



Dossier

PRÉVENIR LES ALLERGIES PROFESSIONNELLES: DES SOLUTIONS EXISTENT

❶ Quelques données épidémiologiques sur les allergies professionnelles

P. 20

❷ Les manifestations et mécanismes des allergies professionnelles

P. 23

❸ Des tests pour prédire le pouvoir sensibilisant cutané des produits chimiques

P. 26

❹ Mesurer les allergènes fongiques dans l'air des lieux de travail

P. 31

❺ Une méthode d'évaluation de l'émissivité des machines en poussières de farine

P. 36

Les allergies professionnelles comptent parmi les maladies professionnelles les plus fréquentes, car nombre de substances et d'organismes sensibilisants sont présents en milieu de travail. Souvent sous-estimées, ces pathologies peuvent pourtant devenir très invalidantes et conduire à des réorientations voire une désinsertion professionnelles. Ce dossier propose un état des lieux des connaissances sur la fréquence de ces pathologies dans le monde du travail et sur les mécanismes physiopathologiques mis en jeu. Il présente également différents axes de prévention des risques: des tests permettant de prédire le pouvoir sensibilisant cutané des produits chimiques, des méthodes de mesure des allergènes dans l'air des lieux de travail ainsi qu'un exemple de méthode d'évaluation de l'émissivité de machines en poussières de farine.

PREVENTING OCCUPATIONAL ALLERGIES: SOLUTIONS DO EXIST – *Occupational allergies are among the most frequent of occupational diseases, because numerous sensitizing substances and organisms are present in the working world. Often underestimated, such pathologies can become very disabling and can lead people to change jobs or careers. This file proposes a round-up of the state of knowledge about the frequency of these pathologies in the working world, and about the physio-pathological mechanisms involved. It also presents various focuses for risk prevention: tests making it possible to predict the skin sensitizing potential of chemicals; methods of measuring allergens in workplace air and an example of a method of evaluating the flour dust emissivity of machines.*

QUELQUES DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES SUR LES ALLERGIES PROFESSIONNELLES

Les allergies comptent parmi les maladies professionnelles les plus fréquentes. Elles touchent principalement les voies respiratoires et la peau. De nombreux secteurs d'activité et professions sont concernés, mais avec des disparités importantes. L'asthme professionnel diminue depuis 10 ans, sauf dans le secteur des soins où il augmente. De même, les dermatites de contact diminueraient dans le secteur de la construction mais augmenteraient dans le secteur sanitaire et social.

VALÉRIE
DEMANGE
INRS,
département
Epidémiologie
en entreprise

Les allergies professionnelles sont des manifestations cliniques dues à une réponse immune non contrôlée provoquée par l'exposition à des substances sensibilisantes en milieu de travail. Les manifestations les plus courantes sont respiratoires (rhinite, asthme, pneumopathie d'hypersensibilité) ou cutanées (dont la plus fréquente est la dermatite de contact allergique).

Les allergies respiratoires

L'asthme est une maladie fréquente en France avec une prévalence en population générale estimée entre 5 et 10%. À titre d'exemple, l'*European Community Respiratory Health Survey* (ECRHS) situe la prévalence cumulée de l'asthme en France entre 7,4 et 9,3%, et entre 2,7% et 4% pour l'asthme actif, défini par l'existence d'au moins une crise d'asthme dans les 12 derniers mois [1]. À ce jour, près de 400 produits utilisés en milieu professionnel pourraient être à l'origine d'un asthme professionnel [2]. L'incidence de l'asthme professionnel en France est estimée actuellement à 27 cas par million de personnes-années¹ chez les hommes et 19 cas par million de personnes-années chez les femmes [3]. Les principaux allergènes décrits sont la farine (et les additifs, 20,3% des cas), les résines polyuréthanes (14,1%), le latex (7,2%), les persulfates alcalins (5,8%) et le bois (3,7%). Les boulangers (683 cas par million de personnes-années), les coiffeurs (308 cas par million de personnes-années), les travailleurs du bois (218 cas par million de personnes-années) ou les professions de santé font partie des professions les plus atteintes en France [3]. Ces valeurs sont probablement sous-estimées du fait de certaines limites du système d'enregistrement des cas d'asthme [2]. L'étude ECRHS a estimé entre 10 et 25% la valeur de la fraction attribuable aux expositions profes-

sionnelles des asthmes de l'adulte, ce qui représente par million de travailleurs entre 250 et 300 nouveaux cas d'asthme par an [4].

L'asthme professionnel (AP) est dû à des causes et des conditions attribuables à un environnement professionnel particulier, et non à une substance rencontrée en dehors du milieu professionnel [5]. Il existe également l'asthme aggravé au travail (AAT), défini comme un asthme préexistant ou simultané qui est aggravé par les expositions du milieu professionnel. On regroupe asthme professionnel et asthme aggravé au travail sous le terme d'asthme en relation avec le travail (ART). Concernant ce dernier, une étude américaine en population générale, auprès de plus de 60 000 assurés sociaux, a estimé la fraction attribuable aux expositions professionnelles des asthmes de l'adulte à 25% [6]. Des données récentes françaises, issues du Réseau national de vigilance et de prévention des pathologies professionnelles (RNV3P), montrent que l'ART semble en diminution sur les 10 dernières années [7]. Cette évolution globale masque toutefois des contrastes importants, la diminution étant observée principalement dans certains secteurs industriels (où sont par exemple utilisées des résines plastiques), alors que d'autres secteurs ne connaissent pas d'évolution significative (par exemple, la coiffure) voire une augmentation en lien avec certaines pratiques récentes (secteurs de soins). Quant à l'AAT, sa fréquence varie de 36 à 58% des ART en fonction des critères d'asthme pris en compte.

Par analogie avec l'asthme, on distingue également au sein des rhinites en relation avec le travail, les rhinites professionnelles et les rhinites aggravées au travail. La rhinite professionnelle est de 2 à 3 fois plus fréquente que l'AP. Quelques études ont évalué l'incidence de la rhinite professionnelle dans différents milieux professionnels: 12,1



© Gaël Kerbaud/INRS

Du fait des produits manipulés, les coiffeurs sont particulièrement sujets aux affections respiratoires et cutanées.

pour 100 personnes-années en cas d'exposition aux animaux de laboratoires, 11,8 pour 100 personnes-années en cas d'exposition à la farine, 0,7 pour 100 personnes-années en cas d'exposition au latex. Les travailleurs présentant une rhinite professionnelle ont un risque accru de développer un asthme professionnel [8].

Les allergies cutanées

La dermatite de contact représente 70 à 90% des déclarations de dermatoses professionnelles. Son incidence annuelle est estimée entre 11 et 86 cas pour 100 000 personnes-années. Les secteurs d'activité les plus concernés sont la coiffure et l'esthétique, l'agroalimentaire, la construction, le nettoyage, la mécanique, la métallurgie, le secteur de la santé, l'industrie chimique, l'électronique et l'agriculture [9]. D'après les données du RNV3P de 2001 à 2009 [7], les nuisances les plus souvent incriminées dans les dermatites allergiques de contact sont, par ordre de fréquence décroissante, les métaux, les biocides, les produits de coiffure, les résines et colles, les additifs du caoutchouc, les cosmétiques, les huiles et graisses, les produits de nettoyage et le béton. L'évolution du nombre de cas signalés dans le réseau est à la hausse sur cette période. Par contre, le nombre de dermatites déclarées et reconnues au titre des maladies professionnelles du régime général sont relativement

stables. Cette différence illustre peut-être le phénomène de sous-déclaration des pathologies professionnelles. L'évolution globale à la hausse dans le RNV3P recouvre des évolutions différentes selon le secteur d'activité. Par exemple, on observe une diminution pour le béton et les ciments dans le secteur de la construction. Cette diminution peut être mise en relation avec la diminution de la quantité de chrome entrant dans la composition du ciment due à l'application de la directive européenne 2003/53/CE et qui concerne surtout les employés du BTP [10]. En revanche, on observe une tendance à l'augmentation du nombre de cas de dermatites allergiques de contact vis-à-vis des produits de nettoyage (détergents et produits d'entretien non précisés) pour le secteur santé et action sociale. Leur utilisation y est très fréquente et s'est accrue ces dernières années (lutte contre les infections nosocomiales par exemple) [11]. Ces produits, du fait de leur composition ou leurs conditions d'utilisation (humidité), allient des propriétés irritantes aux propriétés allergisantes, qui pourraient expliquer, au moins partiellement, cette tendance à la hausse [7].

Les sources de données

Les données permettant de quantifier la fréquence des pathologies respiratoires en relation avec le travail proviennent de deux types de sources: les





©Vincent Nguyen pour l'INRS

Les produits de nettoyage peuvent être irritants et allergisants.

systèmes de surveillance nationaux, par exemple SENSOR (*Sentinel Event Notification Systems for Occupational Risks*, Etats-Unis), SABRE (*Surveillance of Australian workplace Based Respiratory Events*, Australie), SWORD (*Surveillance of Work-related and Occupational Respiratory Disease*, Royaume-Uni), ONAP (Observatoire national des asthmes professionnels, France), RNV3P (Réseau national de vigilance et de prévention des pathologies pro-

fessionnelles, France), et les bases enregistrant les cas donnant lieu à compensation. Ces systèmes présentent différentes limites: le calcul de taux est impossible car l'effectif de la population dont sont issus les cas de pathologies respiratoires enregistrés n'est pas connu; les indicateurs peuvent diminuer du fait d'une baisse de la motivation des personnes alimentant les bases de données; le lien de causalité entre la nuisance et l'effet sur la santé n'est pas connu; les démarches diagnostiques ne sont pas standardisées; il existe une sous-déclaration des maladies professionnelles.

Certains de ces systèmes permettent également de quantifier la fréquence des dermatites de contact professionnelles: c'est le cas de SENSOR ou du RNV3P par exemple. Il existe aussi des bases spécifiques enregistrant les cas de dermatoses professionnelles (EPIDERM, réseau alimenté par les dermatologues du Royaume-Uni) ou encore les résultats des patch-tests réalisés (par exemple la base européenne ESSCA (*European Surveillance System of Contact Allergies*)).

En fonction de l'emploi exercé, de l'agent en cause et des résultats des explorations cliniques, les allergies professionnelles désignées dans un tableau de maladies professionnelles peuvent donner lieu à une indemnisation (www.inrs.fr/mp). ●

1. Personnes-années: nombre de personnes exposées (ici au risque d'asthme professionnel) multiplié par leur durée d'exposition au risque.

BIBLIOGRAPHIE

[1] NEUKIRCH F, PIN I, KNANI J, HENRY C, PISON C, LIARD R, ROMAZZINI S, BOUSQUET J. Prevalence of asthma and asthma-like symptoms in three French cities. *Respir Med*. 1995; 89: 685-692.

[2] FINGER V, SARI-MINODIER I, CHARPIN D. EPIDÉMOLOGIE. In: Bessot JC, Pauli G, Vandenplas O. *L'asthme professionnel*. 2^e édition. Paris: Editions Margaux Orange; 2012: 631 p.

[3] AMEILLE J, PAULI G, CALASTRENG-CRINQUAND A, VERVOÛT D, IWATSUBO Y, POPIN E, BAYEUX-DUNGLAS MC, KOPFERSCHMITT-KUBLER MC; Observatoire national des asthmes professionnels. Reported incidence of occupational asthma in France, 1996-99: the ONAP programme. *Occup Environ Med*. 2003; 60: 136-141.

[4] KOGEVINAS M, ZOCK JP, JARVIS D, KROMHOUT H, LILLIENBERG L, PLANA E, RADON K, TORÉN K, ALLIKSOO A, BENKE G, BLANC PD, DAHLMAN-HOGLUND A, D'ERRICO A, HÉRY M,

KENNEDY S, KUNZLI N, LEYNAERT B, MIRABELLI MC, MUNIOZGUREN N, NORBÄCK D, OLIVIERI M, PAYO F, VILLANI S, VAN SPRUNDEL M, URRUTIA I, WIESLANDER G, SUNYER J, ANTÓ JM. Exposure to substances in the workplace and new-onset asthma: an international prospective population-based study (ECRHS-II). *Lancet*. 2007; 28:336-341.

