portent sur des dispositions générales (sur les risques chimiques, la sécurité et la protection des travailleurs, l'agencement des locaux) et spécifiques (sur l'azote liquide, les gaz liquéfiés, les récipients cryogéniques, le stockage cryogénique, l'asphyxie, la ventilation et les espaces confinés).

Outre les textes applicables en France, les pratiques réglementaires spécifiques aux gaz cryogéniques, à l'asphyxie et aux espaces confinés ont été analysées dans les pays suivants : Allemagne, Autriche, Belgique, Canada, Danemark, Espagne, Etats-Unis, Italie, Pays Bas, Royaume Uni, Suède, Suisse.

En France, cinq textes réglementaires spécifiques ont été identifiés. Parmi ceux-ci, deux arrêtés et un article du Code du Travail s'appliquent aux laboratoires d'AMP, mais ne mentionnent aucun élément précis sur l'azote liquide. En revanche, les deux arrêtés de 1998, bien que non applicables aux laboratoires d'AMP, apportent plus d'éléments sur la sécurité des locaux (voir Annexe 3). Il est notamment demandé d'installer un système à deux vitesses de ventilation, assurant au minimum six renouvellements d'air par heure, un détecteur d'oxygène et une alarme prévenant du manque d'oxygène, ainsi que d'utiliser certains matériaux pour les locaux, et d'afficher les consignes de sécurité.

L'utilisation d'azote liquide telle que prévue dans le cadre de l'étude n'est soumise à aucune réglementation spécifique européenne ou internationale. Cependant les réglementations générales relatives la sécurité des produits chimiques sont applicables.

Le transport d'azote liquide renfermant des cellules humaines, par voies routière, ferroviaire ou maritime, est autorisé et n'est soumis qu'aux prescriptions minimales d'étiquetage et d'emballage des réglementations ADR, RID et ADNR respectivement. D'après la réglementation IATA, le transport par avion est permis en soute mais pas en cabine.

Les recommandations données aux utilisateurs sur le territoire français sont orientées sur la fiabilité des équipements cryogéniques, les risques liés à l'utilisation de l'azote liquide et le risque d'asphyxie en particulier. Ces diverses recommandations, relativement homogènes, sont adaptées aux situations de travail en AMP. Les exigences pour le transport en ascenseur sont peu nombreuses et contradictoires.

D'une manière générale, ces documents comportent peu de données chiffrées ou d'arguments scientifiques.

Les bonnes pratiques qui ressortent des réglementations et recommandations pour minimiser le **risque d'asphyxie** sont les suivantes :

- Ne jamais utiliser un contenant hermétiquement fermé ou non muni de soupape de sécurité pour transporter ou stocker l'azote liquide.
- Installer un détecteur d'oxygène et une alarme se déclenchant à un seuil d'oxygène compris entre 18% et 19% (disposition obligatoire aux Pays-Bas si la ventilation est inférieure à quatre renouvellements d'air par heure pour une pièce de moins de 100 m³).
- Evacuer le local lorsque la teneur en oxygène est inférieure à 18% ou 19%, et interdire l'accès sans appareil respiratoire isolant lorsque la teneur en oxygène est trop faible (entre 17 et 20,5% selon les pays).
- Maitriser le taux d'oxygène du local par mise en œuvre d'une ventilation mécanique (par un apport d'air neuf continu de 6 volumes par heure) couplée à une détection du taux d'oxygène dans l'atmosphère du local.
- Contrôler périodiquement le bon fonctionnement des équipements cryogéniques et des détecteurs d'oxygène.
- Concevoir des locaux de sorte que l'azote ne se disperse pas dans le bâtiment.
- Former le personnel sur les dangers, les risques et les mesures de prévention à prendre et l'informer notamment par la signalisation du danger à l'entrée du local et l'affichage des consignes de sécurité.
- Transporter les récipients contenant de l'azote liquide sur un chariot adapté et utiliser l'ascenseur sans aucun passager et possédant une fonctionnalité « mode prioritaire ».

Afin de minimiser le **risque de brûlure**, les bonnes pratiques qui ont été identifiées sont les suivantes :

- Porter des équipements de protection individuelle : gants isolants sans ouverture qui pourrait laisser passer de l'azote liquide, lunettes ou visière, vêtements recouvrant tout le corps et chaussures fermées.
- Utiliser une pince pour manipuler des échantillons dans l'azote liquide.
- Afficher clairement les risques et les consignes de sécurité et informer le personnel sur les premiers secours à apporter en cas de brûlure.

3.2 Valeurs limites en milieu professionnel

L'azote, constituant majeur de l'air, n'ayant aucun caractère toxique particulier intrinsèque, aucune valeur limite se rapportant à l'exposition à l'azote en milieu professionnel n'a été proposée et de fait identifiée au niveau national, européen et international (Tableau I), le facteur limitant étant l'oxygène disponible dans l'air.

Tableau I : Valeurs limites en milieu professionnel, azote

Organisme source	Valeur Limite en milieu Professionnel		Existence VLEP Azote (Oui/Non)
NIOSH (2003)	USA	REL	N
		IDLH	N
ACGIH (2005)	USA	TLV	N
OSHA (USA) (2004)	USA	PEL-TWA	N
INRS (note Ed 984)	France	VLEP	N
AGS	Allemagne	MAK	N
BGIA (base de données Gestis)	Divers états membres EU, Canada (Québec), Japon, Suisse, USA	–	N

L'American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH, 2001) précise que l'azote agit comme un asphyxiant simple.

Quelques pays ont fixé une valeur limite réglementaire du taux d'oxygène dans l'air en milieu professionnel, en dessous de laquelle il est interdit de pénétrer dans un local sans appareil respiratoire (tableau II).

Tableau II: Valeurs limites professionnelles réglementaires, oxygène (Non exhaustif)

Pays	Référence du texte	Portée	Valeur limite
Canada - Québec - Ontario	S-2.1, r.19.01 (2001)	Provinciale	19,5%
	R.R.O. 1990, Reg. 833 (1990)		18%
Pays-Bas	Beleidsregel 4.4-10 (2002)	Nationale	18%
USA	29 CFR 1910.146 (1999)	Fédérale	19,5%

4 L'azote liquide

L'azote liquide est produit à partir d'environ 78% de diazote présent dans l'air atmosphérique. L'air est comprimé, épuré ; les gaz extraits sont liquéfiés (oxygène et azote pour l'essentiel).

Hormis les activités de laboratoire et de recherche, l'utilisation de l'azote liquide se répand dans de multiples procédés industriels tels que :

- Le recyclage des pneus par cryopulvérisation (l'azote liquide congèle et fragilise les lambeaux de pneus afin de les réduire facilement en miettes de caoutchouc). Une méthode semblable est utilisée pour broyer et trier le chlorure de polyvinyle.
- L'inertage des récipients, locaux et des stockages de produits inflammables (propulsion des liquides dans les pipelines, fabrication d'ammoniaque, silo à grains, ...).
- La surgélation rapide des matières périssables pour leur transport et pour broyer et traiter des fruits séchés, des aromates délicats et des épices (empêchant leur contamination par l'oxydation, la croissance bactérienne, la migration de l'humidité et l'infestation par les insectes).
- La récupération et le maintien de la pression dans les réservoirs de pétrole et de gaz.
- La purge de pipelines, de tubes.
- L'extraction de composés organiques volatils (COV) des émissions gazeuses dans les procédés industriels notamment.
- Le refroidissement des gaz de ventilation (climatisation, industrie du verre).
- La protection des métaux, des semi-conducteurs et des circuits imprimés dans les procédés fabrication.
- Le découpage au plasma.
- Le refroidissement des électrodes des fourneaux de l'industrie du verre, des processeurs informatiques, des équipements d'imagerie à résonance magnétique (IRM), des sols pour les stabiliser (restauration de la tour de Pise).
- L'abaissement de la température de coulée des mélanges de béton, inhibant la formation de fissures.
- La destruction de tissus infectés en cryochirurgie et en dermatologie (cryothérapie).
- La conservation de cellules et tissus humains et animaux.

Tableau III : Numéros d'enregistrement de l'azote liquide

N°CAS	7727-37-9
N°EINECS	231-783-9
N°UN	1977 – Azote liquide réfrigéré

4.1 Propriétés physico-chimiques, stabilité et réactivité

L'azote est incolore inodore et insipide. Il est incombustible, ininflammable et chimiquement stable. L'azote gazeux qualifié de gaz inerte à température ambiante et pression normale est le principal constituant de l'air.

L'azote existe en phase liquide, à la pression ambiante, entre -209,86°C (point de fusion) et -195,8°C (point d'ébullition) (Rockswold, 1982).

4.1.1 Propriétés physico-chimiques

Le tableau IV présente les principales informations recensées en termes de propriétés physico-chimiques de l'azote.

Tableau IV : Propriétés physico-chimiques de l'azote

Symbole	N ₂
Poids moléculaire	28,013 g.mol ⁻¹
Point de fusion	-209,86°C à 1,01325 bar
Point d'ébullition	-195,8 °C
Densité de l'azote liquide	0,8086 (à -195,8°C et à 1,01325 bar)
Solubilité dans l'eau	Faible (1,49% à 25°C, à 1,01325 bar)
Solubilité dans d'autres liquides	soluble dans l'alcool et l'ammoniaque liquide
Coefficient de partition	non applicable
Volume de gaz formé à partir d'un litre de liquide	650 à 683 l dans les conditions normales de température et de pression; 695 l à 21°C, à 1,01325 bar
Densité de la phase gazeuse	0,967 à 0,9737
Facteur de conversion	1 ppm = 1,14 mg.m ⁻³ ; 1 mg.m ⁻³ = 0,875 ppm à 25°C
Pression de vapeur	non applicable
Energie de vaporisation	5.57 KJ.mol ⁻¹ à -195,79°C
Pression critique	3400 kPa (33,54 atm)
Température critique	-147,1°C
Point triple de l'azote	T = -210,0°C et p = 0,13 bar

4.1.2 Stabilité et réactivité

Le tableau V présente les principales informations recensées en termes de stabilité et de réactivité de l'azote (CCOHS, 2006 – a, 2006 – b).

Tableau V : Stabilité et réactivité de l'azote

	Etat ¹	Commentaire
Stabilité	L/G	Normalement stable Soumis à des conditions d'incendie : normalement stable (Code d'instabilité NFPA : 0)
Polymérisation dangereuse	L/G	Inexistante
Incompatibilité – Substances chimiques et matières à éviter²	L	- Matières grasses : risque d'explosion au contact des matières grasses lorsque condensation et concentration de l'oxygène sous forme liquide. - Magnésium : réagit très violemment en présence de poudre de magnésium, pour former du nitrite de magnésium.
	G	- Lithium : réagit à température ambiante pour former du nitrure de lithium. S'enflamme en présence d'azote. - Neodymium, Zirconium : réagit vigoureusement. - Titane : peut brûler en atmosphère enrichie en azote à températures élevées. - Carbone : forme des cyanides lorsque chauffé en présence d'alcali ou d'oxyde de baryum. - Ozone : peut provoquer une réaction explosive. - Calcium, Strontium, Baryum : chauffés à blanc, réagissent pour former des nitrures. - Oxygène : forme de l'acide nitrique puis du dioxyde d'azote quand mélangé à l'azote et soumis à une étincelle électrique.
Produits de décomposition dangereux	L/G	Aucun connu
Corrosivité sur les métaux	L/G	Non corrosif
Inflammabilité	L/G	Ininflammable Soumis à des conditions typiques d'incendie : inflammable (Code d'inflammabilité NFPA : 0)
Combustibilité	L/G	Incombustible

¹ L : Liquide, G : Gazeux

² Les réactions chimiques qui pourraient provoquer une situation dangereuse sont listées ici. Plusieurs de ces réactions peuvent être réalisées en sécurité si des mesures spécifiques de contrôle sont en place. A visée non exhaustive, une vue d'ensemble des réactions importantes impliquant des substances communes en matière d'hygiène industrielle est ici fournie.

4.2 Accidents techniques liés aux propriétés physico-chimiques

Les très basses températures de l'azote à l'état liquide et son important volume d'expansion en azote gazeux à température ambiante sont sources de dommages sur les équipements et installations. Ces propriétés propres aux liquides cryogéniques peuvent aboutir à des accidents tels que :

- l'éclatement d'un récipient ou d'un conduit lié à une augmentation rapide de pression au-delà de la pression maximale de service du contenant ;
- la fragilisation et le bris d'équipements, d'outils ou autres matériaux en contact avec l'azote liquide ou avec des vapeurs froides d'azote ;
- une réaction explosive ou une inflammation par condensation et concentration de l'oxygène de l'air en oxygène liquide.

4.2.1 Eclatement par surpression

A température et pression normales, l'évaporation d'un litre d'azote liquide produit environ 650 litres d'azote gazeux. Le réchauffement de l'azote liquide ou le piégeage de ses vapeurs dans un récipient ou un conduit fermé hermétiquement peuvent provoquer une surpression sur les parois pouvant atteindre plus de 700 bars, à l'origine de l'éclatement du contenant. Ce phénomène peut avoir des conséquences comparables à un BLEVE¹.

Les causes d'obturation du dispositif de mise à l'air libre ou de l'évent sont multiples : utilisation inappropriée d'un bouchon hermétique, création d'un bouchon de glace sur le col des conteneurs en particulier lors du dégazage (INRA, 2006). Le réchauffement de l'azote liquide peut faire suite à la perte du vide assurant l'isolation thermique du contenant ou, cas plus exceptionnel, d'un incendie extérieur (CCOHS, 2002). La perte du vide au niveau de la double enveloppe qui constituent les parois internes et externes des contenants cryogéniques est généralement liée à un défaut de fabrication, à leur vieillissement ou à une fuite au niveau du port de pompage.

A noter que les matériaux sont plus fragiles à ces températures et qu'une condensation d'eau dans un conteneur entraîne la formation de glace qui peut exercer une pression sur les parois.

Par ailleurs, la condensation possible de l'oxygène de l'air en oxygène liquide dans un conteneur d'azote liquide ou dans un conteneur refroidi par l'azote liquide (voir 4.2.3) constitue un facteur aggravant le risque d'éclatement, du fait de la possibilité de réaction explosive avec une matière oxydable (University of Wales, 2001).

Les risques associés à l'éclatement du contenant résultent de la projection du couvercle, d'éclats du contenant et du liquide cryogénique, de l'onde de choc, avec parfois un risque d'asphyxie selon le volume d'azote mis en jeu.

4.2.2 Fragilisation des matériaux et bris

Les très basses températures diminuent la résilience et la ductilité de certains matériaux. Des matériaux tels que le caoutchouc, le plastique ou l'acier au carbone sont alors fragilisés et peuvent se briser facilement. Ils ne sont par conséquent pas adaptés au contact avec l'azote liquide (CERN, 1998 ; CCOHS, 2002).

¹ BLEVE : Boiling Liquid Expanding Vapor Explosion. Se dit d'une explosion due à l'expansion des vapeurs d'un liquide en ébullition (BIT, 2006)

Plusieurs matériaux se contractent aux températures cryogéniques, pouvant occasionner lorsque la limite d'élasticité est dépassée, des endommagements tels que des fuites dans les raccords (CCOHS, 2002 ; Perinic, 2007-a ; Perinic, 2007-b). Pour l'estimation de la contraction thermique entre la température ambiante et des températures cryogéniques, les coefficients de contraction approximatifs sont :

- 0,3% pour les aciers,
- 0,4% pour l'aluminium,
- Supérieur à 1% pour les matières plastiques.

La fragilisation par le froid est plus ou moins prononcée en fonction des matériaux. La plupart des matériaux à structure cristalline cubique à faces centrées sont appropriés aux utilisations à basses températures (Perinic, 2007 a), tels que :

- les aciers austénitiques, soit la grande majorité des aciers inoxydables. Ils peuvent être renseignés dans le document technique AD-Feuille W10 (Merkblätter, 1987) ;
- le cuivre, le nickel, les alliages cuivre-nickel, l'aluminium et ses alliages ;
- certains matériaux non métalliques pouvant être renseignés dans l'ouvrage de G. Hartwig (Hartwig, 1994).



Figure 1 : Rupture de fragilité d'un raccord inadapté aux basses températures
(image : http://gperinic.web.cern.ch/gperinic/kryokurs/EN/kryok_21.htm)

4.2.3 Explosion et inflammation

L'azote liquide et gazeux n'est ni combustible, ni comburant.

Toutefois, le point d'ébullition de l'oxygène se situant autour de -183 °C, la très basse température du liquide cryogénique (entre -209 et -196 °C) peut condenser l'oxygène de l'air en oxygène liquide dans les conteneurs d'azote liquide, dans les conteneurs refroidis par l'azote liquide ou à leur surface (Bretherick L., 1990). L'azote liquide enrichi en oxygène liquide peut alors produire une réaction explosive au contact de matières oxydables et provoquer l'inflammation de matières combustibles (IPCS/CEC, 1999).

Ainsi, à partir d'une concentration de 8%, l'oxygène liquide en mélange dans l'azote liquide peut provoquer notamment l'inflammation spontanée des graisses avec lesquelles il entrerait en contact (INRA, 2006). Le déversement d'un tel mélange sur une surface mal nettoyée telle que la paroi d'un évier ou le sol peut alors produire un départ de feu rapide avec combustion très vive (INRA, 2006).

L'enrichissement en oxygène liquide de l'azote liquide, qui est une substance intrinsèquement incolore, est détectable par la coloration bleutée que prend ce mélange.

4.3 Identification et évaluation des effets sanitaires

La toxicité intrinsèque de l'azote liquide est négligeable. Sa très basse température et sa capacité à générer rapidement des volumes importants d'azote gazeux, qui plus est incolore, inodore et insipide, lui confèrent cependant un réel potentiel de dangerosité.

4.3.1 Effets liés à une exposition aiguë (accidentelle)

4.3.1.1 « Brûlures », gelures et autres lésions liées au froid

4.3.1.1.1 Par contact cutané

L'enthalpie de vaporisation de l'azote liquide est très en deçà de celle de l'eau. Aussi, l'azote liquide, les vapeurs froides qui lui sont associées, et les surfaces refroidies par l'azote à basses températures, peuvent produire sur l'épiderme, le derme et les tissus sous-cutanés des effets semblables à une brûlure thermique, ainsi que des gelures lorsque l'exposition au froid est prolongée ou lorsque le refroidissement des tissus cutanés est rapide (CCOHS, 2002 ; Holmer, 2003). Un contact étendu ou prolongé avec l'azote liquide, même en faible quantité, peut causer des « brûlures » graves ou des gelures (Clayton et Clayton, 1994).

L'azote liquide a une faible tension de surface. Aussi, le contact cutané peut également résulter d'une projection ou du renversement d'azote liquide sur la peau *a priori* protégée ; le liquide cryogénique pénétrant plus rapidement, que l'eau par exemple, à travers les pores d'un matériel vestimentaire (blouse, pantalon, ...).

Outre les brûlures et gelures, le contact cutané avec une surface refroidie par l'azote peut provoquer l'adhérence de la peau à cette surface, suivie de son déchirement lors d'une tentative de retrait. Ce phénomène d'adhésion est généralement rencontré avec des surfaces métalliques et son intensité est grandement conditionnée par le taux d'humidité présente sur les surfaces de contact (Holmer, 2003).

Les principaux facteurs plus ou moins intriqués conditionnant la gravité des « brûlures » et gelures sont :

- la température de l'azote à l'état liquide et/ou gazeux, ou la température et les propriétés thermoconductrices de la surface refroidie ;
- le taux d'humidité présente sur les surfaces de contact ;
- la durée et la pression de contact ;
- la profondeur, l'étendue et la localisation des lésions.

La gravité des « brûlures » et gelures à l'azote liquide est davantage caractérisée par la profondeur des lésions plutôt que par leur étendue.

Considérant la profondeur des lésions :

- Pour les « brûlures » les moins graves qui sont les plus fréquentes, comparables aux brûlures thermiques de 1^{er} degré, seul l'épiderme est touché. Elles ont pour conséquence l'apparition de rougeur et la sensibilité accrue de la région touchée. La peau conserve alors sa capacité de régénération, même sans traitement.
- Lorsque l'épiderme et, de manière moins prononcée le derme, sont endommagés, des phlyctènes apparaissent. Pour ces « brûlures » comparables aux brûlures thermiques de 2^{ème} degré, la cicatrisation spontanée est possible sous deux à trois semaines, à condition notamment de prévenir toute infection.
- Les « brûlures » les plus graves, avec atteinte du derme et de l'épiderme, sont comparables aux brûlures thermiques de 3^{ème} degré. La peau présente un aspect cartonnée, blanc ou brun, et devient insensible. Le risque infectieux est majeur, et une prise en charge hospitalière urgente est indispensable.

Les manifestations cliniques consécutives aux « brûlures » et gelures liées à l'exposition cutanée à l'azote liquide ou gazeux, et qui ont été identifiées dans la littérature, sont nombreuses :

- pâleur cutanéomuqueuse intense : la peau lésée peut alors présenter une couleur jaunâtre et cireuse (CCOHS, 2002)
- paresthésies, dysesthésies : l'absence de douleur initiale est suivie par des douleurs intenses lors du dégel des tissus (CCOHS, 2002);
- douleurs brûlantes et piquantes, pouvant être suivies de douleurs pulsatiles (Kumar, 1975) ;
- érythèmes : des érythèmes ont été rapportés suivant l'application topique d'azote liquide (Wingfield et Fraunfelder, 1979; Epstein et Shupack, 1977; Finelli, 1975; Goldstein, 1979; Caravati et al, 1969) ;
- dermatites : une atteinte cutanée inflammatoire hyperhémique a été rapportée à la suite d'une application topique d'azote liquide (Wingfield et Fraunfelder, 1979; Epstein et Shupack, 1977; Finelli, 1975; Goldstein, 1979; Caravati et al, 1969) ;
- ulcérations : rapportées dans le cadre de traitements cutanés à l'azote liquide suite à des applications prolongées ou réalisées avec une pression de contact excessive (Kumar, 1975) ;
- chéloïdes : ces cicatrices par excès de collagène dans le derme (généralement avec l'aspect d'un bourrelet induré) peuvent parfois se former suite à des ulcérations causées par l'application d'azote liquide (Kumar, 1975) ;
- éruptions bulleuses : des formations bulleuses ont été rapportées suivant l'application topique d'azote liquide (Wingfield et Fraunfelder, 1979; Epstein et Shupack, 1977; Finelli, 1975; Goldstein, 1979; Caravati et al, 1969) ;
- oedèmes : des œdèmes ont été rapportés suivant l'application topique d'azote liquide (Wingfield et Fraunfelder, 1979; Epstein et Shupack, 1977; Finelli, 1975; Goldstein, 1979; Caravati et al, 1969) ;
- emphysèmes sous-cutanés : des emphysèmes sous-cutanés ont été développés après des applications par pulvérisation d'azote liquide sur des kératoses faciales chez deux patients âgés à la peau fragile (Cook et Georgouras, 1993) ;
- granulomes : des granulomes pyogènes ont été développés sur la paume de la main d'un patient traité à l'azote liquide pour une verrue puis par applications quotidiennes d'acide salicylique pendant 5 jours (Kolbusz et O'Donohue, 1993¹) ;
- cryonécroses : consécutives à l'ischémie des tissus lésés (Kumar, 1975). De rares gangrènes ont été rapportées à la suite de renversements de fluides cryogéniques (Edeskuty et Walter, 1996) ;
- neuropathies : très rares, des neuropathies induites par l'azote liquide ont été décrites par Nix (Nix, 1965) et seraient consécutives à une atteinte des nerfs superficiels sous-jacents aux sites d'application d'azote liquide ;
- syncopes : des cas de syncopes, liés notamment à la douleur causée par la gelure et au stress émotionnel, ont été rapportés en tant que complications à la suite d'applications cutanées d'azote liquide pour traiter les verrues (Epstein et Shupack, 1977) ;
- atrophies pigmentaires et hypopigmentations : rares, elles se manifestent principalement sur les peaux typées noires et caucasiennes (Kumar, 1975).

¹ Cas rapporté par Kolbusz et O'Donohue en 1993, et extrait de la notice Micromodex® « Liquid Nitrogen ».



Figure 2 : Phlyctènes claires et œdèmes aux mains consécutives à des gelures

(image Wikipédia : <http://fr.wikipedia.org/wiki/Gelure>)

Le refroidissement des tissus peut entraîner des modifications cellulaires à des températures tissulaires relativement élevées (15°C). La formation de cristaux de glace dans les tissus n'apparaît généralement pas à une température tissulaire supérieure à -3°C (Edeskuty et Walter, 1996). Lorsque la température des tissus est basse, les cristaux commencent à se former dans les milieux extra-cellulaires. L'eau est ensuite transférée des milieux intra-cellulaires vers les milieux extra-cellulaires, induisant une déshydratation suivie de possibles altérations des cellules. Des déformations cellulaires liées à la formation de cristaux et à une modification de la différence de pression osmotique, peuvent notamment se produire.

Du fait de la baisse de température des tissus et de l'altération des cellules, le débit sanguin peut diminuer et provoquer des ischémies et nécroses. Ces lésions renseignées par Edeskuty comme résultant de renversements de fluides cryogéniques sont toutefois rares (Edeskuty et Walter, 1996).

Selon Edeskuty et Walter (1996), pour de très brèves périodes (1 à 2 secondes) d'exposition cutanée modérée à l'azote liquide (débit non rapide et faibles quantités), le liquide cryogénique n'entre pas directement en contact avec l'épiderme du fait de la différence de température entre la peau et le fluide. Cette différence de température entraîne en effet la formation d'un film de vapeur entre le fluide et la surface cutanée (pour ce régime thermodynamique, on parle de caléfaction). Cependant, en dépit de cette apparente protection, le contact prolongé de plus d'une ou deux secondes peut être suffisant pour provoquer de sérieuses gelures. Si le débit d'azote liquide ou gazeux auquel est exposée la peau, est important, les gelures peuvent se produire instantanément. Des gelures instantanées peuvent également être la résultante d'un contact avec une surface refroidie par l'azote, telle qu'une surface métallique. Dans ce cas, la formation de vapeur entre les surfaces de contact est inexistante, et le transfert de chaleur des tissus cutanés à la surface froide est bien plus rapide (Edeskuty et Walter, 1996).

4.3.1.1.2 *Par contact oculaire*

De très brèves expositions à l'azote liquide ou aux vapeurs froides associées, sans effet sur la peau, peuvent altérer des tissus fragiles comme les tissus oculaires et entraîner l'apparition de gelures allant jusqu'à provoquer des lésions irréversibles, voire la cécité (CCOHS, 2002 ; Rockswold, 1982).

Au niveau expérimental, des atteintes de la cornée réversibles ont été mis en évidence par coloration à la fluorescéine chez le lapin exposé par voie oculaire à de l'azote liquide pendant 5 secondes. Cependant, aucune lésion discernable n'a été démontrée après une à deux secondes d'exposition (Grant et Schuman, 1993).

4.3.1.1.3 *Par inhalation de vapeurs froides*

L'inhalation de vapeur d'azote froide ou d'aérosol, provoquent des lésions telles que des irritations, œdème et « brûlures », au niveau de la cavité bucco-pharyngée, du pharynx, des bronches et des poumons (Rockswold, 1982 ; Kumar, 1975).

4.3.1.1.4 Par ingestion

L'ingestion d'azote liquide, cas extrêmement rare, peut entraîner de graves lésions (« brûlures, œdèmes, ...) de l'oropharynx, de l'œsophage et des muqueuses gastriques. Les formes les plus graves peuvent donner lieu à des perforations, notamment au niveau des muqueuses gastriques. Pour cette voie d'exposition souvent écartée, un seul cas a été retrouvé dans la littérature (CCOHS, 2006-a).

4.3.1.2 Hypoxie, asphyxie, anoxie

Azote : du grec a et zoé, "qui prive de la vie"

Trois termes peuvent décrire les dangers liés à l'inhalation d'une atmosphère appauvrie en oxygène (INRS, 2006) :

Hypoxie : diminution de l'apport ou de l'utilisation de l'oxygène au niveau des tissus ;

Asphyxie : suspension de la respiration liée à une déficience d'oxygène ;

Anoxie : absence transitoire ou définitive d'apport ou d'utilisation d'oxygène au niveau d'une cellule, d'un tissu ou de l'organisme entier.

4.3.1.2.1 Mécanisme d'appauvrissement du taux d'oxygène de l'air

Au-delà de 78% dans l'air, l'azote gazeux agit comme un asphyxiant simple en réduisant le taux d'oxygène, sans autres effets physiologiques significatifs (ACGIH, 2001). La capacité de l'azote à générer rapidement à température ambiante un important volume d'azote gazeux à partir de l'évaporation d'un faible volume d'azote liquide peut provoquer, par déplacement de l'oxygène de l'air et dilution, des asphyxies avec atteinte du système nerveux central si l'exposition est prolongée. Ce risque est notamment accentué en espaces confinés. Rappelons qu'à température et pression normales, l'évaporation d'un litre d'azote liquide produit environ 650 litres d'azote gazeux. Etant incolore et inodore à l'état gazeux, l'azote possède de mauvaises propriétés d'alerte.

Par ailleurs, bien que l'azote soit légèrement plus léger que l'air à égales températures, la densité des vapeurs froides d'azote est plus élevée que celle de l'air (Hempseed, 1991). Avant de se mélanger de façon homogène à l'air, les vapeurs froides d'azote se répandent et s'accumulent donc préférentiellement au niveau du sol, accentuant ainsi le risque d'asphyxie en cas de perte de connaissance et de chute. Ce phénomène est d'autant plus marqué que l'atmosphère est peu ou pas ventilée (espace confiné).

4.3.1.2.2 Accidents par asphyxie liés à l'azote et autres gaz inertes

Entre 1992 et 2002 le Chemical Safety and Hazard Investigation Board (US CSB, 2003) a rapporté 85 accidents par asphyxie due à l'azote aux Etats-Unis (US CSB, 2003). Pour l'ensemble de ces accidents, 80 morts et 50 blessés ont été dénombrés. 10% des décès constatés sont survenus chez des personnes tentant de secourir des victimes déjà asphyxiées. 60% de l'ensemble des victimes travaillaient dans un espace confiné ou à proximité immédiate. 79% de l'ensemble des accidents impliquaient des circonstances où le personnel était situé dans un espace confiné tel qu'un local, un véhicule sur rail, un conteneur, un réservoir ou un local de stockage. Par manque d'information, aucun secteur d'activité n'a été particulièrement identifié.

L'European Industrial Gases Association (EIGA) rapporte quelques 20 décès par asphyxie impliquant des gaz industriels tels que l'azote et autres gaz inertes (argon, hélium,...) chaque année dans le monde (EIGA, 2003-a). La plupart des accidents concernent des travailleurs qui pénètrent dans des réservoirs reliés à une alimentation en azote et dont la concentration en oxygène n'a pas été correctement vérifiée avant l'entrée. Au regard des quelques 20 décès rapportés, l'EIGA fait mention d'exemples de travailleurs devenus victimes en portant secours à leurs collègues (EIGA, 2003-a).

4.3.1.2.3 Manifestations cliniques de l'hypoxie

L'hypoxie est une diminution de l'apport ou de l'utilisation de l'oxygène au niveau des tissus. Le début peut être graduel ou rapide. Des troubles cognitifs peuvent apparaître plus ou moins rapidement : ralentissement idéatoire, troubles mnésiques, temps de réaction retardé, erreur de jugement, etc.

Tableau VI : Manifestations cliniques de l'hypoxie (Santé Canada, 2006)

Signes subjectifs	Signes objectifs
Début insidieux*	Dyspnée
Troubles de la vision	Hyperventilation
Respiration de Kussmaul	Cyanose (signe tardif)
État d'appréhension	Tremblements, manque de coordination musculaire
Fatigue	Diminution du niveau de conscience (confusion, stupeur, inconscience)
Nausées	Agitation
Céphalées	Euphorie, attitude belliqueuse
Étourdissements	Peau froide et moite
Confusion	Tachycardie ou bradycardie
Euphorie, attitude belliqueuse, confiance exagérée	Tachypnée
Insomnie	Hypertension (au début)
Bouffées de chaleur et coups de froid	Hypotension (signe tardif)
Engourdissements	Convulsions
Picotements	Arythmie cardiaque

*Les signes subjectifs peuvent débiter insidieusement NDLR.

Des variabilités inter et intra-individuelles marquées sont observées pour la tolérance à l'hypoxie. L'efficacité du système pulmonaire diminue avec l'âge, amenant à des manifestations cliniques plus précoces.

La variabilité de la tolérance à l'hypoxie est également fonction du métabolisme, du régime alimentaire et d'autres facteurs tels que :

- la condition physique : La bonne forme physique augmente la tolérance ;
- l'activité physique : La tolérance diminue avec l'activité physique ;
- la température ambiante : La tolérance s'amenuise par temps très chaud ou très froid ;
- les médicaments, substances toxiques (p.ex. le monoxyde de carbone), le tabagisme.

L'apparition de manifestations cliniques de l'hypoxie est également fonction de la cinétique de décroissance du taux d'oxygène dans l'air. Deux respirations dans une atmosphère pauvre en oxygène peuvent suffire à provoquer une perte de connaissance, la mort pouvant survenir ensuite en quelques minutes (EIGA, 2003-a). En cas d'hypoxie extrême (anoxie totale), la durée critique communément admise avant l'apparition de lésions irréversibles du système nerveux central, est de 3 minutes suite à l'arrêt cardiaque (Dehart LR et Davis JR, 2002).

4.3.1.2.4 Effets hypoxiques liés à l'appauvrissement en oxygène de l'air

La concentration normale de l'oxygène de l'air est de 20,9% (en pourcentage volumique). La plupart des auteurs s'accordent à considérer qu'à 18,5% les premiers troubles apparaissent et en dessous de 18%, les symptômes de l'hypoxie deviennent patents (University of Bath, 2005 ; University of Saint Andrew, 2002 ; Royal Free Hampstead NHS, 2004 ; CERN, 1998 ; BCGA, 2000).

Le Tableau VII ci-après, décrit ces symptômes en fonction de la concentration d'oxygène dans l'air. Les symptômes peuvent survenir à des concentrations d'oxygène supérieures à celles présentées en fonction notamment des facteurs sus-mentionnés influençant la tolérance à l'hypoxie, et de la cinétique de décroissance du taux d'oxygène de l'air (voir 4.3.1.2.3).

Tableau VII : Symptômes décrits en fonction des taux d'oxygène de l'air

% d'oxygène dans l'air (vol/vol)	BCGA (2000)	CERN (1998)	EIGA (2000)	British Cryogenics Council: Cryogenics Safety Manual (3rd edition) (EIGA, 2006)	CGA Safety Bulletin SB-2 (2003) (EIGA, 2006)	IGC Document 75/01/E (EIGA, 2006)	HSE (United Kingdom Occupational Exposure Limits standards) (EIGA, 2006)	
21		Aucun symptôme		1er stade : Augmentation des fréquences cardiaques et respiratoires, troubles de l'attention de la réflexion et de la coordination		- Aucun effet sanitaire sérieux ou irréversible - Aucun symptôme détériorant les capacités de prendre des actions correctives immédiates et appropriées		
20			Limite de sécurité (OSHA)					
19,5			Effets physiologiques non remarquables				Limite de sécurité	
19								
18	Limite de danger	Temps de réaction sensiblement plus lent	Limite de danger					
17								
16						Augmentation des fréquences cardiaques et respiratoires, trouble de l'attention, du jugement et de la coordination		
15								
14	Diminution des performances physiques et intellectuelles	Respiration difficile, pouls rapide, manque de coordination		2ème stade : Conscient, mais augmentation des problèmes physiques	Fatigue anormale, défaut de coordination, jugement appauvri			
13					Capacité de jugement et de coordination très altérée, trouble respiratoire pouvant entraîner des conséquences cardiaques, nausée, vomissement			
12		Vertiges, obnubilation intellectuelle, lèvres bleuâtres			Perte de conscience, convulsions, mort	- Détresse sévère, besoin d'attention immédiate très probable		
11	Possibilité d'évanouissement							
10		Nausées, vomissements, perte de connaissance	Mort presque certaine			- Atteinte sérieuse probable		
9								
8				3ème stade : Effondrement physique et dommages irréversibles sans signe précurseur		- Atteinte fatale possible		
7	Perte de connaissance avec réanimation possible si elle est immédiatement mise en œuvre	Mort dans les 8 minutes, lésions cérébrales dans les 4-8 minutes						
6								
5	Mort pratiquement inévitable			4ème stade : Inconscience conduisant à la mort				
4		Coma après 40 secondes, défaillance respiratoire, mort						
≤ 3								

Les victimes d'un accident lié à une atmosphère appauvrie en oxygène peuvent présenter des lésions affectant plusieurs voire l'ensemble des organes, et particulièrement le système nerveux central par privation d'oxygène (CCOHS, 2006-b). Ces atteintes peuvent être réversibles en fonction du niveau et de la durée de privation en oxygène, et de l'étendue des lésions tissulaires (CCOHS, 2006-b). Selon l'US CSB, les victimes qui survivent à une asphyxie par l'azote présentent toujours des atteintes du système nerveux et du système cardiovasculaire (US CSB, 2003).

L'hypoxie est d'autant plus dangereuse que ses effets sur la victime diminuent ses capacités d'alerte et de réaction. En effet, la détérioration de la motricité et des capacités de raisonnement s'accompagne fréquemment d'un état euphorique ou d'un sentiment de bien-être. La victime risque de ne pas être consciente d'être atteinte d'une hypoxie grave. Les symptômes pouvant être constatés par un observateur sont une respiration plus rapide, une cyanose plus visible au pourtour des lèvres, une confusion mentale et la perte de la coordination musculaire (Doyon, 2007).

4.3.1.3 Effets neurologiques périphériques

Outre les effets neurologiques centraux associés à l'hypoxie (voir 4.3.1.2.3 et 4.3.1.2.4), des cas de neuropathie, parfois associées à une syncope, suivant une application locale d'azote liquide dans le cadre d'un traitement cryogénique, ont été décrits (Rockwold, 1982 ; Dwyer et al., 1990 ; INSERM, 2002 ; Noriko, 1995).

4.3.1.4 Effets cardiovasculaires

Un cas d'arrêt cardiaque a été décrit à la suite d'une application topique d'azote liquide au niveau des lèvres et du front pour le traitement de kératoses actiniques (Golstein, 1979).

4.3.2 Effets liés à une exposition chronique et effets à long terme

Les effets sanitaires liés à une exposition chronique à l'azote liquide (froid ou léger défaut d'oxygène) sont très rarement renseignés dans la littérature. Il est bien établi que le travail à basse température (congélateur industriels, altitude élevée, environnement polaire, ...) peut provoquer, en l'absence de précaution, de nombreux troubles, notamment respiratoires et circulatoires. Cependant l'utilisation d'azote liquide en laboratoire n'impose pas a priori, au personnel, d'évoluer dans des locaux à basse température. Les effets se rapportant aux ambiances froides n'ont donc pas été étudiés dans ce rapport.

4.3.2.1 Contact cutané répété avec l'azote liquide et syndrome de Raynaud

Le syndrome de Raynaud est un acrosyndrome vasculaire paroxystique, lié à une forte diminution ou un arrêt soudain de la circulation artérielle digitale aggravé ou déclenché par le froid (Priollet et Mouthon, 1996). Son étiologie révèle des causes multiples suivant qu'il est :

- bilatéral, avec souvent en cause : les syndromes de Raynaud iatrogènes (Beta bloquants, dérivés de l'ergot de seigle, certains antimitotiques...) et des syndromes d'origine professionnelle (maladie des vibrations, intoxication par le chlorure de vinyle monomère) ;
- unilatéral, avec possiblement en cause : un syndrome compressif (défilé des scalènes), un anévrysme, une sténose artérielle athéromateuse ou inflammatoire, ou un phénomène embolique.

Lorsque la symptomatologie est isolée, bilatérale et symétrique, survenant typiquement chez une femme jeune, avec un bilan étiologique négatif, on est en droit de parler de « maladie de Raynaud » (Priollet et Mouthon, 1996) (5 à 10% de la population générale).

Le syndrome se manifeste par une décoloration des doigts (pâleur) déclenchée par le froid, et désagréable voire douloureuse (phase syncopale). Une phase cyanique (aspect violacé des doigts) peut suivre la phase syncopale, puis survient une phase hyperhémique avec reprise de la circulation digitale, aspect rouge accompagné de paresthésies plus ou moins douloureuses.

Le phénomène est localisé généralement à deux ou trois doigts de chaque main et peut aussi atteindre suivant les causes d'autres extrémités, tels que les orteils.

Bien qu'une manipulation très fréquente d'azote liquide puisse théoriquement entraîner une diminution de la température des extrémités des membres inférieurs et supérieurs, aucune donnée associant spécifiquement le syndrome de Raynaud et l'azote liquide n'a été retrouvée dans la littérature.

4.3.2.2 Affections respiratoires liées à l'inhalation de vapeurs froides

Aucun effet à long terme, ou lié à une exposition chronique à des vapeurs froides d'azote, n'est actuellement décrit dans la littérature.

4.3.2.3 Effets systémiques et cytologiques

L'azote étant un constituant naturellement présent dans l'atmosphère en grande quantité (78%), l'étude des effets génotoxiques, mutagènes et carcinogènes, sur la reproduction, la tératogénèse et l'embryon, sur le système immunitaire, des effets neurologiques, cardiovasculaires, et en toxicologie organique (foie, reins, sang, pancréas) liés à des expositions répétées à l'azote liquide, est apparue sans objet et non décrite dans la littérature.

5 Utilisation de l'azote liquide en AMP

5.1 Activités de cryobiologie en AMP au niveau national

Les activités de cryobiologie dans le cadre de l'AMP répondent aux obligations légales de la loi n° 2004-800 du 6 août 2004 et le décret n°2006-1660 du 22 décembre 2006. Elles regroupent :

- La congélation et la conservation du sperme :
 - (i) à court terme dans le cadre de l'AMP intraconjugale,
 - (ii) à long terme avant la mise en place d'un traitement médical et/ou chirurgical susceptible d'altérer la spermatogenèse,
 - (iii) dans le cadre du don ;
- La congélation et la conservation des embryons dans le cadre de l'AMP intraconjugale ou avec tiers donneur (don de sperme, don d'ovocytes) ;
- La conservation des embryons dans le cadre de l'accueil d'embryons ;
- La congélation et la conservation des ovocytes :
 - (i) à court terme dans le cadre de l'AMP intraconjugale, le plus souvent du fait d'une absence de spermatozoïdes ou d'un échec au recueil de sperme chez le conjoint le jour de la ponction ovocytaire avant fécondation in vitro classique ou avec micromanipulation des gamètes,
 - (ii) à long terme avant la mise en place d'un traitement médical et/ou chirurgical susceptible de réduire prématurément le stock de follicules ovariens de réserve ;

Ces différents prélèvements (gamètes et embryons) sont conditionnés dans des paillettes dites PETG ou « haute sécurité ».

- La congélation et la conservation des tissus germinaux (ovaire ou testicule) avant la mise en route d'un traitement médical et/ou chirurgical à risque élevé de destruction prématuré du stock de spermatogonies souches ou de follicules ovariens de réserve (les prélèvements sont le plus souvent conditionnés dans des cryotubes et plus exceptionnellement dans des paillettes en plastique dont le volume est nettement supérieur à celui des paillettes de spermatozoïdes voire d'embryons).

Les échantillons sont congelés dans la majorité des cas à l'aide d'un appareil automatisé de descente en température alimenté par un conteneur autopressurisé contenant de l'azote liquide. Les échantillons sont conservés en phase liquide dans des conteneurs de stockage remplis d'azote liquide.

Les activités de cryobiologie en AMP au niveau national sont réalisées :

- soit dans des laboratoires qui détiennent les agréments et autorisations pour la mise en œuvre des activités de fécondation in vitro classique ou avec micromanipulation des gamètes, qui effectuent la congélation des embryons et la conservation des spermatozoïdes à court terme dans le cadre de l'AMP intraconjugale,
- soit par des laboratoires pour lesquels les activités de cryobiologie vont intéresser, outre les activités mentionnées ci-dessus :
 - (i) la congélation de sperme en vue d'AMP intraconjugale, avant la mise en route d'un traitement susceptible d'altérer la fertilité masculine et/ou dans le cadre du don de sperme,
 - (ii) la congélation des tissus germinaux (ovaire et testicule),
 - (iii) la congélation ovocytaire.

Les volumes d'azote liquide utilisés dans le cadre des activités de cryobiologie diffèrent selon que le laboratoire appartient à la première ou la deuxième catégorie citée précédemment. Cette différence s'accroît lorsque l'on considère l'activité de conservation de sperme ou des tissus germinaux avant traitement susceptible d'altérer la fertilité. La conservation de spermatozoïdes avant AMP peut être considérée comme une activité de conservation à court terme et la loi du 6 Août 2004 la distingue parfaitement de l'activité de cryoconservation avant traitement gonadotoxique. En effet, l'autoconservation de sperme dans ce contexte se caractérise par la nécessité de congeler des échantillons de sperme sur des périodes longues de quelques années à plusieurs dizaines d'années. Le faible pourcentage d'utilisation des échantillons autoconservés (8 à 10%) entraîne l'augmentation des volumes de stockage. Il en est de même pour la conservation des tissus germinaux qui s'effectuera sur plusieurs dizaines d'années. Ces stockages à long terme ont pour conséquence, au sein de ces structures, une augmentation du nombre de conteneurs de stockage. Ainsi, l'exposition aux risques liés à l'azote liquide est accentuée : manipulation plus fréquentes pour la congélation, stockage et déstockage des échantillons, augmentation de la consommation journalière en azote liquide, nécessité de mettre en place une gestion plus automatisée de ces activités et besoin de systèmes de contrôle pour assurer la sécurité du personnel et des échantillons.

En plus de l'augmentation du volume des différentes activités précédemment citées, une modification du conditionnement des échantillons avant congélation est intervenue ces six dernières années avec le remplacement des paillettes dites « PETG » par des paillettes dites « Haute Sécurité » dont le volume de conditionnement est supérieur à celui de la paillette « PETG ». Ces paillettes sont utilisées dans le cadre de la congélation de sperme et d'embryons. L'utilisation des paillettes dites « Haute-Sécurité » a pour but d'assurer la sécurité microbiologique des échantillons et répond aux obligations de l'arrêté du 12 Janvier 1999 « Relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques en assistance médicale à la procréation »

Ainsi, la problématique de l'utilisation de l'azote liquide dans le cadre de l'AMP est commune à tous les laboratoires mettant en œuvre cette activité. Cependant, l'exposition aux risques liés à la manipulation de l'azote liquide est majorée dans les structures réalisant des congélations de gamètes ou tissus germinaux dans le cadre des traitements gonadotoxiques.

5.2 Equipements utilisés

En dehors des grands réservoirs installés à l'extérieur, il est possible de trouver dans les locaux quatre types de conteneurs. A noter que le maintien à basse température de l'azote avec une légère surpression nécessite une perte par évaporation. Des canalisations spécifiques (ou lignes) sont utilisées pour effectuer les transferts entre conteneurs et réservoirs.

5.2.1 Conteneurs de stockage de fluide cryogénique autoprésurisé

Ce sont des conteneurs en acier inoxydable double enveloppe, sous légère pression de façon à pouvoir transférer du liquide par la poussée de la pression. Ils sont utilisés pour l'approvisionnement des récipients de stockage de produits biologiques. L'isolation est effectuée sous vide ou au moyen d'isolants. Certains modèles sont équipés d'une jauge de contrôle du vide. Ils sont munis d'une soupape de sécurité et d'un régulateur de pression (pression variant de 1,5 bars à 3,9 bars). Leur capacité est très variable, allant de 30 litres à 600 litres. Le soutirage se fait au moyen d'une canne immergée dans le liquide. Ce matériel est muni de dispositif de sécurité (disque de rupture, soupape de sécurité)

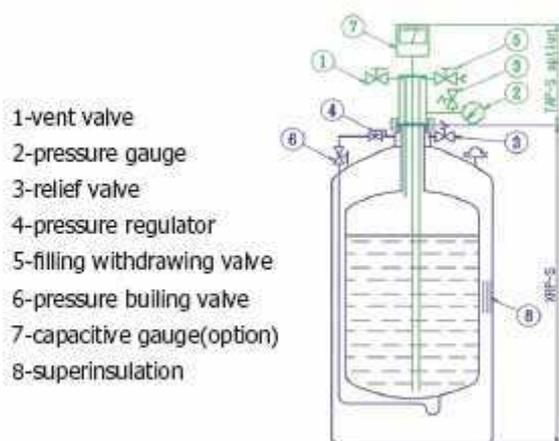


Figure 3: Schéma d'un réservoir pressurisé à tête démontable

(image : Cryodiffusion)

Le taux d'évaporation d'azote liquide journalier donné par le constructeur varie de 4,3% pour les conteneurs de faible capacité (30 litres) à 1,2% pour les conteneurs de forte capacité (450 litres).

5.2.2 Conteneurs de stockage de fluide cryogénique à pression atmosphérique ou très légèrement pressurisés

Il s'agit du même type de conteneur que ceux présentés ci-dessus mais dépourvus de tête de soutirage, ils sont fermés par bouchon. Les pertes sont légèrement plus faibles de 3% à 1% par jour. La pression de service est égale ou légèrement supérieure à la pression atmosphérique et ils peuvent être équipés d'une tête spéciale à fixer sur le col pour des opérations de soutirage.

5.2.3 Récipients de stockage de produits biologiques

Les récipients type Dewar à large col ne sont pas pressurisés. La capacité varie de quelques litres à 2 m³ d'azote liquide.



Figure 4: Photographie des différents types de récipients de stockage de produits biologiques en immersion dans l'azote liquide
(image : Cryodiffusion)

Ils sont en acier inoxydable ou en aluminium. L'évaporation est extrêmement variable et dépend notamment de la largeur du col d'ouverture. Certains matériels peuvent être équipés d'un dispositif de remplissage automatique. Les pertes par évaporation sont de l'ordre de 1% par jour, elles peuvent monter jusqu'à 3% selon le modèle. D'une manière générale plus le conteneur est grand plus les pertes sont faibles en pourcentage de la capacité du conteneur.

5.2.4 Récipients de transport de produits biologiques

Ces récipients de faible capacité (de 0,5 litres à 5 litres) sont utilisés pour le transport de produits biologiques, la manipulation d'azote liquide. Il s'agit, le plus souvent, de réservoirs en aluminium utilisés pour des remplissages par versement manuel (pour les petites capacités). Il n'y a pas besoin de dispositifs de sécurité particuliers pour ces produits. S'ils sont transformables en modèle auto pressurisé à l'aide d'une tête de pressurisation, les dispositifs de sécurité nécessaires sont prévus sur la tête. Les dispositifs utilisés doivent être compatibles (pression d'ouverture et débit minimal) avec la pression maximale de service de l'appareil. Les pertes journalières vont de 4 à 5% pour les récipients de très faible volume à 1% environ pour les récipients de quelques litres.

Les récipients de transport peuvent contenir une matière poreuse absorbant l'azote liquide, ce qui permet de maintenir la température nécessaire pour le transport des échantillons tout en minimisant les risques de déversement d'azote liquide.

5.2.5 Lignes de transfert

Les lignes de transfert sont utilisées pour le transfert entre les conteneurs de stockage d'azote liquide et les conteneurs de stockage des produits biologiques. Elles peuvent être rigides ou flexibles. Les lignes de transfert sont isolées par une mousse ou par une double paroi séparée par un vide d'isolation. Les cannes existent en version nue ou isolée.

Si de l'azote liquide peut être confiné entre deux éléments de fermeture de la ligne, la ligne doit être équipée d'au moins une soupape de sécurité, tarée à la pression maximale de service, ou d'un disque de rupture.

Les pertes par évaporation sont principalement liées à la consommation d'énergie impliquée dans le refroidissement de la ligne au début de chaque utilisation, car la ligne se réchauffe alors rapidement lorsqu'elle ne débite plus. En débit continu, les pertes thermiques dans les lignes sont comprises entre 0,5 et 2 watts par mètre linéaire. Ces pertes sont fonctions de la dimension et de l'isométrie de la ligne.

L'alimentation en azote liquide par ligne de transfert à partir d'un réservoir situé à l'extérieur doit pouvoir être interrompue en cas de défaut (par exemple par l'alarme de manque d'oxygène située dans les locaux).

5.3 Opérations liées à l'utilisation d'azote liquide en AMP : Identification des situations à risque

Le périmètre d'étude des risques se limite aux opérations de travail qui se déroulent dans les salles d'AMP contenant de l'azote liquide, ainsi qu'à la manutention des conteneurs dans les circulations internes au bâtiment ou au service, et au transport sur la voie publique de conteneurs de faibles volumes (Cf. 3.1.2).

Le champ d'investigation exclut le remplissage des réservoirs extérieurs et le transport sur la voie publique de conteneurs de plus d'un litre, puisque ces activités ne sont pas assurées par les professionnels d'AMP. Les risques engendrés dans ces situations sont d'un tout autre ordre et n'exposent pas les personnels visés dans la présente étude. Le transport de conteneurs de stockage hors du bâtiment, réalisé à titre exceptionnel, n'est pas considéré dans ce chapitre.

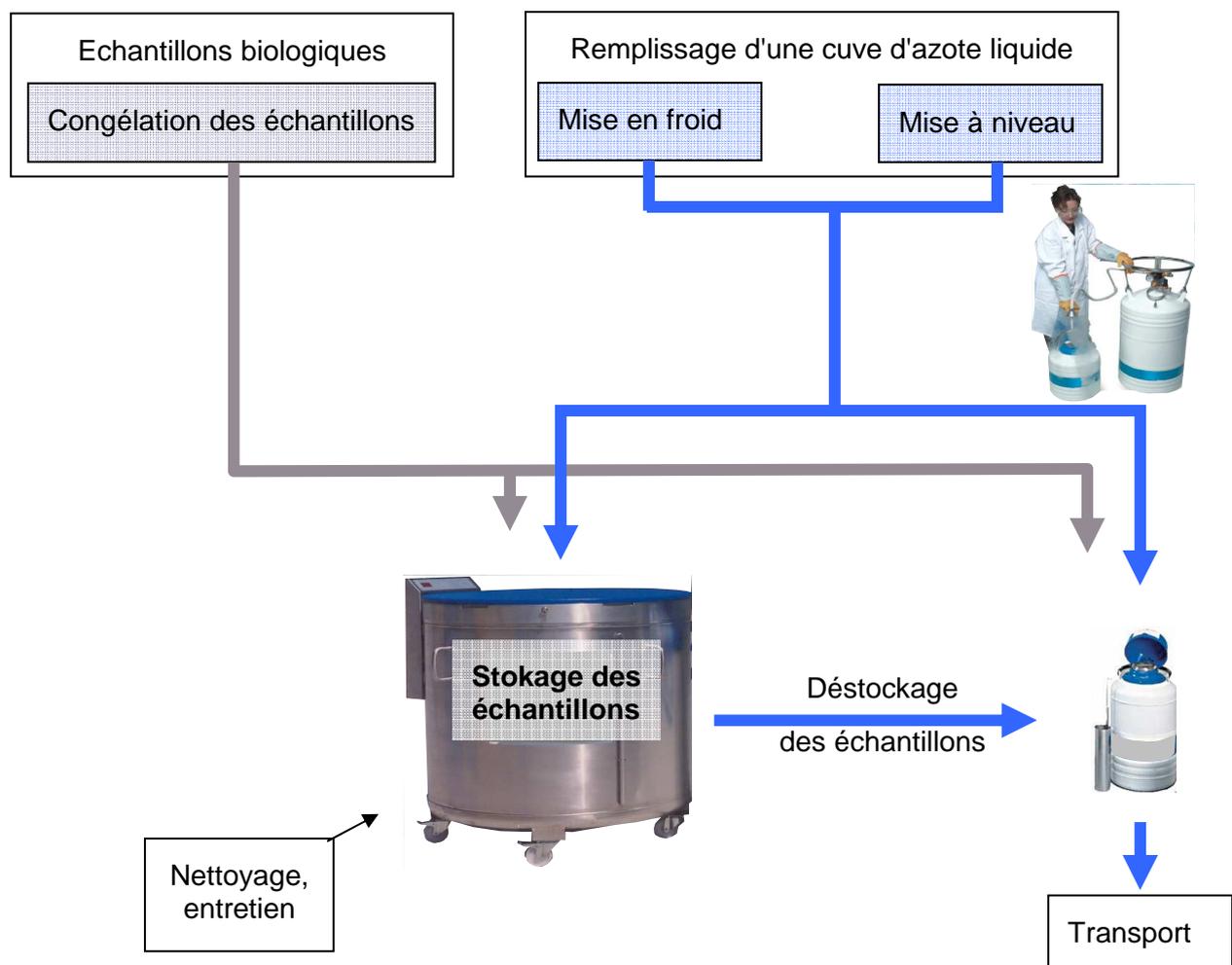


Figure 5: Schéma de principe du procédé de conservation des échantillons biologiques

5.3.1 Remplissage d'azote liquide

Le remplissage à l'azote liquide d'un conteneur de stockage d'échantillons biologiques est nécessaire lors de la première mise en service et après les opérations de nettoyage et d'entretien des conteneurs. Le remplissage d'un conteneur initialement à température ambiante, est moins fréquent pour les grands volumes (une à plusieurs fois par an), que pour les petits (quotidien).

Du fait de l'évaporation naturelle de l'azote liquide et de la consommation issue de l'activité du laboratoire, il est par ailleurs nécessaire d'apporter des compléments d'azote liquide afin que les échantillons soient toujours immergés pour être maintenus à la température souhaitée.

Le remplissage d'un conteneur de stockage d'échantillons immergés dans l'azote liquide peut être effectué manuellement ou automatiquement.

5.3.1.1 Remplissage manuel

Le remplissage manuel d'un conteneur de stockage d'échantillons immergés peut se pratiquer par versement d'azote liquide contenu dans un récipient intermédiaire de stockage ou par une canne de transfert d'azote branchée sur un réservoir de stockage pressurisé d'azote liquide.

5.3.1.1.1 Par versement

Le remplissage manuel d'un conteneur par versement d'azote liquide est une pratique réservée à la manipulation de petites quantités d'azote liquide, de deux à cinq litres.

Il est utilisé pour le remplissage de petits conteneurs de transport et pour la mise à niveau des conteneurs de stockage (plusieurs fois par semaine, pour une quantité inférieure à 1/3 du volume du conteneur)

Les situations à risque

Le remplissage d'un conteneur de transport expose l'opérateur à l'azote liquide 5 à 10 minutes. Le temps total de l'opération varie de 30 à 60 minutes.

Lors du remplissage, le dégagement de vapeur rend difficile la visibilité du niveau d'azote liquide dans le conteneur. Les risques de débordement sont importants.

Ces conteneurs de faible volume peuvent être aisément renversés lors du remplissage.

Les situations accidentelles connues

Les sources d'accidents sont liées au choix d'un conteneur inadapté pour le transport des échantillons en azote liquide ou gazeux ou à une défaillance de l'enveloppe interne du conteneur de transport. Des accidents résultant de projections entraînant un contact cutané ou oculaire ont aussi été observés.

5.3.1.1.2 Par une canne de transfert

Une canne est notamment utilisée pour la mise à niveau quotidienne des conteneurs de stockage (pour une quantité inférieure à 1/3 du volume du conteneur)

Les situations à risque

L'enveloppe extérieure du flexible ou de la canne d'alimentation se refroidit au passage de l'azote liquide, ce qui entraîne une fragilisation des matériaux, le desserrement possible des jonctions et la formation de givre. La fonte du givre forme une flaque d'eau qui induit un risque de chute et glissade. Par ailleurs, la pression d'arrivée de l'azote dans le flexible peut entraîner des mouvements incontrôlés du flexible, et par conséquent des projections accidentelles d'azote liquide.

Lors du remplissage, le débit d'azote liquide délivré par la canne de transfert et les dégagements de vapeur (rendant difficile la visibilité du niveau d'azote liquide dans le conteneur) génèrent des risques de débordement d'azote liquide.

5.3.1.2 Remplissage automatique

Le remplissage automatique d'un conteneur se fait en l'absence d'intervention humaine, en présence ou non de personnel dans le local. Des alarmes de niveau ou de température placées dans le conteneur commandent l'arrivée d'azote liquide pour compenser l'azote liquide évaporé. L'alimentation automatique se déclenche tous les jours pour la mise à niveau d'azote liquide dans un conteneur et est toujours précédée du dégazage de la ligne d'alimentation.

La présence d'une installation de remplissage automatique des conteneurs dans une salle de stockage peut entraîner des dégazages intempestifs bruyants sous une pression qui peut provoquer des projections d'azote liquide.

Les situations à risque

L'enveloppe extérieure du flexible d'alimentation se refroidit au passage de l'azote liquide, ce qui entraîne une fragilisation des matériaux, le desserrement possible des jonctions et la formation de givre. La fonte du givre forme une flaque d'eau qui induit un risque de chute et glissade.

Les situations accidentelles connues

Un déversement continu engendrant une réduction du taux d'oxygène peut résulter du dysfonctionnement d'une sonde ou d'une vanne ou de la montée de la pression dans la ligne d'alimentation.

La projection d'azote liquide peut survenir, principalement lors du remplissage des récipients à azote liquide (projection de gouttelettes) ou lors de la mise en contact d'un objet ou d'un liquide «chaud» avec un bain d'azote liquide (explosion de vapeur).

5.3.2 Mise en froid d'une ligne d'alimentation

La mise en froid est une étape préalable au remplissage d'un conteneur ou d'un réseau d'alimentation initialement à température ambiante. Elle se caractérise par une évaporation totale de l'azote liquide due à la différence de température entre l'azote liquide et la ligne. Cette émission initialement importante d'azote gazeux s'arrête progressivement, à mesure que les matériaux se refroidissent.

Les situations à risque

Cette émission peut modifier rapidement la teneur en oxygène d'un local si l'évacuation des vapeurs d'azote se fait dans espace trop confiné.

5.3.3 Stockage des échantillons biologiques

En AMP, les échantillons biologiques sont nécessairement immergés dans l'azote liquide⁴ après leur descente en température (congélation). Lors du portage des échantillons de l'appareil de congélation vers le conteneur de stockage, les échantillons sont généralement immergés dans un récipient de transport contenant de l'azote liquide.

En outre, lors des fréquentes phases de stockage, l'ouverture des conteneurs et la manipulation des échantillons dans les conteneurs provoquent une évaporation qui vient se cumuler avec l'évaporation naturelle de l'azote liquide. L'évaporation journalière est de l'ordre de 1 à 15% de la capacité totale du conteneur (selon les caractéristiques du récipient et l'activité de travail).

Les situations à risque

L'ouverture du conteneur provoque une forte évaporation d'azote liquide. L'inhalation de vapeurs froides est plus significative dans les phases de rangement des échantillons dans le conteneur.

⁴ La qualité de la conservation des échantillons n'est scientifiquement validée qu'en immersion.

Lors de la mise en stock des échantillons, il existe un risque de renversement du récipient intermédiaire de portage des échantillons (Dewar, gobelet, boîte en polystyrène). Cette opération nécessite également la manipulation d'objets extrêmement froids : canister, pince, échantillons congelés. L'exposition est prolongée lorsque plusieurs échantillons ont été congelés dans l'automate de descente en température (les échantillons sont prêts à être stockés en même temps).

5.3.4 Congélation des échantillons

Les échantillons doivent être congelés avant d'être déposés dans un conteneur de stockage.

La congélation comprend l'étape de descente en température de l'échantillon et le rangement dans le conteneur. La descente en température peut être manuelle, par immersion dans des vapeurs froides d'azote (-70°C), ou automatique (l'échantillon est introduit dans un automate de descente en température).

Situations à risque de la descente en température manuelle

La descente en température manuelle entraîne un contact avec des objets extrêmement froids : plateau thermo-conducteur, échantillons congelés.

Lors des manipulations, il existe également un risque de renversement du gobelet et du Dewar.

Situations à risque de la descente en température automatisée

L'utilisation de l'automate de descente en température provoque le refroidissement du flexible d'alimentation de l'automate. Le flexible et les connexions peuvent être fragilisés ; et la formation de givre donnera lieu à une flaque d'eau (risque de chute et glissade).

Le gobelet ou le Dewar utilisé peut être aisément renversé.

5.3.5 Déstockage des échantillons

Le déstockage des échantillons est inhérent à l'activité d'AMP, en vue d'une technique d'AMP ou avant le nettoyage des conteneurs.

Il consiste dans le retrait d'un échantillon d'un conteneur. L'échantillon est transféré dans un contenant de moindre taille également rempli d'azote. La sortie des échantillons suppose l'ouverture du conteneur, l'immersion manuelle d'un gobelet dans le conteneur ou dans un récipient intermédiaire et le dépôt des échantillons dans le gobelet.

Les situations à risque

Les poignées des gobelets n'étant pas adaptées au rebord de toutes les conteneurs, le risque de renversement du gobelet « de portage » des échantillons se rencontre fréquemment.

Comme pour la phase de stockage, la sortie de conteneur d'échantillons expose l'opérateur à l'inhalation de vapeurs froides et à la manipulation d'une pince de préhension des paillettes extrêmement froide.



5.3.6 Maintenance des conteneurs

La principale opération de maintenance des conteneurs assurée par les professionnels d'AMP réside dans le retrait de la glace sur les parois du conteneur et à l'intérieur dans l'azote liquide. La présence de glaçons complique les manipulations des échantillons et augmente les risques de casse des paillettes. Elle comprend les étapes suivantes :

- Le déstockage de l'ensemble des échantillons (mis en attente dans un autre conteneur)
- L'évaporation de l'azote
- Le conteneur est laissé ouvert pour qu'il se vide.
- L'écopage de l'eau condensée⁵
- Le nettoyage du conteneur à l'aide d'un détergent approprié
- Le conteneur vide est désinfecté avec un désinfectant de surface.
- Le remplissage du conteneur⁶

Les situations à risque

Cette activité cumule les situations à risque décrites ci-avant ; sur une longue durée. Les contraintes sont intensifiées.

5.3.7 Transport

Dans les limites de l'étude, les opérations de transports sont envisagées au sens du déplacement de conteneurs d'azote liquide dans le bâtiment.

5.3.7.1 Portage des échantillons congelés en conteneur de faible volume

Le stockage et le déstockage des échantillons (voir 5.3.3 et 5.3.5) supposent le portage quotidien des échantillons dans des récipients de faible volume.

L'opération nécessite l'accrochage d'un panier au niveau du col du conteneur dans les vapeurs froides d'azote, ou le passage par un récipient intermédiaire contenant de l'azote liquide, la manipulation et le rangement des échantillons, et des déplacements dans la salle ou hors du laboratoire avec les récipients.

Le transport des échantillons par les patients auprès de centres ou de praticiens extérieurs au centre d'AMP expose ceux-ci à la manipulation d'une quantité d'azote en général inférieure à deux litres sauf si des conteneurs de transport en vapeur avec absorption du liquide cryogénique en paroi poreuse sont utilisés. Le transport de ces échantillons est souvent fait en voiture (espace confiné), avec des trajets pouvant dépasser deux heures.

Les situations à risque

L'inhalation de vapeurs froides d'azote et les risques de renversement du conteneur de transport

Les petits conteneurs sont soumis à de multiples manipulations qui mettent leur intégrité en péril. Lorsque la double paroi est fêlée, l'azote est en ébullition permanente et une quantité importante de givre se forme sur l'enveloppe du conteneur.

⁵ Suite à l'évaporation totale de l'azote liquide, il subsiste une flaque d'eau dans le fond du conteneur. C'est le résultat de la condensation de l'humidité de l'air en contact avec la surface d'azote liquide. L'humidité est apportée à chaque ouverture du conteneur.

⁶ Il inclut la mise en froid du conteneur, l'adjonction d'azote liquide puis le rangement des échantillons biologiques.

5.3.7.2 Déplacement de conteneurs

Il comprend :

- Le déplacement des conteneurs sur le lieu de stockage (nettoyage, modification de l'emplacement, remplacement)
- Le déplacement des conteneurs en dehors du laboratoire pour l'approvisionnement en azote liquide ou en cas de changement de locaux,
- L'utilisation des conteneurs pour le transport des échantillons

Les situations à risque

Les risques de chute ou de déversement sont majorés lors du déplacement.

Selon l'organisation du laboratoire au sein de l'établissement, les opérations de remplissage peuvent nécessiter le recours à un ascenseur.

Lorsque le remplissage des conteneurs de grande capacité s'effectue hors du laboratoire, les risques concernent non seulement le personnel du laboratoire qui assure le déplacement des conteneurs mais également le personnel extérieur au service voire les usagers qui passent au voisinage des réservoirs et des conteneurs.

Au cours des différentes opérations décrites précédemment, de l'azote liquide peut s'infiltrer dans les gants et les chaussures ou imbiber les vêtements et causer des gelures sévères avant que la victime n'ait eu le temps de les retirer. Ces cas sont souvent très graves.

5.4 Situations des laboratoires d'AMP en France : résultats de l'enquête de l'agence de la biomédecine

L'enquête conduite en 2006 par l'Agence de la Biomédecine auprès des laboratoires autorisés pour les activités d'AMP français met en évidence que les quantités de stockage d'azote liquide, l'âge et la technologie des conteneurs sont très hétérogènes.

Le territoire compte 229 sites d'AMP parmi lesquels 202 laboratoires ont répondu à l'enquête. Sur les 202 laboratoires d'AMP, 49% (n=98) déclarent utiliser de l'azote liquide au cours de leurs activités.

5.4.1 Caractéristiques générales des salles d'AMP renfermant de l'azote liquide

Au total, 121 locaux renfermant de l'azote liquide à des fins d'AMP ont été étudiés. La grande majorité des laboratoires ne détient de l'azote liquide que dans une seule salle (79/98, soit 80%) (Figure 6).

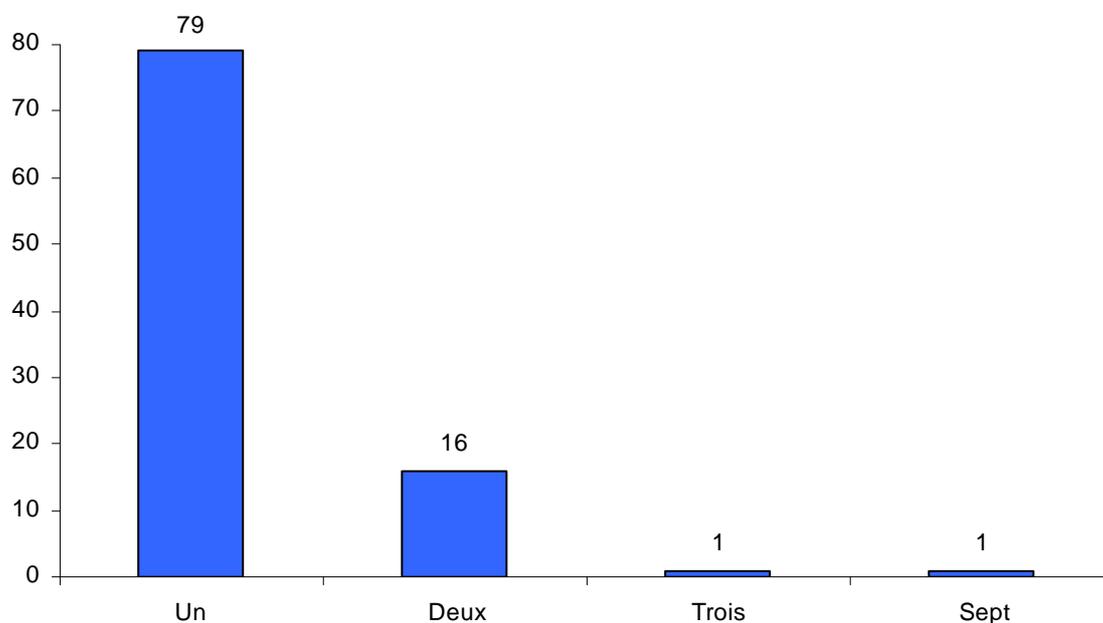


Figure 6: Répartition du nombre de salles renfermant de l'azote liquide par laboratoire d'AMP

La surface des salles varie de 0,5 m² à 60 m², avec une moyenne de 11,3 m² (Tableau VIII ; Figure 7).

Tableau VIII : Données de surface des salles de stockage

	Moyenne	Ecart-type	Min-Max
Surface des salles (m ²)	11,3	± 9,4	0,5 - 60

(118 salles étudiées parmi les 121)

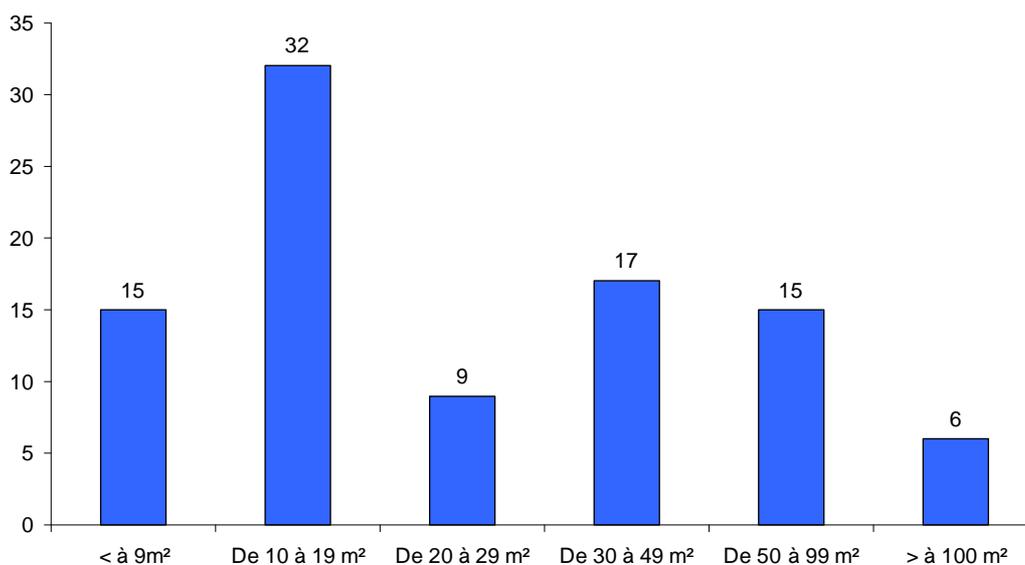


Figure 7: Distribution des surfaces des locaux

Le volume total de locaux concerné sur le plan national s'élève à près de 3 400m³ (sur 116 salles). L'enquête de l'Agence de la biomédecine de 2006 révèle la présence d'une quantité importante d'azote liquide au regard des volumes des 116 salles étudiées (Tableau IX).

Tableau IX : Volume d'azote liquide stocké dans le volume des salles d'AMP

	Volume de la salle (m ³)	Volume d'azote liquide stocké dans la salle (en litres)	Nombre de cuves
Total	3380	38570	1065
Moyenne	29,1	36,2	9,2
Médiane	20,5	207	7
Min	1	12	1
Max	150	2024	36

(Agence de la Biomédecine, 2006)

Les postes de travail présents dans les salles de stockage

Il existe un appareil de descente en température dans 63% des salles. Et seulement 8,7% sont dotées d'une ligne de distribution d'azote liquide.

L'enquête invitait également les centres (98 répondants concernés) à énoncer les postes de travail localisés dans les salles contenant de l'azote liquide. Les activités ainsi déclarées dans les salles sont essentiellement liées à la gestion des échantillons biologiques :

- Soudure de paillettes, n = 1
- Congélation (embryons, gamètes), n = 29
- Décongélation, n = 2
- Saisie informatique, n = 6
- Paillasse sèche pour écriture sur paillette, n = 2
- Mise en paillette, n = 6
- Manipulation de paillettes, stockage, déstockage, n = 6
- Descente en température par automate, n = 7
- Congélation uniquement, n = 2
- Remplissage des petits conteneurs, n = 1

Seuls 45% des salles sont déclarées exemptes de poste de travail. Les différents postes de travail décrits dans les 66 autres salles sont présentés dans le tableau X ci-dessous.

Tableau X : Types d'activités pratiquées aux postes de travail

Types d'activité au poste de travail	Effectifs de salles
Activité AMP sous hotte	4
Activité AMP sous hotte contexte viral	3
Montage paillettes	4
Saisie données, écriture registre	9
Appareil de congélation	45
Non renseigné	1

Si l'on exclut les appareils de congélation, seulement 20 salles (soit 16,5%) accueillent un poste de travail. A noter que 10 de ces salles sont déclarées dépourvues d'un contrôle de la teneur en oxygène dans le local.

5.4.2 Caractéristiques des conteneurs utilisées

Sur 98 laboratoires utilisateurs d'azote liquide, on dénombre un total de 1186 conteneurs d'une capacité supérieure à deux litres ce qui porte la moyenne à environ 9 conteneurs par local (Tableau XI).

Tableau XI : Caractéristiques physiques des conteneurs

	Moyenne	Ecart-type	Médiane	Minimum	Maximum
Nombre de conteneurs par salle de stockage (nb cuves)	9,2	± 7,9	7	1	36
Volume des conteneurs (L)	38,6	± 87,8	26	1	2005
Capacité totale d'azote par salle (L)	364,5	± 438,5	214,9	12	2481,7
Année d'achat	1997	± 6,7 ans	1999	1974	2006

La majorité de salles contient moins de 6 conteneurs, mais il y a aussi 5 salles qui ont plus de 30 conteneurs (Figure 8).

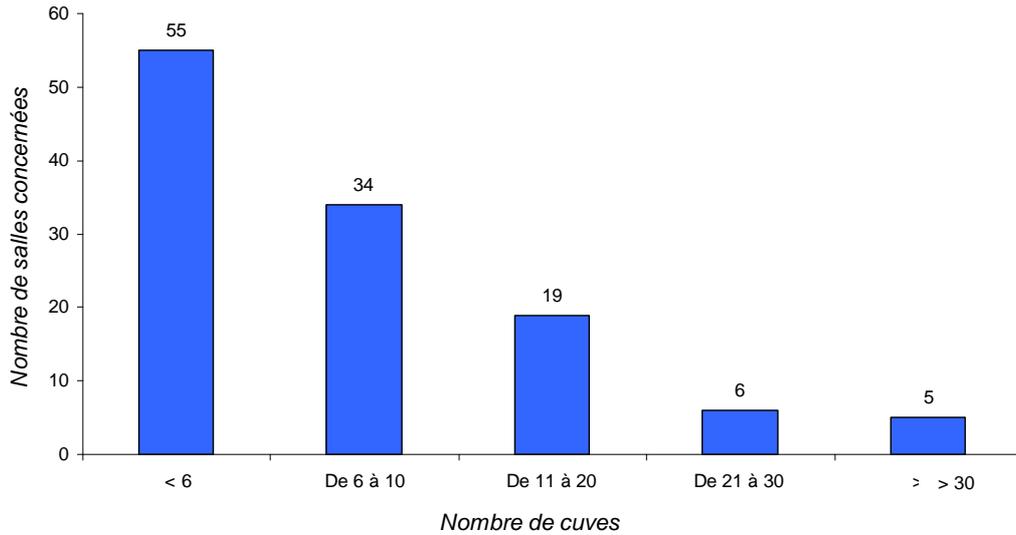


Figure 8 : Répartition du nombre de cuves par salle

Comme attendu, le nombre de cuves dans la salle apparaît assez bien corrélé avec le volume d'azote liquide dans celle-ci (Figure 9). Le volume moyen d'azote liquide par salle est de 336,7 litres.