[5] VANDENPLAS O, MALO JL. Definitions and types of work-related asthma: a nosological approach. *Eur Respir J*. 2003; 2, 706-712.

[6] SAMA SR, MILTON DK, HUNT PR, ANDRES HOUSEMAN E, HENNEBERGER PK, ROSIELLO RA. Case-by-case assessment of adult-onset asthma attributable to occupational exposures among members of a health maintenance organization. *J. Occup. Environ. Med.*, 2006, 48, 400-407.

[7] RNV3P, ANSES. - Réseau national de vigilance et de prévention des pathologies professionnelles, Rapport scientifique. ANSES éditions, octobre 2011. 279 p.

[8] MOSCATO G, VANDENPLAS O, VAN WIJK RG, MALO JL, PERFETTI L, QUIRCE S, WALUSIAK J, CASTANO R, PALA G, GAUTRIN D, DE GROOT H, FOLLETTI I, YACOB MR, SIRACUSA A; European Academy of Allergology and Clinical Immunology. EAACI position paper on occupational rhinitis. *Respir Res*. 2009, 3,10:16

[9] CRÉPY M. Dermatite de contact d'origine professionnelle: conduite à tenir. *Références en santé au travail* 2013, 133, 109-122.

[10] CRÉPY M. *Dermatoses professionnelles aux métaux*. Deuxième partie: allergies de contact aux composés du chrome. Fiches d'allergologie-dermatologie professionnelle TA 85. Documents pour le médecin du travail 2010, 1-13.

[11] CRÉPY M. *Dermatoses professionnelles aux détergents*. Fiches d'allergologie-dermatologie professionnelle TA 72. Documents pour le médecin du travail 2005, 103, 375-384.

LES MANIFESTATIONS ET MÉCANISMES DES ALLERGIES PROFESSIONNELLES

L'allergie professionnelle est une réaction anormale et excessive du système immunitaire suite au contact avec une substance étrangère (l'allergène) rencontrée dans le milieu de travail. Les allergies les plus fréquentes sont respiratoires et cutanées. Cet article explique les différentes manifestations cliniques et les mécanismes physiopathologiques mis en jeu.

NADIA
NIKOLOVA-
PAVAGEAU
INRS,
département
Études et
assistance
médicales

Les allergies professionnelles les plus fréquentes sont respiratoires (rhinite, asthme, pneumopathie d'hypersensibilité) et cutanées (dermatite de contact allergique, urticaire de contact et dermatite de contact aux protéines).

Pathologies respiratoires allergiques professionnelles

Rhinite

La rhinite professionnelle est une rhinite provoquée par des agents présents sur le lieu de travail. Cliniquement, elle se manifeste par un prurit nasal, des éternuements, une rhinorrhée et une obstruction nasale et s'accompagne souvent d'une conjonctivite. Les fosses nasales étant le premier filtre de l'appareil respiratoire aux aérocontaminants, la rhinite constitue la première manifestation d'une maladie respiratoire qui peut conduire à l'apparition d'un asthme. Le mécanisme physiopathologique rejoint celui impliqué dans l'asthme.

Asthme

Les manifestations cliniques de l'asthme professionnel sont similaires à celles de l'asthme non

professionnel et dépendent de la gravité de la pathologie. Les sujets peuvent présenter une toux sèche, des sifflements respiratoires, une oppression thoracique, une dyspnée à l'occasion d'une exposition au travail, voire persistant en dehors du travail dans des cas plus sévères. Le délai d'apparition des symptômes par rapport à l'exposition peut varier selon la nature de l'agent sensibilisant : réponse isolée précoce débutant immédiatement et persistant 1 à 2 heures, réponse bi-phasique caractérisée par une bronchoconstriction précoce et tardive séparées par un intervalle libre ou réponse isolée tardive.

En fonction du mécanisme physiopathologique, on distingue l'asthme immunologique et non immunologique. L'asthme professionnel immunologique ou allergique se caractérise par une période latente d'exposition, cliniquement asymptomatique, pendant laquelle la sensibilisation à l'agent a lieu. Cette catégorie comprend :

- l'asthme causé par tous les agents de haut poids moléculaire (HPM) (> 10 000 Da) (protéines du latex, d'animaux de laboratoire, de la farine...) et certains agents de bas poids moléculaire (BPM) (< 1 000 Da) (œuf, sels de platine, anhydrides d'acides, colorants réactifs...) pour lesquels un mécanisme Ig-E médié est prouvé ;
- et l'asthme à des substances de BPM comme les isocyanates ou les acrylates qui mettent en jeu des mécanismes immunologiques encore non élucidés [1].

Les mécanismes sont mieux connus pour les HPM et correspondent à ceux mis en jeu dans l'asthme non professionnel [2]. Il s'agit d'une réaction d'hypersensibilité immédiate (ou de type I) médiée par les immunoglobulines Ig-E (cf. Encadré 1).

- L'asthme non immunologique ou non allergique se caractérise par l'absence de période de latence. Une hyperréactivité bronchique non spécifique se développe dans les heures suivant une exposition unique ou répétée à des irritants respiratoires à une concentration élevée sur le lieu de travail (asthme induit par les irritants).



ENCADRÉ 1

PHYSIOPATHOLOGIE DE LA RÉACTION IG-E MÉDIÉE

La sensibilisation respiratoire survient par inhalation des allergènes qui pénètrent dans les bronches par effraction de l'épithélium respiratoire. Ils sont pris en charge par des cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules dendritiques qui migrent vers les ganglions lymphatiques où les antigènes sont présentés aux lymphocytes T (LT) CD4+ régulateurs induisant leur différenciation en lymphocytes Th1 et Th2. Les lymphocytes Th2 vont produire des médiateurs responsables de la production d'immunoglobulines Ig-E par les plasmocytes et de l'activation des éosinophiles. Les Ig-E se fixent à la surface des mastocytes via leur récepteur de haute affinité conduisant à la dégranulation et au relargage de médiateurs déclenchant des symptômes asthmatiques chez les individus sensibilisés.

ENCADRÉ 2

PHYSIOPATHOLOGIE DE LA RÉACTION D'HYPERSENSIBILITÉ RETARDÉE

Les principales étapes conduisant à la sensibilisation et aux manifestations cliniques de l'allergie de contact sont résumées dans la figure 1. Certains produits chimiques présentant souvent un caractère électrophile, réagissent avec les protéines de la peau, les modifiant de telle sorte que le système immunitaire les reconnaît comme étrangères. Le mécanisme de l'allergie se déroule en deux temps :

- **Phase de sensibilisation :** elle survient lors du premier contact (pour des haptènes forts) ou le plus souvent après des contacts répétés de

l'haptène avec la peau. Les haptènes ou les complexes haptènes-protéines sont pris en charge par les cellules dendritiques (cellules de Langerhans) présentatrices d'antigènes qui vont migrer de la peau vers les ganglions lymphatiques locorégionaux en achevant leur maturation où des LT CD8+ et CD4+ sont initiés. Les LT prolifèrent et migrent depuis les ganglions vers le sang pour rejoindre les organes lymphoïdes et la peau. Cette phase est asymptomatique.

- **Phase de déclenchement :** chez les sujets sensibilisés, un nouveau

contact avec le même haptène va conduire à l'apparition d'une DAC en 24 à 72h. L'inflammation cutanée est due à des LT CD8+, induits dans les organes lymphoïdes pendant la phase de sensibilisation, et présents dans la peau lors de la réexposition à l'allergène. De plus en plus de cellules seront attirées par les médiateurs cellulaires et amplifieront la réaction inflammatoire qui se traduira alors par l'eczéma. Les LT CD4+ régulateurs ont pour rôle de limiter la réponse inflammatoire chez les sujets allergiques.

Les irritants pourraient également potentialiser les réactions immunologiques en raison de l'altération de la barrière muco-épithéliale [3].

Pneumopathie d'hypersensibilité (PHS)

La PHS est une granulomatose pulmonaire de mécanisme immunoallergique due à l'inhalation chronique de substances antigéniques organiques ou chimiques [4]. Les agents impliqués sont de taille inférieure à 3-4 µm ce qui leur permet d'atteindre les alvéoles pulmonaires. Il s'agit le plus souvent d'agents bactériens (actinomycètes thermophiles, mycobactéries atypiques...) ou de spores de moisissures, plus rarement de substances protéiques animales (protéines aviaires, urines de rat...), de substances chimiques (isocyanates, anhydrides phthaliques...) ou de métaux (cobalt, fumées

de zinc...). L'affection la plus connue est la maladie du poumon de fermier due à l'exposition au foin et autres végétaux moisiss. La forme aiguë apparaît 4 à 8 heures après l'exposition sous la forme d'un tableau pseudogrippal avec fièvre, toux sèche et dyspnée, parfois céphalées, douleurs articulaires et musculaires persistant quelques jours. Des formes subaiguës (apparaissant en quelques semaines) et chroniques (sur plusieurs années) sont également décrites avec une évolution vers un tableau d'insuffisance respiratoire.

Le mécanisme physiopathologique implique une médiation humorale (présence inconstante d'anticorps sériques, appelés précipitines, dirigés contre l'agent en cause) et surtout cellulaire (inflammation des alvéoles pulmonaires ou alvéolite lymphocytaire) [5].

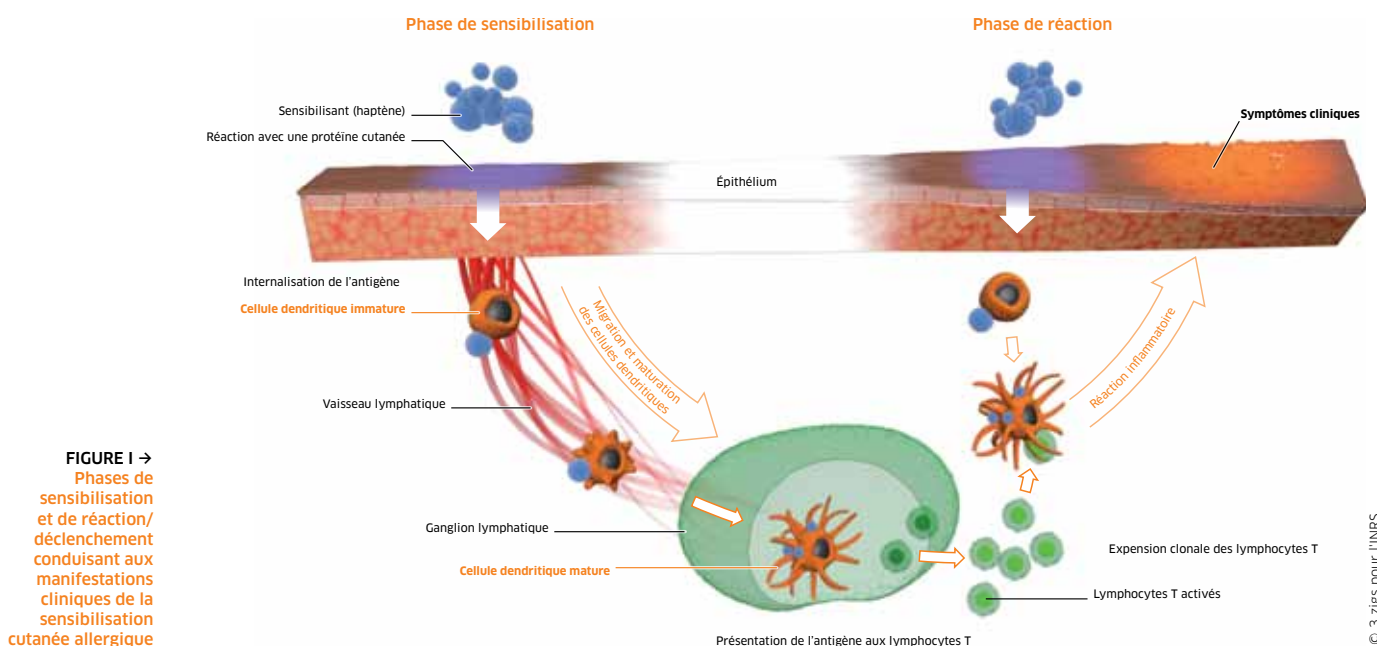


FIGURE 1 →
Phases de sensibilisation et de réaction/déclenchement conduisant aux manifestations cliniques de la sensibilisation cutanée allergique

Pathologies cutanées allergiques professionnelles

Dermatite de contact allergique

La dermatite (ou eczéma) de contact est une dermatose inflammatoire qui se manifeste par des lésions papulo-vésiculeuses prurigineuses [6]. La dermatite d'irritation de contact (DIC) et la dermatite allergique de contact (DAC) sont les dermatoses professionnelles les plus fréquentes. Elles sont souvent localisées aux mains.

- La DAC survient après contact répété de la peau avec des substances chimiques de bas poids moléculaire appelées haptènes qui nécessitent de se lier à des protéines épidermiques pour devenir immunogènes. Elle correspond à une réponse immunitaire de type hypersensibilité retardée (ou de type IV) à médiation cellulaire. La sensibilisation de contact passe par deux phases (cf. Encadré 2) : phase de sensibilisation lors du

tion fait le lit de l'allergie ». En effet, les patients porteurs de DIC se sensibilisent plus fréquemment aux produits manipulés que les patients ne présentant pas d'irritation cutanée.

Urticaire de contact

Elle se caractérise par des lésions érythémato-œdémateuses prurigineuses qui apparaissent quelques minutes après le contact avec la substance en cause [6]. L'urticaire allergique est due à la libération massive d'histamine par les mastocytes cutanés activés après contact cutané avec l'allergène responsable (mécanisme d'hypersensibilité immédiate Ig-E dépendant). L'histamine agit sur les vaisseaux et induit une vasodilatation, à l'origine de l'érythème (rougeur), et une augmentation de la perméabilité vasculaire qui se manifeste par un œdème dermique.

Les agents impliqués en milieu professionnel sont notamment les protéines d'origine animale (rats et souris de laboratoire, viande, poissons et crustacés dans le secteur de l'agroalimentaire...) et végétale (latex, légumes, fruits, céréales...), plus rarement des substances chimiques de BPM (persulfates d'ammonium dans la coiffure, antibiotiques chez les infirmières et les personnels de laboratoires pharmaceutiques, anhydrides d'acides dans l'industrie des matières plastiques...).

Dermatite de contact aux protéines

Elle se présente le plus souvent sous la forme d'un eczéma chronique ou récidivant. Des lésions urticariennes ou vésiculeuses peuvent être observées quelques minutes après le contact avec la protéine en cause [7]. Des protéines d'origine végétale ou animale rencontrées dans l'industrie agroalimentaire sont le plus souvent impliquées. Le mécanisme physiopathologique exact est encore méconnu. Certains auteurs rapportent une association de réactions cutanées allergiques de type I et IV, d'autres considèrent que cette association est difficile à prouver dans la majorité des cas [8]. ●

POUR EN SAVOIR +

- *Collection allergologie professionnelle. Références en santé au travail* (www.rst-sante-travail.fr, rubrique Outils repères).

premier contact (pour des haptènes forts) ou le plus souvent après des contacts répétés de l'haptène avec la peau et phase de déclenchement lors d'un nouveau contact avec le même haptène qui va conduire à l'apparition d'une DAC en 24 à 72 heures.

- La DIC quant à elle implique la mise en jeu de l'immunité innée. Les principaux mécanismes physiopathologiques sont une rupture de la barrière cutanée, la production de nombreuses cytokines par les kératinocytes et le recrutement secondaire de leucocytes sur le site cutané, conduisant à l'apparition de lésions inflammatoires. Il est classiquement admis que « l'irrita-

BIBLIOGRAPHIE

[1] BERNSTEIN DI (Eds). *Occupational asthma. Immunology and allergy clinics of North America*. 2011; 31 (4): 805 p.

[2] MAGNAN A, PAULI G, BESSOT JL. *Physiopathologie*. In: Bessot JC, Pauli G, Vandenplas O. *L'asthme professionnel*. 2^e édition. Paris: Editions Margaux Orange; 2012: 631 p.

[3] MARESCAUX A, THAON I,

DALPHIN JC. *Les pneumopathies d'hypersensibilité (PHS) professionnelles*. In: Bessot JC, Pauli G, Vandenplas O. *L'asthme professionnel*. 2^e édition. Paris: Editions Margaux Orange; 2012: 631 p.

[4] THAON I, REBOUX G, MOULONGUET S, DALPHIN JC. *Les pneumopathies d'hypersensibilité en milieu professionnel*. *Rev Mal Respir*. 2006; 23: 705-725.

[5] CRÉPY M. *Dermatite de contact d'origine professionnelle: conduite à tenir*. *Références en santé au travail*. 2013; 133: 109-122.

[6] CRÉPY MN. *Urticaires de contact d'origine professionnelle*. *Fiche d'allergologie-dermatologie professionnelle* TA 76. *Doc. Méd. Trav*. 2007; 111: 399-410.

[7] CRÉPY MN. *Dermatite de*

contact aux protéines. Une dermatose professionnelle sous-estimée. *Doc. Méd. Trav*. 1999; 79: 249-253.

[8] AMARO C, GOOSSENS A. *Immunological occupational contact urticaria and contact dermatitis from proteins: a review*. *Contact Dermatitis*. 2008; 58: 67-75.

DES TESTS POUR PRÉDIRE LE POUVOIR SENSIBILISANT CUTANÉ DES PRODUITS CHIMIQUES

Près de 20 % des Européens adultes sont sensibilisés à un allergène de contact. La sensibilisation de contact est principalement provoquée par des produits chimiques créés par l'homme au cours des 100 dernières années. Il est donc important, en termes de prévention des risques, de pouvoir identifier à l'avance le pouvoir sensibilisant d'une substance. Pour ce faire, il existe actuellement différentes méthodes dont les avantages et inconvénients sont présentés ici.

FRANÇOIS
GAGNAIRE
INRS,
département
Polluants et
santé

La sensibilisation de contact cutané induite chimiquement est provoquée par des composés chimiques réactifs, appelés allergènes. Ceux-ci sont capables de modifier de façon permanente certaines cellules immunitaires (lymphocytes T) qui, lors d'une nouvelle exposition cutanée à l'allergène en cause, proliféreront et cibleront la peau, conduisant à une réaction allergique. La transformation de ces lymphocytes T en cellules mémoires (phase de sensibilisation) spécifiques d'un antigène est un phénomène fréquent puisque jusqu'à 20 % des européens adultes sont sensibilisés à un allergène de contact. La sensibilisation de contact est principalement provoquée par des produits chimiques créés par l'homme au cours des 100 dernières années. Il est donc très important, dans un souci de prévention, de pouvoir identifier à l'avance le pouvoir sensibilisant d'une substance.

Parmi les méthodes actuelles disponibles pour identifier le pouvoir sensibilisant des produits chimiques, certaines sont validées et réglementaires: l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (LLNA), le test de maximisation chez le cobaye (GPMT) et le test de Buehler; les autres tests et approches présentés dans cet article (approches *in silico*, *in chemico*, *in vitro*) sont suffisamment développés pour servir de sources d'information reconnues dans le cadre d'une évaluation des propriétés toxiques d'une substance. En effet, le règlement (CE) n°1907/2006 du 18/12/06 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), stipule entre autres dans l'Annexe VI que lors d'un enregistrement, le déclarant collecte toutes les informations disponibles et pertinentes sur la substance, y compris des informations provenant de sources alternatives, par exemple les données des études de relations structure-activité, des essais *in vivo* et *in*

vitro, les références croisées à partir d'autres substances, qui peuvent contribuer à identifier la présence ou l'absence de propriétés dangereuses de la substance et, dans certains cas, remplacer les résultats des essais sur animaux.

Les étapes mécanistiques de la réponse allergique cutanée couvertes par les différents tests prédictifs du pouvoir sensibilisant des produits chimiques sont résumées dans la Figure 1.

Tests de détection *in vivo* du pouvoir sensibilisant

Tests de sensibilisation de la peau réalisés chez le cobaye

Deux tests réglementaires sont décrits dans la ligne directrice OCDE 406: le test de maximisation chez le cobaye (GPMT) de Magnusson et Kligman, qui utilise un adjuvant, et le test de Buehler (sans adjuvant). Les deux tests intègrent les différentes phases de la sensibilisation et de la réaction (cf. Figure 1 de l'article « Les manifestations et mécanismes des allergies professionnelles », p. 24).

Pour le GPMT, au moins 10 animaux pour le groupe traité et 5 pour le contrôle doivent être utilisés. Pour le test de Buehler, 20 animaux minimum sont employés dans le groupe traité et au moins 10 pour le contrôle. Les animaux testés sont exposés une première fois à la substance d'essai par injection intradermique et/ou par application épidermique (exposition d'induction). Après une période de repos de 10 à 14 jours (période d'induction) au cours de laquelle une réponse immunitaire peut se développer, les animaux sont exposés à une dose déclenchante. L'étendue et le degré de la réaction cutanée chez les animaux traités sont comparés à ceux obtenus chez les animaux témoins qui ont subi un traitement identique, la substance exceptée pendant l'induction, et qui ont été soumis à l'exposition déclenchante. Le GPMT dure environ 23 à 25 jours, le test de Buehler 30 à 32 jours. La concentration de la substance

d'essai employée pour chaque induction doit être systématiquement bien tolérée et doit entraîner une irritation moyenne à modérée de la peau; pour la concentration déclenchante, la concentration non irritante la plus élevée doit être employée. Toutes les réactions cutanées et les résultats inhabituels doivent être observés et notés (d'autres procédures peuvent suivre pour clarifier des réactions douteuses). Le produit étudié est considéré comme sensibilisant de catégorie 1 lorsqu'au moins 15% (test de Buehler) ou 30% (GPMT) des cobayes présentent une réponse positive, ce qui déclenche l'étiquetage « R43. Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau ». Outre la durée et le grand nombre d'animaux consommés, ces tests présentent certains points faibles: des détails dans la façon dont ils sont conduits peuvent influencer fortement les résultats obtenus, de plus la lecture de l'inflammation cutanée reste subjective [1].

Essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (Local Lymph Node Assay (LLNA))

Contrairement aux tests réalisés sur le cobaye, le LLNA est une méthode d'évaluation du potentiel allergisant des produits chimiques reposant uniquement sur la phase d'induction de la sensibilisation cutanée. Ce test livre des données quantitatives permettant d'évaluer la relation dose-effet. Le LLNA constitue une méthode de remplacement pour identifier les substances d'essai susceptibles d'exercer une action sensibilisante sur la peau. Cela n'implique pas que le LLNA doive systématiquement remplacer les essais sur cobayes, mais plutôt qu'il s'agit d'un outil d'une qualité égale pouvant se substituer à ces essais, et dont les résultats positifs ou négatifs n'ont généralement plus besoin de confirmation supplémentaire. Le test LLNA, mis en œuvre *in vivo*, ne met donc pas un terme à l'utilisation d'animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact. De plus, il ne requiert aucun adjuvant, contrairement à l'essai de maximisation sur le cobaye. C'est pourquoi ce test réduit la souffrance et le stress chez les animaux.

L'essai conduit chez la souris repose sur le principe suivant: les sensibilisants induisent une prolifération primaire de lymphocytes dans les ganglions lymphatiques auriculaires qui drainent le site d'application de la substance chimique. Cette prolifération est proportionnelle à la dose appliquée et fournit une mesure de la sensibilisation. La méthode décrite s'appuie sur l'utilisation du marquage radioactif pour mesurer la prolifération cellulaire. Quatre animaux au minimum sont utilisés par groupe de dose, avec au moins trois concentrations de la substance d'essai, plus un groupe contrôle négatif traité avec le véhicule, et, au besoin, un contrôle positif. Le programme expérimental dure 6 jours. Ensuite, les animaux sont mis à mort et une

suspension de cellules de ganglion lymphatique est préparée. L'incorporation de la 3H-méthylthymidine se mesure par comptage à β scintillation en désintégrations par minute (DPM). Les résultats sont exprimés par l'indice de stimulation (IS). Ce dernier est obtenu par calcul et justifie une classification de la substance d'essai comme sensibilisant de la peau de catégorie 1 s'il est ≥ 3 . Cet essai réglementaire est décrit dans la ligne directrice OCDE 429. Cette ligne directrice décrit également une approche simplifiée du LLNA optionnelle, qui pourrait nécessiter jusqu'à 40% d'animaux en moins. Il faut noter cependant que le LLNA simplifié ne convient pas pour identifier les substances d'essai sensibilisantes pour la peau lorsque des données sur la relation dose-effet sont nécessaires.