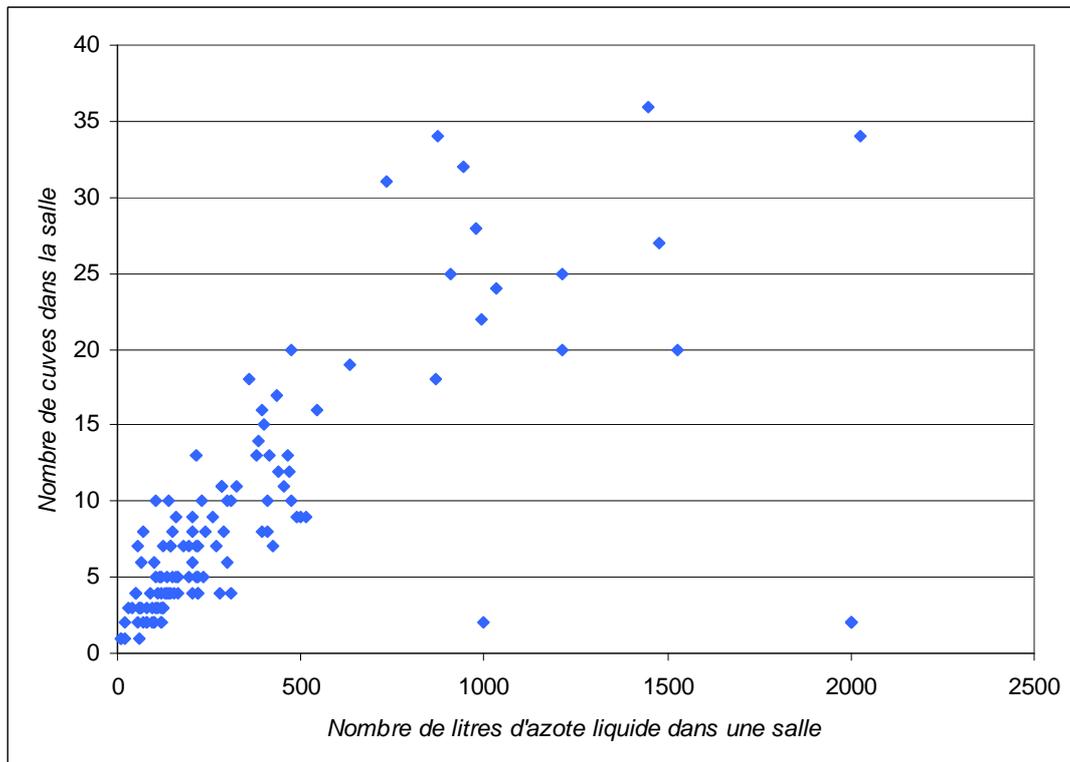


Figure 9: Répartition du nombre de litres de LN₂ stockés dans les salles

La capacité totale des conteneurs représente près de 45 000 litres d'azote liquide (les contenants inférieurs à 2 litres ne sont pas pris en compte dans l'étude). La capacité moyenne d'une cuve est de 38,6 litres.

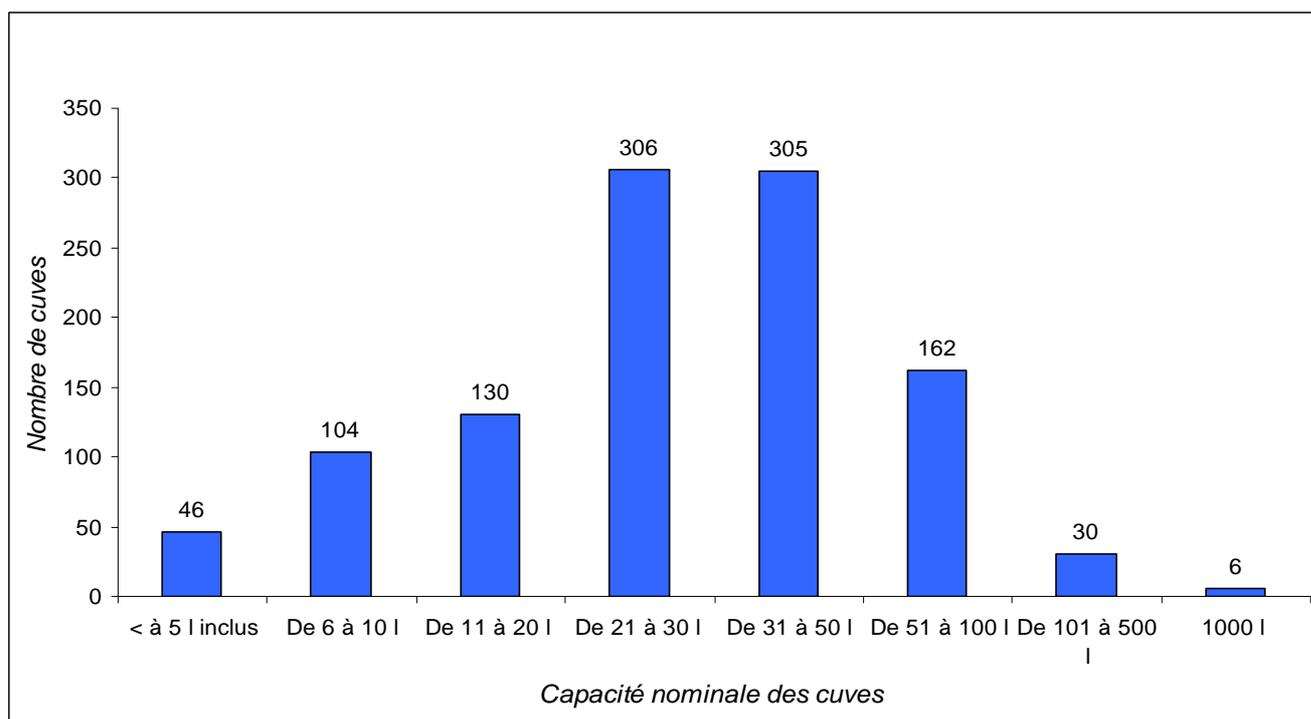


Figure 10 : Répartition du nombre de cuves selon leur capacité nominale

Environ 56% des conteneurs ont une capacité de 20 à 50 litres d'azote liquide (Figure 10).

Les conteneurs de moins de 7 ans représentent 53% du parc et près de 18% ont plus de 15 ans. Le conteneur le plus ancien a été mis en service en 1974.

5.4.3 Les dispositifs de sécurité existants

La règle de sécurité la plus répandue consiste à réglementer l'accès aux locaux (87,6%) (Tableau XII).

Tableau XII : Aménagement des salles contenant de l'azote liquide dans les laboratoires d'AMP

	Oui	Non	NSPP
Accès réglementé	106	13	2
Ouverture de la porte sur l'extérieur	62	57	2
Barre anti-panique	21	83	17
Oculus	48	55	18

NSPP : Ne Se Prononce Pas

Seules 16 salles (13,2%) parmi 121 sont équipées des quatre dispositifs décrits ci-dessus.

Seuls 60% des locaux sont équipés d'un système de ventilation (mécanique) continue, dont la moitié est située en partie basse de la salle.

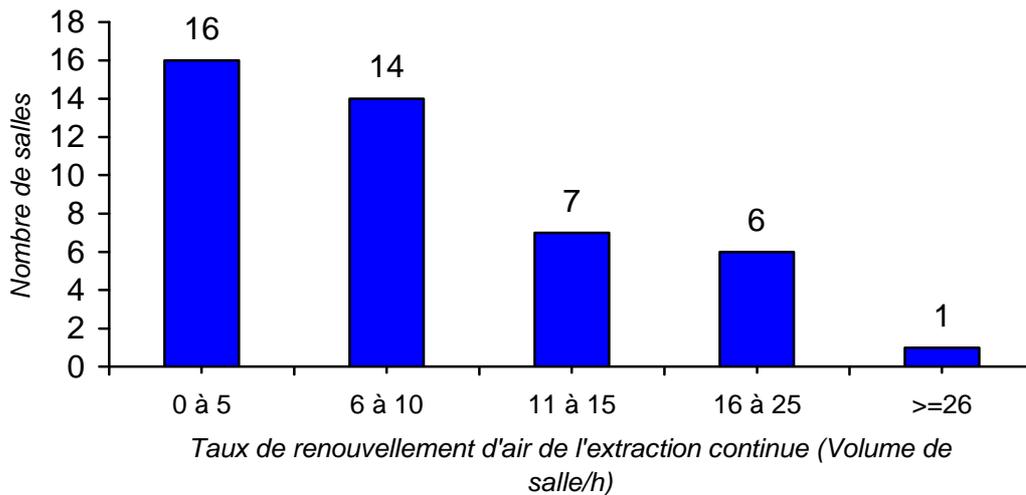


Figure 11 : Répartition des salles en fonction du taux d'extraction continue

Le taux d'oxygène n'est mesuré que dans 55% des salles.

Parmi les 67 salles équipées de sondes à oxygène, 53 salles n'en possèdent qu'une seule, et 12 en ont au moins deux. Deux salles ne renseignent pas le nombre de sondes.

Seuls 27% des locaux seraient dotés d'un système d'extraction asservi au dispositif de contrôle du taux d'oxygène.

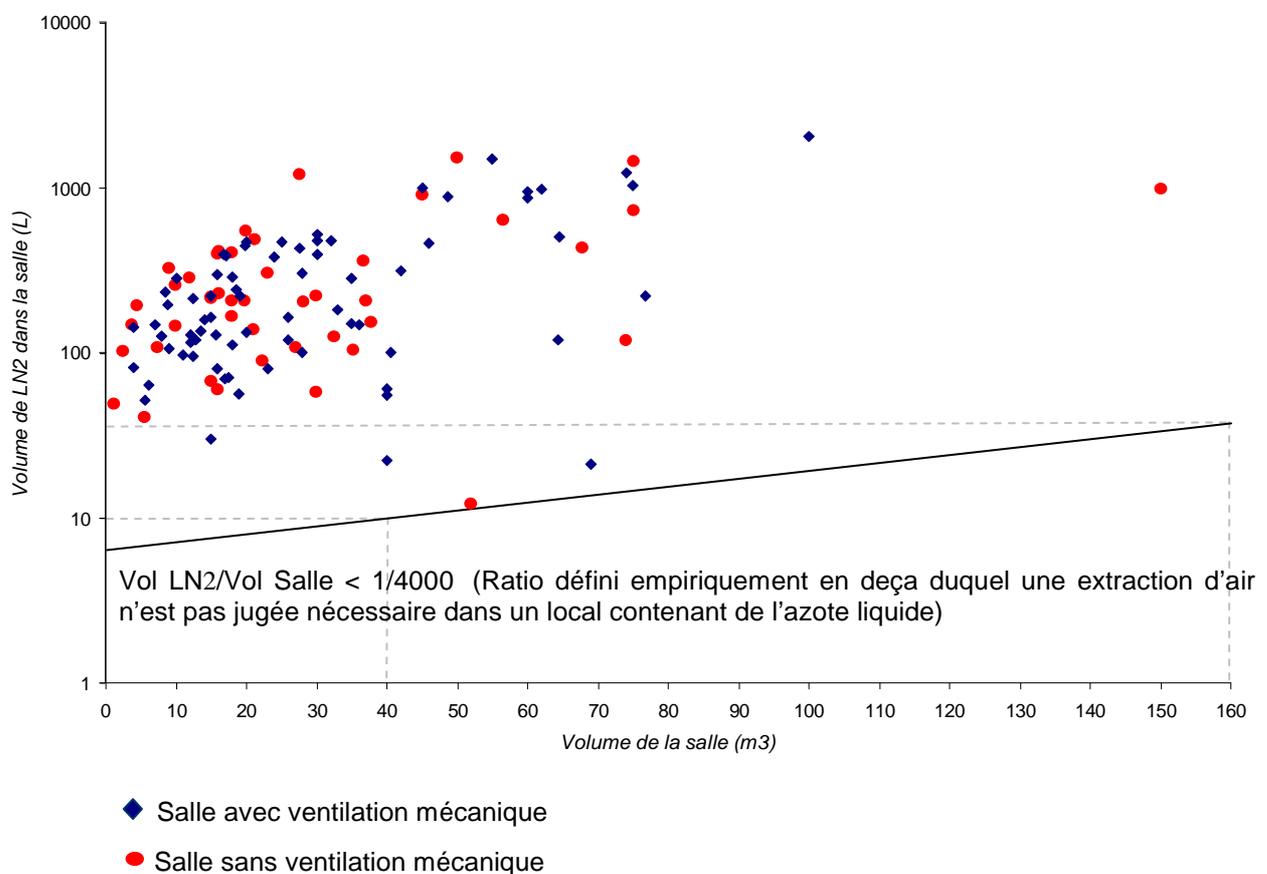


Figure 12 : Répartition du volume d'azote liquide stocké en fonction du volume et de la présence d'une ventilation mécanique dans les salles

La figure 12 met en évidence que :

- 72 salles (62%) sont dument équipées d'un système de ventilation mécanique (en dehors de toutes considérations sur le débit d'extraction),
- 44 salles (38%) ne sont pas pourvues d'un système de ventilation mécanique alors que le volume d'azote liquide qu'elles renferment nécessiterait une telle installation.

Sur les 1186 cuves répertoriées, 114 (9,6%) sont munies d'une alarme de niveau, 78 (6,6%) d'une alarme de température et 68 (5,7%) sont reliées à un système de gestion centralisée des alarmes techniques. Seules 5 cuves (0,7%) disposent d'un système de remplissage automatique. Aucune cuve ne possède tous les équipements.

L'analyse des données met en évidence que deux cuves sont remplies automatiquement dans un local dépourvu de sonde à oxygène.

5.4.4 Les incidents déclarés dans l'enquête

5.4.4.1 Les dommages corporels

Entre 2000 et 2005, des laboratoires d'AMP déclarent des céphalées importantes, des brûlures cutanées superficielles par contact avec de l'azote liquide (8 laboratoires), une brûlure oculaire et un traumatisme du pied suite au basculement d'un conteneur.

Les brûlures sont le plus souvent bénignes. Elles sont notamment causées par des projections d'azote liquide sur les mains et les pieds, et plus rarement au contact de la canne de soutirage ou des paillettes.

En 2002, l'éclatement d'une bouteille thermos en cours de remplissage dans un des laboratoires a blessé une personne à la cuisse.

La manutention des conteneurs entraînent également des douleurs dorso-lombaires.

Les phénomènes de condensation entraînent la formation de flaques d'eau sur les sols, générant un risque de chute et de glissade.

5.4.4.2 Les incidents matériels

Parmi les 98 laboratoires, les incidents matériels relevés au cours des six dernières années sont :

- 3 fissures larvées de petits conteneurs,
- 2 baisses inhabituelles du niveau d'azote liquide,
- 1 rupture de petits conteneurs.

Plus rarement, du matériel biologique a pu être perdu suite à la rupture d'une paillette ou d'un dysfonctionnement de l'appareil de descente en température.

6 Evaluation du risque hypoxique lié à l'utilisation d'azote liquide en AMP

Ce chapitre porte sur des considérations générales de ventilation pour des locaux contenant des récipients d'azote liquide, sur les taux d'oxygène résiduel consécutifs à l'évaporation de l'azote liquide, et sur les effets sanitaires potentiels qui y sont associés.

La ventilation peut être soit naturelle, soit forcée (par exemple : ventilation mécanique). Pour un renouvellement d'air supérieur à 2 volumes de local par heure, un système de ventilation mécanique est généralement nécessaire. Le système de ventilation doit être adapté aux caractéristiques propres à chaque installation, en tenant compte notamment :

- de l'emplacement du local (en sous-sol ou non),
- de la géométrie et du volume du local,
- des irrégularités au niveau du sol, qui peuvent favoriser l'accumulation des vapeurs froides d'azote (fosses, conduits, tranchées...).

Suivant les situations, des renouvellements d'air de 5, 10, 20... volumes de local par heure peuvent être requis.

En France, la CNAMTS recommande un taux d'oxygène $\geq 19\%$ dans l'air d'un local de travail (CNAMTS, 1986). Aussi, un local AMP peut être considéré comme suffisamment ventilé lorsque le taux d'oxygène ne descend pas en dessous de 19%, notamment dans les situations normales suivantes :

- évaporation normale de l'ensemble des récipients contenant de l'azote liquide dans le local ;
- évaporation liée au remplissage pour la mise à niveau du récipient le plus volumineux ;
- voire, évaporation liée au remplissage du récipient le plus volumineux et initialement à température ambiante (dépourvu d'azote liquide).

Afin d'évaluer le risque hypoxique pour le personnel travaillant avec de l'azote liquide dans un local, il apparaît nécessaire de considérer la quantité maximale de liquide pouvant s'évaporer dans des circonstances caractéristiques bien définies, et d'estimer la déplétion maximale d'oxygène dans l'air du local consécutive à cette évaporation.

Il est à souligner que si la ventilation ne permet pas un brassage complet de l'atmosphère en tout point du local, des poches d'atmosphère dangereuses peuvent subsister.

6.1 Estimation du taux d'oxygène résiduel

Le taux d'oxygène résiduel peut être calculé théoriquement en supposant un débit de fuite constant de l'azote liquide par évaporation, et une distribution homogène des gaz dans l'atmosphère du local en utilisant la formule suivante :

$$(0) C_t = \frac{L}{V \cdot n} \cdot (1 - e^{-nt})$$

C_t Concentration en gaz
 L débit d'évaporation (de fuite) du gaz en m³/heure
 V volume du local en m³
 n taux de renouvellement d'air en volume du local par heure
 t temps en heures.

Si l'on connaît le volume d'azote liquide évaporé en litres par minutes L_{LN_2} (un facteur multiplicatif de 0,682 s'applique pour avoir le volume de gaz en m³), la concentration en oxygène résiduel du local C_{O_2} , à un temps t , s'écrira en pourcentage volumique :

$$C_{O_2} = 100 \cdot (0,21 - 0,21 \cdot \frac{0,682 \cdot 60 \cdot L_{LN_2}}{V \cdot n} \cdot (1 - e^{-nt})) , \text{ soit :}$$

$$(1) C_{O_2} = 21 \cdot (1 - \frac{40,92 \cdot L_{LN_2}}{V \cdot n} \cdot (1 - e^{-nt}))$$

Note : Les équations mises en œuvre pour aboutir à cette formule sont démontrées en annexe 5.

Lorsque l'équilibre est atteint, la formule simplifiée suivante peut être appliquée:

$$C_t = \frac{L}{V \cdot n}$$

En tout état de cause il s'agit de la concentration maximale de gaz pouvant être atteinte. La concentration en oxygène résiduel du local C_{O_2} , à l'équilibre, s'écrira en pourcentage volumique :

$$(2) C_{O_2} = 21 \cdot (1 - \frac{40,92 \cdot L_{LN_2}}{V \cdot n})$$

On peut considérer que la situation d'équilibre théorique est atteinte après un temps correspondant à 4 à 5 périodes (Annexe 5). Dans le cas d'une salle faiblement ventilée (0,5 vol.h⁻¹), cela correspondrait à 1h25 (1,4h).

Dans ce chapitre, la concentration en oxygène résiduel du local C_{O_2} sera présentée en utilisant le code couleur suivant :

$$C_{O_2} \geq 19\%$$

- Taux d'oxygène minimal recommandé dans l'air d'un local de travail (CNAMTS, 1986)
- Taux d'oxygène minimal recommandé pour l'activation d'une alarme visuelle, l'évacuation du local et la mise en marche automatique de la deuxième vitesse de ventilation (voir 8.1.1.2)

$$18\% \leq C_{O_2} < 19\%$$

- Premiers troubles hypoxiques (18,5%) (voir 4.3.1.2.4)
- Limite de danger (BCGA, 2000)

$$15\% \leq C_{O_2} < 18\%$$

- Premiers symptômes patents de l'hypoxie (voir 4.3.1.2.4)
- Taux d'oxygène minimal recommandé pour l'activation d'une alarme sonore et visuelle (18%) (voir 8.1.1.2)

$$C_{O_2} < 15\%$$

- Diminution des performances physiques et intellectuelles (de 15 à 10%) (BCGA, 2000)
- Possibilité d'évanouissement (de 10 à 8%) (BCGA, 2000)
- Perte de connaissance avec réanimation possible si elle est immédiatement mise en œuvre (de 8 à 5%) (BCGA, 2000)
- Mort pratiquement inévitable (de 5 à 0%) (BCGA, 2000)

Pour rappel, en termes d'effets sanitaires, les valeurs rapportées ci-dessus sont indicatives et peuvent fluctuer sensiblement en fonction de la cinétique de décroissance du taux d'oxygène de l'air et de la tolérance individuelle à l'hypoxie (voir 4.3.1.2).

Les principales sources d'évaporation de l'azote liquide en AMP sont l'évaporation naturelle des récipients de stockage, l'évaporation durant le remplissage initial ou la mise à niveau d'un récipient en azote liquide et, en situation accidentelle, le renversement d'un récipient d'azote liquide. A titre d'exemples, les quatre scénarii suivants sont donc décrits ci-après :

- **Scénario 1 : Evaporation naturelle à partir des conteneurs**
- **Scénario 2 : Mise à niveau d'un récipient**
- **Scénario 3 : Mise en froid et remplissage d'un récipient initialement dépourvu d'azote liquide**
- **Scénario 4 : Renversement du contenu d'un récipient (« worst case »)**

6.2 Scénario 1 : Evaporation naturelle à partir des conteneurs

Ce scénario s'applique particulièrement le matin alors que plusieurs heures se sont écoulées avant que le personnel n'entre dans le local, et en l'absence de remplissage automatique des récipients durant cette période.

L'équation (2) calculant le taux d'oxygène résiduel à l'équilibre est donc utilisée ici.

Les paramètres importants sont :

- le volume du local,
- le volume d'azote liquide stocké,
- le taux de renouvellement d'air,
- le débit de fuite par évaporation naturelle, qui dépend essentiellement de la qualité de l'isolation thermique des récipients.

Le débit de fuite varie selon le type de récipient et son état de vieillissement (perte d'isolation avec le temps). Les débits de fuite renseignés par les constructeurs pour les récipients neufs non autoprogressifs de stockage de produits biologiques et d'azote liquide sont de l'ordre de 1% de leur capacité par jour, et peuvent atteindre jusqu'à 3% selon le modèle.

Selon les recommandations de la BCGA (BCGA, 2000) largement acceptées par ailleurs, ces débits de fuite ont été doublés pour tenir compte d'un éventuel défaut d'isolation thermique du à la perte du vide dans la double enveloppe (vieillesse, défaut de fabrication).

A titre conservatoire, un débit de fuite journalier de 6% (3% × 2) du volume stocké est donc retenu ici.

On a donc :

$$L_{LN_2} = (0.06 \cdot v_{LN_2}) / (24 \cdot 60)$$

L_{LN_2} débit d'évaporation (de fuite) d'azote liquide en L/mn
 v_{LN_2} volume d'azote liquide stocké en L

et avec (2) on obtient :

$$C_{O_2} = 21 \cdot \left(1 - \frac{40,92 \cdot (0.06 \cdot v_{LN_2}) / (24 \cdot 60)}{V \cdot n}\right), \text{ soit :}$$

$$C_{O_2} = 21 \cdot \left(1 - \frac{1,7 \cdot 10^{-3} \cdot v_{LN_2}}{V \cdot n}\right)$$

C_{O_2} Concentration en oxygène résiduel (% volumique)

V volume du local en m³

n taux de renouvellement d'air en volume du local par heure

v_{LN_2} volume d'azote liquide stocké en L

Les valeurs de paramètres suivantes ont été retenues :

- des volumes de local V de :

- 10m^3 : volume minimal d'un local de travail avec de l'azote liquide parmi les services d'AMP (Agence de la Biomédecine, 2006)⁷,
- 30m^3 : volume moyen d'un local de travail avec de l'azote liquide parmi les services d'AMP (Agence de la Biomédecine, 2006)⁷,
- 150m^3 : volume maximal d'un local de travail avec de l'azote liquide parmi les services d'AMP (Agence de la Biomédecine, 2006).

- des volumes de stockage V_{LN2} de :

- 10L : capacité de stockage minimale parmi les services d'AMP (Agence de la Biomédecine, 2006),
- 200L : capacité de stockage médiane parmi les services d'AMP (Agence de la Biomédecine, 2006),
- 2000L : capacité de stockage maximale parmi les services d'AMP (Agence de la Biomédecine, 2006).

- des taux de renouvellement d'air n de :

- 0,5 : valeur basse correspondant à un local sans ventilation particulière,
- 6 : valeur typique utilisée en milieu de travail, nécessitant généralement un système de ventilation forcée.

Tableau XIII : Taux d'oxygène résiduel (%) lié à l'évaporation naturelle à partir des conteneurs, $n = 0,5 \text{ vol.h}^{-1}$

Volume du local (m3)	Volume d'azote stocké dans le local (L)		
	10	200	2000
10	20,9	19,6	Conditions irréalistes*
30	21,0	20,5	16,2
150	21,0	20,9	20,0

* Conditions jugées irréalistes par le groupe de travail au regard du faible volume de local pour un volume d'azote liquide stocké important, et des données issues de l'enquête de l'Agence de la Biomédecine (Agence de la Biomédecine, 2006)

Tableau XIV : Taux d'oxygène résiduel (%) lié à l'évaporation naturelle à partir des conteneurs, $n = 6 \text{ vol.h}^{-1}$

Volume du local (m3)	Volume d'azote stocké dans le local (L)		
	10	200	2000
10	21,0	20,9	Conditions irréalistes*
30	21,0	21,0	20,6
150	21,0	21,0	20,9

* Conditions jugées irréalistes par le groupe de travail au regard du faible volume de local pour un volume d'azote liquide stocké important, et des données issues de l'enquête de l'Agence de la Biomédecine (Agence de la Biomédecine, 2006)

⁷ Volumes < 10 m3 déclarés dans l'enquête de l'ABM non pris en compte car jugés non pertinents (trop faibles) pour correspondre au volume d'un local de travail.

Les résultats obtenus dans les conditions de ce scénario (Tableau XIII et XIV) montrent globalement **un faible impact de l'évaporation naturelle des récipients stockés sur le taux d'oxygène résiduel du local, même dans des circonstances de ventilation défavorables ($0,5\text{vol}_{\text{local}}\cdot\text{h}^{-1}$)**.

Seules des conditions de stockage extrêmes associant un volume d'azote liquide important (2000L) par rapport au volume du local (30m^3) et une ventilation particulièrement faible ($0,5\text{vol}_{\text{local}}\cdot\text{h}^{-1}$) (Tableau XIII), pourraient entraîner un taux d'oxygène inférieur aux seuils minimaux recommandés et de potentiels effets hypoxiques (voir 4.3.1.2.4), tels que l'augmentation des fréquences cardiaques et respiratoires, des troubles de l'attention, du jugement et de la coordination. Les risques d'apparition de ces effets sont toutefois à nuancer, dans la mesure où la diminution du taux d'oxygène liée à l'évaporation naturelle à partir des conteneurs est lente.

6.3 Scénario 2 : Mise à niveau d'un récipient

Le remplissage en azote liquide des récipients pour les remettre à niveau et ainsi garantir que les produits biologiques sont immergés et correctement conservés, est une opération courante en AMP (tous les jours ou plusieurs fois par semaine).

L'équation (1) calculant le taux d'oxygène résiduel à la fin du remplissage est utilisée ici, considérant qu'à cet instant t_R , le taux d'oxygène est minimal. Après le remplissage, le taux d'oxygène, sous l'influence d'un débit d'évaporation L_{LN_2} décroissant associé à une ventilation n constante, aura en effet tendance à croître vers son niveau initial (21%).

Un taux de perte par évaporation de 10% de l'azote liquide utilisé lors d'une mise à niveau d'un récipient est typiquement utilisé dans les documents guides relatifs à la manipulation de l'azote liquide (BCGA, 2000 ; Royal Free Hampstead, 2004). Ce taux est retenu ici.

Pour garantir en permanence l'immersion totale des produits biologiques, les sondes de niveau sont généralement situées au deux tiers du conteneur (Cryo Diffusion S.A.). En conséquence, le volume d'azote liquide nécessaire pour la mise à niveau peut atteindre un tiers du volume du récipient, proportion retenue ici à titre conservatoire.

Un essai sur un conteneur de 660L réalisé par la Division Matériel Cryogénique d'Air Liquide, rapporte une augmentation du poids du conteneur de 128 Kg en 10 minutes de remplissage (de la 5^{ème} à la 15^{ème} minute) suivant la phase de mise en froid (Annexe 6), soit un débit moyen de remplissage D_{LN_2} de 15,8L/mn pour une densité de 0,8086 (voir 4.1.1). Bien que ces résultats soient spécifiques aux conditions de l'essai (équipements utilisés, température ambiante, débit d'alimentation, ...), on retiendra cette valeur de D_{LN_2} pour calculer t_R dans ce scénario :

$$t_R = (1/3 \cdot v) / D_{LN_2}$$

t_R temps de remplissage du conteneur en minutes

v capacité de stockage du conteneur en L

D_{LN_2} Débit de remplissage, soit 15,8L/mn

Considérant t_R et une perte par évaporation de 10% de l'azote liquide utilisé pour remplir ($1/3 \times v$), on calcule le débit d'évaporation d'azote liquide L_{LN_2} , estimé constant au cours du remplissage, soit :

$$L_{LN_2} = \frac{0,1((1/3 \cdot V)/0,9)}{t_R} = (1/9) \cdot D_{LN_2}$$

t_R temps de remplissage du conteneur en minutes
 v capacité de stockage du conteneur en L
 D_{LN_2} Débit de remplissage, soit 15,8L/mn
 L_{LN_2} débit d'évaporation (de fuite) d'azote liquide en L/mn

et avec (1) on obtient :

$$C_{O_2} = 21 \cdot \left(1 - \frac{40,92 \cdot (1/9) \times D_{LN_2}}{V \cdot n} (1 - e^{-n \cdot ((1/3 \cdot v)/D_{LN_2})})\right), \text{ soit :}$$

$$C_{O_2} = 21 \cdot \left(1 - \frac{4,55 \cdot D_{LN_2}}{V \cdot n} (1 - e^{-n \cdot ((1/3 \cdot v)/D_{LN_2})})\right)$$

C_{O_2} Concentration en oxygène résiduel (% volumique)
 V volume du local en m^3
 n taux de renouvellement d'air en volume du local par heure
 v capacité de stockage du conteneur en L
 D_{LN_2} Débit de remplissage, soit 15,8L/mn

Les valeurs de paramètres suivantes ont été retenues :

- des volumes de local V de :

- 10 m^3 : volume minimal d'un local de travail avec de l'azote liquide parmi les services d'AMP (Agence de la Biomédecine, 2006)⁸,
- 30 m^3 : volume moyen d'un local de travail avec de l'azote liquide parmi les services d'AMP (Agence de la Biomédecine, 2006)⁸,
- 150 m^3 : volume maximal d'un local de travail avec de l'azote liquide parmi les services d'AMP (Agence de la Biomédecine, 2006).

- des capacités de stockage de récipients v de :

- 10L : récipient de stockage de « faible » volume,
- 60L : volume de récipient de stockage le plus fréquemment utilisé dans les services d'AMP (Agence de la Biomédecine, 2006),
- 500 et 1000L : volumes maximaux parmi les récipients utilisés en AMP (Agence de la Biomédecine, 2006).

- des taux de renouvellement d'air n de :

- 0,5 : valeur basse valeur basse correspondant à un local sans ventilation particulière,
- 6 : valeur typique utilisée en milieu de travail, nécessitant généralement un système de ventilation forcée,
- 20 : valeur nécessitant un système de ventilation forcée.

⁸ Volumes < 10 m^3 déclarés dans l'enquête de l'ABM non pris en compte car jugés non pertinents (trop faibles) pour correspondre au volume d'un local de travail.

Tableau XV : Taux d'oxygène résiduel (%) lié à la mise à niveau d'un conteneur, $n = 0,5 \text{ vol.h}^{-1}$

Volume du local (m3)	Capacité de stockage du conteneur (L) Temps de remplissage (mn)			
	10 (0,2)	60 (1,3)	500 (10,5)	1000 (21,1)
10	20,5	17,8	0,0	0,0
30	20,8	19,9	12,5	4,8
150	21,0	20,8	19,3	17,8

Tableau XVI : Taux d'oxygène résiduel (%) lié à la mise à niveau d'un conteneur, $n = 6 \text{ vol.h}^{-1}$

Volume du local (m3)	Capacité de stockage du conteneur (L) Temps de remplissage (mn)			
	10 (0,2)	60 (1,3)	500 (10,5)	1000 (21,1)
10	20,5	18,0	4,6	0,0
30	20,8	20,0	15,5	13,6
150	21,0	20,8	19,9	19,5

Tableau XVII : Taux d'oxygène résiduel (%) lié à la mise à niveau d'un conteneur, $n = 20 \text{ vol.h}^{-1}$

Volume du local (m3)	Capacité de stockage du conteneur (L) Temps de remplissage (mn)			
	10 (0,2)	60 (1,3)	500 (10,5)	1000 (21,1)
10	20,5	18,4	13,7	13,5
30	20,8	20,1	18,6	18,5
150	21,0	20,8	20,5	20,5

Dans les conditions de ce scénario, **des taux d'oxygène résiduel dangereux pouvant induire une diminution des performances physiques et intellectuelles, allant jusqu'à un possible évanouissement voire la mort, sont observés lors de la mise à niveau de récipients volumineux (500 et 1000L) dans des locaux réduits (10 et 30m³) et faiblement ventilés (0,5 et 6vol_{local}.h⁻¹).**

Ce risque est globalement écarté :

- **dès lors que le volume du local est important (150m³),** même avec une ventilation minimale ($n = 0,5$) ;
- **avec une ventilation forcée ($n = 20$),** même pour les situations de mise à niveau de conteneur volumineux (500 et 1000L) dans des locaux relativement réduits (30m³) (Tableau XVII).

Le risque d'une diminution des performances physiques et intellectuelles ne peut toutefois être écarté pour la mise à niveau d'un conteneur volumineux (500 et 1000L), lorsque les locaux sont très réduits (10m³).

6.4 Scénario 3 : Mise en froid et remplissage d'un récipient de 660 litres dépourvu d'azote liquide

En AMP, le remplissage des récipients initialement dépourvus d'azote liquide est une opération plus occasionnelle que les simples remises à niveau. Pour le cas étudié ici d'un conteneur de 660L, l'opération de mise en froid souvent réalisée par le fournisseur lors de la mise en service du conteneur, reste envisageable pour des travailleurs en AMP.

Pour ce scénario, l'évolution du taux d'oxygène résiduel de l'air au cours de la mise en froid suivie du remplissage d'un conteneur de 660L est modélisée via un logiciel de simulation de flux, à partir de l'évolution du débit d'évaporation d'azote liquide résultant de mesures réalisées par la Division Matériel Cryogénique (DMC) d'Air Liquide.

Aussi, pour ce scénario simulant une situation d'évaporation aigue où, en conditions réelles, le débit d'évaporation peut varier dans le temps de façon complexe, on soulignera le caractère spécifique des résultats aux conditions d'essais (équipements utilisés, débit d'alimentation, température ambiante...). Par conséquent, ces résultats ne peuvent être généralisés et utilisés pour d'autres types de conteneur.

6.4.1 Méthode

6.4.1.1 Estimation de l'évolution du débit d'évaporation à partir des mesures DMC

L'essai de DMC a consisté à mesurer la variation du poids d'un conteneur de 660L au cours de sa mise en froid suivie de son remplissage. Ce paramètre associé au débit d'alimentation du conteneur renseigné par DMC a permis au groupe de travail d'estimer l'évolution du débit d'évaporation L_{LN_2} (Annexe 6) en fonction du temps, illustrée dans la Figure 13 ci-dessous.

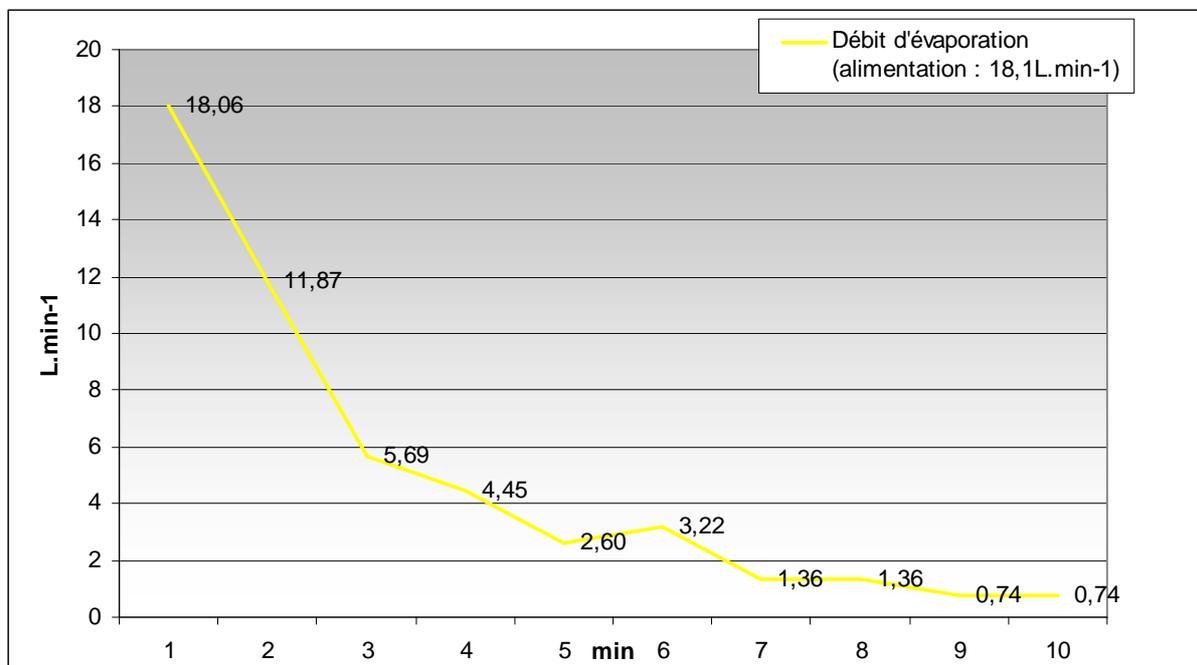


Figure 13 : Evolution du débit d'évaporation d'azote liquide pour la mise en froid d'un conteneur de 660L

Le débit d'évaporation L_{LN_2} est maximal (18 L.mn⁻¹) au début de la mise en froid du conteneur, puis décroît jusqu'à 0,7 L.mn⁻¹, le conteneur stockant alors environ 130 L d'azote liquide.

Le remplissage complet du conteneur (580 L) a été réalisé en 3 fois du fait de la capacité du réservoir de remplissage. Lors des deux reprises du remplissage, les pics d' L_{LN_2} atteignaient respectivement 5 L.mn^{-1} (pour un remplissage de 210 L et un débit d'alimentation de $18,9 \text{ L.mn}^{-1}$) et 8 L.mn^{-1} (pour un remplissage de 440 L et un débit d'alimentation de $24,7 \text{ L.mn}^{-1}$). Ces pics sont vraisemblablement dus au réchauffement des équipements (flexible, canalisations) entre deux remplissages.

6.4.1.2 Modélisation de l'évolution du taux d'oxygène dans l'air du local

Pour représenter la situation dynamique, le bilan de masse sur l'oxygène a été introduit dans le logiciel de simulation de flux Stella™ v9.0.2 (développé par Isee Systems, 1985-2007), qui permet une résolution numérique du problème. Le modèle classique du compartiment avec des gaz idéalement mélangés utilisé ici s'appuie sur le principe de calcul développé en annexe 5.

Les conditions de simulation étaient les suivantes :

- Une concentration en O_2 initiale de 21% ;
- Un débit d'évaporation d'azote liquide $L_{LN_2}(t)$ correspondant à des données expérimentales fournies par DMC, et obtenues lors de la mise en froid d'un conteneur de 660L pour un débit d'alimentation de $18,1 \text{ L.mn}^{-1}$ (voir Annexe 6) ;
- Un pas de calcul de 5 secondes a été utilisé pour un scénario de mise en froid de 10 minutes ;
- des volumes de local V de :
 - 10 m^3 : volume minimal d'un local de travail avec de l'azote liquide parmi les services d'AMP (Agence de la Biomédecine, 2006)⁹,
 - 30 m^3 : volume moyen d'un local de travail avec de l'azote liquide parmi les services d'AMP (Agence de la Biomédecine, 2006)⁹,
 - 150 m^3 : volume maximal d'un local de travail avec de l'azote liquide parmi les services d'AMP (Agence de la Biomédecine, 2006) ;
- des taux de renouvellement d'air n de :
 - 0,5 : valeur basse correspondant à un local sans ventilation particulière,
 - 1 : valeur typique associée à une ventilation naturelle pour des locaux au-dessus du niveau du sol, sans ouverture spéciale de ventilation (BCGA, 2000),
 - 6 : valeur typique utilisée en milieu de travail, nécessitant généralement un système de ventilation forcée,
 - 20 : valeur nécessitant un système de ventilation forcée.