Il existe deux variantes non radioactives de la méthode LLNA qui visent à identifier les substances chimiques sensibilisantes et à mesurer la prolifération lymphocytaire qu'ils induisent dans les ganglions lymphatiques auriculaires. L'une décrite chez la souris (de souche CBA/J), se base sur la quantification par bioluminescence du contenu en adénosine triphosphate (ATP), indicateur de cette prolifération. Le protocole expérimental dure 8 jours. La méthode luciférine/luciférase est appliquée pour quantifier la bioluminescence exprimée en unités relatives de luminescence (RLU). Les résultats sont exprimés par l'indice de stimulation (IS) obtenu par calcul. Une évaluation complémentaire de la substance d'essai comme sensibilisant potentiel est justifiée lorsque $IS \geq 1,8$. Cet essai réglementaire est décrit dans la ligne directrice OCDE 442A.

L'autre variante décrite chez la souris (de souche CBA/JN) se base sur la quantification de la 5-bromo-2-désoxyuridine (BrdU), un analogue de la thymidine, dans l'ADN des lymphocytes, comme indicateur de cette prolifération. Le protocole expérimental dure 6 jours. La BrdU intégrée dans l'ADN des lymphocytes ganglionnaires est quantifiée à l'aide d'un kit de dosage ELISA. Les résultats sont exprimés par l'indice de stimulation obtenu par calcul. Un $IS \geq 1,6$ justifie l'évaluation de la substance d'essai comme sensibilisant potentiel. Cet essai réglementaire est décrit dans la ligne directrice OCDE 442B.

Par la simplicité de son protocole et la nature « quantitative » du paramètre mesuré, le LLNA est moins susceptible d'erreurs techniques que les tests conduits chez le cobaye; cependant, il n'est pas dénué de tout résultat faussement positif ou négatif [2, 3].

Test de gonflement de l'oreille de souris (Mouse Ear Swelling Test (MEST))

Ce test comprend une phase de sensibilisation et une phase de déclenchement [4]. Le test est conduit chez des souris dont l'alimentation est enrichie en



vitamine A pour augmenter la sensibilité des animaux. Ces derniers reçoivent par voie intradermique l'adjuvant complet de Freund avant que la substance à tester ne soit appliquée topiquement sur la peau de l'abdomen rasé à trois reprises aux jours 1, 3 et 5. Après une période de repos de 5 jours une application supplémentaire du produit à tester est réalisée sur la face dorsale d'une oreille; le véhicule est appliqué sur l'autre oreille. L'épaisseur des oreilles de l'animal est mesurée 24 et 48 heures après l'application de la substance. Les essais inter-laboratoires conduits avec ce test indiquent qu'il est moins sensible que le GMPT et ne détecte que les sensibilisants forts. Il n'existe pas de ligne directrice réglementaire pour ce test.

Approches non animales pour détecter les sensibilisants

La durée, le coût des tests réalisés chez l'animal ainsi que l'incitation à limiter l'utilisation d'animaux de laboratoire pour l'évaluation des substances chimiques a conduit à développer des tests alternatifs. Ils sont basés sur les connaissances actuelles des mécanismes de l'allergie de contact et associent des approches *in silico* (modélisation informatique), *in chemico* (étude de la réactivité chimique des agents sensibilisants vis-à-vis des protéines), et *in vitro* (utilisation de cultures cellulaires).

Approches *in silico*

Ces approches peuvent être divisées en trois catégories: les études de relations structure-activité (SAR), les études de relations structure-activité quantitatives (QSAR) et les systèmes experts. Les études de relations structure-activité, cherchent à identifier une relation entre la structure d'une molécule et son activité biologique. La relation établie est de nature qualitative. Ainsi, la prédiction d'une activité biologique est basée sur la présence dans la molécule étudiée d'une structure d'alerte. Dans le cas des études de produits potentiellement sensibilisants, les structures électrophiles représentent des structures d'alerte prioritaires. La première étude corrélant la réactivité chimique et la sensibilisation observée chez le cobaye a été conduite sur des composés halogénés du nitrobenzène. Pour la première fois, il était avancé que la formation d'un complexe haptène-protéine était un prérequis pour le développement d'une sensibilisation cutanée. Dupuis et Benezra sont à l'origine du concept moderne de relation structure-activité. Ces auteurs ont montré que les exigences structurales pour les haptènes sont hautement spécifiques. Depuis, de nombreux auteurs ont défini des relations structure-activité à partir d'un important ensemble de données cliniques et de résultats obtenus chez le cobaye et à partir de l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques [5].

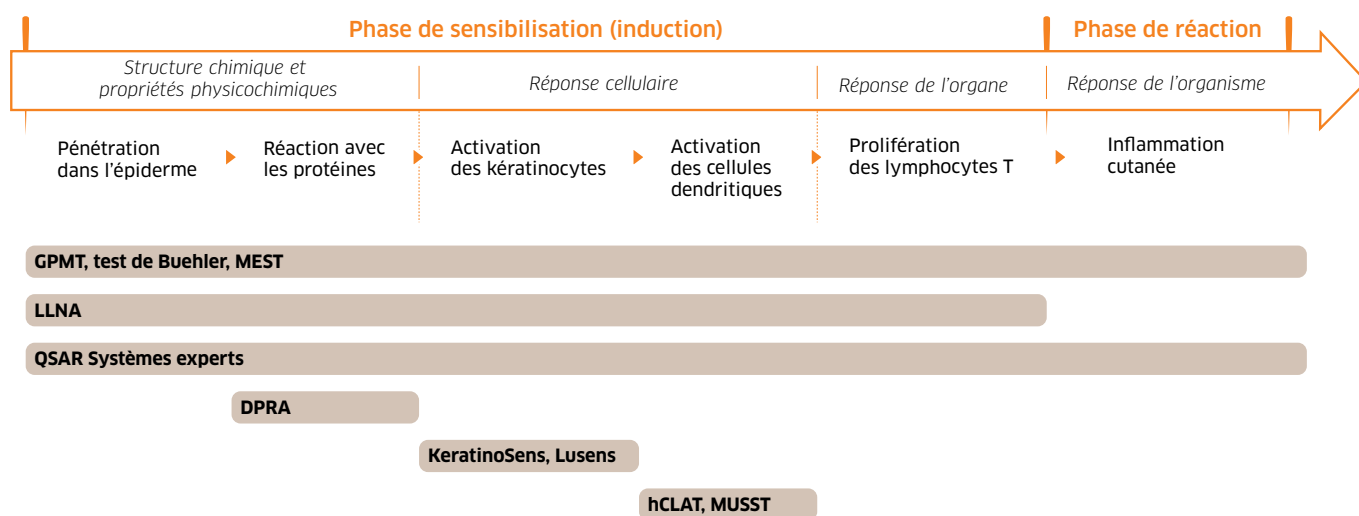
Les études de relations structure-activité quantitatives appliquent des méthodes statistiques à des ensembles de données biologiques et des descripteurs de propriétés moléculaires ou atomiques (coefficients de partage octanol-eau, polarité, électronégativité). Ces modèles peuvent être « locaux » et s'appliquent à une famille chimique ou à un mécanisme de réaction chimique. Les modèles « globaux » intègrent les données de gammes plus larges de familles chimiques et de mécanismes de réactions chimiques. Des analyses critiques de ces modèles ont été réalisées par Patlewicz *et al.* [6]. Parallèlement aux modèles QSAR, des systèmes informatiques dits « systèmes experts » (*Computer-based Expert Systems*) ont été développés afin de prédire le potentiel allergénique d'allergènes présumés. Plusieurs de ces systèmes ont fait l'objet de revues d'évaluation [6]. *DEREK for Windows* est un système expert renfermant environ 360 structures d'alerte couvrant une large gamme d'effets toxicologiques. La version 9.0.0 comprend 64 structures d'alertes se rapportant à la sensibilisation cutanée. *TOPKAT (Toxicity Prediction by Komputer-Assisted Technology)* renferme un module destiné à discriminer les agents sensibilisants des agents non sensibilisants et les sensibilisants forts des sensibilisants faibles ou modérés. *CASE/MultiCASE (Computer Automated Structure Evaluation)* identifie les fragments structuraux associés avec la sensibilisation indépendamment du mécanisme d'action. Ces deux systèmes reposent sur une approche empirique et statistique. *TIMES-SS (Tissue Metabolism Simulator for Skin Sensitization)* est un système expert hybride entre les systèmes basés sur la connaissance et les systèmes statistiques; il prédit le métabolisme cutané et l'interaction du composé parent et de ses métabolites avec les protéines cutanées.

Approches *in chemico*

Ces tests explorent la capacité des produits chimiques à réagir avec des peptides naturels ou synthétiques pour former des adduits par liaison covalente. Contrairement aux méthodes *in silico* basées sur le calcul et la modélisation, les méthodes *in chemico* évaluent la réactivité chimique des agents sensibilisants expérimentalement [7].

Test de réactivité avec le glutathion

Le test repose sur la mesure par spectrophotométrie de la réactivité du glutathion avec le composé potentiellement sensibilisant étudié. L'essai permet de calculer la valeur de la EC50 GSH correspondant à la concentration du composé étudié responsable d'une diminution de 50% de la concentration de glutathion après deux heures d'incubation. Il existe actuellement plus de 250 composés chimiques industriels pour lesquels un EC50 GSH a été calculée.



↑ FIGURE 1 Étapes mécanistiques de la réponse allergique cutanée couvertes par les différents tests prédictifs du pouvoir sensibilisant des produits chimiques

Test de réactivité avec des peptides synthétiques (*Direct Peptide Reactivity Assay* (DPRA))

Cet essai basé sur la réactivité des molécules à tester avec deux peptides synthétiques contenant des nucléophiles (lysine ou cystéine) mesure la déplétion des peptides par une méthode HPLC après réaction avec le composé étudié. Ce test a fait l'objet d'une soumission à l'ECVAM (*European Center for the Validation of Alternative Methods*) pour entrer dans une phase de prévalidation.

Approches *in vitro*

Utilisation de kératinocytes: KeratinoSens, LuSens

Des études récentes suggèrent que la réponse au stress oxydant est la voie principale induite par les sensibilisants de contact. Dans cette voie, la protéine Keap1 renferme des cystéines qui sont hautement réactives aux haptènes. En l'absence d'haptène, Keap1 est associée au facteur de transcription nucléaire Nrf2. Lorsqu'un haptène réagit avec la protéine Keap1, Nrf2 se dissocie de Keap1 et migre dans le noyau où, après avoir formé un hétérodimère avec la protéine MAF, il se fixe sur des éléments de réponse antioxydants (ARE) et induit ainsi la transcription de gènes qui contiennent ARE dans leur promoteur. Les tests KeratinoSens et LuSens utilisent une lignée cellulaire humaine HaCaT dérivée de kératinocytes. Le test repose sur l'activation d'un gène reporteur (la luciférase) contrôlé par des éléments de réponse antioxydants [8]. Le test a été soumis à des essais de reproductibilité inter- et intralaboratoires et a donné un taux de réponses exactes de 85% en testant 28 substances à l'aveugle. Les résultats obtenus avec le test KeratinoSens sont encourageants et le test est actuellement soumis à une prévalidation avec la collaboration de l'ECVAM. Ce test pourrait être un des premiers tests à recevoir une reconnaissance réglementaire avec les tests DPRA et h-CLAT (Cf. Figure 1).

Utilisation de cellules dendritiques et de lignées de cellules dendritiques-like

La maturation des cellules de Langerhans et leur migration est une étape clef dans la réponse immune aux allergènes de faibles poids moléculaire. Comme ces cellules ne sont disponibles qu'en très petit nombre et mûrent parfois spontanément, les cellules dendritiques ont été utilisées à leur place. Elles sont d'origine humaine la plupart du temps et quelquefois d'origine murine. Les cellules humaines sont mises en culture soit à partir de monocytes sanguins CD14⁺ soit de cellules du sang de cordon ombilical CD 34⁺. Après mise en contact avec l'agent sensibilisant étudié, la maturation de ces cellules est étudiée en mesurant l'expression de marqueurs membranaires tels que CD40, CD54, CD80, CD83, CD86, (HLA)-DR et la production de cytokines telles que IL-6, IL-8, IL-12p40 et TNF- α [9]. Un désavantage présenté par l'utilisation de ces cellules est la grande variabilité des résultats obtenus entre donneurs.

Bien que la maturation des cellules dendritiques puisse être utilisée pour détecter le pouvoir sensibilisant, des difficultés majeures subsistent: la reproductibilité limitée intra- et interlaboratoire due à la variabilité entre donneurs, les variations dans les techniques d'isolement et de cultures, le manque de sensibilité et l'échelle étroite des concentrations exploitables. Afin de surmonter les désavantages associés à l'utilisation de cellules dendritiques primaires, des lignées cellulaires substituts de cellules dendritiques ont été intensément étudiées.

• Cellules THP-1: *Human Cell Line Activation Test* (h-CLAT)

Ce test est basé sur l'utilisation d'une lignée cellulaire THP-1 issue d'une leucémie humaine à monocytes. Les cellules en cultures sont exposées à des concentrations croissantes de l'agent

sensibilisant étudié. Après 24 heures d'incubation, l'expression des marqueurs CD86 et CD54 est mesurée par cytométrie en flux. Deux études donnent une prédictibilité du test de 89 % et 93,1 %. Des essais conduits sur une centaine de produits chimiques pour comparer les tests h-CLAT et LLNA donnent une concordance de 84 % entre les deux tests. Ce test a fait l'objet d'une soumission à l'ECVAM pour entrer dans une phase de prévalidation.

- Cellules U937: *Myeloid U937 Skin Sensitization Test* (MUSST)

Ce test est très similaire au test h-CLAT, mais est basé sur l'utilisation de la lignée cellulaire U937 issue d'un lymphome histiocytaire humain. Les cellules en cultures sont exposées à des doses croissantes de molécules à tester. Après 48 heures d'incubation, l'expression du marqueur de surface CD86 est mesurée par cytométrie en flux. Les résultats des essais conduits sur 50 composés donnent une prédictibilité du test de 90 %. Ce test a fait l'objet d'une soumission à l'ECVAM pour entrer dans une phase de prévalidation.

Perspectives

Les tests actuellement validés par les institutions européennes pour évaluer le potentiel sensibilisant des produits chimiques mettent en œuvre des méthodes *in vivo* chez le cobaye ou chez la souris (LLNA, GMPT, test de Buehler). Le test de référence reste celui de stimulation locale des ganglions lymphatiques chez la souris ou LLNA.

Les limites de ces tests sont leur réalisation sur l'animal vivant, l'utilisation pour certains d'entre eux de molécules radioactives, leur durée et leur coût. De plus, la législation européenne relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques évolue: la directive n°2010/63/UE (décret publié au JO le 7 février 2013), modifiant la directive n°86/609/EC, et le système REACH incitent à limiter l'utilisation d'animaux de laboratoire pour l'évaluation des substances chimiques. Il y a donc besoin de développer des tests *in vitro* alternatifs aux tests *in vivo* existants. Les tests *in vitro* ou *in chemico* actuellement proposés n'explorent chacun qu'une voire deux étapes du processus conduisant à la sensibilisation (cf. Figure 1). Actuellement des études sont menées afin de développer des stratégies mettant en œuvre plusieurs tests complémentaires couvrant les étapes clefs du processus biologique qui conduisent à la sensibilisation cutanée. Parmi les différentes combinaisons de tests proposées, celle combinant le DPRA, le KeratinoSens ou le LuSens et le h-CLAT ou le MUSST semble prometteuse; elle explore la réactivité envers les protéines (DPRA), l'activation des kératinocytes (KeratinoSens et LuSens) et celle des cellules dendritiques (h-CLAT et MUSST). La prédictibilité de ce modèle semble surpasser celle du LLNA [10]. Les résultats très prometteurs de ces modèles laissent entrevoir le remplacement futur des tests réalisés sur l'animal tout en maintenant le même degré de prédictibilité du pouvoir sensibilisant des produits chimiques. ●

BIBLIOGRAPHIE

[1] FRANKILD S, VØLUND A, WAHLBERG JE, ANDERSEN KE. Comparison of the sensitivities of the Buehler test and the guinea pig maximization test for predictive testing of contact allergy. *Acta Derm Venereol*. 2000;80:256-262.

[2] LOVELESS SE, LADICS GS, GERBERICK GF, RYAN CA, BASKETTER DA, SCHOLDS EW, HOUSE RV, HILTON J, DEARMAN RJ, KIMBER I. Further evaluation of the local lymph node assay in the final phase of an international collaborative trial. *Toxicology*. 1996;108:141-152.

[3] BASKETTER DA, KIMBER I. Information derived from sensitization test methods: test sensitivity, false positives and false negatives. *Contact Dermatitis*. 2007;56:1-4.

[4] GAD SC. The mouse ear swelling test (MEST) in the 1990s. *Toxicology*. 1994;93(1):33-46.

[5] ASHBY J, BASKETTER DA, PATON D, KIMBER I. Structure activity relationships in skin sensitization using the murine local lymph node assay. *Toxicology*. 1995;103:177-194.

[6] PATLEWICZ G, APTULA AO, URIARTE E, ROBERTS DW, KERN PS, GERBERICK GF, KIMBER I, DEARMAN RJ, RYAN CA, BASKETTER DA. An evaluation of selected global (Q)SARs/expert systems for the prediction of skin sensitisation potential. *SAR QSAR Environ Res*. 2007;18:515-541.

[7] GERBERICK F, ALEKSIC M, BASKETTER D, CASATI S, KARLBERG AT, KERN P, KIMBER I, LEPOITTEVIN JP, NATSCH A, OVIGNE JM, ROVIDA C, SAKAGUCHI H, SCHULTZ T. Chemical reactivity measurement and the predictive identification of skin sensitizers. The report and recommendations of ECVAM Workshop 64. *Altern. Lab. Anim*. 2008;36:215-242.

[8] EMTER R, ELLIS G, NATSCH A. Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2010;245:281-290.

[9] CASATI S, AEBY P, BASKETTER DA, CAVANI A, GENNARI A, GERBERICK GF, GRIEM P, HARTUNG T, KIMBER I, LEPOITTEVIN JP, MEADE BJ, PALLARDY M, ROUGIER N, ROUSSET F, RUBINSTEN G, SALLUSTO F, VERHEYEN GR, ZUANG V. Report and Recommendations of ECVAM Workshop 51. *Dendritic cells as a tool for the predictive identification of skin sensitisation hazard*. *Altern. Lab. Anim*. 2005;33:47-62.

[10] BAUCH C, KOLLE SN, RAMIREZ T, ELTZE T, FABIAN E, MEHLING A, TEUBNER W, VAN RAVENSWAAY B, LANDSIEDEL R. Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul. Toxicol. Pharmacol*. 2012;63:489-504.

MESURER LES ALLERGÈNES FONGIQUES DANS L'AIR DES LIEUX DE TRAVAIL

Le comptage des cellules fongiques, utilisé généralement pour évaluer les expositions professionnelles aux moisissures, ne permet pas de déterminer directement les allergènes responsables des pathologies causées par ces micro-organismes. Cela nécessite de disposer de méthodes de mesurage validées et standardisées, aujourd'hui encore peu développées. Cet article fait le point sur les méthodes disponibles.

PHILIPPE DUQUENNE
INRS,
département
Métrologie
des polluants

Les allergènes d'origine biologique susceptibles d'être retrouvés dans l'air proviennent de végétaux (pollens, épices, grains de café, farine, soja...), d'animaux (animaux de compagnie, de laboratoire ou d'élevage, insectes, poissons, crustacés...), de micro-organismes (moisissures, bactéries) ou peuvent être des enzymes destinés à des utilisations industrielles (boulangerie, détergents...). Ce sont généralement des protéines ou des glycoprotéines. Les moisissures¹ sont des champignons microscopiques omniprésents dans l'environnement. Ils se développent à partir de la matière organique et forment des filaments ramifiés, appelés hyphes ou mycélium (Cf. Figure 1). La croissance de ce mycélium permet aux moisissures de coloniser le milieu environnant. Beaucoup d'entre elles comportent également des structures reproductrices qui produisent des spores. Celles-ci peuvent être transportées par différents vecteurs (air, eau, etc.) sur de longues distances et, lorsque les conditions sont favorables, germer et donner naissance à une nouvelle moisissure. Ces dernières peuvent être mises en suspension dans l'air des lieux de travail (cf. Figure 2). Des expositions importantes ont été mesurées dans de nombreuses situations professionnelles [3] et ont pu être associées à des pathologies allergiques comme l'asthme et la pneumopathie d'hypersensibilité chez les travailleurs [5].

Traditionnellement, la mesure des expositions professionnelles aux moisissures repose sur des méthodes permettant de compter les cellules fongiques. Ces méthodes donnent une estimation des expositions qui est utile à la prévention des risques biologiques. Pour autant, elles ne permettent pas de mesurer directement les allergènes responsables du déclenchement des symptômes et du développement des maladies, ce qui contribuerait à une meilleure évaluation des risques allergiques

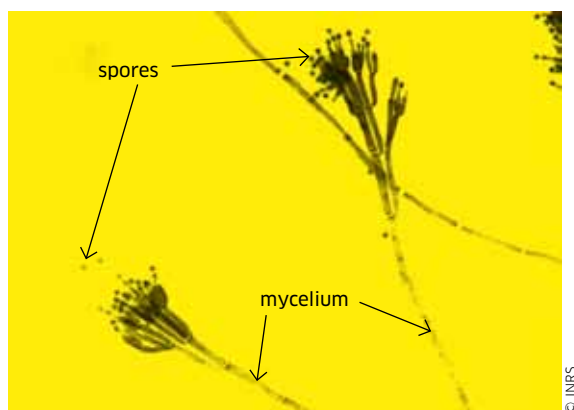
associés à l'exposition aux bioaérosols. L'évaluation des risques professionnels associés à l'exposition à des allergènes aéroportés nécessite de disposer de méthodes de mesurage de ces substances suffisamment validées et standardisées.

Les moisissures allergènes dans les bioaérosols

Les champignons représentent un règne estimé à 1,5 millions d'espèces dont environ 80 000 sont décrites. Parmi celles-ci, plus d'une centaine de genres a été incriminée dans le déclenchement de réactions allergiques chez les personnes exposées (Cf. Tableau I). Par exemple, *Alternaria alternata* est une moisissure omniprésente dans l'air extérieur, les environnements intérieurs domestiques et les environnements professionnels. C'est aussi l'une des moisissures les plus fréquemment impliquée dans les maladies et les symptômes allergiques qui sont rapportées. Les autres moisissures souvent identifiées appartiennent aux genres *Cladosporium* (*C. cladosporioides*), *Penicillium* (*P. olivumviride*, *P. expansum*, *P. nalgiovense*, *P. camembertii*, *P. glabrum*), *Aspergillus* (*A. oryzae*, *A. nidulans*), *Geotrichum* (*G. candidum*), *Chrysosporium* (*C. sitophila*) et *Helminthosporium*. Les moisissures allergènes que l'on retrouve dans l'air des lieux de travail présentent une diversité importante et mais elles n'ont pas encore été toutes identifiées. Elles peuvent être présentes dans des secteurs d'activités aussi diversifiés que le tri et le compostage des déchets, l'élevage, le travail du bois, le travail du grain, la fabrication des produits de charcuterie [3]. Il faut aussi souligner que les enzymes fongiques sont utilisés de façon délibérée dans l'industrie [7]. Les moisissures présentes dans les environnements professionnels incluent des spores, des fragments de mycéliums uni- ou pluricellulaires et des débris de ces entités, isolés ou formant des assemblage complexes. Ces particules sont susceptibles de pénétrer dans les voies respiratoires



FIGURE 1 → Observation au microscope optique des différentes parties constituant une moisissure (*Penicillium* sp.).



et de s'y déposer. Les spores et les fragments de *mycéliums* ont une taille généralement comprise entre un et quelques dizaines de micromètres; les débris sont plutôt de taille sub-micrométrique. Le pouvoir allergisant de ces micro-organismes varie avec la moisissure considérée, les conditions environnementales, la germination des spores ainsi que la fragmentation du mycélium allergène mais d'autres facteurs restent à identifier [8]. La

TABEAU 1 → Principaux genres auxquels appartiennent les moisissures allergènes.