⁹ Volumes < 10 m³ déclarés dans l'enquête de l'ABM non pris en compte car jugés non pertinents (trop faibles) pour correspondre au volume d'un local de travail.

6.4.2 Résultats

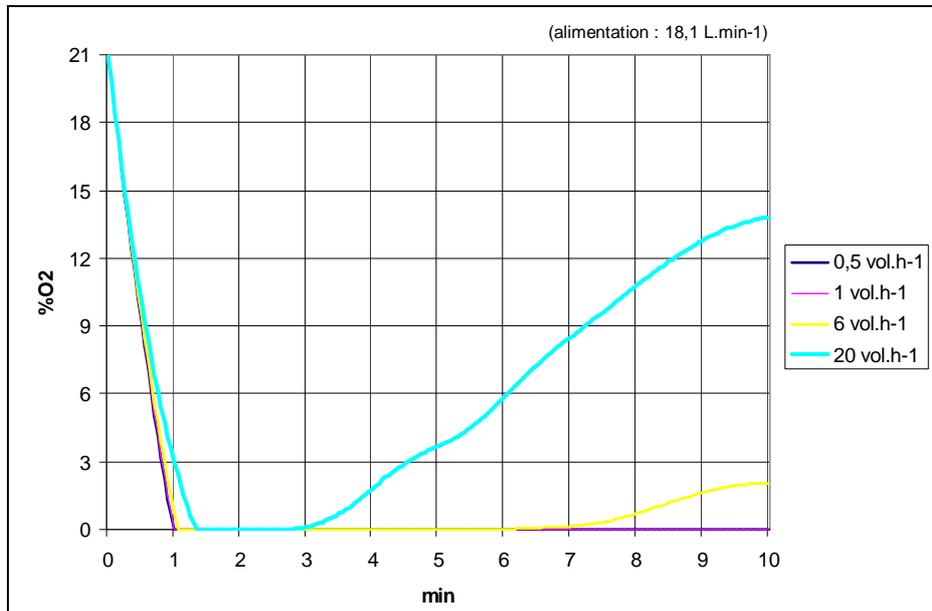


Figure 14 : Taux d'oxygène d'un local de 10m^3 au cours de la mise en froid d'un conteneur de 660L

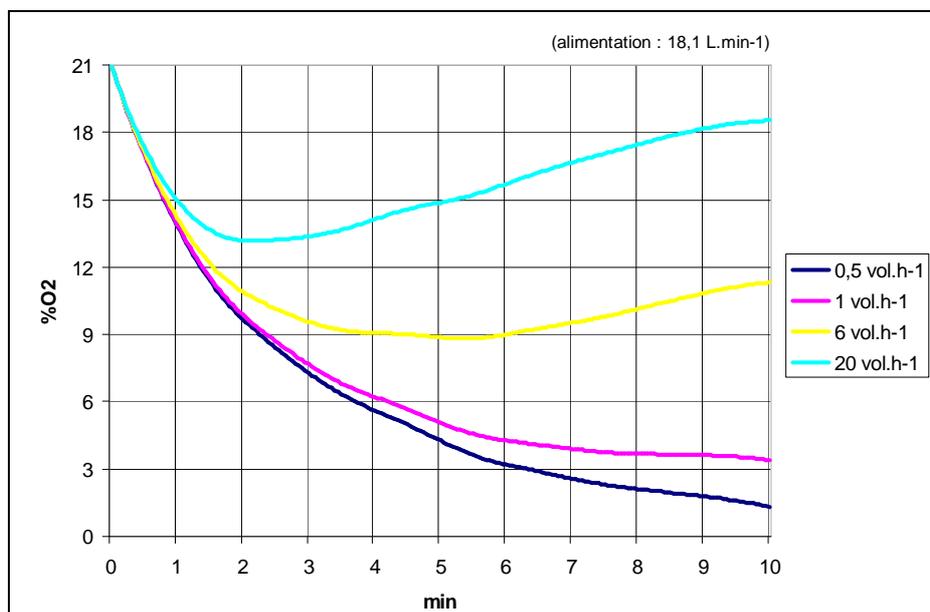


Figure 15 : Taux d'oxygène d'un local de 30m^3 au cours de la mise en froid d'un conteneur de 660L

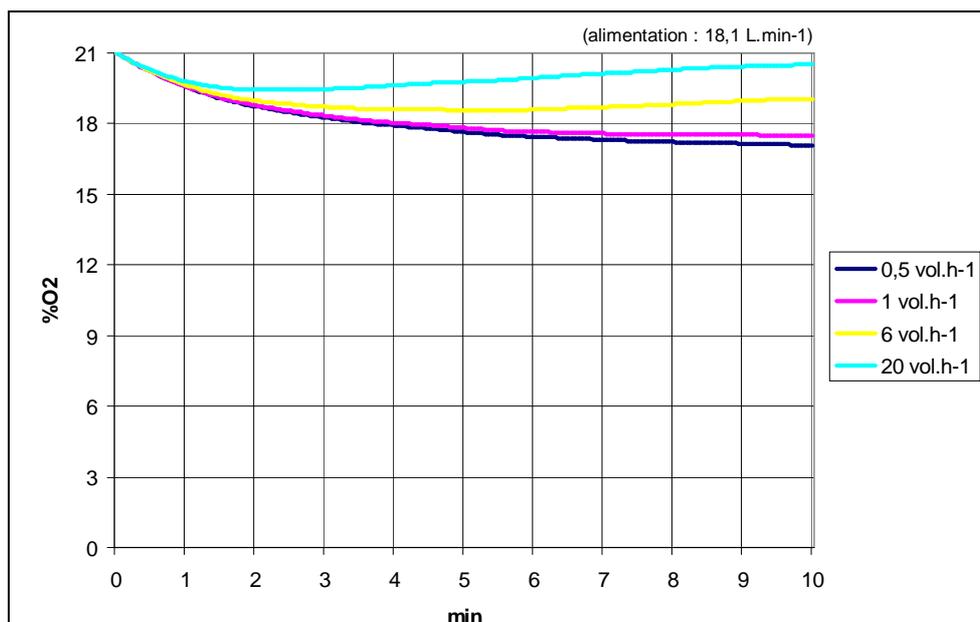


Figure 16 : Taux d'oxygène d'un local de 150m^3 au cours de la mise en froid d'un conteneur de 660L

Dans les conditions de ce scénario, une diminution brutale du taux d'oxygène allant jusqu'à une atmosphère totalement appauvrie en 1 à 1mn30, est observée pour la mise en froid d'un conteneur de 660 L dans **un local particulièrement réduit (10m^3)**, quelque soient les conditions de ventilation (Figure 14). L'atmosphère reste dangereusement appauvrie en oxygène tout au long de la mise en froid et vraisemblablement après, même sous l'influence d'une ventilation forcée ($20\text{vol}_{\text{local}}\cdot\text{h}^{-1}$).

Les résultats confirment que la mise en froid d'un conteneur de 660L dans un local particulièrement réduit (10m^3) peut conduire à un risque vital (évanouissement quasi immédiat, lésions irréversibles des cellules nerveuses, décès) (voir 4.3.1.2).

Pour **un local de dimensions moins modestes (30m^3)**, la diminution du taux d'oxygène est plus progressive (Figure 15).

Après 1 minute, les niveaux d'oxygène résiduel peuvent conduire à une diminution des performances physiques et intellectuelles ($\approx 15\%$), quelque soient les conditions de ventilation.

Après 2 à 2mn30 avec une ventilation allant jusqu'à $6\text{vol}_{\text{local}}\cdot\text{h}^{-1}$, les taux d'oxygène résiduel atteints ($\approx 10\%$) peuvent entraîner des évanouissements.

Après 3mn avec une ventilation faible ($0,5$ et $1\text{vol}_{\text{local}}\cdot\text{h}^{-1}$), le risque léthal intervient ($< 8\%$).

Une ventilation forcée suffisante ($20\text{vol}_{\text{local}}\cdot\text{h}^{-1}$) permet de limiter sensiblement la gravité de la situation hypoxique puisque le niveau minimal atteint 13% de la 2^{ème} à la 3^{ème} mn, puis croit jusqu'à 15% et 18%, respectivement à la 4^{ème} et 8^{ème} mn.

Pour **un local très volumineux (150m^3)**, une diminution faible et progressive du taux d'oxygène (-2% en 2mn pour $20\text{vol}_{\text{local}}\cdot\text{h}^{-1}$, -4% en 6mn pour $0,5\text{vol}_{\text{local}}\cdot\text{h}^{-1}$) suivie d'une tendance à la stagnation ou au retour à la normale (21%) est observée durant les 10mn de mise en froid, quelque soient les conditions de ventilation (Figure 16). Dans un local beaucoup plus volumineux que les précédents, la même opération ne semble donc pas présenter de risque particulier pour la santé. Ce résultat montre l'intérêt de disposer de locaux les plus vastes possibles.

6.5 Scénario 4 : Renversement du contenu d'un récipient

Ce scénario suppose le renversement instantané et complet du récipient.

Malgré le caractère aigu de la situation étudiée ici, le manque de données et la complexité des phénomènes d'évaporation n'ont pas permis d'apprécier dans des conditions dynamiques les répercussions possibles du renversement d'azote liquide sur le taux d'oxygène. On suppose que l'azote liquide s'évapore immédiatement et que l'azote évaporé se mélange instantanément à l'atmosphère du local. Dans ces conditions, la ventilation n'a pas le temps d'influencer le taux d'oxygène résiduel. Le taux de renouvellement d'air n'est donc pas pris en compte dans les calculs. Les hypothèses conservatrices utilisées ici ne permettent donc pas de faire des comparaisons entre les résultats de ce scénario « worst case » et ceux des autres scénarii.

Le taux minimal d'oxygène pouvant être atteint C_{O_2} est calculé théoriquement en rapportant le volume d'azote évaporé (soit le volume d'azote renversé) sur le volume du local V :

$$C_{O_2} = 100 \left(0,21 - 0,21 \cdot \frac{0,682 \cdot V_{LN_2}}{V} \right), \text{ soit :}$$

$$(6) C_{O_2} = 21 \cdot \left(1 - \frac{0,682 \cdot V_{LN_2}}{V} \right)$$

C_{O_2} Concentration en oxygène résiduel (% volumique)

V volume du local en m^3

V_{LN_2} volume d'azote liquide stocké dans le conteneur en L

Les valeurs de paramètres suivantes ont été retenues :

- des volumes de local V de :

- $10m^3$: volume minimal d'un local de travail avec de l'azote liquide parmi les services d'AMP (Agence de la Biomédecine, 2006)¹⁰,
- $30m^3$: volume moyen d'un local de travail avec de l'azote liquide parmi les services d'AMP (Agence de la Biomédecine, 2006)¹⁰,
- $150 m^3$: volume maximal d'un local de travail avec de l'azote liquide parmi les services d'AMP (Agence de la Biomédecine, 2006).

- des volumes de récipients V_{LN_2} de :

- 1, 3, 5 et 10L : récipient de transport et de stockage de « faibles » volumes, propices à se renverser,
- 60L : récipient de stockage le plus fréquemment utilisé dans les services d'AMP (Agence de la Biomédecine, 2006), et potentiellement renversable.

¹⁰ Volumes < 10 m3 déclarés dans l'enquête de l'ABM non pris en compte car jugés non pertinents (trop faibles) pour correspondre au volume d'un local de travail.

Tableau XVIII : Taux d'oxygène résiduel (%) lié au renversement d'un conteneur

Volume du local (m3)	Volume d'azote renversé (L)				
	1	3	5	10	60
10	19,6	16,7	13,8	6,7	0,0
30	20,5	19,6	18,6	16,2	0,0
150	20,9	20,7	20,5	20,0	15,3

Dans les conditions de ce scénario, les résultats mettent en perspectives des taux d'oxygène particulièrement dangereux pour le renversement accidentel d'un conteneur (5, 10, 60L) dans un petit local (10 ou 30m³) (Tableau XVIII).

Dans un local exigu de 10m³, le renversement de 10L d'azote liquide suffit pour atteindre un taux d'oxygène impliquant un risque létal (<8%).

Dans un local de 30m³, un même renversement de 10L semble induire un risque sanitaire beaucoup plus limité, alors que pour le renversement de 60L, on observe un air totalement appauvri en oxygène induisant un risque létal.

Dans un grand local de 150m³, des renversements de 1 à 10L d'azote liquide ne semblent pas induire de risque particulier pour la santé. Le renversement de 60L pourrait conduire à des effets réversibles tels que l'augmentation des fréquences cardiaque et respiratoire, des troubles de l'attention, du jugement et de la coordination (voir 4.3.1.2.4).

6.6 Conclusions

Les résultats obtenus avec ces scénarii montrent globalement :

- un faible impact de l'évaporation naturelle des récipients stockés sur le taux d'oxygène du local. Seules des conditions de stockage très défavorables associant un volume d'azote liquide important (2000L) par rapport à un débit de renouvellement d'air particulièrement faible (volume du local : 30m^3 ; ventilation : $0,5\text{vol}_{\text{local}}\cdot\text{h}^{-1}$, taux d' O_2 résiduel $\approx 16\%$), pourraient entraîner de potentiels effets hypoxiques, tels que l'augmentation des fréquences cardiaques et respiratoires, des troubles de l'attention, du jugement et de la coordination.
- pour la mise à niveau d'un récipient volumineux (500 et 1000L, remplissage avec un tiers de sa capacité volumique) dans des conditions défavorables (locaux réduits : 10 et 30m^3 ; ventilation faible : 0,5, et $6\text{vol}_{\text{local}}\cdot\text{h}^{-1}$), des taux d'oxygène résiduel dangereux pouvant induire une diminution des performances physiques et intellectuelles, allant jusqu'à un possible évanouissement voire des effets irréversibles (lésions cérébrales) et le décès. Ce risque est globalement écarté dès lors que le volume du local est important (150m^3), ou qu'une ventilation forcée est utilisée ($20\text{vol}_{\text{local}}\cdot\text{h}^{-1}$, sauf pour des locaux très réduits de 10m^3).
- pour la mise en froid d'un conteneur de 660L :
 - dans un local très réduit (10m^3) : une diminution brutale du taux d'oxygène induisant de manière rémanente (plus de 10mn) une atmosphère dangereusement appauvrie, quelque soient les conditions de ventilation (0,5, 1, 6 ou $20\text{vol}_{\text{local}}\cdot\text{h}^{-1}$). Cette opération réalisée dans un local réduit en l'absence de ventilation suffisamment forcée pourrait donc conduire à un danger grave, tel que l'évanouissement quasi immédiat, des effets irréversibles voire le décès ;
 - dans un local moins modeste (30m^3) : une diminution plus progressive du taux d'oxygène à des niveaux induisant de possibles effets sur la santé. Une ventilation forcée de $20\text{vol}_{\text{local}}\cdot\text{h}^{-1}$ permettrait d'éviter les risques les plus graves (évanouissement, effets irréversibles voire décès) ;
 - dans un local très volumineux (150m^3), l'opération ne semble pas présenter de risque particulier pour la santé.
- pour le scénario de renversement accidentel d'un récipient de transport ou de stockage (5, 10 et 60L) basé sur des hypothèses de calcul majorantes en termes de risque hypoxique, sont observés des taux d'oxygène particulièrement dangereux pouvant induire une diminution des performances physiques et intellectuelles, allant jusqu'à un possible évanouissement voire la mort, lorsqu'il s'agit d'un local exigu (10 ou 30m^3). Ce type d'incident induit vraisemblablement moins de risque lorsqu'il survient dans un local plus volumineux (150m^3).

Il est à souligner que ces résultats sont obtenus avec l'hypothèse d'un brassage complet de l'atmosphère conduisant à une concentration en oxygène homogène en tout point du local. En conditions réelles, des poches d'atmosphère dangereuses peuvent subsister, notamment en partie basse du local. Cette stratification de l'atmosphère du local est particulièrement probable dans les situations entraînant un fort dégagement d'azote telles que celles présentées dans les scénarii 3 et 4.

Ces résultats issus de scénarii « cas d'école » sont présentés dans l'objectif d'illustrer l'influence de paramètres tels que le volume des locaux et leur ventilation dans la prévention du risque hypoxique lié à l'utilisation d'azote liquide.

7 Abaque déterminant le taux de renouvellement d'air recommandé pour la ventilation continue d'un local d'AMP

L'analyse de l'enquête de l'Agence de la Biomédecine concernant la situation des laboratoires de biologie de la reproduction a permis de mettre en évidence un dispositif de ventilation globalement insuffisant dans ces locaux. Le groupe de travail s'est donc proposé de construire un abaque visant à faciliter la mise en œuvre des actions de prévention des risques liés à l'hypoxie lors de la conception des systèmes de ventilation des laboratoires.

L'abaque présenté ci-après concerne exclusivement les taux de renouvellement d'air recommandés en continu, la complexité et l'hétérogénéité des phénomènes « aigus » d'évaporation d'azote liquide n'ayant pas permis d'estimer des taux de renouvellement d'air à recommander pour des situations particulièrement émettrices d'azote gazeux (opérations de refroidissement d'un conteneur, d'une ligne de transfert, ...).

7.1 Méthode de construction de l'abaque

La méthode de calcul vise à estimer le taux de renouvellement d'air nécessaire en ventilation continue pour maintenir **un taux d'oxygène minimal de 19%** dans l'air d'un laboratoire d'AMP utilisant de l'azote liquide, à partir de la consommation annuelle du laboratoire en azote liquide et du volume du local.

La méthode s'applique pour une utilisation normale d'azote liquide, en dehors des situations aiguës particulièrement émettrices d'azote gazeux (opérations ponctuelles de refroidissement d'un conteneur ou d'une ligne, renversement d'un conteneur rempli d'azote liquide, ...). Elle s'appuie sur le principe d'un mélange idéal entre l'azote évaporé et l'air du local.

La méthode consiste chronologiquement à :

1. Déterminer la « **consommation journalière moyenne** » en divisant la consommation annuelle d'azote liquide par le nombre de jours par an ;
2. Appliquer ensuite la règle empirique qui considère que **80% de l'azote liquide est consommé par jour durant une période d'activité journalière¹¹ estimée à 5 heures**, pour établir la « **consommation durant la période d'activité journalière** » ;
3. Considérer que la « consommation durant la période d'activité journalière » représente le « **débit de fuite moyen durant la période d'activité journalière** » ;
4. Obtenir ainsi un taux de renouvellement d'air ***n*** nécessaire pour un taux d'oxygène résiduel ***C_{O₂}*** de 19% (seuil de tolérance), un volume de local ***V*** donné et un « débit de fuite moyen durant la période d'activité journalière » ***L***, via la formule (explicitée au chapitre 6) :

$$C_{O_2} = 21 \cdot \left(1 - \frac{40,92 \cdot L_{LN_2}}{V \cdot n}\right)$$

avec :

- C_{O₂}*** Concentration en oxygène résiduel à l'équilibre (%)
- L_{LN₂}*** Débit de fuite d'azote liquide (L.mn⁻¹)
- V*** Volume du local en (m³)
- n*** Taux de renouvellement d'air du local (vol_{local}.h⁻¹)

5. Affecter un **facteur de sécurité de 4 (x4)** au taux de renouvellement d'air obtenu, considérant :
 - l'hétérogénéité des conditions réelles (température ambiante, humidité relative, tendance des vapeurs d'azote liquide évaporé à s'accumuler au niveau du sol, configuration des locaux, disposition des analyseurs d'oxygène) ;
 - la variabilité des « débits de fuite moyen durant la période d'activité journalière » qui peut être importante, en particulier lorsque les volumes annuels consommés sont faibles ;
 - une consommation vraisemblablement plus importante la semaine par rapport au week-end ;
 - l'expérience acquise et le savoir-faire des experts.
6. Appliquer une **limite basse équivalente à 45 m³.h⁻¹** pour les taux de renouvellement d'air calculés qui sont inférieurs à cette valeur. Cette limite basse a été retenue au regard de l'Art. 232-5-3 du Code du travail qui fixe un débit minimal d'air neuf de 45 m³.h⁻¹ par occupant pour les « *ateliers et locaux avec travail physique léger* ».

¹¹ La période d'activité journalière est définie ici comme la période durant laquelle le personnel AMP utilise et/ou fait évaporer de l'azote liquide (mise en froid d'un récipient, ouverture d'un couvercle de récipient, manipulation d'échantillons biologiques, transvasement d'azote liquide...).

La méthode permet notamment :

- d'estimer a minima le taux de renouvellement d'air nécessaire à partir de deux paramètres a priori facilement renseignables par le gestionnaire du laboratoire à savoir : la consommation annuelle d'azote liquide et le volume du local ;
- d'avoir une approche majorante du calcul du débit de fuite donc sécuritaire puisque :
 - elle part de l'hypothèse que l'ensemble de l'azote liquide consommé s'évapore dans le local, et ne tient donc pas compte d'autres types de pertes tels que l'évaporation d'azote liquide à l'extérieur du local (événements des lignes d'alimentation...) et l'utilisation d'azote liquide pour le transport des échantillons biologiques ;
 - elle tient compte des pics d'évaporation d'azote liquide, ce qui majore la moyenne du débit de fuite calculée pour estimer le taux de renouvellement d'air nécessaire en dehors des opérations particulièrement émettrices d'azote gazeux (refroidissement d'un conteneur ou d'une ligne...) ;
- d'estimer a minima le taux de renouvellement d'air nécessaire à partir de la capacité de stockage d'azote liquide et du volume du local, **à défaut d'information en termes de consommation annuelle d'azote liquide.**

En effet, l'estimation du taux de renouvellement d'air associée à une « capacité de stockage » tient compte d'une consommation annuelle théorique, estimée selon une relation jugée linéaire à partir de la capacité de stockage. Cette relation a été établie à partir des données de l'enquête de l'Agence de Biomédecine (Agence de Biomédecine, 2006) (Annexe 7).

La méthode ne permet pas d'estimer le taux de renouvellement d'air nécessaire lors des situations particulièrement émettrices d'azote gazeux (situations accidentelles, opérations ponctuelles de refroidissement d'un conteneur ou d'une ligne...). Dans ce cas un calcul complémentaire doit être effectué afin de déterminer le taux de renouvellement d'air supplémentaire à ajouter.

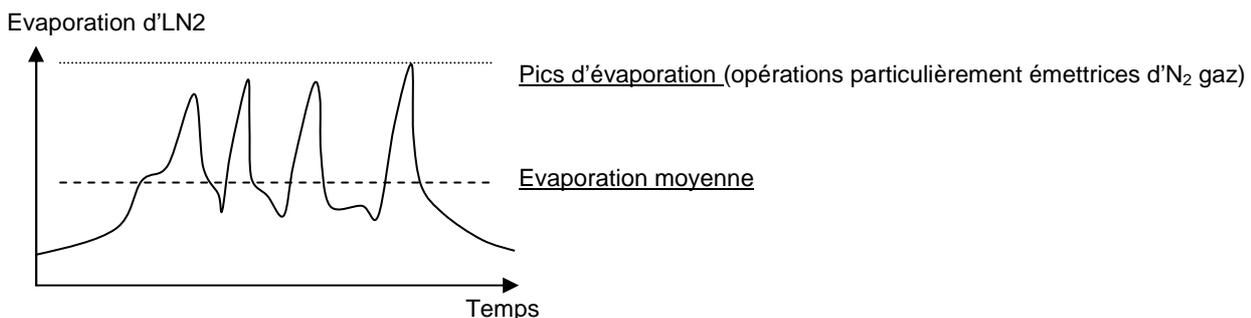


Figure 17 Représentation schématique du profil d'évaporation d'azote liquide au cours d'une journée

In fine, le taux de renouvellement d'air recommandé dans l'abaque n'a pas vocation à se substituer à un dimensionnement de ventilation plus spécifique déterminé par une étude de terrain.

7.2 Présentation schématique de l'abaque

La Figure 18 présente l'abaque sous sa forme schématique. L'abaque sous sa forme plus détaillée (à utiliser) est illustré au chapitre 8.1.1.3 des recommandations du groupe de travail.

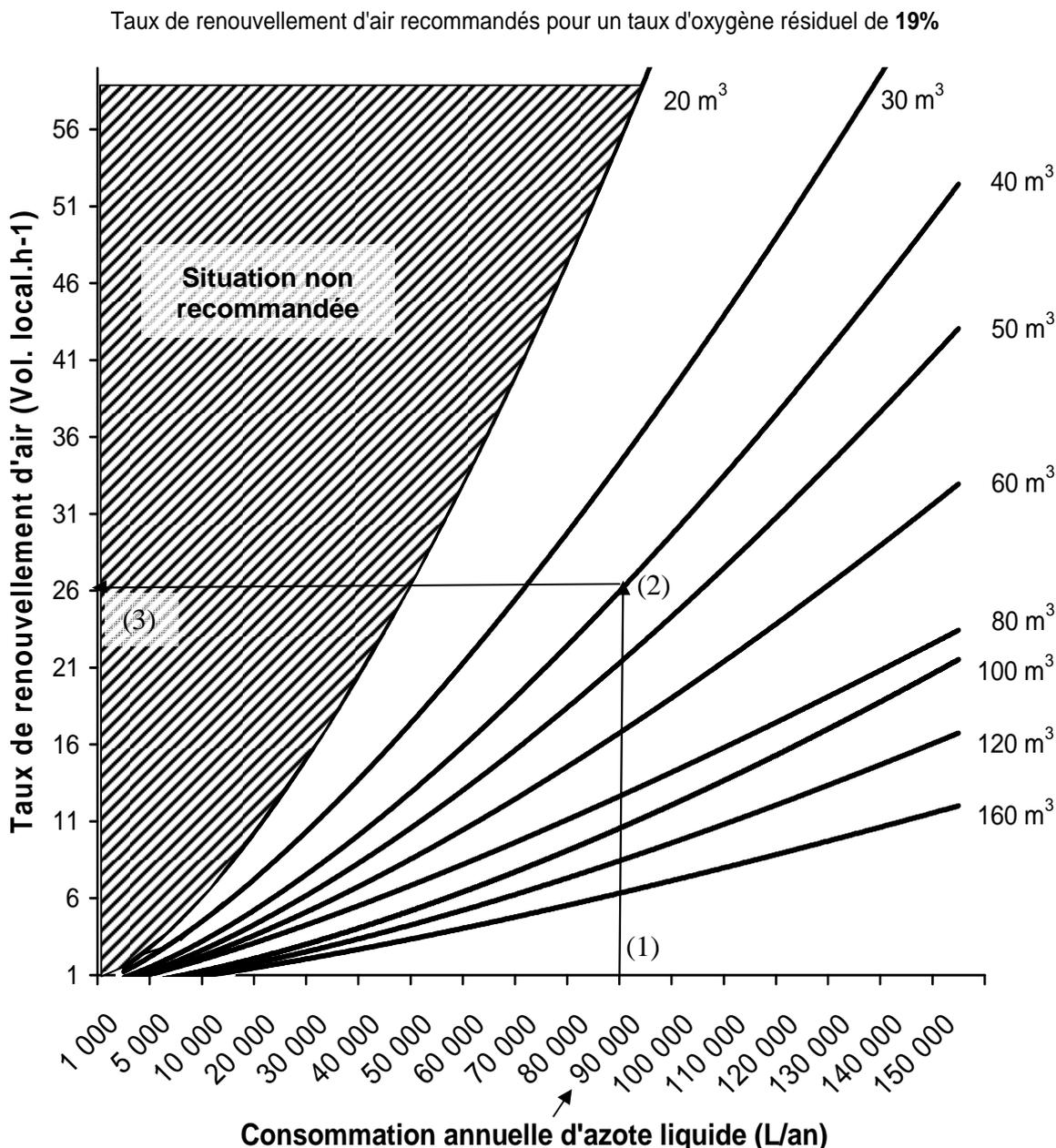


Figure 18 : Taux de renouvellement d'air recommandés pour la ventilation continue d'un local d'AMP (Abaque simplifié)

Utilisation de l'abaque « schématique » :

- 1) Sélectionner la consommation annuelle d'azote liquide dans le local
- 2) Tracer une droite verticale jusqu'à la courbe correspondant à la surface du local (de 20 à 160 m²)
- 3) Lire la valeur minimale recommandée du taux de renouvellement d'air en continu dans le local, en ordonnée.

Exemple : Pour une consommation de 90 000 l/an, dans un local de 40 m², le taux de renouvellement d'air minimal recommandé en continu est de l'ordre de 25 vol.h⁻¹.

8 Recommandations pour la prévention des risques liés à l'utilisation de l'Azote Liquide dans des laboratoires d'AMP

Les recommandations s'appuient notamment sur les dangers et risques identifiés et évalués dans le cadre de cette expertise, ainsi que sur le bilan des réglementations et recommandations applicables à l'azote liquide en France et à l'étranger.

Elles portent sur l'équipement des locaux, la mise en place de dispositifs de protection collective, le port d'équipements de protection individuelle, les procédures à mettre en œuvre lors des opérations normalement pratiquées dans le cadre de l'AMP, et sur les contrôles périodiques des installations et des équipements de travail qui concernent spécifiquement les laboratoires d'AMP.

8.1 Prévention

Les recommandations décrites ci-après n'ont pas pour objet de fournir des instructions en cas d'accident ou d'important déversement d'azote liquide dans un local. En effet, sauf formation particulière avec mise en œuvre d'appareils de protection respiratoire adaptés, il convient dans ce cas d'appeler les secours et de ne pas pénétrer dans le local.

En cas d'asphyxie d'une personne, la priorité est d'éviter le suraccident. Dans de nombreux cas, la personne découvrant son collègue inanimé sur le sol se précipite pour le secourir et est à son tour victime d'asphyxie. Il faut en premier lieu alerter les services de secours, ventiler le local et évaluer s'il existe une possibilité de sortir la victime en toute sécurité. La zone à risque doit être identifiée, signalée et interdite d'accès jusqu'à un retour à une situation normale. Les agents doivent avoir reçu des consignes spécifiques en cas d'accident.

A noter que selon les laboratoires, d'autres risques non directement liés à l'utilisation d'azote liquide peuvent exister (risques électrique, chimique, microbiologique, mécanique...). Pour déterminer si des précautions additionnelles sont éventuellement nécessaires, une analyse de risques prenant en compte les caractéristiques propres à l'installation et à son environnement doit être effectuée.

8.1.1 Protection collective - aménagement des locaux

8.1.1.1 Généralités

Il est recommandé de ne pas manipuler et stocker de l'azote liquide dans des locaux de volume inférieur à 20 m³.

Les locaux où est manipulé l'azote liquide devront être clairement identifiés avec une signalisation des dangers et des équipements de protection individuelle requis via les pictogrammes correspondants. L'accès à ces locaux doit être contrôlé et réservé au seul personnel habilité et spécialement formé.



Danger de froid

Pour permettre une ventilation naturelle suffisante, il est recommandé de ne pas utiliser de locaux souterrains ni pour le stockage ni pour le travail avec l'azote liquide.

Comme les vapeurs froides s'accumulent près du sol, il est important que les locaux ne communiquent pas par des trappes ou d'autres ouvertures (ex : gaine technique) avec des locaux situés à des niveaux inférieurs.

Ces locaux doivent être réservés uniquement au stockage et à la manipulation de produits biologiques (congélation ...) et ne doivent pas comporter de poste de travail autres.

Les locaux dédiés à la congélation ou au stockage dans l'azote liquide doivent être équipés des dispositifs suivants pour assurer la sécurité du personnel :

1. un ou plusieurs appareils de détection et de mesure du taux d'oxygène ;
2. une ventilation mécanique adaptée (extraction et entrée d'air neuf), à deux vitesses ;
3. un oculus ou une partie vitrée permettant l'observation, de manière à ce que la surveillance depuis l'extérieur soit possible en permanence ;
4. une porte munie d'une barre anti panique ouvrant vers l'extérieur du local ;
5. un appareil respiratoire isolant disposé à l'extérieur, à proximité de l'entrée.

8.1.1.2 Mesure du taux d'oxygène

Pour avertir les utilisateurs d'une éventuelle réduction du taux d'oxygène dans les locaux, ils doivent être équipés avec au moins un détecteur d'oxygène pour signaler un taux inférieur à 19%. Il est recommandé d'installer au moins un détecteur par tranche de 50 m³. Ces appareils seront conformes à la norme NF EN 50104.

Les vapeurs froides de l'azote s'accumulant près du sol, il est conseillé d'installer les détecteurs en partie basse et en tout état de cause à une hauteur inférieure à l'hauteur habituelle des voies respiratoires des opérateurs, dans un endroit près des lieux de passage, à proximité des sources de vapeurs et éloigné des bouches d'extraction et d'entrée d'air. Un mauvais emplacement des détecteurs peut conduire à des mesures non représentatives et ainsi déclencher des fausses alarmes.

Il est recommandé de définir un fonctionnement de sécurité en deux temps :

- Lorsque le taux d'oxygène mesuré dans le local atteint 19%, une alarme visuelle doit entraîner l'évacuation du local et la mise en marche automatique de la deuxième vitesse de ventilation (alarme de niveau 1),
- Si le taux d'oxygène décroît malgré la ventilation, lorsqu'il atteint 18%, des alarmes sonore et visuelle doivent s'activer (alarme de niveau 2). Si le local est équipé d'un système de remplissage automatisé depuis un réservoir extérieur, l'alarme de manque d'oxygène doit entraîner la coupure automatique du transfert d'azote liquide depuis le réservoir.

L'alarme émise par le détecteur doit être affichée et signalée par moyen optique et sonore avec renvoi à l'extérieur afin que les utilisateurs présents dans le local ainsi que les utilisateurs qui s'apprêtent à y accéder soient prévenus. L'alarme de niveau 2 sera transmise au poste de sécurité si l'établissement en dispose.

Pour prévenir ces situations, la deuxième vitesse de ventilation peut être mise en route manuellement avant une opération émissive (exemple : remplissage, mise en froid).

8.1.1.3 Ventilation mécanique

Le but d'une ventilation mécanique est de maintenir le taux d'oxygène au-dessus de 19%. Il est donc nécessaire d'adapter la ventilation aux pics d'évaporation qui peuvent se produire lors des opérations de congélation, de manipulation d'azote liquide et de remplissage des conteneurs.

Pour assurer la sécurité du personnel, les locaux doivent être équipés d'une ventilation mécanique adaptée (extraction et entrée d'air neuf), à deux vitesses.

Les taux de renouvellement d'air minimaux recommandés en continu (1^{ère} vitesse) sont définis dans l'abaque ci-après (Tableau XIX).

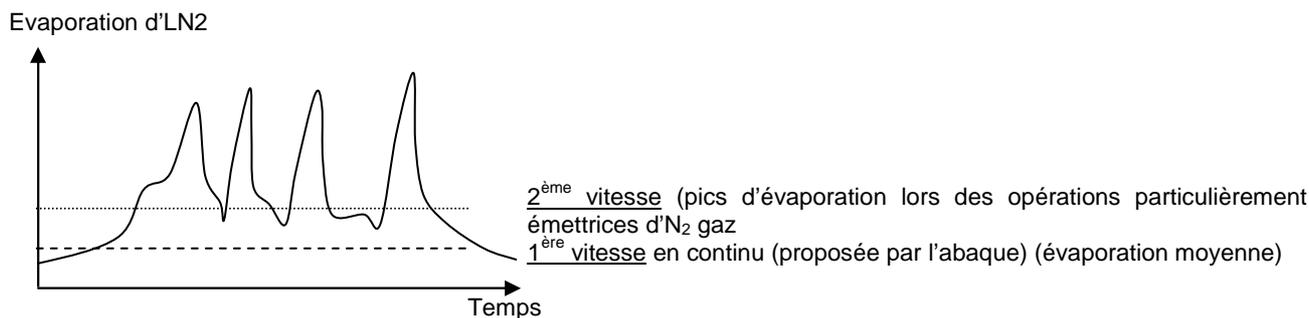


Figure 19 Concept d'utilisation des deux vitesses de ventilation

IMPORTANT

- L'abaque **n'est pas destiné à estimer le taux de renouvellement d'air nécessaire lors des situations particulièrement émettrices d'azote gazeux (situations accidentelles, opérations de refroidissement d'un conteneur ou d'une ligne...)**.
- En aucun cas, le taux de renouvellement d'air ne devra être inférieur à 45 m³.h⁻¹ par occupant, conformément à l'Art. R.232-5-3 du Code du Travail pour les « *ateliers et locaux avec travail physique léger* ».
- L'abaque part de l'hypothèse d'une configuration du local (préférentiellement parallélépipédique afin d'avoir une ventilation homogène dans le local) et un positionnement des oxygénomètres adaptés au stockage et à l'utilisation d'azote liquide.
- Le taux de renouvellement d'air recommandé dans l'abaque n'a pas vocation à se substituer à un dimensionnement de ventilation plus spécifique déterminé par une étude de terrain.
- La lecture de l'abaque par la colonne « Consommation annuelle » est prioritaire à la lecture par la colonne « Capacité de stockage », qui ne doit se faire qu'en l'absence d'information permettant d'estimer la consommation liée à l'utilisation d'azote liquide dans le local, lorsque seule la capacité de stockage est connue.

(En effet, l'estimation du taux de renouvellement d'air associée à une « capacité de stockage » tient compte d'une consommation théorique estimée selon une relation linéaire à partir de la capacité de stockage (Annexe 7).)

- L'abaque doit être utilisé sur la base d'une consommation d'azote liquide estimée sur l'année. Une consommation annuelle extrapolée à partir d'une consommation sur une période plus courte (hebdomadaire, mensuelle...) peut être fortement erronée et donc aboutir à une ventilation inadéquate.

Le code couleur utilisé dans l'abaque (Tableau XIX) est le suivant :

Taux de renouvellement d'air (vol _{local} .h ⁻¹) :	Volume de local ≥ 20m ³	Volume de local < 20m ³
< 6		
6 ≤ ≤ 20		
> 20		

LN₂ : Azote liquide (Liquid Nitrogen)

Tableau XIX : Taux de renouvellement d'air recommandés pour la ventilation continue d'un local d'AMP (Abaque), en $\text{vol}_{\text{local}} \cdot \text{h}^{-1}$

Consommation annuelle d' LN_2 (L/an)	Volume du local (m^3)																Capacité de stockage du local en LN_2 (L)*		
	Volume de local insuffisant							Volume minimal recommandé											
	7	8	10	12	14	16	18	20	25	30	40	50	60	80	100	120		160	
1000	6	6	5	4	3	3	3	2	2	2	1	1	1	1	0,5	0,4	0,3		
4000	7	6	5	4	4	3	3	3	2	2	1	1	1	1	1	0,4	0,3		
5000	9	8	6	5	4	4	3	3	2	2	2	1	1	1	1	1	0,4		
6000	10	10	8	6	5	5	4	4	3	3	2	2	1	1	1	1	0,5		
7000	15	10	9	7	6	6	5	4	4	3	2	2	1	1	1	1	1	50	
8000	15	15	10	9	7	6	6	5	4	3	3	2	2	1	1	1	1	90	
9000	15	15	10	10	8	7	7	6	5	4	3	2	2	1	1	1	1	130	
10000	20	15	15	10	9	8	7	6	5	4	3	3	2	2	1	1	1	170	
15000	25	25	20	15	15	10	10	9	8	6	5	4	3	2	2	2	1	370	
20000	35	30	25	20	20	15	15	15	10	8	6	5	4	3	3	2	2	570	
25000		40	30	25	20	20	15	15	15	10	8	6	5	4	3	3	2	770	
30000		45	40	30	25	25	20	20	15	15	9	8	6	5	4	3	2	970	
35000			45	35	30	30	25	20	20	15	10	9	7	6	4	4	3	1170	
40000			50	40	35	30	30	25	20	15	15	10	8	6	5	4	3	1370	
45000				45	40	35	30	30	25	20	15	10	9	7	6	5	4	1560	
50000				50	45	40	35	30	25	20	15	15	10	8	6	5	4	1760	
55000					50	45	40	35	30	25	15	15	10	9	7	6	4	1960	
60000					55	45	40	40	30	25	20	15	15	9	8	6	5	2160	
65000						50	45	40	35	25	20	15	15	10	8	7	5	2360	
70000						55	50	45	35	30	20	20	15	10	9	7	6	2560	
75000							50	45	40	30	25	20	15	10	9	8	6	2760	
80000							55	50	40	35	25	20	15	15	10	8	6	2960	
85000								55	45	35	25	20	20	15	10	9	7	3160	
90000								55	45	40	30	25	20	15	10	9	7	3360	
95000									50	40	30	25	20	15	10	10	7	3560	
100000										50	40	30	25	20	15	15	10	8	3760
110000											45	35	30	25	15	15	10	9	4150
120000											50	40	30	25	20	15	15	9	4550
130000												40	35	25	20	15	15	10	4950
140000												45	35	30	20	20	15	10	5350
150000													40	30	25	20	15	10	5750

* La lecture de l'abaque par la colonne « Consommation annuelle » est prioritaire à la lecture par la colonne « capacité de stockage », qui ne doit se faire qu'en l'absence d'information permettant d'estimer la consommation liée à l'utilisation d'azote liquide dans le local.