	PHYLUM		BASIDIOMY- CÈTES	ZYGOMY- CÈTES
	ASCOMYCÈTES			
GENRE	Acremonium	Eurotium	Agaricus	Mucor
	Alternaria	Fusarium	Calvatia	Rhizopus
	Aspergillus	Gliocladium	Cantharellus	
	Aureobasidium	Helminthosporium	Cyathus	
	Botryotrichum	Monilia	Ganoderma	
	Botrytis	Nigrospora	Geastrum	
	Candida	Neurospora	Lentinus	
	Chaetomium	Paecilomyces	Pleurotus	
	Chrysosporium	Penicillium	Polyporus	
	Cladosporium	Phoma	Psilocybe	
	Claviceps	Pyrenochaeta	Puccinia	
	Coniosporium	Saccharomyces	Rhodotorula	
	Curvularia	Scopulariopsis	Serpula	
	Cylindrocarpon	Stachybotrys	Sporotrichum	
	Daldinia	Stemphylium	Tilletia	
	Didymella	Torula	Urocystis	
	Drechslera	Trichoderma	Ustilago	
	Epicoccum	Trichophyton	Wallemia	
	Erysiphe	Ulocladium	Xylobolus	
	Cephalosporium			

présence des moisissures allergènes est donc avérée dans de nombreux secteurs professionnels et des expositions à ces agents biologiques ont été recensées. Dans certaines situations, un salarié peut être exposé à plusieurs moisissures allergènes différentes et à des allergènes d'autres sources [10].

Les allergènes identifiés chez les moisissures

Une bonne connaissance des allergènes fongiques est un pré-requis à la définition de méthodes et de stratégies de mesure adaptées. Des études ont permis d'identifier et de décrire certaines des substances responsables du pouvoir allergène des moisissures. Les allergènes complètement caractérisés sont décrits par l'*International Union of Immunological Societies* (IUIS) (www.allergen.org). Parmi eux, 303 sont d'origine animale, 354 sont d'origine végétale et 105 d'origine fongique. Les allergènes fongiques peuvent être des métabolites émis dans le milieu extracellulaire ou des composés cytoplasmiques et structuraux. La plupart des moisissures sont porteuses de plusieurs allergènes qui sont généralement des protéines, notamment des enzymes, ou des glycoprotéines. Certains enzymes fongiques utilisés délibérément dans l'industrie (α -amylase, protéases, lipases cellulases...) sont identifiés comme des allergènes [7].

Les travaux visant à caractériser les allergènes fongiques ont été moins nombreux par rapport à ceux portant sur les allergènes issus des animaux et des végétaux. Ce déficit tient sans doute au défaut de préparations antigéniques suffisamment standardisées et pures [4]. De telles préparations sont en cours de développement et la caractérisation de ces allergènes se poursuit. Néanmoins, un travail important reste à faire afin de mieux connaître la chimie et la biochimie de ces substances et leur répartition parmi les champignons. Ce travail comprend également la recherche des homologues de structure entre les différents allergènes (partie de la molécule dont la structure chimique est similaire entre plusieurs allergènes) qui pourraient être impliquées dans les réactions croisées².

Les concentrations en allergènes fongiques mesurées dans l'air

Les mesures d'allergènes fongiques dans les bioaérosols sont assez peu nombreuses et concernent un nombre limité d'allergènes. Le mesurage est effectué selon un processus classique (Cf. Figure 3) et les résultats sont exprimés en nano-grammes d'allergène par mètre cube d'air (ng/m³). L'allergène Asp f1 (*Aspergillus fumigatus*) a été mesuré à des concentrations maximum de 4 ng/m³ dans des ateliers de production des copeaux de bois [1]. Les concentrations mesurées dans une habitation



↑ FIGURE II Un exemple d'activité productrice d'aérosols fongiques: la fabrication de produit de charcuterie.

À gauche: produits couverts de moisissures prêt à être brossés et conditionnés. À droite: colonies de la moisissure *Penicillium nalgioyense*, isolée à partir des échantillons d'air prélevés dans les ateliers de production de ces produits.

sont de l'ordre de 13 ng/m³ pour un allergène d'*Alternaria alternata* et de 7 ng/m³ pour celui d'*Aspergillus niger*. D'autres allergènes fongiques ont pu être identifiés mais non quantifiés dans l'air de bureaux et d'archives [8]. Les mesures ont été plus nombreuses pour les enzymes fongiques utilisés délibérément dans l'industrie (α -amylase, protéases, lipases cellulases...) pour lesquels des expositions pouvant atteindre 40 voire 200 ng/m³ sont rapportées [7]. Les méthodes employées ne sont pas standardisées actuellement.

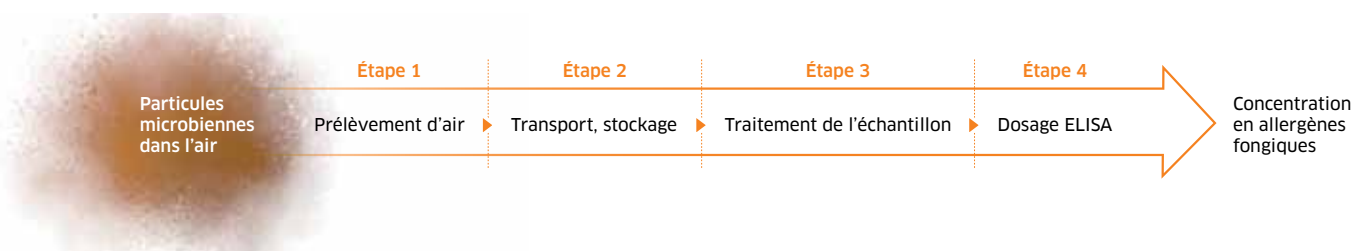
Les méthodes et stratégies de prélèvement

Les quelques mesures effectuées ont été faites par filtration avec un prélèvement sur filtre ou membranes (polycarbonate, Téflon, fibre de verre...). Les conditions de prélèvement et la conservation des échantillons ne sont pas standardisées et ont fait l'objet de peu d'études: leurs effets sur les résultats de mesure restent donc à évaluer [9]. En particulier, les performances biologiques des dispositifs de prélèvement des allergènes ne sont pas connues. Celles-ci doivent être étudiées car le prélèvement pourrait fragmenter les particules fongiques ou dénaturer les sites réactifs nécessaires à la détection des allergènes à l'aide de tests immuno-chimiques utilisant des anticorps. Pour progresser sur les méthodes de prélèvement des allergènes fongiques, il est possible de tirer profit de l'expérience et des connaissances acquises en métrologie des bioaérosols. Cela est

envisageable avec les allergènes biologiques d'origine animale ou végétale pour lesquels les études ont été plus nombreuses. Mais les progrès réalisés pour d'autres agents biologiques (bactéries, moisissures...) sont également exploitables au profit de la métrologie des allergènes. En particulier, la majorité des méthodes disponibles pour le prélèvement des bioaérosols peuvent être utilisées pour mesurer l'exposition aux allergènes fongiques. Le prélèvement individuel de la fraction inhalable est adapté à la mesure de l'exposition aux allergènes fongiques présents dans les bioaérosols. Les stratégies de mesure qui seront mises en place pour les allergènes fongiques devront également prendre en compte les autres voies d'exposition possibles (notamment par contact).

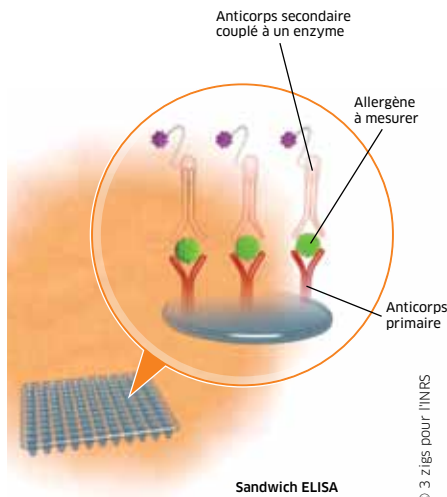
Le traitement des échantillons

Pour les prélèvements qui ont été effectués sur filtre, une étape d'élution est nécessaire avant l'analyse. Cette étape a pour objectif d'extraire les allergènes solubles qui ont été collectés sur le filtre lors du prélèvement et de les remettre en suspension dans une solution aqueuse stérile. Les solutions employées sont généralement des solutions physiologiques stériles; l'extraction est effectuée par agitation orbitale. L'optimisation des conditions d'extraction n'a pas fait l'objet d'une attention particulière pour les allergènes fongiques et un travail est nécessaire sur ce point. L'étape d'élution doit à la fois maximiser la quan-



↑ FIGURE III Les principales étapes impliquées dans la mesure des allergènes fongiques dans l'air.

ENCADRÉ 1 PRINCIPE DE LA TECHNIQUE ELISA



La technique ELISA (*Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay*) exploite la réaction anticorps/antigène. L'analyse est souvent effectuée dans les puits d'une plaque de microtitration à l'aide d'un lecteur de microplaque (spectrophotomètre ou fluorimètre) et des tests se développent par le biais de la cytométrie en flux. Pour la variante « Sandwich ELISA », le protocole comprend les étapes suivantes : 1- la préparation des puits de la microplaque destinée à l'analyse, 2- l'attachement de l'anticorps primaire (ou de capture) sur la surface de ces puits, 3- l'ajout des échantillons contenant les allergènes dans les puits, 4- le rinçage de la plaque de manière à éliminer les allergènes non liés, 5- l'ajout de l'anticorps secondaire associé à l'enzyme dans les puits, 6- le rinçage de la microplaque et 7- l'ajout du substrat de l'enzyme. L'analyse se poursuit par une étape d'incubation et de lecture donc les paramètres (température, durée, longueur d'onde...) dépendant de l'enzyme et de substrat qui lui est spécifique et de l'antigène recherché.

© 3 ZIGS POUR l'INRS

tité récupérable de substances et préserver les propriétés réactives des allergènes échantillonnés [6]. Compte tenu des propriétés physiologiques et biochimiques de ces allergènes, l'optimisation de l'extraction pourra porter sur la composition, le pH et la force ionique des solutions physiologiques ainsi que sur les conditions d'agitation.