Concernant la 2^{ème} vitesse de ventilation destinée aux situations aiguës d'évaporation de l'azote liquide (opérations de refroidissement d'un conteneur, d'une ligne de transfert...), elle devra donc être significativement supérieure à la 1^{ère} vitesse. La complexité et l'hétérogénéité des phénomènes « aigus » d'évaporation n'ont pas permis d'estimer des taux de renouvellement d'air à recommander pour la 2^{ème} vitesse.

Dans le cas de petits locaux, le taux de renouvellement d'air méritera d'être surdimensionné pour tenir compte de la cinétique d'abaissement plus rapide du taux d'oxygène de l'air lors des opérations particulièrement émettrices d'azote.

L'air sera extrait des locaux en partie basse par une ou plusieurs bouches d'extraction ; l'entrée d'air neuf de compensation sera réalisée par des orifices en partie haute disposés si possible sur la façade opposée de façon à assurer un balayage efficace de l'atmosphère du local et à proscrire toute zone susceptible d'être confinée.

Dans certain cas, un dispositif de contrôle de la température de l'air neuf introduit dans le local peut être nécessaire.

8.1.2 Protection individuelle

L'azote liquide traverse n'importe quel tissu beaucoup plus facilement que l'eau. Les vêtements habituels n'offrent donc pas de protection.

8.1.2.1 Protection des mains

Lors de la manipulation des objets froids, les mains devront être protégées par des gants de protection contre le froid (conformes à la norme EN 511) en matière non-combustible. Des gants à manchette longue, qui ferment bien autour des bras sont préférables pour éviter que le liquide puisse s'introduire dans la manche en cas de déversement accidentel.

A noter que :

- il n'existe aucun gant adapté à l'immersion dans l'azote liquide
- il n'existe pas aujourd'hui de gants adaptés à la manipulation des paillettes et autres matériels de faibles dimensions.

La protection effective des professionnels de laboratoire utilisant de l'azote liquide nécessite donc de développer des équipements de travail permettant de réduire le risque de « brûlure » ou gelure, tout en préservant un confort de manipulation de paillettes et autres matériels de taille similaire.

8.1.2.2 Protection des yeux

Lors des manipulations du liquide des éclaboussures sont toujours possibles et les yeux devront être protégés par des lunettes de protection (conforme à la norme EN166) ou par des visières.

8.1.2.3 Protection des pieds

Le risque le plus important est l'entrée accidentelle d'azote liquide dans les chaussures. Pour minimiser ce risque, les chaussures doivent être fermées et équipées d'un haut de tige bien fermé.

8.1.2.4 Protection du corps

Si des éclaboussures sur le corps sont possibles lors des manipulations, une protection du corps par un tablier en matière non-tissée est nécessaire.

8.1.3 Procédures de travail

Il est recommandé à chaque laboratoire de définir et de formaliser les règles de sécurité relatives à l'accès aux locaux, y compris pour les intervenants extérieurs, et aux opérations exposant potentiellement à l'azote liquide.

Le travail d'une personne isolée dans un laboratoire ne peut être autorisé que dans le cadre d'un dispositif de sécurité adapté.

Les recommandations s'appliquent aux personnels des entreprises extérieures dont les conditions de sécurité sont régies à travers la rédaction du plan de prévention prévu dans le code du travail.

Protection obligatoire :



de la vue



du visage



du corps



des mains



des pieds

8.1.4 Stockage, remplissage et installations de remplissage

8.1.4.1 Réipients

Il est recommandé de n'utiliser que des récipients conçus pour contenir de l'azote liquide **avec leurs propres dispositifs d'obturation**. Le risque principal est l'éclatement du récipient suite à un bouchage par fermeture étanche du récipient ou par dépôt de glace dans son col. Les bouchons non étanches fournis par le fabricant sont prévus pour éviter le dépôt de glace dans le col ainsi que la condensation d'oxygène dans le récipient pour les récipients non pressurisés. La mise en œuvre de bouteilles « thermos » du commerce avec leur bouchon hermétique est à proscrire.

Refroidissement et remplissage

Lors des remplissages une partie de l'azote liquide s'évapore à cause de l'expansion du liquide et du refroidissement d'éléments chauds. Le refroidissement des conteneurs à température ambiante génère des débits de vapeurs importants qui peuvent dépasser la capacité du système de ventilation et donc réduire le taux d'oxygène dans l'air du local. Pour cette raison le débit d'azote liquide doit être limité lors du refroidissement ou le refroidissement doit se faire à l'extérieur du bâtiment. Le remplissage des conteneurs sera effectué si possible en dehors des heures de travail normal, une méthode de remplissage automatique sera donc choisie préférentiellement au remplissage manuel.

8.1.4.2 Systèmes de remplissage par ligne de transfert

Dans les laboratoires effectuant une activité de conservation à long terme, l'alimentation d'azote liquide par une ligne de transfert à partir d'un réservoir de stockage extérieur, est préférable.

Dans ce cas, cette ligne « superisolée » sous vide devra être conçue afin de minimiser les pertes par évaporation. Afin d'éviter tout risque d'éclatement elle sera munie de soupapes de sécurité ou de disques de rupture. Dans le cas de ligne de transfert de grande longueur, il y aura lieu de l'équiper d'une vanne d'évent à l'air libre (vanne de dégazage) avant son entrée dans le local pour l'évacuation des vapeurs d'azote lors du refroidissement de la ligne.

Il doit être tenu compte dans l'évaluation des risques qu'un éventuel dysfonctionnement des vannes de la ligne de transfert est susceptible d'introduire une forte quantité d'azote dans le local.

En conséquence, l'alimentation en azote liquide doit être coupée par l'alarme basse de manque d'oxygène (18%) et un arrêt d'urgence doit être accessible à l'extérieur du local.

8.1.5 Transport

8.1.5.1 Transport dans le laboratoire ou l'établissement

Le transport d'azote liquide par un escalier est potentiellement dangereux à cause du risque élevé de déversement voire de chute.

A cause du volume très restreint des ascenseurs et comme leur ventilation s'arrête en cas de coupure de courant, le transport d'azote liquide ne doit être autorisé que **non-accompagné** et seulement dans des ascenseurs pouvant être verrouillés pour le transport.

Pour les faibles quantités, l'utilisation d'un Dewar spécifique dans un dispositif permettant d'assurer sa stabilité ou d'un conteneur de transport en vapeur avec absorption de l'azote liquide en paroi poreuse est recommandée. L'utilisation de « bouteilles thermos » est à proscrire.

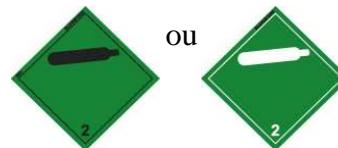
8.1.5.2 Transport par la route

Pour le transport d'azote liquide par la route les réglementations ADR sont applicables. Selon l'ADR le transport d'échantillons médicaux ou biologiques est permis dans des récipients à double paroi non refermables. L'utilisation d'un Dewar dans un dispositif permettant d'assurer sa stabilité ou d'un conteneur à paroi poreuse est recommandée.

Le transport en faible quantité dans un véhicule de tourisme est potentiellement dangereux à cause de l'évaporation de l'azote dans l'habitacle.

Dans ce cas, il est recommandé de rouler avec une vitre ouverte.

Les voitures avec un compartiment fret séparé sont recommandées avec utilisation de Dewar adaptés avec leur caisse de transport et solidement arrimés. Le récipient sera identifié par les pictogrammes illustrés à ci-contre.



8.1.6 Formation du personnel

Toute personne appelée à manipuler de l'azote liquide doit avoir reçu une formation spécifique, renouvelée régulièrement, conformément au code du travail.

Le programme de la formation doit notamment apporter des connaissances dans les domaines suivants :

- La respiration et les échanges gazeux
- Les caractéristiques physiques et chimiques de l'azote
- Les risques liés à l'utilisation de l'azote liquide (surpression, brûlure cryogénique, anoxie)
- Les moyens techniques et organisationnels développés pour la prévention lors des opérations à risques (présentation des équipements cryogéniques et des installations).

Ainsi, au terme de la formation, l'utilisateur d'azote liquide doit être capable de :

- Evaluer les risques associés aux différentes opérations
- Appliquer les principes de prévention :
 - o Connaître l'installation de sécurité et comprendre son fonctionnement
 - o Mettre en œuvre les équipements de protection collective
 - o Mettre en œuvre les équipements de protection individuelle (y compris une formation spécifique à l'utilisation des Appareils Respiratoires Isolants).
- Participer à la rédaction des procédures d'utilisation de l'azote liquide en sécurité et les faire respecter
- Détecter un dysfonctionnement ou une anomalie
- Appliquer les consignes prévues en cas d'accident (asphyxie, déversement, brûlures cryogéniques ...)

Le personnel occupant les locaux voisins devra recevoir une information sur le sujet.

8.2 Contrôles périodiques

Ce chapitre ne vise pas à dresser la liste exhaustive des dispositions générales relatives au contrôle des installations et des équipements de travail. Ne sont mentionnés ci-après que les contrôles concernant spécifiquement les laboratoires d'Assistance Médicale à la Procréation.

8.2.1 Contrôles réglementaires

L'arrêté du 8 octobre 1987 relatif au contrôle périodique des installations d'aération et d'assainissement des locaux de travail prévoit des contrôles annuels sur les installations de ventilation des locaux à pollution spécifique. Ils portent sur :

- Un examen de l'état de tous les éléments de l'installation (systèmes d'introduction, de captage, d'extraction, conduits, ventilateurs...)
- Des essais de pressions statiques ou de vitesses d'air aux points caractéristiques de l'installation
- Le mesurage du débit global d'air extrait par l'installation ; les méthodes de mesurage dans les gaines de ventilation sont précisées par les normes NF EN ISO 5167-1 et NF X 10-112.

Les Appareils Respiratoires Isolants, en tant qu'Équipements de Protection Individuelle destinés à des interventions accidentelles en milieu hostile, doivent être entretenus et vérifiés tous les ans (arrêté du 19 mars 1993 fixant la liste des équipements de protection individuelle qui doivent faire l'objet des vérifications générales périodiques prévues à l'article R. 233-42-2 du code du travail).

L'ensemble de ces contrôles doit être effectué par une personne compétente, il n'existe aucune obligation d'agrément.

Les dates des contrôles et des interventions doivent être consignées.

8.2.2 Autres dispositions

Il convient d'inspecter régulièrement l'état des éléments de l'installation, notamment le serrage des raccords et l'état des flexibles.

Une attention particulière sera portée sur la vérification et le calibrage des détecteurs d'oxygène qui doivent respecter les exigences des constructeurs notamment en ce qui concerne l'entretien et l'étalonnage.

Concernant les équipements, un contrôle triennal des récipients cryogéniques est prévu par les normes européennes EN 1251-3 et EN 13458-3.

Enfin, le groupe de travail recommande à l'Agence de la Biomédecine de mettre en place la traçabilité des incidents et accidents liés à l'utilisation d'azote liquide.

9 Conclusions

A ce jour, il n'existe pas de réglementation spécifique relative à la prévention des risques lors de l'utilisation de l'azote liquide dans les laboratoires d'AMP. L'état des lieux des réglementations en vigueur en France montre que la prévention des risques spécifiques relatifs à l'utilisation d'azote liquide est peu cadrée sur le plan réglementaire et sur celui des recommandations, en regard du nombre importants de centre d'AMP intéressés et des quantités d'azote liquide mises en œuvre. Deux arrêtés, non applicables aux laboratoires d'AMP et qui concernent les bonnes pratiques lors du prélèvement, du transport, de la transformation, de la conservation des cellules souches hématopoïétiques issues du corps humain, des cellules mononuclées sanguines et des tissus d'origine humaine utilisés à des fins thérapeutiques, apportent toutefois des éléments sur la sécurité des locaux (système de ventilation, détecteur d'oxygène et alarme, matériaux, consignes de sécurité).

A l'échelle nationale comme internationale, les règles de sécurité sont développées par les fournisseurs et les « grands consommateurs », sous la forme de recommandations.

- Identification et caractérisation des dangers

Il y a lieu de rappeler en premier que l'azote, constituant majeur de l'air, ne présente pas intrinsèquement de toxicité particulière.

En ce qui concerne l'utilisation de l'azote liquide, bien que les risques soient difficilement quantifiables du fait de la grande hétérogénéité des situations de travail et des configurations de locaux.

Cette situation engendre des niveaux de sécurité hétérogènes en fonction des lieux de travail alors que les principaux dangers de l'azote liquide, que sont les gelures et l'asphyxie, sont décrits dans la littérature scientifique. Si le premier est bien connu du fait de la température extrêmement basse de l'azote à l'état liquide (-196°C), le second l'est beaucoup moins, bien qu'il puisse être fatal. Le risque d'asphyxie est lié à la capacité de l'azote liquide à générer rapidement par évaporation un important volume d'azote gazeux, provoquant ainsi une réduction du taux d'oxygène de l'air par déplacement et dilution de l'oxygène. Selon la réduction de la teneur en oxygène en dessous de 18%, les principaux effets vont de la diminution réversible des performances physiques et intellectuelles, à une altération ou une perte de conscience, voire des lésions cérébrales irréversibles et la mort. Ce risque est d'autant plus pernicieux que l'azote gazeux, incolore et inodore, possède de très mauvaises propriétés d'alerte.

Les très basses températures de l'azote liquide et son important volume d'expansion en azote gazeux à température ambiante sont également sources de dommages sur les équipements et installations, et peuvent aboutir à des accidents tels que l'éclatement d'un récipient ou d'un conduit (augmentation rapide de pression), la fragilisation et le bris d'équipements, d'outils ou autres matériaux. Il peut provoquer une réaction explosive ou une inflammation suite à la condensation et concentration de l'oxygène de l'air en oxygène liquide.

- Evaluation du risques hypoxique - Etudes de scenarii d'exposition

D'après une enquête conduite en 2006 par l'Agence de la Biomédecine, la France compte 98 laboratoires d'assistance médicale à la procréation déclarant utiliser de l'azote liquide. D'après cette enquête, seuls 60% des locaux sont équipés d'un système de ventilation (mécanique) continue, 45% d'un dispositif de mesure du taux d'oxygène, et 27% d'un système de ventilation asservi au dispositif de mesure. En dehors de toutes considérations sur le débit d'extraction, 37% des locaux ne sont pas pourvus d'un système de ventilation mécanique alors que le volume d'azote liquide qui y est stocké par rapport au volume du local nécessiterait une telle installation afin de limiter le risque d'hypoxie. La description des installations, des locaux et des activités de travail dans les salles renfermant de l'azote liquide montre que les risques au sein des laboratoires d'AMP français doivent être mieux maîtrisés.

Afin d'évaluer le risque hypoxique pour le personnel, la quantité maximale d'azote liquide pouvant s'évaporer dans des circonstances caractéristiques de l'activité de biologie de la reproduction, a été estimée, pour ensuite calculer la déplétion maximale d'oxygène dans l'air d'un local consécutive à cette évaporation. Les taux d'oxygène résiduels, calculés sous différentes conditions de ventilation et de volume de local, ont été confrontés aux effets sanitaires communément associés à ces taux d'oxygène :

- Les résultats montrent globalement un faible impact de l'évaporation naturelle des récipients stockés sur le taux d'oxygène de l'air d'un local, et par conséquent sur la santé.
- Pour la mise à niveau d'un récipient en azote liquide (remplissage pour garantir que les produits biologiques soient immergés en permanence), le risque hypoxique apparaît fortement conditionné par la ventilation et le volume du local et est globalement écarté dès lors que le volume du local est important (150 m^3), ou que la ventilation est forcée ($20 \text{ vol}_{\text{local}} \cdot \text{h}^{-1}$, sauf pour des locaux très réduits de 10 m^3).
- Le remplissage de mise en froid d'un conteneur volumineux de 660 L (opération peu fréquente en AMP) implique une évaporation d'azote liquide relativement forte au début du remplissage du fait de la différence de température entre les parois du conteneur et l'azote liquide. Les résultats issus d'une modélisation de mesures expérimentales (donc spécifiques aux conditions d'expérience) montrent effectivement une décroissance du taux d'oxygène dans les premières minutes. La pente de cette décroissance est conditionnée par la ventilation et le volume du local. Un risque d'hypoxie grave voire vital apparaît dans un local très réduit de 10 m^3 , de possibles effets plus ou moins graves selon le taux de ventilation dans 30 m^3 , a priori pas de risque particulier dans un local de 150 m^3 quelque soit la ventilation considérée.
- Pour le scénario de renversement accidentel d'un récipient (5, 10 et 60 L) basé sur des hypothèses de calcul majorantes en termes de risque hypoxique, sont observés des taux d'oxygène particulièrement dangereux pouvant induire une diminution des performances physiques et intellectuelles, allant jusqu'à l'évanouissement voire la mort, lorsqu'il s'agit de locaux de faible volume (moins de 30 m^3). Le risque est minimisé dans des locaux de grand volume (150 m^3).

Les résultats de ces travaux illustrent bien l'influence de paramètres tels que le volume des locaux et leur ventilation dans la prévention du risque hypoxique lié à l'utilisation d'azote liquide. Ils constituent, avec l'identification et l'évaluation des dangers et risques réalisées et avec le bilan des réglementations et recommandations applicables à l'azote liquide en France et à l'étranger, les principaux éléments de base permettant au groupe de travail de l'Afsset de proposer des recommandations de prévention des risques liés à l'utilisation de l'azote liquide en AMP. Ces recommandations portent sur :

- La mise en œuvre de protections collectives et aménagement des locaux, (accès, volume, ventilation, détecteur d'oxygène, ...)
- La mise à disposition et le port de protections individuelles (port de gants, lunettes ou visières, appareil de protection respiratoire isolant, ...)
- Les procédures de travail
- Le stockage, le remplissage et les installations de remplissage
- Le transport
- La formation du personnel
- Les contrôles périodiques

Le groupe de travail propose également un abaque permettant de définir le taux de renouvellement d'air minimal en continu, recommandé dans un local contenant de l'azote liquide afin de respecter une teneur minimale en oxygène de 19%

Ces recommandations destinées aux gestionnaires et aux professionnels de l'assistance médicale à la procréation peuvent être extrapolées, pour beaucoup, à d'autres utilisations de l'azote liquide.

10 Bibliographie

10.1 Publications, Rapports, ouvrages, thèses

ACGIH. (2005). **Threshold Limit Values (TLVs®) for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices (BEIs®)**. American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Cincinnati.

ACGIH, (2001). **Nitrogen TLV**. *Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices* : 7th Ed.

Agence de la biomédecine. (2006) **Analyse descriptive des données de l'enquête azote**. Non publié

BCC (1991). **Cryogenics safety manual: a guide to good practice**. 3rd ed. Butterworth Heinemann.1346-1347

BIT. (2006). **Encyclopédie de sécurité et de santé au travail, Guides des unités, des abréviations, et des acronymes**. 3^{ème} édition française. 105-10.

BCGA. (2000). **The safe use of liquid nitrogen dewars up to 50 litres**, Code of practice CP 30

Bretherick L. (1990). **Handbook of Reactive Chemical Hazards**. 4th ed. Boston. MA: Butterworth-Heinemann Ltd

Caravati CM., Wood BT., Richardson DR. (1969). **Onychodystrophies secondary to liquid nitrogen cryotherapy**. *Arch Dermatol*. Octobre 1969;100(4):441-2

Clayton GD et Clayton FE. (1994). **Patty's Industrial Hygiene and Toxicology**. *Toxicology (4th edition)*. 2F : 4563-4565.

CCOHS (2006-a). **Nitrogen gas**. <http://ccinfoweb2.ccohs.ca/cheminfo>. Consulté le 18 septembre 2006.

CCOHS (2006-b). **Nitrogen Liquid**. <http://ccinfoweb2.ccohs.ca/cheminfo>. Consulté le 19 septembre 2006.

CCOHS. (2002). **How to work safely with cryogenic liquids**. <http://www.cchst.ca/reponsesst/chemicals/cryogenic/cryogen1.html> (mise à jour : 16 octobre 2002)

CGA (2007). **Hazards Of Nitrogen/Inert Gas Creating An Oxygen-Deficient Atmosphere**. Safety Alert. SA-17

CGA (1981). **Handbook of compressed gases**. 2nd ed. Van Reinhold. 412-417

Cook D., Georgouras K. (1993). **Nitrogen emphysema: a complication of cryotherapy**. *Med J Aust*. Dec 6-20;159(11-12):836

CNAMTS (1986). **Cuves et réservoirs**. R 276. INRS

David G. (2004). **Naissance du premier CECOS – un défi et un pari**. *La tribune des CECOS* 2004. 15 : 3-5

Dehart RL, Davis JR (2002). **Fundamentals of Aerospace Medicine**. 3rd edition. Lippincott Williams & Wilkins. p.32. Philadelphie.

- DFG. (2002). **List of MAK and BAT Values 2002**. Report No. 38. Deutsche Forschungsgemeinschaft. Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area. Wiley-VCH. Weinheim. Federal Republic of Germany.
- Doyon M. <http://serabec.org/chronique/hypoxie.htm>. Consulté en juillet 2007.
- Dwyer DM. et al. (1990). **Liquid nitrogen installation can cause venous gas embolism**. *Anesthesiology* : 73 : 179-181
- Edeskuty F.J et Walter F.S. (1996). **Safety in the Handling of Cryogenic Fluids**. Los Alamos National Laboratory. Plenum Press. NY and London.
- EIGA (2006). **Definitions of Oxygen Enrichment/Deficiency Safety Criteria**. Position Paper PP-14
- EIGA (2004-b). **The Pressure Equipment Directive Reassessment of static cryogenic vessels for use in the European Union**. Position Paper PP-09
- EIGA (2003-a). **L'asphyxie – un tueur silencieux. L'EIGA lance une campagne contre l'asphyxie**. Safety Newsletter, SAG NL 77/03/F.
- EIGA (2003-b). **Operation Of Static Cryogenic Vessels**. IGC Doc 114/03/E
- EIGA (2000). **Hazards of inert gases**. IGC, Doc 44/00/E
- Empereire JC, Hurpy R, Rivière J. (1973). **Congélation comparée des spermatozoïdes humains et bovins : application à la mise au point d'une méthode de congélation du sperme humain en paillettes fines**. *J. Gyn. Obst. Biol. Repr.* 2 : 707-719
- Epstein AM. et Shupack JL. (1977). **Syncope associated with liquid nitrogen therapy**. *Arch. Dermatol.*, 113 : 847
- Finelli.P.F. (1975). **Ulnar neuropathy after liquid nitrogen cryotherapy**. *Arch Dermatol.* 111:1340-1342
- Golstein N. (1979). **Cardiac arrest following application of liquid nitrogen**. *Dermatol. Surg. Oncol.* 5:602
- Grant W.M. et Schuman J.S. (1993). **Toxicology of the eye: Effects on the Eyes and Visual System from Chemicals, Drugs, Metals and Minerals, Plants, Toxins and Venoms; also Systemic Side Effects from Eye Medications** By W. Morton Grant, Joel S. Schuman. 4th edition.
- Haefer R.A. (1981). **Kryo-Vakuumtechnik: Grundlagen und Anwendungen**. Springer-Verlag. Berlin
- Hartwig G. (1994). **Polymer properties at room and cryogenic temperatures**. Plenum Press. The international cryogenics monograph series.
- Hempseed JW. (1991). **Safety considerations in using liquid nitrogen**. *Loss Prevention Bulletin* : 097 : 1-3
- Hennebicq S. et les membres de la Fédération française des CECOS. (2004). **30 années de CECOS : 30 années de bilans. Bilan de l'activité des CECOS de la création des premiers centres en 1973 jusqu'au dernier bilan annuel recensé en 2002**. La tribune des CECOS 2004.15 : 12-15
- Holmer I., Geng Q., Havenith G., den Hartog E., Rintamaki H., Malchaire F. and Piette A. (2003). **Temperature limit values for cold touchable surfaces**, Final report on the project SMT4-CT97-2149. Arbete och Hälsa -Vetenskaplig Skriftserie, Arbetslivsinstitutet
- IARC. (2004). **List of all agents, mixtures and exposures evaluated to date**. *IARC Monographs: Overall Evaluations of Carcinogenicity to Humans*. 1-88.1972 : World Health Organization, International Agency for Research on Cancer.

- INRA. (2006). **Conditions d'utilisation de l'azote liquide**. Les Guides de la Prévention. Mission Centrale Prévention. S-23. (non publié)
- INRS (2006). **Les espaces confinés. Préconisations en vue d'assurer la sécurité et la protection de la santé des personnels d'exploitation**. ED 967
- INRS (2007). **Valeurs limites d'exposition professionnelle aux agents chimiques en France**. ED 984
- INSERM (2002). **Règles de stockage et de manipulation de l'azote liquide**. Fiche technique. Santé et sécurité. Bureau des conditions de travail.
- IPCS/CEC (1999). **International Chemical Safety Card on Oxygen**. <http://www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics0138.htm>
- IRIS. (2004). **Integrated Risk Information System (IRIS) Substance Reports**. United States Environmental Protection Agency. Office of Research and Development. National Center for Environmental Assessment. Washington DC
- Kolbusz A.M. et O'Donohue J.L. 1993. **Observation de Kolbusz A.M. et O'Donohue J.L. extraite de la notice Micromedex® « Liquid Nitrogen »**. Base de données Micromedex® consultée le 19 septembre 2007 (<http://csi.micromedex.com>).
- Kumar A.A. (1975). **Liquid nitrogen cryotherapy in the treatment of benign skin lesions**. J. Fam. Pract. 2 : 221-224.)
- Merkblätter AD. (1987). **Materials for pressure vessels**. W10.
- NIOSH. (2003). **Pocket Guide to Chemical Hazards**. National Institute for Occupational Safety and Health. Cincinnati. OH.
- Nix TE. (1965). **Liquid nitrogen neuropathy**. Arch Dermatol 92 : 185-188
- Noriko T. (1995). **On an accident by liquid nitrogen - histological changes of skin in cold**. *Forensic Science International* : 76 : 61-67
- NTP. (2005). **Report on Carcinogens**, Eleventh Edition. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. National Toxicology Program. Research Triangle Park, NC.
- OSHA (2004). **Cryogenic Liquid Use (Research)**. Occupational safety and environmental health guideline
- Perinić G. (2007-a). http://gperinic.web.cern.ch/gperinic/kryokurs/fr/kryok_21.htm. Consulté en juillet 2007
- Perinić G.(2007-b). **Sécurité en cryogénie**. CERN
- Porcu E, Fabbri R, Damiano G, Giunchi S, Fratto R, Ciotti PM (2000). **Clinical experience and applications of ovocyte cryopreservation**. Mol Cell Endocrinol.169 : 33-37
- Priollet P.et Mouthon JM. (1996) **Phénomène de Raynaud**. In Traité de médecine. Pierre Godeau et Coll
- Rockswold G. et al. (1982). **Inhalation of liquid nitrogen vapeur**. *Annals of Emergency Medicine*: 11/10 : 553-555
- Royal school of veterinary studies (2006). **Handling liquid nitrogen, University Edinburgh**. Veterinary Biomedical Sciences..
- Royal Free Hampstead NHS Trust & Royal Free & University collège Medical School. (2004). **Code of practice : Safe use of liquid nitrogen**.

Santé Canada. (2006). **Guide du transport médical d'urgence à l'intention du personnel infirmier en soins primaires, Chapitre 2, Tableau 2-4 : Manifestations cliniques de l'hypoxie.** http://www.hc-sc.gc.ca/fnih-spni/pubs/nursing-infirm/2002_transport-guide/chap_2_f.html#2-4 (mise à jour : 31 août 2006).

Smith A.H. et Polge C. (1950). **Survival of spermatozoa at low temperatures.** Nature (London), 166, 668-671

University of Bath. (2005), **Cryogenic materials. The risk posed by using them.** Département of biology & biochemistry.

University of Wales. Bangor. (2001). **Guidance on the handling, storage and transportation of liquid nitrogen.** *Guidance note OHSU G25.* Occupational health and safety unit.

US CSB. (2003). **Hazard of nitrogen asphyxiation.** Safety bulletin. 2003-10-B.

Wingfield DL. et Fraunfelder FT. (1979). Possible complications secondary to cryotherapy. *Ophthalmic Surg.* 10(8) : 47-55

10.2 Textes réglementaires

Code du travail, « Aération et assainement » livre II, titre III, chap II, section II, art. R 232-5 -1 à 12 et chap V, section II, art. R 235-2-6 et s.

Arrêté du 29 décembre 1998 portant homologation des règles de bonnes pratiques relatives à la conservation, à la transformation et au transport des tissus d'origine humaine utilisés à des fins thérapeutiques - NOR: MESP9824165A - J.O n°6 du 8 janvier 1999 page 389

Arrêté du 16 décembre 1998 portant homologation des règles de bonnes pratiques relatives au prélèvement, au transport, à la transformation, y compris la conservation, des cellules souches hématopoïétiques issues du corps humain et des cellules mononucléées sanguines utilisées à des fins thérapeutiques - NOR: MESP9824006A - J.O n°30 2 du 30 décembre 1998 page 19824

10.3 Normes

NF EN 511 (juin 2006). **Gants de protection contre le froid.** AFNOR

NF EN 13458-3 (septembre 2003). **Réceptacles cryogéniques - Réceptacles fixes isolés sous vide - Partie 3 : exigences opérationnelles.** AFNOR (Indice de classement E86-504-3)

NF EN ISO 5167-1 (juin 2003). **Mesure de débit des fluides au moyen d'appareils déprimogènes insérés dans des conduites en charge de section circulaire. - Partie 1 : principes généraux et exigences générales.** AFNOR (indice de classement X10-102-1)

NF X 50-110 (mai 2003). **Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise.** AFNOR (indice de classement X 50-110).

NF EN 1251-3 (Mars 2000). **Réceptacles cryogéniques - Réceptacles transportables, isolés sous vide, d'un volume n'excédant pas 1000 litres - Partie 3 : exigences de fonctionnement.** AFNOR (Indice de classement E86-500-3)

NF EN 50104 (Décembre 1995). **Appareils électriques de détection et de mesure d'oxygène - Règles de fonctionnement et méthodes d'essais.** AFNOR (Indice de classement : C23-564)

NF X 10-112 (Septembre 1977). **Mesure de débit des fluides dans les conduites fermées - Méthode d'exploration du champ des vitesses pour des écoulements réguliers au moyen de tubes de Pitot doubles.** AFNOR (Indice de classement X10-112)

10.4 Communications, actes de conférences, liens internet

CERN. (1998). **Instruction de sécurité, Utilisation des fluides cryogéniques**. TIS-IS 47

CCHST, consulté en juillet 2007

<http://www.cchst.ca/reponsesst/chemicals/cryogenic/cryogen1.html>

IPCS

<http://www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics0138.htm>

OSHA, consulté le 18 septembre 2006

<http://www.osha.gov>.

Royal school of veterinary studies, consulté le 7 novembre 2006

<http://www.vet.ed.ac.uk>.

Royal Free Hampstead NHS Trust & Royal Free & University collège Medical School, consulté le 5 juillet 2006

<http://www.univ-montp2.fr>

Université de montpellier, consulté le 5 juillet 2006

<http://www.univ-montp2.fr>.

University of Bath Consulté le 11 juillet 2006

<http://internal.bath.ac.uk>.

University of Saint Andrews, consulté le 8 août 2006

<http://www.st-andrews.ac.uk>.

University of Wales. Bangor, consulté le 11 juillet 2006

<http://www.bangor.ac.uk>.

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre de saisine



COURRIER REÇU LE

14 AVR. 2006

Direction médicale et scientifique

Dossier suivi par
Docteur Françoise MERLET
Pôle Stratégie PEGH
Tél : 01 55 93 65 09
Fax : 01 55 93 65 13
francoise.merlet@biomedecine.fr

Docteur Marie-Annick LIE POGAM
Pôle Evaluation PEGH
Tél : 01 55 93 65 16
Fax : 01 55 93 65 30
marieannick.liepogam@biomedecine.fr

Ref : ONIS/Stratégie/FMVLB 2006-016

La directrice générale

à

Madame la directrice générale
Agence française de sécurité sanitaire de
l'environnement et du travail
AFSSET
253 avenue du général Leclerc
94701 MAISONS ALFORT Cedex

Saint-Denis, le 11 avril 2006

Objet : Prévention du risque relatif à l'utilisation de l'azote liquide dans le cadre des activités biologiques d'assistance médicale à la procréation

PJ : Questionnaire azote

Madame la directrice générale,

L'Agence de la biomédecine, compétente dans le domaine de l'assistance médicale à la procréation (AMP), est chargée d'élaborer des règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques que devront respecter les structures autorisées pour ces activités.

Au cours des différentes phases d'AMP, les professionnels sont amenés à conserver des gamètes et des embryons humains dans l'azote liquide.

Les membres de l'Agence et les professionnels de l'AMP, qui travaillent sur la rédaction de ces bonnes pratiques, souhaitent connaître la réglementation en vigueur en matière d'installation cryogénique. A défaut, ils envisagent d'intégrer dans le document final, qui sera publié sous forme d'un arrêté opposable, des recommandations relatives à la prévention du risque lié à l'utilisation d'azote liquide, notamment en terme d'installations.

Ceci nécessite une évaluation des risques spécifiques au domaine de l'AMP, afin de définir des mesures minimales à imposer aux centres, les situations étant très hétérogènes entre les laboratoires, en terme de volume d'activité, de superficie des locaux dédiés à la conservation et de taille des cuves. A cet effet, et dans un premier temps, un état des lieux sera réalisé par mes services afin d'appréhender au mieux les conditions actuelles d'utilisation de l'azote liquide dans les laboratoires de biologie de la reproduction.

Vous trouverez, ci-joint, le projet de questionnaire relatif à l'enquête que l'Agence effectuera courant avril auprès des laboratoires concernés.

Pour mener à bien ces travaux, je me permets de solliciter votre collaboration à l'analyse du risque auquel sont soumis les professionnels de l'AMP et à la définition de préconisations spécifiques en ce domaine qui devront être définies pour juin 2006 au plus tard.

1 avenue du Stade de France
93212 SAINT-DENIS LA PLAINE CEDEX
Tél : 01 55 93 65 50 - Fax : 01 55 93 85 55

www.agence-biomedecine.fr

Par ailleurs, je souhaite mettre en œuvre cette enquête auprès des centres très rapidement, et je vous saurais gré de bien vouloir faire parvenir, dans les plus brefs délais, vos observations ou commentaires éventuels au docteur Françoise MERLET (francoise.merlet@biomedecine.fr ; Tél. : 01 55 93 65 09)

Je vous prie de croire, Madame la directrice générale, à l'assurance de ma considération la meilleure.

Carine CAMBY



Directrice générale

FICHE N°1

ÉTABLISSEMENT AUTORISÉ

Établissement de Santé ou LABM

FINESS :

Nom :

Adresse :

Code postal :

Ville :

Personne contact

Nom :

Prénom :

Tél. :

E-mail :

Vous utilisez de l'azote dans votre laboratoire : oui non

Vous disposez de cuves et/ou de bonbonnes
au sein du laboratoire : oui non

- Si oui, merci de remplir le questionnaire ci-dessous.
- Si non, merci de nous retourner le questionnaire vierge.

QUESTIONNAIRE

Veillez remplir une **fiche n°2 par salle** (pièce individualisée et fermée par une porte)
contenant :

- Des cuves et/ou des bonbonnes de conservation de gamètes ou d'embryons,
- Des bonbonnes de réserve d'azote,
- Des bonbonnes pressurisées d'azote.

Et une **fiche n°3** concernant les aspects descriptifs des incidents ou accidents ayant été
constatés dans votre laboratoire.

Nombre total de fiches n°2 transmises à l'Agence de la biomédecine : _____

Document à retourner à :

Nathalie Estève
Direction Médicale et Scientifique
Pôle Evaluation
Tél : 01 55 93 69 20 Fax : 01 55 93 69 30
E-mail : nathalie.esteve@biomedecine.fr

Agence de Biomédecine
1 avenue du Stade de France
93212 SAINT-DENIS LA PLAINE CEDEX

FICHE N°2



REPLIR UNE FICHE PAR SALLE (PHOTOCOPIER CETTE FICHE AUTANT QUE DE BESOIN).

I. Caractéristiques concernant la salle

Surface au sol : _____ m²

Volume de la salle : _____ m³

La salle bénéficie d'un accès réglementé oui non

La salle bénéficie d'une porte s'ouvrant de l'intérieur vers l'extérieur oui non

Si oui :

- La porte est équipée d'une barre anti-panique oui non
- La porte est équipée d'un oculus oui non

La salle comprend un poste de travail oui non

Si oui, activité réalisée sur ce poste de travail : _____

II. Cuves et bonbonnes incluant les réserves

Répertorier l'ensemble des cuves et bonbonnes de la salle dans le tableau suivant.

Merci de remplir la colonne « Usage » en utilisant le codage ci-après :

1 – Conservation de gamètes ou d'embryons

1a – Conservation de gamètes en vue de don

1b – Autoconservation de gamètes

1c – Conservation d'embryons

2 – Réserve d'azote

3 – Alimentation d'un appareil de descente en température contrôlée.

Volume de la cuve ou de la bonbonne (en litres)								
Année d'achat								
Usage (cf. codage ci-dessus)								
Alarme de niveau (oui/non)								
Alarme de température (oui/non)								
Remplissage automatique (oui/non)								
Alarme reliée à une Gestion Technique Centralisée (oui/non)								

23

III. Ventilation

Extraction continue

La salle bénéficie d'un système d'extraction continue oui non

Si oui :

- Taux de renouvellement d'air : _____ vol/h
(en volume d'air de la salle par heure)

- L'extraction est en position basse oui non

Extraction forcée

La salle bénéficie d'un système d'extraction forcée oui non

Si oui :

- Taux de renouvellement d'air : _____ vol/h
(en volume d'air de la salle par heure)

- L'extraction est en position basse oui non

- Mode de déclenchement de l'extraction forcée :

• Manuel oui non

• Automatique lié au taux d'oxygène de la salle oui non

IV. Oxygène

La salle est équipée d'une ou de plusieurs sondes à oxygène oui non

Si oui, nombre de sondes : _____

V. Appareil de descente en température

L'appareil ou les appareils de descente en température sont dans la salle de conservation oui non

VI. Ligne de distribution d'azote

La salle est équipée d'une ligne de distribution d'azote oui non

FICHE N°3

Aspects descriptifs¹ des incidents ou accidents ayant été constatés dans votre laboratoire

Durant l'année 2005 (effectif*)

Dans les 5 dernières années (effectif*)

- Concernant les personnes :

- | | | |
|--|-----|------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Malaise hypoxique | () | <input type="checkbox"/> () |
| <input type="checkbox"/> Brûlure cutanée | () | <input type="checkbox"/> () |
| <input type="checkbox"/> Autres : | () | <input type="checkbox"/> () |

Préciser : _____

- Mettant en cause les matériels :

- | | | |
|--|-----|------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Fissure larvée de bonbonne | () | <input type="checkbox"/> () |
| <input type="checkbox"/> Rupture brutale de bonbonne | () | <input type="checkbox"/> () |
| <input type="checkbox"/> Changement de récipient
en urgence pour baisse de niveau | () | <input type="checkbox"/> () |
| <input type="checkbox"/> Perte de matériel biologique | () | <input type="checkbox"/> () |

* L'effectif des incidents pourra être ajouté dans les parenthèses de manière facultative.