L'analyse des allergènes dans les échantillons

Les méthodes immunochimiques sont les plus utilisées pour mesurer les allergènes dans les échantillons d'air. Celles-ci reposent sur l'emploi d'anticorps (Cf. Encadré 1)³ réagissant directement avec les antigènes que l'on cherche à mesurer. Ces anticorps à usage analytique peuvent être produits à partir du sérum issu de personnes sensibilisées à l'antigène que l'on recherche ou d'animaux sensibilisés en laboratoire. Les anticorps produits sont dits polyclonaux lorsqu'ils

sont capables de reconnaître plusieurs épitopes (clones d'un anticorps spécifiques) et monoclonaux lorsqu'ils sont spécifiques d'un seul épitope. La technique ELISA (Cf. Encadré 1) met en œuvre deux anticorps différents et une réaction enzymatique. Le premier anticorps, appelé anticorps primaire, est spécifique de l'antigène que l'on cherche à détecter. Le second anticorps, appelé anticorps secondaire, réagit avec le complexe anticorps primaire-antigène et il est associé à une enzyme (ENCART). L'enzyme hydrolyse un substrat qui lui est spécifique, ce qui provoque une coloration (substrat chromogène) ou l'émission d'une fluorescence (substrat fluorogène) dans le milieu réactionnel. La réaction indique la présence de l'allergène recherché et l'intensité de la coloration ou de l'émission de la fluorescence est proportionnelle à la quantité d'allergène. Le test ELISA permet donc d'obtenir un résultat quantitatif. La quantification est effectuée en comparaison à une gamme étalon constituée avec un allergène de concentration connue. Les méthodes ELISA sont présentées comme étant spécifiques, sensibles, précises et reproductibles, faciles à mettre en œuvre et autorisant des mesures quantitatives fiables. Des progrès sur l'automatisation des analyses ont aussi été réalisés ces dernières années. En revanche, il est nécessaire d'effectuer un test séparé pour chaque allergène recherché ce qui peut alourdir le coût des études impliquant plusieurs allergènes et allonger le temps consacré aux analyses. Des tests multiplexes ont été développés dans le but pouvoir détecter et quantifier plusieurs allergènes en une seule analyse. L'une de ces méthodes, appelée MARIA (*Multiplex*

Moisissures sur déchets en cours de compostage.



© INRS

Array for Indoor Allergens) permet de quantifier les principaux allergènes retrouvés dans les environnements intérieurs [2]. Il intègre notamment un allergène d'*Aspergillus fumigatus* et un autre d'*Alternaria alternata* mais les applications de ce test pour la recherche d'autres allergènes de moisissures sont rares et doivent être développées. La méthode fHIA (fluorescent Halogen Immuno-Assay) est une autre méthode immuno-chimique utilisée pour la quantification de la plupart des allergènes d'origine biologique et notamment ceux d'origine fongique. La méthode met en œuvre des observations microscopiques de micro-organismes marquées par immunochimie. La méthode fHIA a été adaptée à l'étude de plusieurs espèces de moisissures et a permis de mettre en évidence les allergènes présents sur les fragments de mycélium.

La robustesse des méthodes immuno-chimiques repose essentiellement sur l'affinité et la spécificité des anticorps monoclonaux utilisés et sur la disponibilité d'un antigène de référence pure et de concentration connue. Des méthodes sont actuellement disponibles pour la mesure de quelques allergènes de moisissures mais un effort de développement est nécessaire pour les étendre à un nombre de substances plus important. Il sera nécessaire de disposer des allergènes de référence suffisamment standardisés et purifiés et de produire les anticorps correspondant pour développer des méthodes quantitatives. L'une des difficultés réside dans le choix des allergènes possibles au regard de la grande diversité des substances considérées et des possibles réactions croisées entre ces allergènes d'origine différente.

Conclusion

La mesure des allergènes fongiques dans l'air représente un enjeu d'avenir pour l'évaluation et la prévention des risques associés à l'exposition aux bioaérosols. Des méthodes sont actuellement disponibles et peuvent déjà être utilisées pour mesurer l'exposition à quelques allergènes précis (*Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata*...). Pour autant, un effort de développement est encore nécessaire afin d'améliorer la pertinence des mesures effectuées et la standardisation des méthodes. En particulier, les travaux visant à améliorer les connaissances sur la diversité des allergènes fongiques, leurs rôles et leur répartition parmi les moisissures doivent être poursuivis. Ce travail doit être accompagné par la caractérisation complète des substances correspondantes et l'identification des allergènes d'intérêt en hygiène du travail. Par ailleurs, le développement des méthodes standardisées, reproductibles et de stratégies de mesure adaptées est nécessaire. Un effort indispensable doit être mené pour développer des tests immuno-chimiques utilisant des anticorps nonoclonaux ou polyclonaux pour les moisissures. ●

1. D'un point de vue biologique, les moisissures sont des micro-organismes eucaryotes (qui possèdent un noyau isolé du cytoplasme) pluricellulaires.
2. Réaction d'un antiserum dirigé contre un allergène avec un autre allergène différent mais de structure très proche. On parle de réaction croisée lorsqu'un même anticorps est capable de se combiner à des antigènes différents possédant des déterminants antigéniques très proches.
3. Les anticorps sont des protéines produites par les cellules du système immunitaire des vertébrés; lorsqu'un antigène (substance étrangère) est présent dans l'organisme d'un vertébré, son système immunitaire produit des anticorps contre celui-ci.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] DILLON, H. K., D. K. BOLING, AND J. D. MILLER. Comparison of detection methods for *Aspergillus fumigatus* in environmental air samples in an occupational environment. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 2007, 4:509-513.
- [2] EARLE, C. D., E. M. KING, A. TSAY, K. PITTMAN, B. SARIC, L. VAILES, R. GODBOUT, K. G. OLIVER, AND M. D. CHAPMAN. High-throughput fluorescent multiplex array for indoor allergen exposure assessment. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2007, 119:428-433.
- [3] EDUARD, W. Fungal spores: A critical review of the toxicological and epidemiological evidence as a basis for occupational exposure limit setting. *Critical Reviews in Toxicology*, 2009, 39:799-864.
- [4] ESCH, R. E. Manufacturing and standardizing fungal allergen products. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2004, 113:210-215.
- [5] FUNG, F., AND W. G. HUGHSON. Health effects of indoor fungal bioaerosol exposure. *Applied Occupational and Environmental Hygiene*, 2003, 18:535-44.
- [6] GORDON, S. Collection of Air Samples to Quantify Exposure to Airborne Allergens, p. 209-215. In M. Jones and P. Lympny (ed.), *Allergy Methods and Protocols*, 2008, vol. 138. Humana Press.
- [7] GREEN, B. J., AND D. H. BEEZHOLD. Industrial fungal enzymes: an occupational allergen perspective. *Journal of Allergy Article*, 2011, ID 682574:1-11.
- [8] GREEN, B. J., J. K. SERCOMBE, AND E. R. TOVEY. Fungal fragments and undocumented conidia function as new aeroallergen sources. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2005, 115:1043-1048.
- [9] RENSTROM, A. Exposure to airborne allergens: a review of sampling methods. *Journal of Environmental Monitoring*, 2002, 4:619-622.
- [10] RIMAC, D., J. MACAN, V. VARNAI, M. VUCEMILO, K. MATKOVIC, L. PRESTER, T. ORCT, I. TROSIC, AND I. PAVICIC. Exposure to poultry dust and health effects in poultry workers: impact of mould and mite allergens. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 2010, 83:9-19.

UNE MÉTHODE D'ÉVALUATION DE L'ÉMISSIVITÉ DES MACHINES EN POUSSIÈRES DE FARINE

Les poussières de farine peuvent être à l'origine d'allergies professionnelles comme l'asthme ou les rhinites. Près de 100 000 boulangers y sont directement exposés. Alors que les systèmes de captage des poussières sont difficiles à intégrer, la réduction des émissions des machines est privilégiée. Cela nécessite, au préalable, la mise au point de protocoles robustes de mesure de ces émissions.

FRANCIS BONTHOUX
INRS,
département
Ingénierie des
procédés

La farine est la première cause d'asthme professionnel en France. Avec les poussières de céréales, elle est incriminée dans 25% des cas d'asthme professionnel. La durée moyenne d'exposition aux poussières de farine à partir de laquelle apparaît l'asthme est estimée entre 6 et 10 ans. La poussière de farine peut aussi être à l'origine de rhinites allergiques aiguës ou chroniques (tableau de maladie professionnelle n°66 du tableau du régime général) [1]. Près de 100 000 boulangers sont directement exposés aux poussières de farines (30 000 artisans et près de 70 000 salariés).

La recommandation R439 de la Cnamts [2] met l'accent sur les méthodes de travail et les perfectionnements des machines permettant de limiter les expositions en réduisant les émissions de farine. Les machines les plus émissives y sont abordées :

- les pétrins, utilisés pour confectionner la pâte, qui émettent des poussières lors du chargement et pendant le frasage, notamment au début du mélange;
- les diviseuses, utilisées pour séparer la pâte en pâtons, qui rejettent une quantité importante de la farine abondamment utilisée lors du fleurage pour éviter le collage de la pâte;
- les laminoirs, utilisés pour diminuer l'épaisseur de la pâte qui, pour certains, intègrent un système de fleurage automatique pour éviter que la pâte ne colle au tapis.

Il faut préciser que, dans ce secteur d'activité, l'installation de système de captage, solution cou-

ramment utilisée dans l'industrie, est mal acceptée car, en présence d'humidité, la farine peut former des agglomérats dans les orifices de captage rendant le nettoyage problématique. Il faut donc, plus qu'ailleurs, traiter le problème à la source en réduisant les émissions. Une charte de partenariat a été signée entre la Cnamts et la profession en vue d'aider les constructeurs de matériels à développer des machines qui généreraient moins de poussières de farine. L'objectif étant de pouvoir étiqueter les appareils avec une mention du type « outils plus sûrs ».

Le point de départ d'une telle action est la mise au point d'un protocole robuste de mesures des émissions de poussières de farine. Deux publics sont potentiellement utilisateurs de ce protocole d'évaluation :

- les constructeurs qui recherchent avant tout un outil simple leur permettant d'estimer rapidement l'impact d'une modification en termes d'émission (processus d'amélioration);
- les organismes délivrant le label qui doivent positionner les machines sur une échelle absolue.

La difficulté liée au développement d'une telle méthodologie est accrue par la nécessité de la rendre accessible à un public dépassant le cadre du laboratoire. La méthode doit être financièrement et techniquement accessible. Cette mesure est simple en apparence car il suffit de placer la machine dans un environnement ventilé et de collecter dans la sortie d'air les poussières de farine générées (Cf. Figure 1).

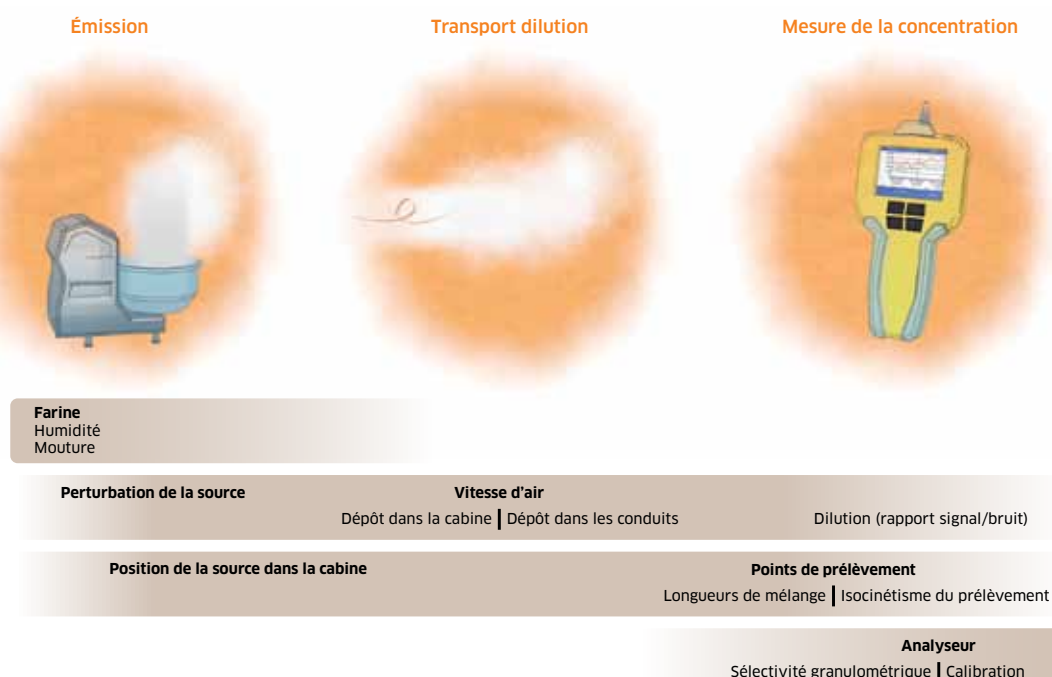
En pratique, elle engendre de nombreuses difficultés : celles inhérentes aux mesures de concentration en poussières et celles inhérentes à la conversion d'une mesure de concentration en un débit de polluant. Dans le cas des machines de boulangerie, viennent s'ajouter les caractéristiques de pulvéulence propre à chaque farine. Le graphique ci-après (Cf. Figure 2) résume les paramètres influents et les interactions entre ces paramètres.

L'INRS travaille depuis de nombreuses années sur



FIGURE 1 →
Evaluation du
débit d'émission
dans le collecteur
d'air d'une cabine.

© 3 zigs pour l'INRS



© 3 ZIGS pour l'INRS

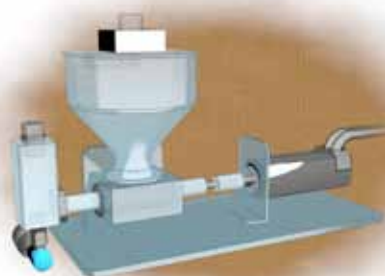
← **FIGURE II**
Paramètres à maîtriser lors du processus de mesure en cabine.

les techniques permettant d'évaluer ces débits sources [3] et a participé activement à l'élaboration de normes européennes [4] permettant d'estimer les débits de polluant des machines. Bien que le champ d'application de ces normes ne soit pas limité en termes de types de polluants, leur applicabilité réelle se limite aux polluants gazeux. Une première partie de l'étude a été réalisée dans un banc d'essai de type laboratoire, où l'environnement parfaitement maîtrisé a permis d'évaluer l'émission en poussières de farine de sources stables (Cf. Figure 3) et de comparer les performances des appareils de mesure en concentration. Une seconde partie s'est déroulée dans une enceinte ventilée constituée d'une structure tubulaire revêtue d'une bâche antistatique (Cf. Figure 4) - ce type d'installation est à la portée d'un constructeur de matériel de boulangerie. Une nouvelle évaluation des débits d'émission des sources a été réalisée dans cet environnement dégradé.

Les mesures effectuées en banc d'essai comme en enceinte ventilée montrent qu'une évaluation reposant sur une détermination absolue du débit d'émission n'est pas envisageable. Les incertitudes liées aux appareils de mesure de la concentration en poussières, aux variabilités de la granulométrie des farines (liée au lot de farine) et à la maîtrise des conditions aérodynamiques du local d'essai conduiraient à une dispersion trop élevée des résultats fournis par différents laboratoires.

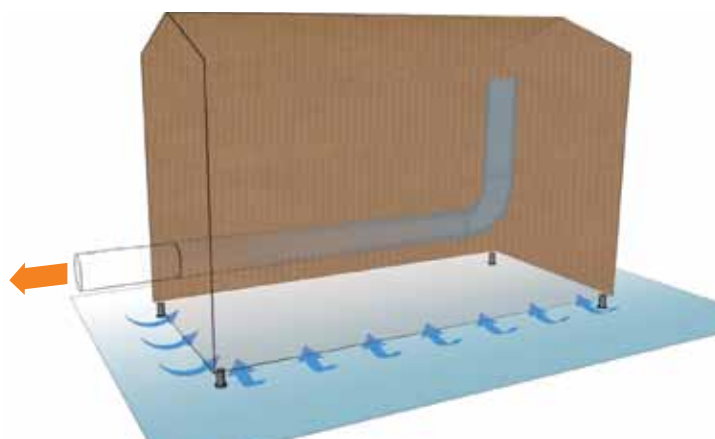
La solution développée pour contourner ces difficultés consiste à exprimer l'émission de la machine testée en fraction de l'émission d'une source de référence placée en lieu et place de la machine à évaluer (Cf. Figure 5).

Cette approche revient à « étalonner » globalement l'installation d'essai par rapport à une source connue. La majeure partie des difficultés se déplacent alors vers la mise au point d'une telle source, qui doit être simple à confectionner et reproductible.



↑ **FIGURE III**
Générateur de poussières.

© 3 ZIGS pour l'INRS



↑ **FIGURE IV**
Enceinte ventilée.

© 3 ZIGS pour l'INRS



FIGURE V →
Evaluation par
comparaison à
une source de
référence.



© 3 zigs pour l'INRS

Plusieurs dispositifs ont été construits à partir de composants simples et disponibles sur le marché; les meilleurs résultats en termes de reproductibilité ont été obtenus avec un tamis fixe, dont la farine chute à la suite de coups cadencés donnés par une masselotte montée sur un balancier (Cf. Figures 6 et 7). Ce type de mise en suspension, comparé à une aérosolisation par jet d'air comprimé, présente l'avantage d'être représentatif d'une émission de machine de boulangerie.

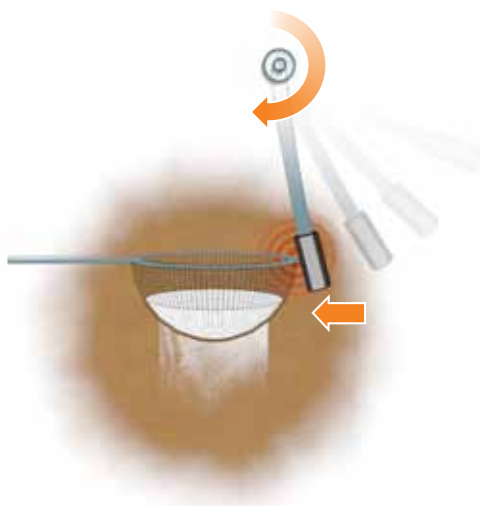
Pour une même farine, une série de quatre essais a donné une dispersion inférieure à 7% du débit source. Cette bonne reproductibilité permet d'envisager l'élaboration d'une méthode robuste. La validation complète de la faisabilité d'une source

de référence basée sur un tamis nécessite d'étudier son indépendance vis-à-vis du trio (diamètre de tamis, taille de maille, force de frappe), qui devrait trouver un point d'invariance par rapport au nombre de coups nécessaires pour faire passer une quantité donnée de farine.

À plus long terme, une méthode normalisée est envisageable. La méthode proposée, reposant sur une source de référence simple, est un bon candidat pour un tel développement. Elle n'impose pas de contraintes fortes sur les installations d'essai, sur les consommables et sur les appareils de mesure, éliminant ainsi les points limitant l'acceptation d'une norme au niveau européen ou international. ●

FIGURE VI →
Principe de
génération.

FIGURE VII →
Chute d'un
« paquet » de
farine après
impact.



© 3 zigs pour l'INRS



© INRS

BIBLIOGRAPHIE

[1] ROSENBERG N. Allergie respiratoire du boulanger. Fiche d'allergologie respiratoire professionnelle. TR 29. Tiré à part de la revue Documents pour le médecin du travail. INRS, 2002, 8 p.

[2] RECOMMANDATION 439: PRÉVENTION DES RISQUES LIÉS AUX ÉMISSIONS DE POUSSIÈRES DE FARINE (ASTHME, RHINITES, ALLERGIES

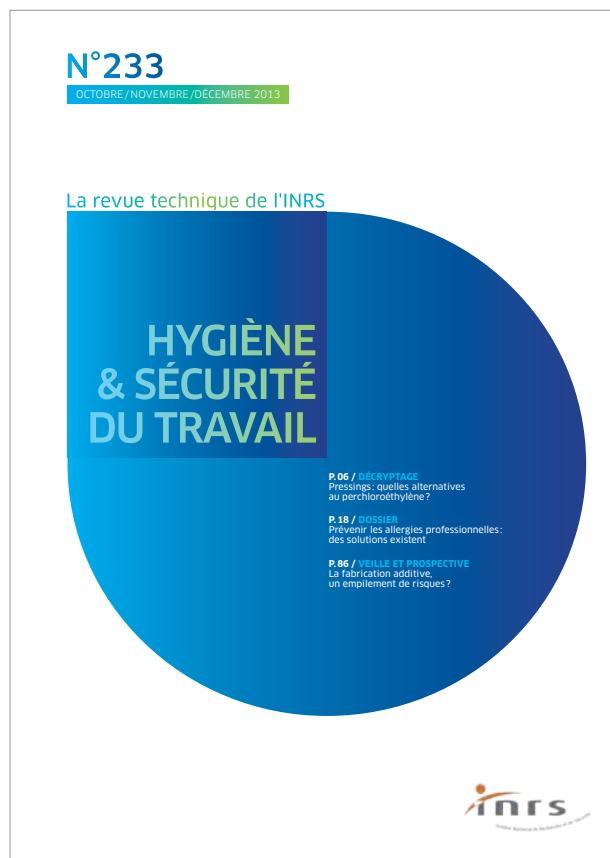
RESPIRATOIRES). Caisse nationale de l'assurance maladie des travailleurs salariés (CNAMTS), 1^e éd., Paris, INRS, 2008, 5 p.

[3] BEMER D., DESSAGNE J.M., AUBERTIN G.- Traçage à l'hélium - Mise au point d'une méthode de mesure du débit d'émission d'une source gazeuse, INRS, Hygiène et sécurité du travail - Cahiers de notes

documentaires, 161, 1995, ND 2007, pp. 509 - 518.

[4] NF EN 1093-3. Sécurité des machines. Évaluation de l'émission de substances dangereuses véhiculées par l'air. - Partie 3: méthode sur banc d'essai pour le mesurage du débit d'émission d'un polluant donné.

ABONNEZ-VOUS



TARIFS ANNUELS 2014* (1 an/4 n°)

- ☐ France: 72 €
- ☐ DOM: 78 €
- ☐ TOM et Europe: 84 €
- ☐ Reste du monde: 90 €

* exonération TVA

JE RÈGLE COMPTANT:

- ☐ Par chèque à l'ordre de l'INRS
- ☐ Par virement bancaire sur le compte de l'INRS
(IBAN: FR44 3000 2005 7200 0000 0309 D24 -
BIC: CRLYFRPP) et recevrai une facture acquittée.

Bulletin à retourner accompagné de votre règlement à:
INRS service abonnements - 17 rue des Boulangers -
78926 Yvelines Cedex 9 - France
Tél.: 01 55 56 71 03 - Fax: 01 55 56 70 50
Mail: abonnements@inrs.fr

- ☐ **OUI, je m'abonne à Hygiène et sécurité du travail (HST)**
pour une durée d'un an, soit 4 numéros.
Un bulletin de réabonnement me sera adressé
à échéance.

À remplir en lettres capitales:

- ☐ M^{ME} ☐ M^{LLE} ☐ M.

NOM:

PRÉNOM:

SOCIÉTÉ:

CODE APE:

ADRESSE:

VILLE:

CODE POSTAL:

PAYS:

TÉL.:

MAIL:

Profession (cochez la case):

- ☐ Chargé de prévention en entreprise
- ☐ Intervenant en prévention des risques professionnels (IPRP)
- ☐ Médecin du travail
- ☐ Formateur
- ☐ Ressources humaines
- ☐ Chef d'entreprise
- ☐ Chercheur
- ☐ Autre

Secteur d'activité (cochez la case):

- ☐ Métallurgie
- ☐ Bâtiment et des travaux publics
- ☐ Transports, eau, gaz, électricité, livre et communication
- ☐ Services et commerces de l'alimentation
- ☐ Chimie, caoutchouc et plasturgie
- ☐ Bois, papier, textile, cuirs et peaux, pierres et terres à feu
- ☐ Commerces non alimentaires
- ☐ Activités de services I (banques, assurances, administrations...)
- ☐ Activités de services II (travail temporaire, action sociale, santé, nettoyage...)

Le traitement des données recueillies a fait l'objet d'une déclaration à la CNIL (récépissé n°1677876 du 11 juin 2013). Elles sont conservées dans un fichier géré par le département Produits d'information de l'INRS. Conformément à l'article 34 de la loi Informatique et libertés du 6 janvier 1978 modifiée en 2004, vous disposez d'un droit d'accès, de modification, de rectification et de suppression des données qui vous concernent. Pour l'exercer, adressez un courrier à INRS, département Produits d'information, 65 boulevard Richard Lenoir, 75011 Paris, France ou par mail à revue.hst@inrs.fr