Commentaires libres si besoin :

¹ Il s'agit d'établir une liste des incidents les plus habituels et non d'en déterminer la fréquence.

Annexe 2 : Synthèse des déclarations d'intérêts par rapport au champ de la saisine suite à la réunion du 7 février 2008

RAPPEL DES RUBRIQUES DE LA DECLARATION PUBLIQUE D'INTERETS

IP-A	Interventions ponctuelles : autres
IP-AC	Interventions ponctuelles : activités de conseil
IP-CC	Interventions ponctuelles : conférences, colloques, actions de formation
IP-RE	Interventions ponctuelles : rapports d'expertise
IP-SC	Interventions ponctuelles : travaux scientifiques, essais, etc.
LD	Liens durables ou permanents (Contrat de travail, rémunération régulière ...)
PF	Participation financière dans le capital d'une entreprise
SR	Autres liens sans rémunération ponctuelle (Parents salariés dans des entreprises visées précédemment)
SR-A	Autres liens sans rémunération ponctuelle (Participation à conseils d'administration, scientifiques d'une firme, société ou organisme professionnel)
VB	Activités donnant lieu à un versement au budget d'un organisme

DECLARATIONS PUBLIQUES D'INTERETS DES MEMBRES DU CES

NOM	Prénom <i>Rubrique de la DPI</i> Description de l'intérêt	Date de déclaration de des intérêts
ALARY	René	06/11/2006 06/02/2007
Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine		
ANNESI-MAESANO	Isabella	08/11/2006 27/11/2007
Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine		
BLANCHARD	Olivier	21/03/2007 05/02/2008
Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine		
De BLAY de GAIX	Frédéric (membre du CES « Évaluation des risques liés aux milieux aériens » jusqu'au 14 juin 2007)	28/12/2005
Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine		

CABANES	Pierre-André	09/02/2007 23/01/2008
Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine		
CAMPAGNA	Dave	08/11/2006 13/12/2006 03/12/2007
Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine		
DELMAS	Véronique	22/03/2007 05/02/2008
Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine		
ELICHEGARAY	Christian	21/03/2007 05/02/2008
Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine		
EZRATTY	Véronique (membre du CES « Évaluation des risques liés aux milieux aériens » depuis le 15 juin 2007)	10/10/2007
Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine		
FILLEUL	Laurent	16/06/2006
<i>Démission le 7 novembre 2006</i>		
Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine		
GARNIER	Robert	12/10/2006 12/02/2008
Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine		
GARREC	Jean-Pierre	04/02/2003
<i>Démission le 2 novembre 2006</i>		
Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine		
GLORENNEC	Philippe	23/11/2006 03/12/2007
Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine		
JUST	Jocelyne	20/05/2004 26/10/2005
<i>Démission le 2 février 2007</i>		
Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine		
KIRCHNER	Séverine	10/03/2003 17/06/2003
Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine		

LEFRANC	Agnès (membre du CES « Évaluation des risques liés aux milieux aériens » depuis le 15 juin 2007)	10/10/2007 05/02/2008
	Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine	
MATHIEU	Laurence	03/07/2007
	<i>Démission le 28 novembre 2006</i>	
	Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine	
MILLET	Maurice	06/11/2006 21/03/2007 07/12/2007
	Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine	
MORCHEOINE	Alain	17/07/2003
	Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine	
MOREL	Yannick	12/02/2007 12/02/2008
	Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine	
MORIN	Jean-Paul	26/02/2007 27/11/2007
	Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine	
NEMERY de BELLEVAUX	Benoît (membre du CES « Évaluation des risques liés aux milieux aériens » jusqu'au 14 juin 2007)	17/01/2007
	Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine	
PARIS	Christophe	09/01/2006
	Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine	
PEUCH	Vincent-Henri	11/02/2007 29/11/2007
	Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine	
POINSOT	Charles	18/06/2006 11/02/2008
	Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine	
PONS	Françoise	28/06/2004
	<i>Démission le 7 novembre 2006</i>	
	Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine	
RAMEL	Martine	05/02/2008
	Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine	
SLAMA	Rémy (membre du CES « Évaluation des risques liés aux milieux aériens » depuis le 15 juin 2007)	10/10/2007
	Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine	

SQUINAZI Fabien (membre du CES « Évaluation des risques liés aux milieux aériens » depuis le 15 juin 2007) 10/10/2007

Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine

VENDEL Jacques (membre du CES « Évaluation des risques liés aux milieux aériens » depuis le 15 juin 2007) 10/10/2007

Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine

DECLARATIONS PUBLIQUES D'INTERETS DES MEMBRES DU GT

NOM	Prénom <i>Rubrique de la DPI</i> Description de l'intérêt	Date de déclaration des intérêts
ALARY	René (membre du CES « Évaluation des risques liés aux milieux aériens »)	06/11/2006 06/02/2007
Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine		
ANNESI-MAESANO	Isabella (membre du CES « Évaluation des risques liés aux milieux aériens »)	08/11/2006 27/11/2007
Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine		
BARRIERE	Paul Professeur des universités-Praticien hospitalier Biologie de la reproduction Centre Hospitalier Universitaire de Nantes	16/11/2006
Analyse Afsset :	Pas de risque de conflits d'intérêts par rapport à la thématique de la saisine	
CAMPAGNA	Dave (membre du CES « Évaluation des risques liés aux milieux aériens »)	08/11/2006 13/12/2006 03/12/2007
Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine		
HENNEBICQ	Sylviane Maître de conférences des universités-Praticien hospitalier Responsable du Centre d'Étude et de Conservation des Œufs et du Spermé humains de Grenoble	10/11/2006
Analyse Afsset :	Pas de risque de conflits d'intérêts par rapport à la thématique de la saisine	

HOELLINGER Henri	12/01/2007
Aucun lien déclaré par rapport au champ de la saisine	
LE BON Cynthia	16/11/2006
Technicienne de laboratoire Biologie de la reproduction Hôpital Cochin de Paris	
Analyse Afsset :	Pas de risque de conflits d'intérêts par rapport à la thématique de la saisine
NEMERY de BELLEVAUX Benoît	17/01/2007
<i>Démission le 13 juin 2007</i> N'a pas participé aux travaux	
PERINIĆ Goran	05/11/2006
Chef de section au Centre Européen de Recherches Nucléaires de Genève	
Analyse Afsset :	Pas de risque de conflits d'intérêts par rapport à la thématique de la saisine
RIVES Nathalie	13/11/2006
Professeur des universités-Praticien hospitalier Biologie de la reproduction Centre Hospitalier Universitaire de Rouen	
Analyse Afsset :	Pas de risque de conflits d'intérêts par rapport à la thématique de la saisine
ROYÈRE Dominique	15/11/2006
Professeur des universités-Praticien hospitalier Chef de service de médecine et de biologie de la reproduction Centre Hospitalier Régional Universitaire de Tours	
Analyse Afsset :	Pas de risque de conflits d'intérêts par rapport à la thématique de la saisine

L'INRS, représenté par Jérôme TRIOLET, a signé une attestation garantissant l'absence de liens de nature à présenter un conflit d'intérêt avec le champ de la saisine.

ORGANISME-EXPERT PARTICIPANT

L'INRS est représenté par Jérôme TRIOLET, intégré au groupe de travail le 1^{er} octobre 2007.

Annexe 3 : Bilan des réglementations et recommandations applicables à l'azote liquide

A. En France

1-Dispositions nationales

Trois textes réglementaires applicables à l'azote liquide et aux laboratoires d'AMP ont été identifiés en France, mais aucun élément très précis n'apparaît en terme de sécurité des utilisateurs.

L'arrêté du 21 septembre 1978 relatif aux récipients à double paroi utilisés à l'emmagasinage des gaz liquéfiés vise à éviter la surpression dans les récipients. Il prévoit l'obligation d'équiper les récipients de soupape de sûreté pour le récipient intérieur et d'un dispositif de sécurité limitant à un demi bar la pression effective pour l'enveloppe extérieure.

L'arrêté du 10/12/2004 relatif au règlement de sécurité contre les risques d'incendie et de panique dans les établissements recevant du public, en précisant le règlement de sécurité incendie, préconise que les locaux destinés aux stockages cryogéniques soient faciles d'accès, conçus avec un sol horizontal en matériaux ininflammables et pourvus d'un système de ventilation mécanique indépendant relié à l'extérieur.

L'Article R 232-5 et suivants du Code du Travail relatif à l'aération et l'assainissement des locaux de travail, recommande dans les locaux à pollution spécifique, de maintenir un état de pureté de l'air dans les locaux de travail (art. R 232-5) :

- Eviter les condensations (art. R 232-5) ;
- Apporter de l'air neuf dans le local (art. R 232-5) ;
- Déterminer le débit d'arrivée d'air neuf en fonction de la nature et de la quantité de polluant, qui doit être de toute façon supérieur à $45 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ (R 232-5-6)
- Tenir compte du nombre d'occupants (R 232-5-1) ;
- Disposer d'un système d'avertissement automatique en cas de défaillance du système de captage du polluant (R 232-5-7).

Avant d'entrer dans des locaux en atmosphère confinée, il faut vérifier l'absence de risque pour l'hygiène et la sécurité des travailleurs en s'assurant que l'atmosphère ne présente pas de risque en ce qui concerne la toxicité, l'asphyxie, la corrosivité, l'inflammabilité ou l'explosivité. (Art. R 232-5-12).

Deux réglementations de 1998 contenant des éléments plus précis sur la sécurité des locaux contenant de l'azote liquide, ne semblent pas s'appliquer aux laboratoires d'AMP :

- Arrêté du 16 décembre 1998 sur les bonnes pratiques relatives au prélèvement, au transport, à la transformation, y compris la conservation, des cellules souches hématopoïétiques issues du corps humain et des cellules mononuclées sanguines et
- Arrêté du 29 décembre 1998 sur les bonnes pratiques relatives à la conservation, à la transformation et au transport des tissus d'origine humaine utilisés à des fins thérapeutiques

Ils prévoient la mise en œuvre des équipements de protection collective suivants :

- Un système de ventilation continue d'au moins 6 volumes.h⁻¹ (arrêté du 16/12/1998)
- Un système de ventilation plus puissante (20 à 25 volumes.h⁻¹) en partie basse pour toute opération provoquant une évaporation importante d'azote ou lorsque le taux d'oxygène est inférieur à 19% (arrêté du 16/12/1998)
- Un système de contrôle du fonctionnement de la ventilation
- Des détecteurs d'oxygène et alarmes prévenant du manque d'oxygène (obligatoire dans l'arrêté 16/12/1998 et recommandé dans l'arrêté du 29/12/1998)
- La mise à disposition d'un appareil respiratoire isolé

Les locaux concernés doivent être facile d'accès. Les portes doivent être munies d'un panneau transparent. Le sol des locaux doit être en matériaux résistants aux basses températures et aux fortes charges. La température des locaux doit être supérieure ou égale à 20°C.

Par ailleurs, les procédures de manipulation de l'azote liquide doivent être affichées.

2-Dispositions internationales applicables en France

- La sécurité des travailleurs utilisant de l'azote liquide

L'azote liquide n'est pas classé au titre de la directive 67/548/CEE sur la classification des substances et préparations dangereuses.

D'après l'Organisation Internationale du Travail (OIT), l'European Society for Human Reproduction & Embrology (ESHRE), l'Agence Européenne pour la Sécurité et la Santé au Travail (OSHA), la Commission Européenne (CE), et l'European Industrial Gases Association (EIGA), l'utilisation d'azote liquide dans le cadre de l'étude n'est soumise à aucune réglementation spécifique, européenne ou internationale. Des réglementations générales, telles que la directive 89/686/CE relative aux prescriptions minimales de sécurité et de santé pour l'utilisation par les travailleurs d'équipements de protection individuelle, sont applicables.

- Les règles de transport extérieur d'azote liquide

Le transport d'azote liquide est régi par la réglementation sur le transport des matières dangereuses : Nom : Azote liquide réfrigéré, Classe 2, Numéro ONU : 1997.

L'application des dispositions relatives au transport de matières dangereuses dépend des quantités transportées. Dans le cadre des activités d'AMP, les biologistes de la reproduction estiment que les récipients de transport de l'azote liquide sur la voie publique renferment généralement deux litres d'azote liquide.

Le transport **par route** d'échantillons biologiques est exempté de la réglementation ADR selon la disposition spéciale n°593 du chapitre 3.3 de l'Annexe A de l'ADR (portant sur le transport d'échantillons biologiques), quelles que soient les quantités d'azote liquide en jeu. Toutefois, l'instruction P 203 sur l'emballage demeure applicable. Elle fixe les prescriptions minimales en termes d'étiquetage et d'information.

Le transport **ferroviaire** d'échantillons biologiques immergés dans une quantité illimitée d'azote liquide est possible sans se conformer à la réglementation RID selon l'article 12.4 du Contrat de transport International ferroviaire des Voyageurs (CIV) et l'article 5 de l'Appendice C de la Convention Relative aux Transports Internationaux Ferroviaires (COTIF).

Le transport **par bateau** d'échantillons biologiques immergés dans de l'azote liquide est possible, quelles que soient les quantités en jeu. Il échappe à la réglementation ADNR selon la disposition spéciale n° 93 du chapitre 3.3 de l'ADNR.

Le transport **par avion** d'échantillons biologiques immergés dans l'azote liquide n'est possible qu'en soute et pour des quantités inférieures à 50 kg par emballage (dans les avions de transport de passagers), et pour des quantités inférieures à 500 kg par emballage dans les avions cargos. Les emballages qui correspondent à la disposition A152 de IATA sont exemptés d'étiquetage : « Les emballages isothermes contenant de l'azote liquide réfrigéré entièrement absorbé dans un matériau poreux et destinés au transport, à basse température, de produits non dangereux, ne sont pas soumis à ces instructions, à condition que la conception du récipient ne permette pas de montée de pression au sein du récipient et ne permette pas la libération d'azote liquide réfrigéré quelque soit l'orientation de l'emballage isotherme. »

3-Recommandations diverses

Les informations délivrées ci-après constituent une synthèse des recommandations produites par les industriels, les organisations professionnelles et quelques « grands » utilisateurs.

Les producteurs d'azote liquide considérés appartiennent à des groupes multinationaux. Ils sont membres des associations professionnelles, implantées au Royaume Uni et aux Etats-Unis. Ces organismes étant cités en référence dans les recommandations anglo-saxonnes, le présent chapitre expose un socle commun des règles d'utilisation de l'azote liquide largement partagé dans les 12 pays étudiés et par les utilisateurs français, lorsqu'ils rédigent leurs consignes internes.

a) Equipements cryogéniques et maintenance

La recommandation IGC Doc 114/03/E recommande le contrôle des équipements cryogéniques avant leur mise en service. Il doit exister un espace d'au moins 0,5 m autour de l'installation pour la maintenance et le ménage.

Les canalisations contenant de l'azote liquide doivent être calorifugées et identifiées, et, lorsqu'elles sont susceptibles d'être sous pression, équipées d'une soupape de sécurité.

Pour les transvasements entre récipients, utiliser en priorité les cannes de transfert.

Les récipients en plastique ou en polystyrène expansé sont à proscrire pour la manipulation d'azote liquide car le froid les rend cassant.

Le stockage d'azote liquide est proscrit dans les chambres froides car elles sont insuffisamment ventilées au regard des propriétés de l'azote liquide.

b) Equipements de protection collective et des locaux

Les recommandations sur l'utilisation de l'azote liquide sont nombreuses mais ne mentionnent pas de taux de renouvellement d'air nécessaire dans les locaux de travail contenant de l'azote liquide.

La fiche technique de l'INSERM (2002) relative à la manipulation d'azote liquide recommande d'éviter une teneur en oxygène inférieure à 18% dans un local renfermant des liquides cryogéniques. Ce taux est fixé à 19% pour la société Air Liquide.

L'Association Européenne des Gaz Industriels a publié deux recommandations sur l'utilisation d'azote liquide. La recommandation IGC Doc 115/04/E interdit les tranchées, fosses, bouches d'égout et conduits débouchant dans les locaux où un gaz liquéfié est stocké ; et requiert un système de ventilation et des portes s'ouvrant vers l'extérieur.

La recommandation IGC Doc 114/03/E prévoit un accès au local par des portes automatiques, une ventilation « suffisante » et un contrôle de l'atmosphère avant d'entrer dans le local.

Les recommandations espagnoles prévoient l'installation d'un détecteur de débit dans les conduits de la ventilation.

Idéalement, le local de stockage de l'azote liquide devrait être en façade avec un accès direct à une fenêtre ouvrante. Les portes du local doivent être à fermeture automatique de préférence, mais toujours muni d'un oculus permettant de voir à l'intérieur du local si une personne est inanimée au sol. L'oculus doit permettre une visibilité constante et générale de la salle.

Les sols ne doivent pas comporter de débouché de conduites ou caniveau qui permettrait à l'azote de se disperser dans d'autres locaux du bâtiment.

Les dispositifs d'arrêt d'urgence reliés à l'arrivée automatique d'azote liquide doivent être situés à l'extérieur du laboratoire.

c) Ventilation et teneur en oxygène

- Ventilation continue

Lorsque la quantité d'azote liquide stockée dans un local représente plus de 1/1000 du volume du local, ce local doit être pourvu d'un système de ventilation dimensionné en sorte d'assurer un taux d'oxygène dans l'air supérieur à 19% dans toutes les phases de l'activité.

Dans les 12 pays étudiés, la principale recommandation est la mise en place d'une **ventilation mécanique** adaptée à la situation, selon le volume du local, la quantité d'azote liquide,...

Il est souvent recommandé de réaliser une évaluation des risques pour savoir si la présence d'un détecteur d'oxygène et d'une alarme s'avère nécessaire. Lorsqu'il existe un risque d'asphyxie, il est recommandé d'installer en Allemagne, en Espagne, au Royaume-Uni, en Suède et en Suisse :

- Un détecteur proche du sol ou portatif

- Une alarme visuelle et/ou sonore qui prévienne à l'intérieur mais aussi à l'extérieur (Royaume-Uni)

Au Royaume-Uni et au Pays-Bas, au taux d'oxygène de 19% déclenche une première alarme. Une seconde alarme doit être déclenchée à un taux d'oxygène de 18% en Italie et aux Pays Bas.

Une ventilation continue doit assurer un renouvellement d'air neuf de 6 volumes.h⁻¹ (valeur à moduler en fonction de la taille du local et de la quantité d'azote liquide stockée). Le débit de la ventilation mécanique doit être contrôlé.

- L'oxygénométrie

Les sondes à oxygène utilisant un procédé électro-chimique doivent être calibrées tous les 9 mois et changées tous les 18 mois.

L'alarme doit être déclenchée lorsque le taux d'oxygène mesuré dans le local est inférieur ou égal à 19 %.

La localisation des sondes notamment leur position en hauteur doit être étudiée pour prévenir les fausses alarmes, préjudiciables à la sécurité.

d) Dispositions relatives à l'usage des locaux

La recommandation IGC Doc 115/04/E de l'Association Européenne des Gaz Industriels (EIGA, 2004-b) recommande que l'accès aux locaux contenant des gaz liquéfiés soit facile et limité aux personnes autorisées.

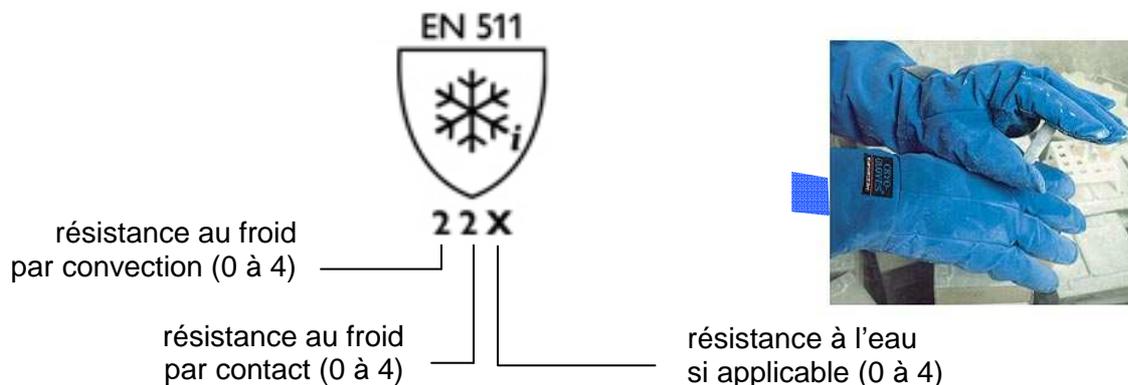
Le local de stockage doit être réservé à ce seul usage. Il ne peut donc pas être jumelé à une autre activité de stockage, un autre poste de travail et encore moins servir de couloir de passage.

Afin de limiter les risques, il est recommandé de ne rester dans le local que le temps strictement nécessaire et de n'ouvrir que les conteneurs nécessaires.

Avant d'entrer dans le local, il convient de vérifier le bon fonctionnement de la ventilation et du système de détection d'oxygène.

e) Equipements de protection individuelle

Les **gants** isolants contre le froid doivent répondre à la norme EN 511 (Juin 2006).



Les gants commercialisés pour la manipulation de liquides cryogéniques ont une résistance par convection limitée à l'indice 3, et une résistance par contact d'indice 2.

Lors des opérations exposant à des **projections** d'azote liquide (transvasement, par exemple), le port de lunettes de sécurité (enveloppantes) ou d'un écran facial est fortement recommandé.

Les **vêtements** de travail doivent être longs, recouvrant tout le corps, et les chaussures fermées.

La recommandation IGC Doc 115/04/E de l'Association Européenne des Gaz Industriels recommande le port de lunettes et de gants dans les locaux de stockage de gaz liquéfié (EIGA, 2004-b).

f) Formation

La recommandation IGC Doc 115/04/E de l'Association Européenne des Gaz Industriels stipule que les utilisateurs soient formés à la manipulation des gaz liquéfiés (EIGA, 2004-b).

Information et signalisation

La recommandation IGC Doc 114/03/E, relative à l'exploitation des équipements cryogéniques préconise la signalisation des risques, et notamment l'étiquetage des récipients cryogéniques (EIGA, 2003-b).

Un panneau de danger et les consignes de sécurité doivent être affichés à l'entrée du local où l'azote liquide est entreposé.



Risque d'asphyxie
(non normalisé)



Basses températures



Azote liquide



de la vue



du visage



du corps



des mains



des pieds

Le personnel manipulant de l'azote liquide doit **être informé** :

- Des procédures de travail,
- De la conduite à tenir en cas d'accident dans le local (premiers secours à appliquer en cas de brûlure)
- Des procédures d'urgence applicables dans le local concerné.

Le port de bijoux métalliques, qui risquent de rester collés, est proscrit.

g) Procédure d'urgence

En cas de brûlure

1) Il convient de retirer ou desserrer les vêtements sur la zone touchée et de la passer sous l'eau chaude (environ 40°C) pendant 10 minutes au minimum. En aucun cas il ne faut frotter la peau de la victime pour essayer de la réchauffer.

2) Contactez les secours extérieurs (SAMU tél : 15) et le service de Médecine Préventive.

h) Transport

Les chariots de transports de récipients cryogéniques doivent être munis de freins.

L'utilisation des ascenseurs n'est possible que si personne n'accompagne les récipients d'azote liquide et si le risque est signalé dans la cabine.

Pour le transport par route, l'azote liquide est soumis à des prescriptions issues de la réglementation sur le transport de marchandises dangereuses (ADR) :

- indication sur le contenant : « UN 1977 Azote liquide réfrigéré ».
- étiquettes sur le contenant (classe 2.2) :



Une fiche de format libre (document de transport) doit reporter les indications suivantes :

- le nom et l'adresse de l'expéditeur ainsi que du destinataire éventuel
- « UN 1977 Azote liquide réfrigéré »
- « étiquette classe 2.2 code 3A »
- la description du colis et la quantité
- la mention « transport dans les conditions du chap. 1.1.3.6 »

Si un problème survient, arrêter rapidement et évacuer le véhicule. Tenter de l'aérer en ouvrant une porte si cela est possible en toute sécurité. N'intervenir sur le récipient que si des équipements de protection adéquats sont à disposition dans le véhicule (INRA, 2006).

B. Dans 12 autres pays

Hormis la France, le Canada, la Suède et l'Allemagne sont les pays pour lesquels des réglementations spécifiques plus élaborées ont été identifiées.

Seules la Hollande et la Suède ont (ou avaient) des réglementations précises concernant la sécurité sur le lieu de travail, en termes de ventilation, d'oxygénométrie, d'alarme, de taux d'oxygène, d'équipements de protection individuelle, ... Les réglementations identifiées dans les autres pays ne présentent que très rarement des données quantitatives et restent le plus souvent assez générales.

Aucune réglementation nationale ne semble exister en Belgique, au Danemark, en Espagne, en Italie, en Suisse.

1-Equipements et pression

Contre les risques de surpression, une soupape est obligatoire sur les équipements et installations cryogéniques.

Seule la Suède possède une réglementation sur la sécurité des équipements. Dans d'autres pays, les règles de sécurité concernant les équipements sont de l'ordre de la recommandation.

Ainsi il est mentionné que le couvercle ou le bouchon des récipients non pressurisés contenant de l'azote liquide ne doit pas être totalement vissé (Allemagne).

Les équipements doivent être inspectés régulièrement ; la glace qui pourrait bloquer l'ouverture des récipients doit être enlevée (Suède, Etats-Unis).

2-Equipements de protection collective et des locaux

La quasi totalité des pays recommandent voire obligent (Canada, Etats-Unis, Suède) d'installer un système de ventilation ; avec des bouches d'extraction proches du sol pour l'Allemagne, l'Italie, l'Espagne et la Suède. Le taux de renouvellement d'air le plus fréquemment cité est de 6 volumes. h⁻¹.

La teneur minimale en oxygène obligatoire ou recommandée pour rentrer dans un local sans assistance respiratoire se situe à :

- 18% pour les Pays Bas et le Canada (Ontario)
- 19,5% pour le Canada (Québec) et les Etats-Unis
- 20% pour la Suède (texte abrogé)
- 20,5% pour l'Institut de Santé au travail espagnol (recommandations sur les espaces confinés)

La réglementation des Pays-Bas est une des plus précises. Elle rend obligatoire la présence d'un détecteur si le volume de la pièce est inférieur à 100 m³ avec un taux de renouvellement d'air inférieur à 4 volumes.h⁻¹ ou si le volume de la pièce est supérieur à 100 m³ avec un taux de renouvellement d'air inférieur à 2 volumes.h⁻¹.

En Allemagne, en Autriche, aux Etats-Unis, en Italie et au Royaume Uni, les dispositions concernant l'aménagement des **locaux** ont le statut de recommandations, et non de réglementations contraignantes.

Ainsi, pour assurer la sécurité des travailleurs et favoriser la gestion des situations d'urgence ; les exigences suivantes sont recommandées :

- Sol :
 - Facile d'entretien
 - Matériaux ininflammables et résistants au froid (Allemagne)
 - Pas de tranchée, bouche d'égout, sillon, fosse (Royaume-Uni, Italie)
- Porte :
 - Sur la porte : Oculus pour permettre aux personnes extérieures de surveiller ce qui se passe à l'intérieur (Royaume-Uni)
 - Porte s'ouvrant vers la sortie (Europe)
- Local de stockage :
 - Accès facile au local et aux équipements (Europe)
 - Ne pas stocker dans une entrée, un couloir étroit ou une cage d'escalier (Etats-Unis)
 - Ne pas avoir le niveau du sol du local plus bas que celui des pièces environnantes (Autriche)

3-Equipements de protection individuelle

Le port d'équipements de protection individuelle n'est mentionné que dans la réglementation canadienne et suédoise. Pour les autres pays étudiés, il prend la forme de recommandations.

Les gants isolants sont en cuir pour l'Allemagne et le Royaume-Uni (norme anglaise : BS EN 511) ou en Kevlar; sans ouverture permettant à de l'azote liquide de s'infiltrer, mais faciles à enlever.

L'utilisation de pinces est recommandée pour immerger des objets dans de l'azote liquide (Canada, Espagne, Etats-Unis, Italie).

Les lunettes de sécurité (avec protection sur les côtés, norme anglaise BS EN 166 grade 3) ou un masque couvrant tout le visage, notamment pour les opérations telles que le transvasement, sont recommandés en Allemagne, au Canada, aux Etats-Unis, en Italie et au Royaume Uni.

Les vêtements de travail doivent être secs et propres, recouvrant tout le corps, sans poche et faciles à enlever. Les chaussures doivent être fermées. Les bottes sont proscrites.

Un appareil respiratoire isolant doit être utilisé si la teneur en oxygène est trop faible. Les masques à cartouche sont proscrits en Allemagne et en Suède.

4-Formation et information des personnels

Seuls le Royaume Uni et la Suède réglementent la signalisation du risque d'asphyxie par la pose d'un panneau à l'entrée du local ou au cours d'une formation spécifique.

La formation des personnels manipulant l'azote liquide est recommandée en Espagne, aux Etats-Unis et au Royaume Uni. Elle consiste à :

- Prévenir des risques potentiels (brûlure et asphyxie)
- Informer sur les moyens de protection à utiliser
- Informer sur les premiers secours à effectuer en cas d'accident

5-Transport des récipients cryogéniques à l'intérieur des locaux

Aucun texte ne réglemente le transport intérieur des récipients cryogéniques. Toutefois, des recommandations nord américaines, italiennes et britanniques formulent les précautions suivantes :

- Transporter les récipients cryogéniques sur des chariots équipés de freins (Italie, Canada, Etats-Unis) ou alors les porter le plus loin possible du visage (Etats-Unis).
- Ne pas faire rouler le récipient et le maintenir à la verticale (Canada).
- Ne pas prendre l'ascenseur avec un récipient contenant de l'azote liquide (Canada, Etats-Unis). Au Royaume-Uni, l'ascenseur peut être utilisé sans aucun passager et avec un couvercle sur le récipient.
- Eviter de prendre les escaliers avec un récipient cryogénique (Royaume-Uni).

- **Arrêté du 16 décembre 1998 portant homologation des règles de bonnes pratiques relatives au prélèvement, au transport, à la transformation, y compris la conservation, des cellules souches hématopoïétiques issues du corps humain et des cellules mononucléées sanguines utilisées à des fins thérapeutiques - NOR: MESP9824006A - J.O n°302 du 30 décembre 1998 page 19824 (Extraits)**

2.3. Zones de stockage des produits cellulaires

L'organisation générale de cette zone se fait de façon à ne pas gêner la libre circulation du personnel, à favoriser l'accès aux dispositifs de sécurité (vannes manuelles par exemple) et à faciliter les manipulations autour et dans les récipients cryogéniques selon des procédures de dépôts ou de retrait des produits à stocker ou à attribuer.

Le local est à une température comprise entre + 20 °C et + 25 °C et à un taux d'humidité tel qu'il n'y ait pas de condensation importante avec dépôt de givre sur le col et à l'intérieur des récipients.

Une extraction d'air avec entrée d'air frais fonctionnant en continu est obligatoire. Elle assure au minimum un renouvellement de l'air à raison de six fois le volume du local par heure.

Une extraction d'air en partie basse et plus puissante, soit vingt à vingt-cinq fois le volume du local par heure, se met en service lors de toute opération provoquant une évaporation importante d'azote liquide ou lors d'une teneur en oxygène inférieure à 19 %.

Les lignes de distribution d'azote liquide sont isolées sous vide ou avec un isolant spécifique. Dans ce cas, l'enveloppe de l'isolation doit être étanche et la matière isolante doit être compatible avec l'oxygène. Ces lignes doivent être pourvues des dispositifs de sécurité. Elles doivent être qualifiées par le fournisseur.

Le sol est recouvert d'un matériau résistant aux basses températures et aux fortes charges au sol et d'un entretien facile.

La porte d'accès est équipée d'un panneau transparent qui permet la surveillance par des personnes extérieures au laboratoire et porte un pictogramme « Risque d'asphyxie ». L'ouverture de cette porte se fait vers la sortie. La porte est équipée d'une barre anti-panique afin de permettre l'évacuation rapide du personnel.

A l'entrée du local :

- un signal lumineux prévient de l'état de fonctionnement du ventilateur ;
- l'alarme d'arrêt de fonctionnement du ventilateur est reportée au poste de surveillance central de l'établissement ;
- le contrôle en continu de la teneur en oxygène est obligatoire et des alarmes locales sonores et visuelles, placées à l'extérieur de la zone de stockage, alertent le personnel en cas de teneur insuffisante en oxygène. Ces alarmes sont également reportées à un poste de surveillance permanent ;
- un appareil de respiration autonome de secours pour le sauveteur et un appareil de réanimation alimenté en oxygène pour la victime éventuelle sont disponibles à tout moment.

Des procédures écrites fixent les conditions d'accès et les mesures à prendre en cas d'anomalies. Les exercices d'alerte et de secours doivent être effectués périodiquement.

- **Arrêté du 29 décembre 1998 portant homologation des règles de bonnes pratiques relatives à la conservation, à la transformation et au transport des tissus d'origine humaine utilisés à des fins thérapeutiques - NOR: MESP9824165A - J.O n°6 du 8 janvier 1999 page 389**

Le secrétaire d'Etat à la santé et à l'action sociale,

Vu le code de la santé publique, et notamment son article L. 673-8,

Arrête :

Art. 1er. - Sont homologuées les règles de bonnes pratiques relatives à la conservation, à la transformation et au transport des tissus d'origine humaine utilisés à des fins thérapeutiques figurant en annexe du présent arrêté.

Art. 2. - Le présent arrêté est applicable dans un délai de six mois à compter de la publication du décret prévu à l'article L. 672-10 du code de la santé publique.

Art. 3. - Le directeur général de la santé et le directeur des hôpitaux sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié ainsi que son annexe au Journal officiel de la République française.

Fait à Paris, le 29 décembre 1998.

Bernard Kouchner

A N N E X E

REGLES DE BONNES PRATIQUES RELATIVES A LA TRANSFORMATION, A LA CONSERVATION ET AU TRANSPORT DES TISSUS D'ORIGINE HUMAINE UTILISES A DES FINS THERAPEUTIQUES

Glossaire

Allogreffe tissulaire : Désigne un tissu provenant d'un individu différent appartenant à la même espèce (synonyme : homogreffe) ; se distingue de l'autogreffe (provenant du même individu) et de la xéno greffe (provenant d'une espèce différente).

Accident : Evénement ou effet indésirable qui peut affecter la pureté, la sécurité, l'efficacité, la qualité, la traçabilité ou l'identification d'un élément destiné à être greffé.

Assurance de la qualité : L'assurance de la qualité est un large concept qui couvre tout ce qui peut, individuellement ou collectivement, influencer la qualité d'un tissu. Elle représente l'ensemble des mesures prises pour s'assurer que les tissus mis à disposition sont de la qualité requise pour l'usage auquel ils sont destinés. L'assurance de la qualité dépasse donc le cadre des règles de bonnes pratiques.

Audit interne : Autoévaluation périodique destinée à identifier et corriger les déviations des exigences de qualité.

Banque de tissus : Désigne une unité, un service, un département d'un établissement public de santé ou un organisme assurant la transformation, la conservation, la distribution et la cession de tissus d'origine humaine.

Cession : Transfert d'un tissu validé d'une banque de tissus autorisée vers une autre banque de tissus ou transfert d'un tissu validé par une banque à un fabricant de dispositif médical ou un fabricant de produit pharmaceutique.

Conservation : Action de stocker des tissus validés et étiquetés dans des conditions permettant d'en maintenir les qualités requises.

Conteneur : Matériel utilisé pour le stockage et le transport des tissus.

Contrôle de qualité : Ensemble d'examens qui permettent de vérifier que les produits, les matériels et l'environnement sont conformes aux spécifications préétablies, et effectuées selon un programme définissant les paramètres à contrôler, la périodicité des contrôles, la qualification du personnel et ses responsabilités.

Coordination hospitalière : Désigne la fonction d'une personne ou d'un groupe de personnes identifié dans l'établissement de santé, notamment chargé d'assurer l'accueil des familles et de participer au bon déroulement des activités de prélèvement.

Coordination interrégionale : Les coordonnateurs interrégionaux sont des médecins faisant partie de l'Etablissement français des greffes et dont la zone de compétence est l'une des sept interrégions de découpage de l'organisation territoriale de la coordination du prélèvement et des greffes en France. Ils sont nommés par le directeur général de l'Etablissement français des greffes. Leur nomination est faite pour une période de cinq ans renouvelable.

Dépôt de tissus : La loi n'a pas prévu, dans le domaine des tissus, à la différence des dépôts de sang, de dépôts pouvant distribuer des produits à d'autres établissements de santé et autorisés à cet effet. On appelle donc ici dépôt de tissu simplement un lieu de stockage temporaire, situé dans un établissement de santé, qui reçoit des tissus validés, conditionnés et étiquetés provenant d'une banque de tissus autorisée, les conserve pour son propre usage, puis les fournit à différents praticiens de l'établissement de santé, pour une utilisation immédiate.

Désinfection : Destruction par une méthode physique ou chimique d'une majorité des micro-organismes.

Distribution : Délivrance d'un tissu validé par le responsable de la banque à un praticien greffeur au vu d'une prescription médicale nominative. Cette délivrance peut également être effectuée à un dépôt de tissus pour une conservation temporaire et une utilisation par les praticiens de l'établissement au sein duquel se situe le dépôt.

Documentation : On entend par « documentation » l'ensemble des documents descriptifs de l'organisation de la structure, des opérations à effectuer et des exigences relatives aux tissus, produits et matériels, des enregistrements des actions réalisées et des documents de liaison.

Enucléation : Prélèvement de globe oculaire dans sa totalité.

Enregistrement : Action de consigner par écrit ou par tout autre moyen un fait ou une mesure comme réel ou authentique, de telle manière que cette information soit conservée durant une période appropriée.

Etiquette : Support écrit, imprimé ou graphique, fixé de façon adéquate sur le conditionnement, permettant de faire le lien avec la personne prélevée et décrivant les caractéristiques du produit. C'est un élément indispensable de la traçabilité.

Evaluation : Processus qui permet de déterminer si un protocole ou une étape de travail atteint les critères spécifiés.

Local de prélèvement : Désigne le lieu où est réalisé l'acte de prélèvement.

Lot : Quantité définie d'une matière première, d'un produit fabriqué ou préparé en une opération ou en une série d'opérations telle qu'elle puisse être considérée comme homogène.

Médecin préleveur : Personne qui réalise l'acte chirurgical de prélèvement.

Non-conformité : Non-satisfaction aux spécifications des produits, matières premières ou tissus.

Prélèvement : S'applique aux tissus prélevés en vue d'une utilisation thérapeutique chez l'homme.

Prélèvement de peau : Désigne un prélèvement dermo-épidermique en couche mince.

Procédures écrites : Document décrivant selon un plan logique, de façon cohérente et détaillée, les opérations à effectuer, les mesures à prendre, les moyens techniques et la documentation à utiliser afin d'assurer d'une manière reproductible la prise en charge des tissus.

Qualification du matériel : Opération destinée à démontrer qu'un matériel fonctionne correctement et donne réellement les résultats attendus.

Qualifié : Désigne du personnel médical ou hospitalier qui, du fait de son statut ou de sa compétence, est habilité à assurer les fonctions définies.

Qualité : Désigne la totalité des caractéristiques d'un tissu aboutissant à sa capacité d'être utilisé de façon satisfaisante.

Quarantaine : Situation des matières premières et des éléments placés en attente d'une décision sur leur conformité.

Recueil : S'applique aux résidus opératoires (art. L. 672-1 du CSP).

Résidus opératoires : Désignent les tissus, cellules et produits humains recueillis à l'occasion d'une intervention médicale lorsqu'ils sont conservés en vue d'une utilisation ultérieure.

Sous-traitance : Préparation ou étape de préparation exécutée conformément à un cahier des charges par un autre établissement ou un organisme pour le compte d'un établissement de conservation donneur d'ordres et dans le cadre d'un contrat écrit.

Spécification : Description détaillée des impératifs auxquels un tissu, une matière première, un matériel doivent répondre. Elle sert de référence aux contrôles.

Tissus : Désignent les éléments prélevés sur le corps humain que sont notamment la cornée, les os, les éléments de l'appareil locomoteur, les valves cardiaques, les vaisseaux (artères et veines), la peau, les chaînes ossiculotympaniques, les tissus endocriniens, selon la réglementation applicable.

Traçabilité : On entend par traçabilité l'ensemble des informations et des mesures permettant de suivre et de retrouver rapidement chacune des étapes allant de l'examen clinique du donneur à l'utilisation thérapeutique de cet élément ou produit du corps humain, en passant par le prélèvement, la transformation, la conservation, le transport, la distribution et la dispensation à un patient. La traçabilité permet d'établir un lien entre le donneur et le ou les receveurs. Elle est établie à partir d'une codification préservant l'anonymat des personnes.

Transformation : Toutes les opérations concernant un tissu depuis sa réception jusqu'à sa validation et sa délivrance, ainsi que les contrôles correspondants.

Validation : Etablissement de la preuve que la mise en oeuvre ou l'utilisation de tout procédé, procédure, matériel, matière première ou produit, activité ou système permet réellement d'atteindre les résultats escomptés et les spécifications fixées.

I. - PREAMBULE

1. Dispositions communes

Les bonnes pratiques de conservation, transformation et transport des tissus d'origine humaine ont pour objectif de fournir un cadre à l'organisation générale de la préparation des allogreffes de tissus. Elles font partie du système de l'assurance de la qualité et sont la suite logique des bonnes pratiques de prélèvement de tissus. Lorsque des autogreffes ne sont pas implantées au cours d'une même intervention chirurgicale que le prélèvement, leur conservation obéit aux mêmes règles que les allogreffes.

Ces règles consistent en la description d'un ensemble de méthodes à mettre en oeuvre concernant le personnel, les locaux, le matériel, les procédés, la documentation. Elles garantissent que les tissus sont préparés, contrôlés, conservés selon les normes de qualité adaptées à leur emploi. Elles s'appliquent tout au long de la chaîne allant de la réception des prélèvements à la distribution et au transport des tissus.

L'application de ces règles doit aboutir à la mise en place d'un système de maîtrise et de surveillance de la qualité ayant pour but d'apporter un maximum de garanties au niveau de la sécurité des tissus. Certaines techniques ou procédures particulières pourront faire l'objet de fiches techniques complémentaires à ces règles de bonnes pratiques, élaborées par l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé après avis de l'Etablissement français des greffes.

2. Protocoles dérogatoires

D'autres méthodes que celles décrites dans ces règles peuvent permettre de répondre aux principes d'assurance de la qualité. Ces règles ne devraient en aucune façon freiner l'utilisation de nouvelles technologies ou de nouveaux concepts, à condition qu'ils aient donné lieu à une procédure écrite, qu'ils procurent une efficacité comparable pour un niveau de sécurité au moins équivalent et qu'ils fassent l'objet d'une autorisation du directeur général de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé.

Les dispositions de ces règles s'appliquent sous réserve des dispositions du livre II bis du code de la santé publique relatives à la protection des personnes qui se prêtent à des recherches biomédicales.

II. - DISPOSITIONS GENERALES

CONCERNANT LES BANQUES DE TISSUS

1. Structure de la banque

1.1. Sans préjudice du respect des règles comptables et financières qui leur sont applicables, les organismes autorisés mettent en place une comptabilité analytique relative à ces activités pour faire apparaître les données économiques, financières et comptables prévues par la réglementation en vigueur.

Si la banque de tissus dépend d'un établissement public de santé ou d'un établissement privé à but lucratif admis à participer à l'exécution du service public hospitalier, il est souhaitable de faire apparaître cette activité dans les objectifs stratégiques de l'établissement inscrits dans le projet d'établissement.

1.2. Un comité médico-technique est mis en place au sein de chaque banque de tissus. Ce comité rend compte de ses missions et propose toutes mesures propres à améliorer le fonctionnement médical et technique de la banque de tissus à l'instance décisionnelle.

Ce comité assure l'orientation scientifique et technique de la banque. Il en suit l'activité et les résultats. Il propose et facilite la mise en place de travaux de recherche dans le domaine de la préparation, de la conservation ou de la validation des tissus. Il participe à l'organisation des formations internes (médecins, techniciens...).

Lorsque la banque est située au sein d'un établissement de santé, cette mission est assurée par l'instance médicale consultative de l'établissement ou par une instance spécifique mise en place par celle-ci.

Il est souhaitable d'associer aux travaux de ce comité l'ensemble des participants aux actions réalisées au sein de la banque, et notamment des représentants du personnel de la banque, des praticiens préleveurs et utilisateurs, des biologistes, de la coordination interrégionale de l'Etablissement français des greffes et de l'administration de l'établissement.

Le comité médico-technique peut inviter toute personne susceptible d'être utile à ses travaux, et s'efforce d'établir des liens avec les équipes réalisant des travaux de recherche dans le domaine des greffes de tissus ou les domaines connexes.

Un règlement intérieur de la banque définit les modalités de fonctionnement de ce comité.

1.3. Les relations existant avec les sites et les équipes de prélèvement, d'une part, et avec les chirurgiens utilisateurs, d'autre part, doivent faire l'objet de procédures spécifiques définies par écrit, notamment dans le cadre de conventions,

transmises pour information à l'autorité administrative compétente et au directeur général de l'Etablissement français des greffes.

2. Personnel

2.1. Généralités

2.1.1. La mise en place et le maintien d'un système d'assurance de qualité repose sur l'ensemble du personnel. Pour cette raison, il est nécessaire de disposer d'un personnel qualifié et en nombre suffisant pour mener à bien toutes les tâches qui lui incombent.

2.1.2. Un organigramme ou des emplois fonctionnels sont déterminés pour l'ensemble de la structure de banque de tissus. Des fiches de postes, régulièrement mises à jour, déterminent de façon précise les activités et les responsabilités de chaque personne concourant à l'activité de la banque de tissus.

Les fonctions de production excluent la participation à l'activité d'assurance qualité. La responsabilité du système d'assurance qualité est assurée par une personne qualifiée distincte du responsable médico-scientifique.

La fonction de mise en oeuvre des règles administratives et financières est distincte de celle de la fonction d'encadrement médical et scientifique de la banque.

2.1.3. Le secret médical et la discrétion professionnelle s'appliquent à l'ensemble du personnel.

2.2. Encadrement

2.2.1. Encadrement médical et scientifique de la banque :

Le personnel est placé sous l'autorité d'un responsable nommé désigné par la personne physique ou morale ayant obtenu l'autorisation, ayant les qualifications et l'expérience nécessaires et investi de l'autorité requise pour exercer ces fonctions.

Le responsable de la banque de tissus veille au respect des règles techniques, éthiques et administratives de l'activité, et en particulier :

- de l'organisation générale, y compris le maintien de la continuité du service lorsqu'elle est nécessaire ;
- de l'établissement des fiches de postes ;
- de la qualification et de la formation du personnel ;
- de la mise en place et du respect des règles d'hygiène et de sécurité ;
- de l'approbation des procédures et de leurs mises à jour, et de la vérification de leur application ;
- de la mise en place de l'assurance de la qualité et de son responsable ;
- de la vérification de la qualité des prélèvements qui lui sont confiés ;
- de la validation des tissus ;
- de la rédaction du rapport d'activité ;
- de la relation avec les partenaires de l'activité.

Par ailleurs, il doit se tenir informé régulièrement des développements technologiques afin d'améliorer les performances de son unité et de favoriser les travaux de recherche.

Des remplaçants nommé désignés et possédant les qualifications identiques peuvent avoir délégation d'une partie de ces fonctions.

2.2.2. Les analyses de biologie médicale sont réalisées soit par des laboratoires hospitaliers de biologie médicale, soit par des laboratoires d'analyses de biologie médicale autorisés (art. L. 757 du code de la santé publique).

2.2.3. Chaque membre du personnel doit porter un regard critique sur le travail et les conditions dans lesquelles il l'effectue. Il propose au responsable médical et scientifique toute modification susceptible d'améliorer les performances, la qualité ou les conditions d'exécution. Il participe au suivi des évolutions technologiques liées aux activités de l'unité.

2.3. Qualification

Une personne est considérée comme compétente lorsqu'elle possède une formation et une expérience professionnelles lui apportant les connaissances indispensables à la maîtrise des techniques qu'elle doit mettre en oeuvre.

Le personnel remplaçant doit posséder les mêmes compétences et formation que le personnel titulaire.

2.4. Formations interne et externe

La formation du personnel a pour objectif de répondre aux besoins de qualification et d'actualisation des connaissances du personnel.

Le personnel doit recevoir, initialement puis de façon régulière, une formation théorique et pratique correspondant aux bonnes pratiques de préparation des tissus et être tenu régulièrement informé sous des formes appropriées des évolutions théoriques, biologiques et techniques.

Les aspects théoriques doivent comporter des notions techniques, éthiques et administratives sur l'activité de greffe de tissus, depuis l'accueil du donneur et le prélèvement jusqu'à l'implantation et les résultats des greffes.

Le programme détaillé des connaissances minimales à acquérir doit faire l'objet d'un document écrit, permettant de définir les compléments de formation théorique et pratique nécessaires avant toute prise de fonctions ainsi que l'établissement d'un plan de formation continue pour l'ensemble des personnels.

La formation comporte un enseignement spécifique, adapté aux connaissances minimales requises pour la compréhension et la maîtrise des techniques utilisées, concernant en particulier :

- les différents tissus pris en charge par la banque ;
- les différentes techniques utilisées depuis la prise en charge jusqu'à la distribution des tissus ;
- les démarches d'assurance de la qualité et les règles de sécurité à appliquer ;
- l'informatique telle qu'elle est utilisée dans la banque.

L'efficacité pratique de cette formation doit être périodiquement évaluée. Le programme et les comptes rendus des séances de formation doivent être archivés.

2.5. Sécurité

Le personnel doit être formé à l'utilisation des installations, des systèmes de sécurité et des matériels de secours. Cette information et cette formation doivent être périodiquement testées par des exercices donnant lieu à analyse critique et éventuellement à des compléments de formation.

2.6. Hygiène

Des programmes détaillés traitant de l'hygiène doivent être établis et adaptés aux différents besoins de la banque. Ils comportent des procédures écrites relatives à la protection, à la santé, à l'hygiène et à l'habillement du personnel.

Il convient notamment de prendre les dispositions nécessaires en vue d'éviter qu'une personne présentant une affection susceptible d'influer sur la qualité des produits ne soit employée à la préparation.

Toute personne pénétrant dans une zone où les tissus sont manipulés porte des vêtements protecteurs appropriés aux opérations qui s'y déroulent et utilise les lavabos mis à disposition. Les vêtements de ces zones sont lavés ou nettoyés selon des procédures écrites, de façon qu'ils ne se chargent pas de particules.

Le port de gants à usage unique, d'un masque évitant l'émission de gouttelettes et de lunettes sont nécessaires pour le personnel manipulant des tissus ; ils sont changés au moins à chaque séance de travail. En outre, les montres, bracelets et bijoux sont à exclure, les cheveux et, le cas échéant, la barbe doivent être couverts.

3. Locaux

3.1. Généralités

Les locaux doivent être adaptés aux opérations à effectuer.

Le plan des locaux, leur agencement, leur conception et leur utilisation doivent tendre à minimiser les risques de confusion ou d'erreur en établissant des circuits logiques. Ils doivent correspondre aux niveaux de propreté requis par les différentes opérations à effectuer. Ils doivent également contribuer à la protection du personnel et de l'environnement, être tempérés, correctement éclairés et ventilés et être conformes à la réglementation en vigueur contre les incendies. Ils doivent être clairement identifiés et signalés.

Les locaux destinés à des opérations essentielles pour la qualité des produits doivent avoir fait l'objet d'une qualification. Pour cela, chaque lieu d'activité doit faire l'objet d'une fiche descriptive qui doit être réactualisée en cas de modification, et selon le rythme de révision prévu des procédures.

L'accès aux différentes zones de travail est strictement limité aux personnes autorisées. Il est interdit de fumer, manger et boire en dehors des zones annexes.

3.2. Conception des zones

3.2.1. Les locaux doivent représenter une unité de lieu, au moins en ce qui concerne les activités de base de la banque, permettant d'établir des circuits logiques de préparation des tissus en fonction de la succession des opérations à effectuer et des niveaux de propreté requis.

Une zone réservée et isolée (ou plusieurs) sera utilisée pour la préparation des tissus et une autre (ou plusieurs) pour leur conservation. Ces deux zones ne doivent pas être utilisées comme lieu de passage pour le personnel, ni pour le stockage de fournitures. Leur accès est réservé aux personnes autorisées.

3.2.2. Zones de réception et de distribution des tissus :

C'est dans ces zones que sont accomplies l'ensemble des formalités administratives liées :

- à la réception du tissu par la banque : enregistrement, anonymisation, ouverture d'un dossier accompagnant le tissu au long des différentes étapes de sa transformation jusqu'à sa distribution ou sa cession ;
- à la distribution ou la cession du tissu.

3.2.3. Zones classées de préparation des tissus :

Toute manipulation des tissus, c'est-à-dire toute opération obligeant à ouvrir l'emballage du tissu ou à rompre son système clos, impose l'utilisation d'une zone classée de préparation des tissus.

L'entrée de cette zone se fait par un (ou des) sas réservé(s) au personnel et aux fournitures. Les différentes portes d'un sas ne peuvent pas être ouvertes en même temps. Un système de blocage alterné avec une alerte visuelle ou sonore est utilisé en vue d'empêcher l'ouverture de plus d'une porte à la fois.

Les faux plafonds sont scellés. Les saillies, étagères et placards sont réduits au minimum. Les portes sont d'un modèle ne présentant pas d'anfractuosités difficiles à nettoyer, excluant les portes coulissantes. Les plafonds, le sol et les murs doivent être lessivables avec des produits agréés désinfectants hospitaliers. Les tuyaux et robinets inamovibles doivent être clairement étiquetés pour indiquer leur contenu et, le cas échéant, le sens du courant. Les éviers et canalisations doivent être évités si possible. Sinon, ils sont équipés de siphons lavables et doivent éviter tout reflux, de façon à limiter les risques de contamination microbienne. Toute évacuation au sol doit être ouverte, peu profonde et facile à nettoyer selon des procédures établies. Les lave-mains ne peuvent être installés que dans les vestiaires ou sas et ne pas avoir de commande manuelle. Dans les zones de préparation, ne sont pas entreposés cartons et dossiers.

L'ouverture des emballages des tissus ou la rupture du système clos ne peuvent être réalisées qu'à un poste de travail de classe A et dans une salle de classe D permettant de réduire les risques de contaminations microbiennes, particulaires et pyrogènes. Toutes les préparations sur les produits contaminés ou potentiellement contaminés sont effectuées sous des hottes de sécurité biologique ou selon des dispositions de confinement physique.

Cette zone est alimentée en air entièrement filtré sur des filtres d'efficacité correspondant au niveau de propreté requis.

Les caractéristiques de l'atmosphère du poste de travail ou des salles classées hors activité correspondent aux normes et sont retrouvées en cas d'activité après un bref temps d'épuration. Pour atteindre ces classes dans les salles, le nombre de renouvellements d'air est égal ou supérieur à 20 par heure dans des pièces caractérisées par de bons schémas aérauliques et munies de filtres à haute efficacité vis-à-vis des particules de l'air (HEPA), selon les normes figurant dans le tableau suivant :

Normes d'environnement de base pour la préparation des produits

=====

Vous pouvez consulter le tableau dans le JO

n°6 du 08/01/1999 page 389 à 399

=====

L'alimentation en air filtré maintient en toute circonstance une pression positive par rapport aux zones voisines, imposant une circulation d'air des zones de plus haute sécurité vers des zones de moindre sécurité.

Il doit être démontré que le schéma aéralique ne présente pas de contamination donc de circulation d'air vers une zone de haute sécurité. L'alimentation en air doit être munie d'un système d'alarme détectant toute déficience.

Ces zones sont équipées d'un indicateur de gradient de pression qui doit être contrôlé chaque jour et les résultats enregistrés.

Un contrôle microbien et particulaire doit être régulièrement réalisé et planifié.

Les désinfectants et les détergents sont contrôlés sur le plan de la contamination microbienne. Les récipients entamés ne doivent pas être remplis à nouveau sans lavage et désinfection préalables.

Lorsque l'entretien de matériel a été effectué au sein de la zone classée, et si les conditions de propreté requises ou de stérilité n'ont pas pu être maintenues, cette zone est nettoyée et éventuellement décontaminée.

L'ensemble du matériel est entretenu et validé de façon planifiée. Les ateliers d'entretien sont isolés des zones de préparation.

Une attention particulière est apportée à la protection et au nettoyage des flacons ou accessoires introduits dans la zone de préparation.

Le personnel présent dans la zone est en nombre minimum.

3.2.4. Zones de conservation des tissus :

3.2.4.1. Outre les dispositions générales qui s'appliquent aux locaux de la banque de tissus, les zones de conservation doivent être de taille suffisante et adaptées aux modalités de conservation et aux équipements utilisés.

Celles consacrées à la conservation des tissus, d'une part, et celles affectées au stockage des matériels et différents produits, d'autre part, doivent être distinctes.

Dans tous les cas, elles doivent permettre le rangement logique et adapté afin d'éviter tout risque de confusion.

3.2.4.2. Zones de conservation comportant des récipients cryogéniques contenant de l'azote liquide :

Lorsque la conservation est réalisée à basse température dans des récipients cryogéniques contenant de l'azote liquide, ceux-ci doivent être placés dans des locaux adaptés. L'accès de ces locaux est réservé aux seules personnes autorisées, ils ne sont pas utilisés comme lieu de passage. Ils doivent être conçus, construits et adaptés pour éviter les risques d'erreur et d'accident pour le personnel. L'organisation générale des locaux doit se faire de façon à ne pas gêner la libre circulation du personnel, à favoriser l'accès aux systèmes de sécurité, à faciliter les manipulations autour et dans les récipients cryogéniques.

Le sol doit être recouvert d'un matériau isolant thermique, résistant aux basses températures, aux désinfectants et d'un entretien facile.

Les portes d'accès, qui doivent être conçues de manière à permettre un accès facile par des personnes extérieures et l'évacuation rapide des personnes y travaillant, sont équipées d'un oculus permettant la surveillance par des personnes extérieures.

La ventilation doit correspondre aux normes d'hygiène et de sécurité exprimées dans le code du travail et aux recommandations des fournisseurs de fluide cryogénique.

Un contrôle du fonctionnement de la ventilation est obligatoire avant l'entrée dans le local.

Le local doit être à une température supérieure ou égale à + 20 °C afin d'éviter une condensation sur les parties les plus froides des équipements cryogéniques et le dépôt de glace à l'intérieur des récipients.

Le contrôle en continu de la teneur en oxygène est recommandé. Des alarmes locales et reportées à un poste de surveillance alertent le personnel en cas de teneur insuffisante en oxygène. Des procédures écrites fixent les conditions d'accès et les mesures à prendre en cas d'anomalies. Des exercices d'alerte et de secours doivent être effectués périodiquement.

Un appareil de respiration autonome de secours (pour le sauveteur) et un appareil de réanimation alimenté en oxygène (pour la victime) sont placés à l'extérieur du local, à proximité immédiate, disponibles à tout moment, et leur bon fonctionnement est vérifié périodiquement.

Tous les appareils de distribution et de mise en oeuvre d'azote liquide doivent être pourvus de dispositifs de sécurité. Ils doivent être qualifiés.

3.2.5. Zones annexes :

Les zones de repos et de restauration doivent être séparées des zones de travail. Les vestiaires et sanitaires doivent être facilement accessibles et adaptés au nombre d'utilisateurs et ne doivent pas communiquer directement avec les zones de production et de stockage.

3.3. Entretien, maintenance

L'aménagement des locaux doit permettre un nettoyage et un entretien efficaces en vue d'éviter les contaminations, les dépôts de poussière et, de façon plus large, toute atteinte à la qualité des tissus. En particulier, la conception du plafond, des murs, du sol et des paillasse doit permettre un entretien facile et une désinfection efficace. Des surfaces lisses doivent être prévues lors de la construction ou de la réfection des locaux. Les surfaces doivent être exemptes de fissures et de joints ouverts et les matériaux constituant ces surfaces ne doivent pas libérer de particules.

Les locaux doivent être équipés et entretenus en vue d'empêcher l'entrée d'insectes et d'autres animaux. La présence de végétaux d'ornement est proscrite dans les zones de préparation et de stockage. Ils doivent être entretenus et nettoyés soigneusement et selon des modalités adaptées au niveau de propreté requis. Des procédures écrites détaillées fixent modalités, circonstances et fréquences de l'entretien et du nettoyage.

Les réparations, l'entretien et le nettoyage ne doivent présenter aucun risque direct ou indirect pour la qualité des tissus.

4. Matériel

4.1. Généralités

La qualité et l'emplacement du matériel doivent être adaptés aux méthodes de préparation et de conservation des tissus concernés et répondre aux normes de sécurité et de protection du personnel.

Le matériel doit être conçu de façon à permettre un nettoyage fiable et minutieux.

Les opérations d'entretien et de réparation du matériel ne doivent présenter aucun risque pour la qualité des tissus.

4.2. Fiche technique

Pour chaque matériel, une fiche technique doit être établie précisant notamment :

- la destination du matériel et sa justification ;
- le nom, le type et le numéro de série ou de référence de l'appareil ;
- la date d'achat, la date de mise en service ;
- le nom, l'adresse du fournisseur ;
- les conditions d'installation telles que l'alimentation en eau, en électricité, l'environnement et la température ;
- la durée et les conditions de garantie du constructeur ;
- le numéro de téléphone et les références de la société de maintenance ;
- la notice technique d'utilisation ;
- les modalités de l'entretien et de la maintenance ;
- la procédure ou la référence à une procédure en cas de panne.

4.3. Qualification

4.3.1. La qualification du matériel est obligatoire dans trois circonstances :

- lors de l'installation d'un nouvel équipement ;
- après toute réparation ou adaptation pouvant modifier le fonctionnement ou la destination du matériel ;
- s'il y a un doute au sujet de son fonctionnement.

4.3.2. La qualification consiste à démontrer que le matériel fonctionne correctement et donne réellement le résultat conforme à la fiche descriptive et aux spécifications du fournisseur. Elle doit faire l'objet d'un protocole écrit.

Chaque qualification fait l'objet d'un dossier qui comprend en particulier :

- la fiche technique ;
- le compte rendu de qualification ;
- les résultats des contrôles ;
- la conclusion précisant les conditions d'utilisation du matériel et montrant qu'il correspond à l'usage pour lequel il est prévu.

Ce dossier, daté et signé par le responsable de l'unité, doit être archivé.

4.4. Entretien, maintenance

Chaque appareil doit faire l'objet d'un entretien et d'une maintenance à intervalle régulier. Un membre du personnel est chargé de l'entretien et du suivi de cette maintenance qui doivent faire l'objet d'une procédure écrite.

Les vérifications à effectuer sont détaillées sur une fiche d'entretien et de maintenance, donnant en particulier les renseignements suivants :

- le nom de l'appareil ;
- la marque ;
- le numéro de référence ;
- la périodicité des interventions de maintenance et d'entretien ;
- la nature des interventions à effectuer ;
- le nom du responsable de la maintenance et, éventuellement, de la société spécialisée.

A chaque intervention seront consignés sur la fiche de maintenance :

- la date ;
- le nom de l'opérateur ;
- la nature de l'intervention réalisée.

Toute opération de maintenance réalisée en sous-traitance doit faire l'objet d'un contrat écrit.

En dehors des opérations régulières de maintenance, toute intervention doit faire l'objet d'un compte rendu technique daté et signé justifiant l'intervention et décrivant le type d'anomalie de fonctionnement constaté, ainsi que les actions correctrices mises en oeuvre. Ces documents sont archivés en les classant par type d'appareils.

4.5. Utilisation

A proximité de chaque appareil, seront rangées de façon à être facilement accessibles pour le personnel :

- la fiche technique ;
- la fiche récapitulative des opérations de maintenance.

Le matériel défectueux doit être retiré de la zone d'activité ou étiqueté en tant que tel en attente d'évacuation ou de réparation.

5. Produits et ingrédients (produits thérapeutiques annexes)

Les produits ou ingrédients éventuellement utilisés pour la préparation des tissus et entrant en contact avec eux (produits thérapeutiques annexes) doivent faire l'objet de spécifications précises et écrites et de contrôles appropriés à leur nature et à leur utilisation. Leur provenance est contrôlée, ainsi que les modalités d'adjonction.

6. Documentation et système d'information

6.1. Généralités

Les documents sont un des éléments essentiels du système d'assurance de la qualité.

6.1.1. La documentation comporte :

- des documents descriptifs de l'organisation de la banque de tissus, des opérations à effectuer et des exigences relatives aux tissus, produits et matériels ;
- des enregistrements des actions réalisées ;
- des documents de liaison.

6.1.2. Les documents doivent être clairs et lisibles, ils doivent comporter le titre, la nature et l'objet, et doivent être signés et datés par les personnes qualifiées autorisées. La reproduction des documents de travail à partir des originaux doit être conçue pour éviter toute erreur.

6.1.3. Toute correction doit être signée et datée, la correction permettant la lecture du texte original ; le cas échéant, le motif de la correction doit être noté.

6.1.4. Les documents sont tenus à jour et régulièrement révisés. La mise à jour et la gestion des documents doivent faire l'objet d'une procédure cohérente. Lorsqu'une révision est intervenue, le document précédent est archivé et son utilisation doit être rendue impossible.

6.2. La documentation doit au moins comporter

les documents suivants

6.2.1. Documentation générale :

6.2.1.1. Les documents descriptifs de l'organisation de la banque de tissus :

L'organisation générale de la banque doit être définie dans un document comportant, entre autres points, l'organigramme de la production, l'organigramme du contrôle, leur place respective dans celui de la banque et l'intégration des contrôles dans les organigrammes de production ;

Les relations existant avec les sites et les équipes de prélèvement, d'une part, et avec les chirurgiens utilisateurs, d'autre part, doivent faire l'objet de procédures spécifiques définies par écrit, notamment dans le cadre de conventions ;

Chaque banque de tissus doit disposer de la liste exhaustive des tissus qui y sont préparés. Chaque type de tissu préparé doit faire l'objet d'une documentation complète, qu'il s'agisse de l'organisation, des procédures, des spécifications, des documents de liaison ou des enregistrements.

6.2.1.2. Les procédures générales :

Elles donnent les indications nécessaires à la réalisation de certaines opérations comme le nettoyage des locaux, les mesures d'hygiène et de sécurité, les contrôles de l'environnement, la gestion des documents, les circuits, la formation du personnel.

6.2.1.3. Les fiches de postes du personnel.

6.2.1.4. Les dossiers techniques concernant chaque matériel :

Ce dossier comporte :

- tout document provenant du fournisseur ;
- le dossier de qualification ;
- un exemplaire de la fiche technique ;
- un exemplaire de la fiche de maintenance ;
- les documents correspondant aux différentes opérations de maintenance ou de réparation.

Ce dossier doit être tenu à la disposition de l'ensemble du personnel utilisant le matériel.

6.2.1.5. Les dossiers techniques concernant les produits et ingrédients utilisés pour la préparation des tissus (produits thérapeutiques annexes) comportent leurs spécifications et validations et leur mode d'utilisation et de contrôle.

6.2.2. Les procédures spécifiques et spécifications concernant les tissus :

6.2.2.1. Les procédures ou instructions doivent décrire en détail, pour chaque type de tissu pris en charge par la banque, la réalisation des différentes opérations à effectuer depuis leur prise en charge jusqu'à leur distribution et leur évaluation.

6.2.2.1.1. Les procédures spécifiques décrivent les conditions dans lesquelles les tissus sont manipulés. Elles doivent comporter en particulier :

- les principes de base sur lesquels elles sont établies ;
- la nature des tissus concernés ;
- la zone affectée ;
- la nature du matériel utilisé et les conditions d'utilisation ;
- les méthodes utilisées avec des instructions détaillées et les précautions à respecter pour chaque étape ;
- la nature des contrôles réalisés au début, en cours ou en fin d'opération ;
- les documents à utiliser et à établir.

6.2.2.1.2. Des procédures d'urgence s'appliquent en cas d'incident ou d'accident survenu lors des différentes étapes, y compris le rappel des tissus.

6.2.2.2. Des spécifications doivent décrire en détail les exigences auxquelles doivent répondre les tissus aux différents stades des opérations réalisées dans la banque ainsi que les produits utilisés au cours des différentes opérations.

6.2.3. Les enregistrements :

Les origines, relevés d'analyse, comptes rendus ou enregistrements retraçant les étapes suivies par chaque tissu depuis sa prise en charge jusqu'à sa distribution et son évaluation doivent faire l'objet de documents écrits permettant de retracer l'historique de chaque produit.

6.2.4. L'étiquetage des tissus :

La fixation des étiquettes sur les conditionnements des tissus et les caractéristiques de l'étiquette doivent assurer la pérennité et la lisibilité des informations fournies.

Les informations fournies doivent en particulier permettre de connaître la nature et l'origine du tissu, d'assurer son identification et doivent être conformes à la réglementation en vigueur.

6.2.5. Les documents de liaison internes ou externes :

6.2.5.1. L'existence de documents de liaison internes ou externes est indispensable à la bonne transmission des informations.

6.2.5.2. Lors du prélèvement, des documents de liaison doivent permettre à l'équipe de prélèvement de connaître les conditions techniques devant être mises en oeuvre pour le prélèvement, le conditionnement initial, le stockage temporaire éventuel et le transport vers la banque. Un document (fiche de prélèvement) doit permettre de noter très précisément l'origine du tissu, les antécédents et l'histoire médicale du donneur, les résultats des examens cliniques et complémentaires réalisés, les conditions du prélèvement, afin que le responsable de la banque détienne les éléments nécessaires pour juger de la recevabilité des tissus (cf. règles de bonnes pratiques relatives au prélèvement des tissus et au recueil de résidus opératoires).

6.2.5.3. Chaque tissu, pour pouvoir être utilisé à des fins thérapeutiques, doit être accompagné des documents prévus par la réglementation en vigueur.

6.2.5.4. Lorsque le tissu a été implanté, la fiche de prélèvement mentionnée ci-dessus est complétée par le nom du receveur et la date d'implantation et conservée dans le dossier médical du receveur. Les informations concernant le site et la date d'implantation, le nom du receveur, les contrôles de qualité effectués sur le tissu, en particulier de stérilité, l'indication et les résultats de la greffe, l'existence d'éventuelles complications liées à son usage doivent être conservées selon les dispositions réglementaires en vigueur et transmises à la banque dont provient le tissu.

6.2.6. Les rapports d'activité

Ils comportent au moins un rapport d'activité annuel et toute information nécessaire à l'évaluation de l'activité réalisés selon la réglementation en vigueur.

Ces rapports sont adressés aux autorités administratives concernées et aux partenaires de l'activité de la banque.

6.3. Traçabilité, confidentialité

La documentation doit permettre d'assurer la traçabilité des produits depuis leur prélèvement jusqu'à leur utilisation et leur évaluation, en passant par les différentes étapes de préparation et de conservation.

Quel que soit le système de gestion et d'archivage de la documentation, la confidentialité des informations doit être assurée.

6.4. Archivage

Sous réserve de dispositions réglementaires spécifiques prévoyant des délais de conservation plus longs, les documents concernant la traçabilité et la sécurité des tissus sont archivés pendant une durée de quarante ans.

Les autres documents relatifs à l'activité de la banque sont conservés cinq ans, sauf lorsqu'ils font l'objet d'une réglementation spécifique. Il est toutefois important de rappeler que la règle de prescription en matière de responsabilité civile est dans tous les cas de trente ans.

L'archivage des documents doit se faire de telle sorte que la qualité de leur conservation soit garantie pendant la durée prescrite et que le recueil des données soit possible de façon correcte et dans un délai raisonnable.

Une procédure doit définir le lieu, la durée, la méthode, le support utilisé et les personnes autorisées à intervenir sur les documents archivés. L'ensemble des documents doit permettre de répondre à différents travaux d'évaluation ou études et doit être tenu à la disposition des autorités ou organismes publics compétents, en particulier de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé et de l'Etablissement français des greffes.

6.5. Système informatique

Les données concernant au minimum l'origine des tissus (sites de prélèvement, numéro de code des donneurs), leur nature, leurs caractéristiques essentielles et leur destination (établissements, patients receveurs, dates d'implantation, indication) doivent être enregistrées par un système de traitement informatisé.

Il est souhaitable que ce système informatique soit adapté pour transmettre à l'Etablissement français des greffes les informations qui lui seront nécessaires pour que ses missions concernant la sécurité et l'évaluation des greffes puissent être assurées.

Des procédures détaillées de fonctionnement du système doivent être disponibles et l'exactitude des enregistrements doit être vérifiée. Les informations doivent être conservées durant la période fixée pour chaque type de document. Seules les personnes autorisées par le responsable médical et scientifique de la banque doivent pouvoir entrer ou vérifier des données dans le système et effectuer les changements. La trace des modifications réalisées doit être conservée (en dehors de celles réalisées lors de la saisie initiale).

L'accès doit être protégé par des mots de passe ou d'autres moyens validés. La prise en charge des informations par le système de traitement informatisé devra être en accord avec la réglementation en vigueur.

Le fournisseur du système doit l'avoir validé et prouver que les données sont conservées pendant la période envisagée.

7. Sécurité de l'activité

7.1. Maîtrise de la qualité

L'assurance de la qualité représente l'ensemble des mesures prises pour assurer une qualité et une sécurité maximales. Elle relève d'une fonction différente de celle de production, mais requiert la participation et l'engagement de l'ensemble du personnel. Le système d'assurance de la qualité doit être bien conçu, contrôlé, largement diffusé. Il peut se référer à des normes d'assurance qualité (normes ISO et EFl...).

L'assurance de la qualité est notamment fondée sur :

- l'adéquation de la qualification du personnel aux fonctions qu'il occupe ;
- le respect des règles d'hygiène et de sécurité ;
- l'adéquation des locaux aux activités qui s'y déroulent et leur entretien ;
- la qualification et la maintenance du matériel ;
- le respect de l'ensemble des procédures, spécifications et documents mis en oeuvre ;
- le contrôle de la qualité des approvisionnements ;
- les contrôles des tissus lors de leur arrivée, en cours de préparation, lors de la validation et du déstockage ;

- la connaissance des résultats des greffes et de la survenue d'éventuelles complications ;
- la précision de l'étiquetage et la fiabilité du système de traçabilité ;
- la mise en oeuvre de mesures correctives en cas de dérive à tous les niveaux ;
- l'existence d'audits internes et externes.

Le maintien de la qualité impose la vérification et l'actualisation permanente des procédures et spécifications, le développement de l'autocontrôle et de l'évaluation interne.

La révision des procédures et spécifications impose une actualisation permanente des connaissances techniques et médicales.

7.2. Contrôles de la qualité

Les tissus ne peuvent être distribués sans qu'aient été effectués la sélection des donneurs basée sur les antécédents et l'histoire médicale, les analyses biologiques, les tests de dépistage des maladies transmissibles et les contrôles requis garantissant que leurs qualité et sécurité sont satisfaisantes.

Des procédures spécifiques doivent définir les modalités des contrôles des tissus à chaque stade, du prélèvement à la distribution. Toute opération de contrôle réalisée en sous-traitance doit faire l'objet d'une convention écrite et d'audit du fournisseur ou prestataire.

Des contrôles doivent être mis en place aux stades appropriés de chaque procédé afin de vérifier la conformité des produits ou des produits intermédiaires chaque fois qu'ils constituent un indicatif représentatif de la qualité d'une étape.

La fréquence et les conditions de réalisation de ces contrôles doivent permettre des actions de correction rapides chaque fois qu'elles s'avèrent nécessaires.

7.3. Vigilance et analyse des accidents

Des procédures écrites doivent définir chaque modalité de distribution et les conditions qui permettent à la banque de tissus d'être informée de l'identité du receveur, de la date de l'intervention, des conditions d'utilisation du tissu et de la survenue de complications éventuelles liées à son utilisation.

La traçabilité entre donneur et receveur doit être possible dans les deux sens et permettre d'analyser les différentes étapes de contrôle et de traitement subies par le tissu.

La survenue d'accidents ou d'incidents liée à l'utilisation du tissu doit donner lieu à une procédure d'alerte et à une enquête immédiate destinée à en comprendre la cause et à éviter toute répétition de l'événement. Les résultats de ces enquêtes doivent être transmis à l'autorité administrative compétente définie par la réglementation en vigueur.

7.4. Systèmes d'alerte et procédures d'urgence

Des procédures d'urgence doivent être définies afin de permettre, lorsque cela s'avère nécessaire, d'alerter l'ensemble des circuits de distribution concernant les différents organes, tissus ou cellules provenant d'un même donneur, permettant en particulier le rappel des produits concernés et la destruction des tissus qui seraient encore en stock.

III. - REGLES TECHNIQUES CONCERNANT LA CONSERVATION,

LA TRANSFORMATION ET LE TRANSPORT

1. Généralités

Les tissus, depuis leur arrivée à la banque jusqu'à leur utilisation, subissent un certain nombre d'étapes qui sont décrites dans les paragraphes suivants.

Chaque banque de tissus doit disposer de la liste exhaustive des tissus qui y sont préparés.

Toutes les étapes de conservation-transformation et de transport des tissus doivent être pratiquées dans des conditions garantissant la qualité des produits et la sécurité du personnel. Pour chaque type de tissu fourni, les méthodes de préparation comprennent le procédé de production, le matériel utilisé et sa qualification ainsi que les contrôles effectués et doivent faire l'objet de procédures écrites précisant la chronologie des étapes.

Les règles concernant les locaux, le matériel et le personnel ont été développées dans les chapitres précédents, ainsi que la maîtrise de la qualité, les contrôles et la vigilance.

Toute opération de production réalisée en sous-traitance doit faire l'objet d'un contrat écrit.

2. Réception des tissus

2.1. Identification et vérification des tissus à leur réception

Lors de leur réception, les tissus doivent être identifiés et vérifiés.

L'identification repose sur les indications portées sur l'étiquetage apposé sur le conditionnement des tissus lors du prélèvement, sur les documents et, éventuellement, les tubes sanguins.

Le conditionnement et le produit doivent être examinés afin de vérifier que la qualité du tissu n'a pas été altérée pendant le transport.

Les tissus doivent être accompagnés des documents permettant de préciser leur origine, les caractéristiques du donneur et les conditions du prélèvement. Si les tubes de prélèvement sanguin sont adressés à la banque, ils sont également vérifiés et identifiés avant d'être envoyés au laboratoire d'analyses ; si les prélèvements sanguins ont été initialement adressés à un autre laboratoire, un compte rendu d'analyses de biologie médicale doit être obtenu et l'identification du donneur doit être clairement établie.

2.2. Conservation temporaire en zone de quarantaine

Quelle que soit la technique de conservation utilisée, une zone spécifique doit permettre de stocker les produits non validés, séparément des produits validés. Les tissus doivent être identifiés de façon adéquate afin d'éviter toute utilisation tant qu'aucune action appropriée n'a été décidée par les personnes qualifiées et désignées à cet effet.

3. Sélection des donneurs, biothèque

La sélection des donneurs repose notamment sur l'étude des antécédents et de l'histoire médicale du donneur recueillis lors du prélèvement, sur les examens de laboratoire et en particulier le dépistage de certaines maladies transmissibles, en application des textes en vigueur. Les originaux des documents recueillis lors du prélèvement des tissus et des comptes rendus d'analyses doivent être archivés.

Peuvent également être pris en compte, pour certains tissus, l'âge du donneur, les conditions du prélèvement (délai, asepsie) ou certains antécédents (notamment locaux ou liés aux effets secondaires d'un médicament) pouvant altérer la qualité du tissu prélevé.

La nature exacte des critères de sélection pour chaque tissu préparé doit faire l'objet de documents de spécification.

Un (ou des) échantillon(s) du produit biologique ayant servi à effectuer les recherches des marqueurs biologiques d'infection chez les donneurs doit être conservé au sein d'une biothèque.

4. Préparation des tissus

4.1. Toute manipulation des tissus, c'est-à-dire toute opération obligeant à ouvrir leur conditionnement, nécessite l'utilisation d'une zone classée de préparation des tissus et les précautions d'asepsie exigées du personnel et du matériel utilisé, telles qu'elles ont été décrites plus haut.

4.2. Addition de produits ou ingrédients

(produits thérapeutiques annexes) aux tissus

Lors de l'addition de produits thérapeutiques annexes aux tissus, le choix des produits, leurs caractéristiques, leur provenance et leur contrôle, les modalités d'addition et d'homogénéisation, les règles d'asepsie et d'étiquetage doivent être établies par écrit.

4.3. La conformité des produits tissulaires aux spécifications doit être vérifiée à chaque étape significative. En cas de non-conformité, les produits non conformes doivent être identifiés et enregistrés. A chaque fois que cela est possible, une étude rétrospective doit être effectuée. Les produits non conformes doivent être séparés des produits conformes. Ils sont identifiés de façon adéquate afin d'éviter toute utilisation tant qu'aucune action appropriée n'a été décidée par les personnes qualifiées et désignées à cet effet. Le traitement des produits non conformes fait l'objet d'une procédure décisionnelle.

Des dispositions appropriées doivent être prises pour empêcher la récurrence des non-conformités. Il est nécessaire de répertorier les non-conformités, de les analyser et de les gérer, et d'informer largement tous les intervenants.

5. Sécurité microbiologique des tissus

5.1. La sécurité microbiologique repose avant tout sur la sélection des donneurs, tout particulièrement vis-à-vis des virus et des agents non conventionnels.

5.2. La sécurité bactériologique des tissus peut être assurée par le contrôle de l'absence de contamination initiale de chaque tissu et son maintien au cours des différentes opérations. Des contrôles bactériologiques doivent être réalisés aux différentes étapes, sur chaque tissu, afin de s'assurer de la stérilité bactériologique. D'autres contrôles, en particulier parasitologiques, peuvent être nécessaires pour certains tissus.

5.3. La sécurité bactériologique peut également être obtenue par la mise en oeuvre d'un agent stérilisant physique ou chimique en fin de préparation lorsqu'ils sont compatibles avec les caractéristiques biologiques des tissus et à condition que le niveau de contamination initial soit maîtrisé. La mise en oeuvre de ces agents doit se faire dans le respect de leurs règles générales d'utilisation (en particulier normes européennes EN 550, 552, 554 et 556 concernant la stérilisation des dispositifs médicaux par irradiation, par la vapeur d'eau et par l'oxyde d'éthylène) et doit avoir fait l'objet d'une validation en fonction du protocole utilisé. L'efficacité de la stérilisation doit être vérifiée pour chaque lot de stérilisation, et un témoin de stérilisation devra être utilisé sur chaque emballage, à chaque fois que possible.

Un registre de stérilisation est établi, mentionnant les renseignements suivants :

- service ou société ayant réalisé la stérilisation et signature du représentant du service ou de la société ;
- date de stérilisation ;
- type et numéro des tissus stérilisés ;
- conditions de stérilisation (durée, dose reçue, température...).

L'enregistrement a pour but d'assurer la traçabilité et permet le contrôle des conditions de stérilisation.

6. Validation des tissus

La validation correspond à l'établissement de la preuve que le tissu correspond aux spécifications fixées, en particulier : critères de sélection clinique et biologique du donneur, qualité et stérilité du tissu, contrôles effectués lors des différentes opérations. Elle est authentifiée par le responsable médico-technique de la banque. Cette validation permet la distribution et la cession des tissus.

Seuls les tissus validés peuvent quitter les zones de stockage temporaires des produits en quarantaine ou en cours de préparation.

La validation doit apparaître clairement sur les documents accompagnant chaque tissu.

7. Etiquetage réalisé par la banque de tissus

L'étiquetage du tissu est adapté de façon à assurer tout au long des étapes l'identification du tissu et de ses différents niveaux de préparation. Cet étiquetage est décrit dans une procédure.

L'étiquetage définitif du tissu validé constitue l'étape qui permet le passage du tissu de la zone de préparation à la zone de distribution.

8. Conservation

8.1. Généralités

8.1.1. Choix du contenant

Il est adapté et validé pour la conservation de tissus en fonction de leurs caractéristiques, leurs conditions de conservation (température, durée). L'identification des contenants en vue de la traçabilité est validée.

8.1.2. Les matériels de conservation

Les matériels de conservation doivent répondre aux règles générales décrites pour tout matériel de la banque de tissus ; ils doivent en outre être adaptés aux produits conservés, à leur conditionnement et à leur durée de conservation.

Ils sont équipés d'un système de rangement évitant tout risque de perte ou de confusion entre les différents produits.

Des systèmes autonomes de contrôle et d'enregistrement de température ou de niveau sont obligatoires pour tous les matériels devant assurer le maintien des tissus à une température spécifique. Ces enregistrements sont archivés.

Les alarmes de température ou de niveau à une valeur seuil déterminée, adaptée à chaque récipient, doivent être locales et reportées à un poste de surveillance en continu.

Les armoires frigorifiques et les incubateurs doivent être secourus en cas de panne mécanique ou de défaut d'alimentation électrique pour éviter toute variation de température au-delà de valeurs seuils définies pour la

conservation et pendant un temps compromettant la qualité des tissus conservés. Ces matériels doivent faire l'objet d'une qualification.

L'entretien, la réparation et le contrôle régulier systématique dont doit bénéficier chaque appareil font l'objet d'une procédure écrite.

8.1.3. Les caractéristiques des zones de conservation

ont déjà été décrites (cf. locaux)

8.1.4. Formation du personnel

La formation du personnel doit comporter les aspects théoriques et pratiques liés à l'utilisation des procédés de conservation mis en oeuvre. En particulier, tout personnel travaillant dans un local où est utilisé du fluide cryogénique doit avoir bénéficié d'une information sur :

- la cryobiologie et l'utilisation du fluide cryogénique ;
- le risque que représente la raréfaction en oxygène de l'atmosphère ;
- les moyens de prévention et leur mise en oeuvre ;
- la conduite à tenir en cas d'accident.

Le personnel doit être formé à l'utilisation des installations, des dispositifs de sécurité et des matériels de secours. Cette information et cette formation doivent être périodiquement testées par des exercices donnant lieu à analyse critique et éventuellement à des compléments de formation, à l'initiative du responsable de la banque.

8.2. La congélation

8.2.1. Mise en oeuvre de la congélation

Ce procédé met en oeuvre des équipements électriques, des fluides cryogéniques et des moyens de surveillance de leur bon fonctionnement.

La congélation est une opération au cours de laquelle des paramètres, tels que la vitesse de refroidissement et la température finale, sont définis, contrôlés et recueillis selon un ou plusieurs protocoles internes définis et transmis à l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé.

Cette congélation est adaptée à la nature, au nombre et au volume des tissus à traiter ainsi qu'au type de cryoprotecteur éventuellement utilisé.

Lorsque la descente en température est enregistrée, la courbe est conservée dans le dossier concernant le tissu.

Le transfert pour le stockage doit respecter la chaîne du froid afin de garantir la qualité des tissus congelés. Si le lieu de stockage n'est pas contigu au lieu où s'effectue la congélation, il est nécessaire d'utiliser un récipient adapté pour le transport des tissus congelés jusqu'au lieu de stockage.

8.2.2. Délai de conservation des tissus congelés

La conservation des tissus à l'état congelé impose l'utilisation d'un appareillage garantissant le maintien constant de la température préconisée par la procédure de conservation établie par la banque.

Le délai de péremption doit tenir compte de la nature du tissu et des techniques utilisées, et doit être exprimé sur l'étiquetage des tissus.

8.3. La lyophilisation

8.3.1. Technique de lyophilisation

La technique de lyophilisation peut varier quant à la vitesse de refroidissement, la température et la durée de déshydratation, mais elle doit aboutir à un produit dont l'humidité résiduelle n'excède pas 5 % du poids sec.

Les enregistrements des différents paramètres de lyophilisation sont conservés dans le dossier de chacun des tissus.

Le produit final doit être protégé de l'air ambiant. Il est emballé soit sous vide, soit sous gaz inerte, dans un récipient ou un sachet hermétique.

8.3.2. Délai de conservation

Le délai de péremption du tissu lyophilisé emballé sous vide doit tenir compte de la nature du tissu et des techniques de préparation utilisées et doit être exprimé sur l'étiquetage des tissus.

8.4. La conservation à + 4 oC

Il s'agit d'un procédé de conservation à court terme, en milieu liquide adapté au tissu conservé et à température réfrigérée contrôlée par thermostat.

Le délai de péremption doit tenir compte de la nature du tissu et des techniques utilisées et doit être exprimé sur l'étiquetage des tissus.

8.5. La conservation en organoculture

Il s'agit d'un procédé de conservation à moyen terme de tissus en milieu de culture cellulaire dans un incubateur à température homéostatique contrôlée aux environs de 30 oC.

Le délai de péremption doit tenir compte de la nature du tissu et des techniques utilisées et doit être exprimé sur l'étiquetage des tissus.

9. Elimination des tissus non validés et des déchets

Le circuit des déchets relève d'une organisation rigoureuse et parfaitement contrôlée.

Les déchets générés par les activités de préparation des tissus doivent être séparés en :

- déchets potentiellement contaminés ou contaminés ;
- déchets de type ménager.

Ils doivent suivre des circuits différents :

- déchets potentiellement contaminés ou contaminés : ils doivent être enlevés dans des récipients scellés et étanches destinés à l'incinération. Pour les liquides, le récipient doit au préalable renfermer un antiseptique dont la nature et la proportion sont adaptées au risque potentiel. Le ramassage et l'élimination des déchets doivent suivre un circuit permettant à la banque de tissus de justifier de la quantité, de la date et du lieu de l'incinération par un procédé agréé ;
- déchets ménagers : les déchets ne nécessitant pas de précaution particulière sont regroupés dans des sacs plastiques ou conteneurs hermétiquement fermés et évacués avec les ordures ménagères.

La destruction d'un tissu doit faire l'objet d'un procès-verbal de destruction.

10. Cession, transport, évaluation

10.1. Distribution, cession

10.1.1. Les tissus validés par la banque ou provenant d'une autre banque, qu'elle siège sur le territoire national ou au dehors, peuvent être distribués selon deux modalités distinctes :

- la délivrance à un praticien au vu d'une prescription médicale nominative ;
- la délivrance à des dépôts situés dans des établissements de santé utilisateurs.

Les tissus validés peuvent également être cédés par une banque de tissus à une autre banque de tissus, en vue de leur distribution par cette seconde banque selon les modalités prévues ci-dessus.

Les tissus peuvent également être cédés, dans le respect des règles éthiques et sanitaires en vigueur, à des fabricants de dispositifs médicaux, lorsqu'ils sont destinés à être associés à des dispositifs médicaux ou à des fabricants de produits pharmaceutiques lorsque les tissus ou leurs dérivés sont destinés à la préparation d'une spécialité pharmaceutique ou d'un médicament fabriqué industriellement régis par la section 2 du chapitre II du livre V du code de la santé publique. Ces cessions font l'objet de procédures écrites.

10.1.2. Dans tous les cas, avant de délivrer un tissu, l'identité du tissu, les critères de validation, l'intégrité de l'emballage et de l'étiquetage sont vérifiés.

La banque doit transmettre au destinataire toutes les informations à sa disposition sur le donneur, les conditions du prélèvement, le bilan biologique pratiqué sur le donneur et les conditions de conservation et de stérilisation éventuelle du tissu permettant de s'assurer de son innocuité.

Les caractéristiques du tissu sont également précisées, afin de pouvoir faire un choix adapté au receveur et à l'intervention prévue. L'anonymat du donneur doit être respecté. Les conditions d'utilisation particulières éventuelles doivent être précisées (décongélation, réhydratation par exemple).

Le médecin qui réalise la greffe a la possibilité d'accepter ou de refuser le tissu.

10.2. Transport

10.2.1. Règles générales

Le transport des tissus à usage thérapeutique obéit aux réglementations générales régissant les transports et s'effectue selon des circuits clairement définis correspondant aux caractéristiques de chaque produit.

10.2.1.1. Conditions de transport

Le choix du mode de transport se fait selon des critères de sécurité et de respect des conditions de conservation correspondant aux caractéristiques de chaque tissu ; la traçabilité et la transmission des informations concernant le tissu sont assurées. Le transport des tissus s'établit selon des circuits validés, en assurant l'information entre les différents intervenants quant à la nature du tissu et aux conditions de transport. La sécurité des personnes intervenantes est assurée.

La durée de transport est adaptée au tissu et à ses caractéristiques afin d'en garantir la qualité. L'heure d'arrivée et les conditions de réception (notamment de température lorsqu'elle doit être maintenue à des valeurs spécifiques) sont transmises à la banque par le destinataire du tissu.

10.2.1.2. Emballage

L'emballage est obligatoire ; il comprend :

- le conditionnement primaire : le contenant du tissu, boîte, poche ou tube, est hermétique, quels que soient le mode de transport, sa durée et sa distance. Il garantit l'intégrité et assure le respect des conditions de conservation du tissu. Lorsque les récipients sont des poches, les tubulures sont scellées afin de garantir l'absence de contamination bactérienne. Lorsque le transport est assuré en milieu liquide, les conditions de remplissage des conditionnements doivent être précisées et des précautions spécifiques prises pour assurer la sécurité du remplissage et de l'étanchéité du conditionnement ;

- le conditionnement extérieur : la protection intermédiaire est propre, imperméable, éventuellement multiple, elle assure la séparation entre la boîte de transport et le contenant du tissu, le mettant ainsi à l'abri des chocs. Le volume laissé libre par le tissu et la protection intermédiaire est comblé afin d'éviter le déplacement du tissu à l'intérieur du récipient de transport ;

- le récipient de transport est adapté aux conditions de conservation, en particulier de température, et assure l'étanchéité et la protection du tissu contre les chocs et les risques d'écrasement. La taille du récipient de transport doit être adaptée au volume du tissu à transporter et conforme aux spécifications de mensurations éventuelles du transporteur.

Lorsque la température doit être maintenue à un certain seuil pendant le transport, son contrôle fait l'objet, au préalable, d'une validation et tient compte des possibles variations climatiques.

10.2.1.3. Etiquetage

Le tissu est étiqueté de façon conforme aux spécifications données et comporte l'identification des tissus d'origine humaine.

10.2.2. Transport de tissus entre deux sites

10.2.2.1. Organisation du circuit

L'ensemble du circuit est validé. Cette validation inclut le choix du transporteur, l'information des personnes intervenantes, l'étiquetage du tissu et de son emballage.

10.2.2.2. Mode de transport

Les conditions de transport sont définies par un cahier des charges auquel le transporteur est soumis par contrat ou par une procédure si le transporteur fait partie de l'effectif de l'organisme conservateur ou de l'établissement de santé.

10.2.2.3. Récipient de transport

Le récipient de transport comporte la mention : « tissu d'origine humaine à usage thérapeutique », ainsi que la température de transport et le nombre d'unités transportées. Il comporte les noms, les adresses et les numéros de téléphone du site expéditeur et du site destinataire.

10.2.2.4. Fiche de transport

Une fiche de transport est jointe au récipient de transport. Elle a pour but d'assurer le suivi entre les deux sites et de garantir la traçabilité du tissu.

Elle identifie les personnes intervenant au départ et à l'arrivée. Elle comporte l'identité du transporteur.

Elle mentionne les horaires de prise en charge et de décharge du tissu, les différentes étapes du transport, ainsi que tout retard ou incident intervenant pendant le transport.

A l'arrivée au site receveur, l'intégrité du matériel de transport est vérifiée, ainsi que le respect des conditions de transport, en particulier de température lorsqu'elle doit être contrôlée.

Les personnes intervenant dans le transport remettent en main propre le tissu emballé à une personne désignée sur la fiche d'envoi et qui est chargée d'assurer la fin de l'acheminement dans de bonnes conditions ou de réceptionner le tissu pour l'étape ultérieure (traitement, stockage, greffe).

10.2.2.5. Maintien de la température

10.2.2.5.1. Tissus non congelés :

La température durant le transport est maintenue à la valeur indiquée par l'établissement fournisseur. Si l'on utilise des éléments réfrigérants, ils sont impérativement isolés d'un contact direct avec le contenant du tissu.

10.2.2.5.2. Tissus congelés :

Les tissus congelés sont transportés dans un récipient adapté permettant une autonomie suffisante afin de garantir le maintien de la température du tissu au cas où le transport aurait une durée deux fois supérieure à celle estimée au départ.

Les tissus devant être transportés à des températures inférieures à - 80 °C sont conditionnés en utilisant un appareil spécialisé de transport en azote liquide dans lequel l'azote n'est pas à l'état libre et assure le maintien de la température et la sécurité du transport.

Les tissus transportés à des températures supérieures ou égales à - 80 °C sont conditionnés dans de la glace carbonique. Celle-ci est séparée du contenant du tissu par une enveloppe protectrice qui a pour but d'éviter les chocs entre les fragments de carboglace et le tissu. La glace carbonique est en quantité suffisante pour assurer l'autonomie souhaitée.

10.2.3. Transport de tissus à l'intérieur d'un même établissement

Les conditions de transport des tissus congelés ou non congelés assurent l'intégrité, la sécurité, la non-contamination bactériologique et doivent faire l'objet de procédures écrites reprenant les règles précédemment énoncées.

10.3. Rappel de tissus impropres à l'implantation

Une procédure doit fixer les modalités de rappel de tissus en cas de nécessité.

10.4. Suivi des receveurs

Après implantation des tissus, des documents doivent permettre le retour d'informations vers la banque de tissus concernant en particulier la destination des tissus (site d'implantation et date, receveur, conditions d'utilisation), l'existence d'éventuelles complications liées à leur usage et l'évaluation de leurs résultats.

IV. - DISPOSITIONS CONCERNANT LES DEPOTS DE TISSUS

1. Définition

Le dépôt, situé dans un établissement de santé, reçoit des tissus validés, conditionnés et étiquetés, provenant d'une ou de plusieurs banques de tissus, les conserve, puis les fournit à différents praticiens, sur prescriptions médicales nominatives et pour une utilisation immédiate. Le dépôt doit en outre assurer le retour vers la banque d'origine des informations concernant le devenir des tissus.

Les tissus ne peuvent pas être cédés à d'autres dépôts, d'autres établissements de santé ou d'autres organismes, mais seulement être directement distribués ou être retournés à la banque d'origine.

2. Généralités

Les dépôts de tissus doivent respecter des procédures proposées par la banque concernant la réception, la conservation, la mise à disposition et l'évaluation des tissus, afin d'en assurer la sécurité et la traçabilité depuis leur réception jusqu'à leur distribution ou leur destruction.

3. Personnel

Les activités du dépôt de tissus sont sous la responsabilité d'un médecin ou d'un pharmacien nommément désigné et dûment qualifié.

4. Locaux, équipement

Les locaux et matériel de stockage doivent répondre aux mêmes normes, contrôles et conditions d'entretien et de maintenance que celles énoncées pour les banques de tissus et faire l'objet de fiches techniques, dossiers de qualification et fiches d'entretien.

5. Conservation

La conservation des tissus doit être en conformité avec les procédures établies par la banque qui a fourni le tissu.

6. Etiquetage

L'étiquetage des tissus ne doit pas être modifié et en aucun cas les étiquettes préexistantes ne doivent être enlevées.

7. Distribution

Les tissus ne peuvent être fournis que sur la demande écrite d'un praticien pour utilisation immédiate.

Le transport doit être assuré selon les procédures utilisées par la banque de tissus dont provient le tissu.

Tous documents accompagnant les tissus et destinés au praticien utilisateur des tissus doivent lui être fournis.

Les tissus ne peuvent pas être cédés à d'autres dépôts, à d'autres établissements de santé ni à d'autres organismes, mais seulement être directement distribués ou être retournés à la banque d'origine.

8. Destruction des tissus

Les tissus qui seraient devenus impropres à la distribution doivent être retournés à la banque d'origine qui procède à leur destruction.

9. Documentation

Le dépôt de tissus doit maintenir à jour une documentation concernant la réception, la conservation et la distribution des tissus afin d'en assurer la traçabilité. Ces documents sont archivés selon les mêmes procédures que celles utilisées par les banques de tissus.

Lors de la distribution des tissus, la documentation du dépôt doit enregistrer le nom et l'adresse de la banque de tissus d'origine, la nature et l'identification des tissus concernés, le nom de l'hôpital, du médecin et du patient auxquels le tissu est destiné, la date d'envoi. Ces informations doivent être également transmises à la banque d'origine du tissu.

Tout incident ou accident lié à l'utilisation du tissu est notifié à la banque de tissus d'origine. Le dépôt de tissus doit posséder une documentation écrite décrivant la procédure utilisée en cas de nécessité de retrait d'un tissu.

Annexe 4 : Tableau des propriétés physico-chimiques détaillées de l'azote

Propriétés physico-chimiques détaillées de l'azote (HAEFER, 1981)			
Poids moléculaire	M	kg/kmol	28,013
Point d'ébullition normal (1,01285 bar)	Tb	K	77,348
Point critique			
Température	Tc	K	125,98
Pression	pc	bar	33,93
RTcrc/Mpc	zc	-	3,426
Tb/Tc	-	-	0,62
Point triple			
Température	Tt	K	63,148
Pression	pt	mbar	126,1
Densité			
Gaz, 273K, 1bar	ρ_N	kg/m ³	1,2342
Point critique	ρ_c	kg/m ³	311
Vapeur au Tb	ρ''	kg/m ³	4,59
Liquide au Tb	ρ'	kg/m ³	804,2
Solide à Tt	ρ_t	kg/m ³	946
Au point zéro T=0, p=0	ρ_0	kg/m ³	1137
Vol.Gaz à 273K, 1bar	ρ'/ρ_N	m ³ /m ³	652
A partir d'1m ³ liquide			
Chaleur latente			
Evaporation au Tb	le	kJ/kg	199,1
Fusion à Tt	lm	kJ/kg	25,73
Evapor.-Entropie	Mle/Ts	kJ/kmolK	72
Capacité de chaleur spécifique			
Gaz, 273K, 1bar	cp	kJ/kgK	1,042
Vapeur au Tb	cp	kJ/kgK	1,039
Liquide au Tb	cp	kJ/kgK	2,03
Solide à Tt	cp	kJ/kgK	1,691
Debye-Température	Θ_D	K	68
cp/cv, 1bar, 300K	κ	-	(T<20K) 1,401
Enthalpie de vapeur	h300-hTb	kJ/kg	233,8
Energie minimale de liquéfaction	eL	kJ/kg	766
Constante diélectrique			
Gaz, 273K, 1bar	$\epsilon-1$	10-avr	5,87
Vapeur au Tb	$\epsilon-1$	10-mars	2,08
Liquide au Tb	ϵ	-	1,4318
Solide à Tt	ϵ	-	1,514
Tension de surface au Tb	σ	10-3J/m ²	8,8
Viscosité			
Gaz, 273K, 1bar	η	10-7kg/ms	166,3
Gaz à Tc, 1bar	η	10-7kg/ms	86,2
Vapeur au Tb	η	10-7kg/ms	55
Liquide au Tb	η	10-7kg/ms	1650
Conductivité de la chaleur			
Gaz, 273K, 1bar	λ	10-3W/mK	24
Gaz à Tc, 1bar	λ	10-3W/mK	12,6
Vapeur au Tb	λ	10-3W/mK	7,5
Liquide au Tb	λ	10-3W/mK	139,8

Annexe 5 : Calcul de la réduction du taux d'oxygène par une fuite d'azote dans un local ventilé

Dans des laboratoires travaillant avec de l'azote liquide une partie de l'azote liquide est évaporée dans les conteneurs de stockage et au cours des opérations avec le liquide. Ceci engendre un débit de gaz qui se mélange avec l'air du laboratoire s'il n'est pas aspiré et extrait à la source. L'azote apporté entraîne une baisse du taux d'oxygène de l'air local.

Cette annexe démontre l'équation permettant de calculer la teneur en oxygène d'un local en fonction d'un débit de fuite d'azote connu, du volume du local et de son taux de renouvellement d'air.

Variables :

V_{local} = volume du local

n = nombre de renouvellements d'air du local

\dot{L} = débit de fuite de gaz

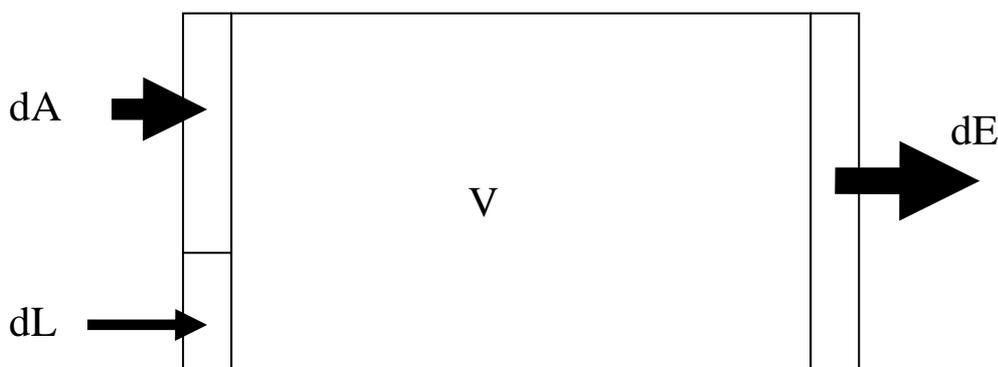
La concentration de l'oxygène dans le local au moment t est de

$$(1) \quad c_{O_2}(t) = \frac{V_{O_2}}{V_{local}}$$

Le débit de gaz extrait du local \dot{E} est

$$(2) \quad \dot{E} = \frac{dE}{dt} = n * V_{local}$$

Dans un petit laps de temps dt le volume dE est extrait et remplacé par un volume égal, composé de volumes de gaz de fuite dL et d'air dA .



$$(3) \quad dE = dL + dA$$

La concentration d'oxygène dans le gaz extrait est identique à la concentration $c_{O_2}(t)$ dans le volume du local. La concentration d'oxygène dans le volume du gaz de fuite dL est zéro et la concentration dans le volume d'air aspiré dA est de 0.21 .

Le volume d'oxygène V_{O_2} après le laps de temps dt est donc

$$(4) \quad V_{O_2}(t + dt) = V_{O_2}(t) - c_{O_2}(t) * dE + 0.21 * dA$$

Avec les équations (2) et (3) on obtient

$$\Rightarrow V_{O_2}(t + dt) - V_{O_2}(t) = -c_{O_2}(t) * nV_{local} dt + 0.21 * (nV_{local} dt - \frac{dL}{dt} dt)$$

Par substitution avec l'équation (1) il suit

$$\Leftrightarrow \frac{V_{local}(c(t + dt) - c(t))}{c_{O_2}(t) - 0.21(1 - \frac{\dot{L}}{nV_{local}})} = -nV_{local} dt$$

$$\Leftrightarrow \frac{1}{c_{O_2}(t) - 0.21(1 - \frac{\dot{L}}{nV_{local}})} dc(t) = -ndt$$

et après integration

$$\Rightarrow \ln \left| c(t) - 0.21(1 - \frac{\dot{L}}{nV_{local}}) \right| \Bigg|_{0.21}^{c(t)} = -nt \Big|_0^t$$

$$\Rightarrow \ln \left[c(t) - 0.21(1 - \frac{\dot{L}}{nV_{local}}) \right] - \ln \left[0.21 \frac{\dot{L}}{nV_{local}} \right] = -nt + 0$$

$$\Leftrightarrow \frac{c(t) - 0.21\left(1 - \frac{\dot{L}}{nV_{local}}\right)}{0.21 \frac{\dot{L}}{nV_{local}}} = e^{-nt}$$

$$\Leftrightarrow c(t) = 0.21\left(1 - \frac{\dot{L}}{nV_{local}}\right) + 0.21 \frac{\dot{L}}{nV_{local}} e^{-nt}$$

(5)

$$\Leftrightarrow c(t) = 0.21\left(1 - \frac{\dot{L}}{nV_{local}}\right) (1 - e^{-nt})$$

Pour un calcul simplifié du taux en pourcent avec les unités ci-dessous l'équation devient

$$\Leftrightarrow \frac{c(t)}{\%} = 21\left(1 - \frac{40.92 * \frac{\dot{L}}{l/\text{min.}}}{\frac{n}{h} * \frac{V_{local}}{m^3}}\right) \left(1 - e^{-\frac{n}{h} * \frac{t}{\text{min.}}}\right)$$

t - en minutes

V_{local} - en m^3

\dot{L} - en l/min. (de liquide)

n - nombre de renouvellements d'air par heure

A l'équilibre, l'équation (5) devient

$$(6) \quad c(t) = 0.21\left(1 - \frac{\dot{L}}{nV_{local}}\right)$$

On peut considérer que la situation d'équilibre théorique est atteinte après un temps correspondant à 4 ou 5 périodes :

$$4 \text{ ou } 5 \cdot (\ln(2)/n)$$

soit respectivement 93,75% ou 96,83% de la concentration d'équilibre (équilibre quasi atteint).

Annexe 6 : Débits d'évaporation d'azote liquide au cours de la mise en froid d'un conteneur de 660L - Résultats de mesures DMC utilisés

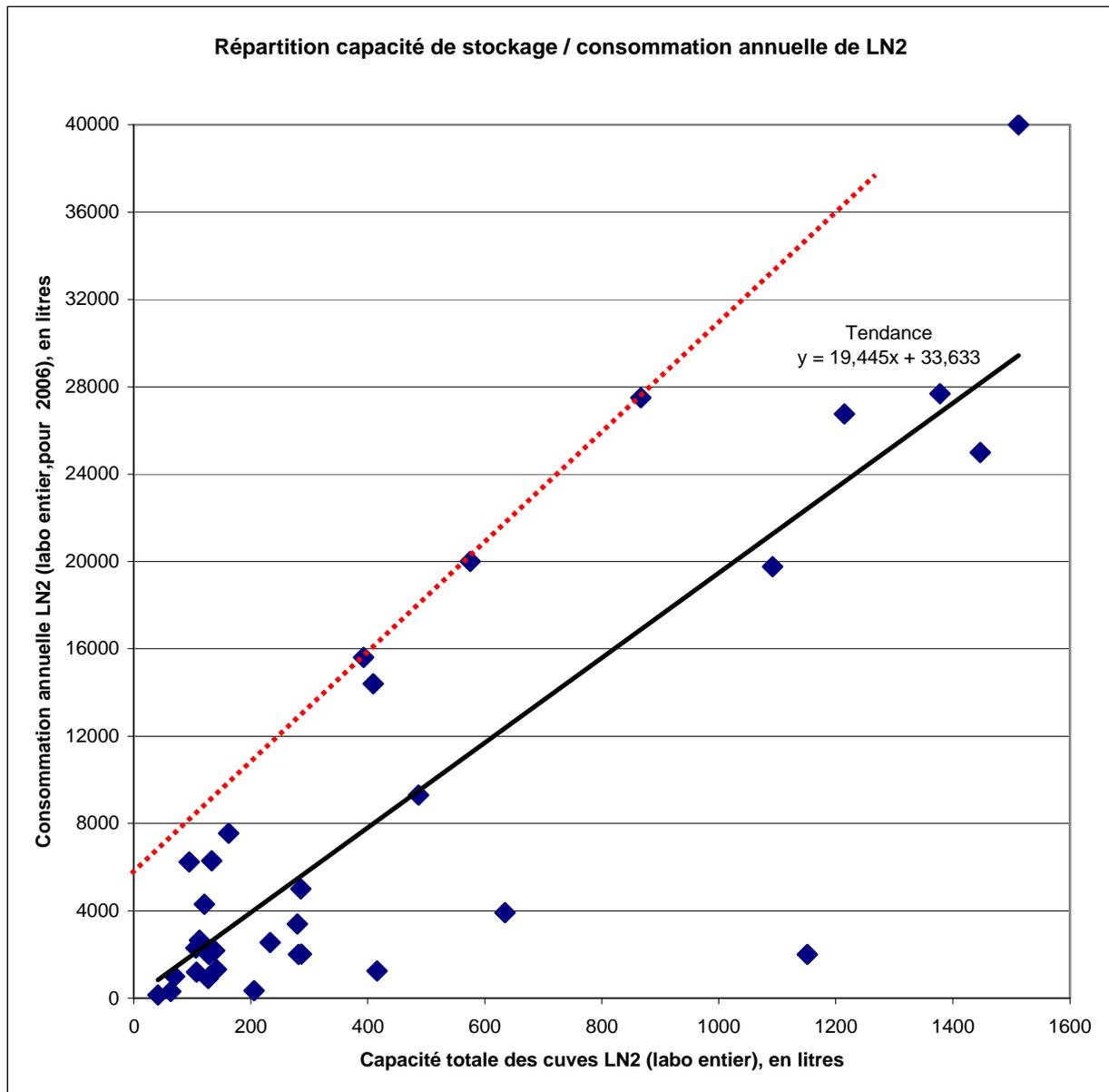
A partir des mesures en temps réel du poids du conteneur et de l'estimation du débit d'alimentation en azote liquide (données DMC), le débit d'évaporation est calculé :

$$L_{LN_2} = (\text{AlimentationLN2} - \Delta\text{PoidsConteneur}) / (\text{DensitéLN2})$$

Temps de remplissage (min)	Poids du conteneur (Kg)	Δ Poids du conteneur (Kg)	Alimentation en azote liquide du conteneur (supposée constante)	Débit d'évaporation (de fuite) d'azote liquide L_{LN_2} (L/min)
0	340	0	14,6 Kg/min (soit 18,1 L/min , densité _{LN2} = 0.8086)	0
1	342	+2		18,1
2	347	+5		11,9
3	357	+10		5,7
4	368	+11		4,5
5	380,5	+12,5		2,6
6	392,5	+12		3,2
7	406	+13,5		1,4
8	419,5	+13,5		1,4
9	433,5	+14		0,7
10	447,5	+14		0,7

Annexe 7 : Relation entre capacité de stockage d'un laboratoire et consommation annuelle d'azote liquide

Données sur la capacité de stockage issues de l'enquête de l'Agence de la Biomédecine (Agence de la Biomédecine, 2006) et données sur la consommation annuelle, issues d'une enquête menée par le groupe de travail en 2007.



..... $Y = 25,1X + 5735$

Annexe 8 : Tableau de correspondances des normes applicables aux équipements cryogéniques

Europe	International	France
EN 1251 CV - Transportable vacuum insulated vessels of not more than 1000 litres volume		
Part 1	ISO/CD 21029-1	NF E86-501-1
Part 2	ISO/CD 21029-1	NF E86-501-2
Part 3	ISO/CD 21029-1	NF E86-501-3
EN 1252 CV Materials		
Part 1	ISO/DIS 21028-1	NF E86-506-1
Part 2	ISO/DIS 21028-2	NF E86-506-2
EN 1626:1999 CV - Valves for cryogenic service	ISO/WD 21011	NF E86-507
EN 1797:2002 CV Gas/material compatibility	ISO/DIS 21010	NF E86-505
EN 12213:1998 CV Methods for performance evaluation of thermal insulation	ISO/AWI 21014	NF E86-508
EN 12300:1999 CV - Cleanliness for cryogenic service	ISO/WD 23208	NF E86-509
EN 12434:2000 CV - Cryogenic flexible hoses	ISO/WD 21012	NF E86-511
prEN12456:1996 CV - Pressure protection devices for vacuum insulated cryogenic vessels outer jackets	-	-
EN 13275:2000 CV - Pumps for cryogenic service	ISO/WD 24490	NF E86-514
EN 13371:2002 CV - Couplings for cryogenic service	-	NF E86-515
EN13458 CV - Static vacuum insulated vessels		
Part 1	ISO/WD 21009-1	NF E86-503-1
Part 2	ISO/WD 21009-1	NF E86-503-
Part 3	ISO/DIS 21009-2	NF E86-503-3
EN 13530 CV - Large transportable vacuum insulated vessels		
Part 1	ISO/CD 20421-1	-
Part 2	ISO/CD 20421-1	-
Part 3	ISO/DIS 20421-2	-

Europe	International	France
EN 13648 CV - Safety devices for protection against excessive pressure		
Part 1	ISO/WD 21013-1	NF E86-512-1
Part 2	ISO/WD 21013-2	NF E86-512-2
Part 3	ISO/WD 21013-3	NF E86-512-3
prEN 14197 CV - Static non-vacuum insulated vessels		
Part 1	-	-
Part 2	-	-
Part 3	-	-
prEN 14398:2002 CV - Large transportable non-vacuum insulated vessels		
Part 1	-	-
Part 2	-	-
Part 3	-	-
	ISOTC 220/WG 2 N 104. DIN. (2001). Cryogenic vessels, transportable vacuum insulated vessels of not more than 1000 litres volume. Part 2 : Operational requirements	

Annexe 9 : Liste thématique pour l'audition de fabricants/fournisseurs d'équipements cryogéniques et distributeurs gaziers

- Les équipements cryogéniques utilisés dans le cadre des activités d'AMP :
 - les spécifications techniques et les caractéristiques technologiques des équipements cryogéniques utilisés pour le transport et le stockage d'azote liquide
 - les normes de fabrication des équipements cryogéniques (réservoirs, ...)
 - les contrôles qualité lors de la fabrication des équipements cryogéniques
 - les données d'évaporation naturelle de l'azote liquide dans les réservoirs, théoriques et réelles (mode stockage – mode utilisation)
 - les expériences liées à la condensation de l'oxygène
 - la fin de vie des équipements cryogéniques
 - les modes de dégradations des équipements cryogéniques
 - le lien entre durée de garantie des équipements cryogéniques et leur durée de vie
 - la fiabilité des équipements cryogéniques et des soudures en particulier
 - les modalités d'installation du matériel neuf
 - la maintenance : modalités de mise en place – fréquence – paramètres à évaluer
- Les critères à identifier par les utilisateurs symptômes d'une défaillance du matériel : modalités - fréquence
- Les dispositifs de sécurité associés à ces équipements et les mesures de sécurité préconisées :
 - les dispositifs de sécurité associés aux équipements cryogéniques et les mesures de sécurité préconisées pour les professionnels
 - les recommandations et consignes de sécurité spécifiques aux équipements cryogéniques et à l'utilisation des dispositifs de sécurité
 - les normes en matière d'alarme
 - les évolutions technologiques récentes et en cours des dispositifs de sécurité
 - la mise à niveau des sécurités constructeur et celles à réaliser par les sites utilisateurs
 - les possibilités d'adaptation des réservoirs existants
 - les programmes de formation pour l'utilisation des réservoirs à azote liquide
 - les recommandations de maintenance des équipements cryogéniques et particulièrement des réservoirs (dont la maintenance périodique)
 - les procédures à appliquer pour vider un réservoir et l'envoyer en réparation
 - les procédures de désinfection d'un réservoir avant envoi ou nouvelle utilisation
 - les règles à appliquer pour le réétalonnage des oxygéno-mètres (norme)
- Les accidents liés à l'azote liquide et/ou aux équipements cryogéniques utilisant de l'azote liquide :
 - la nature des accidents liés à l'azote liquide et leur résolution
 - la nature des accidents liés aux équipements cryogéniques utilisant de l'azote liquide et leur résolution
- Le marché français des équipements cryogéniques utilisés dans les laboratoires d'AMP
- Les utilisations et utilisateurs d'azote liquide :
 - les diverses utilisations de l'azote liquide
 - les activités des utilisateurs de réservoirs à azote liquide

Notes



agence française de **sécurité sanitaire**
de l'environnement et du travail

253, avenue du Général Leclerc
94701 Maisons-Alfort Cedex
Tél. +33 1 56 29 19 30
afsset@afsset.fr

www.afsset.fr

ISBN 978-2-11-097826-4

