

Notes techniques

OPTIMISATION DE LA MÉTHODE DE MESURE DES ENDOTOXINES DANS L'AIR DES LIEUX DE TRAVAIL

Cet article vise à présenter une nouvelle méthode mise au point dans le but d'améliorer la caractérisation des expositions aux endotoxines présentes dans des atmosphères de travail contenant certains micro-organismes (bactéries à Gram négatif). Ces travaux sont mis à disposition des personnes en charge de la surveillance des expositions professionnelles, *via* la publication de la méthode Métropol M-454, destinée à remplacer l'ancienne méthode M-154.

PAULINE LOISON,
LISE ALONSO,
CATHERINE COULAIS,
XAVIER SIMON
INRS,
département
Métrologie
des polluants

POUR EN SAVOIR +

• La nouvelle méthode Métropol M-454 est accessible sur le site de l'INRS : https://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/html?ref=INRS=METROPOL_454

Contexte

Les endotoxines sont des lipopolysaccharides présents dans la membrane externe de la plupart des bactéries à Gram négatif. Ces bactéries possèdent une paroi de peptidoglycane fine et une membrane externe (contenant les lipopolysaccharides), au contraire des bactéries à Gram positif, qui possèdent uniquement une paroi de peptidoglycane épaisse. Ce sont des molécules complexes, constituées d'une partie polysaccharidique et d'une partie lipidique pouvant être libérées lors de la croissance ou de la lyse (destruction) des cellules. Le terme « endotoxines » caractérise des fragments de membrane, c'est-à-dire des molécules de lipopolysaccharides attachées à d'autres constituants des membranes bactériennes. En milieu professionnel, les endotoxines peuvent être mises en suspension dans l'air lors d'opérations qui vont générer des aérosols à partir de réservoirs solides ou liquides, contenant ces micro-organismes (eaux usées, déchets, compost, boues, etc.).

Elles peuvent ainsi être présentes dans les atmosphères de travail de secteurs aussi divers que la collecte et la valorisation des déchets, la transformation du bois, l'élevage, l'agroalimentaire ou encore, le traitement des eaux usées. Si le nombre de personnes exposées aux endotoxines pendant leur travail n'est pas précisément connu, la diversité des secteurs étudiés et les données de l'enquête Sumer de 2017 [1] permettent de supposer que plusieurs centaines de milliers de travailleurs sont concernés.

Les concentrations d'endotoxines mesurées dans les atmosphères professionnelles ne sont pas

précisément corrélées aux symptômes observés, si bien que la relation dose-effet entre l'exposition et les éventuelles affections qui pourraient en résulter n'est pas établie. Cependant, il semble que, pour la majorité des personnes exposées, plus les concentrations ou la fréquence d'exposition sont élevées, plus les risques d'altération de la santé sont importants [2]. L'inhalation des endotoxines par les travailleurs est associée à des effets délétères sur la santé, tels que des manifestations bronchiques aiguës, des altérations chroniques de la fonction respiratoire qui peuvent devenir irréversibles au fil du temps (en particulier, la bronchopneumopathie chronique obstructive : BPCO), mais aussi des symptômes plus généraux tels que fièvre et toux [3]. Une revue récente de la littérature évoque cependant les effets possibles d'une exposition aux endotoxines, même à faible concentration (< 100 unités endotoxines [UE].m⁻³), bien que des études supplémentaires apparaissent nécessaires pour renforcer ces conclusions [4]. La mesure des endotoxines aux postes de travail apparaît donc essentielle pour estimer les expositions des travailleurs et pour mettre en place des mesures de prévention adaptées, en vue de réduire les niveaux de concentration dans les atmosphères professionnelles. L'utilisation de l'ancienne méthode M-154, par les Carsat et l'INRS, a déjà permis de « démocratiser » le prélèvement des bioaérosols, d'évaluer les expositions aux endotoxines et d'établir, en 2015, des valeurs guides de 200 et 1 000 UE.m⁻³, à partir d'une analyse pragmatique des concentrations en endotoxines mesurées dans l'air des lieux de travail.



RÉSUMÉ

Les endotoxines sont des constituants de la membrane externe de certaines bactéries qui peuvent être mises en suspension dans l'air, au cours de certaines tâches professionnelles exposant plusieurs centaines de milliers de salariés. L'ancienne méthode de mesure M-154 datant de 2005 nécessitait une mise à jour. Une approche complémentaire de laboratoire et de terrain a permis

de valider une nouvelle méthode optimisée et simplifiée. Elle prend en compte l'ensemble des endotoxines captées en réalisant une extraction efficace directement dans la cassette et rend les prélèvements représentatifs de la fraction inhalable. Les endotoxines peuvent désormais être analysées dans les huit jours après le prélèvement au lieu de 24 heures précédemment,

avec une conservation et un transport des cassettes à température ambiante non contraignants. Ces améliorations rendent plus robustes les mesures de concentration en endotoxines, et devraient participer à une appropriation plus aisée de la méthode Métropol M-454 (destinée à remplacer l'ancienne méthode M-154) par ses utilisateurs.

OPTIMISATION OF THE MEASUREMENT METHOD FOR AIRBORNE ENDOTOXINS IN WORKPLACE ATMOSPHERES

Endotoxins are components of the outer membrane of some bacteria that can become airborne during certain work activities, thus exposing hundreds of thousands of employees. The old M-154 measurement method dating back to 2005 needed an update. A complementary laboratory and field approach was used to

validate a new optimised and simplified method. It takes into account all of the endotoxins captured by efficient extraction directly inside the cassette and makes samples representative of the inhalable fraction. Endotoxins can now be analysed within eight days after sampling compared to 24 hours

previously, with more flexible room temperature storage and transport of cassettes. These improvements make endotoxin concentration measurements more robust, and provide for easier adoption of the Métropol M-454 (aimed at replacing the old M-154 method) by its users.

Ces valeurs ont permis d'harmoniser l'interprétation des concentrations mesurées en milieu professionnel, ainsi que la prise de décision concernant la mise en place de mesures de prévention adaptées [2]. L'évolution des connaissances depuis l'élaboration de la méthode M-154, en 2005, les constats d'utilisateurs quant à la gestion complexe des échantillons (analyses à réaliser dans les 24 heures) et les contradictions observées dans la littérature scientifique (modalités et durée de conservation, protocole d'extraction, etc.) ont conduit l'INRS à engager de nouveaux travaux de recherche, en vue de proposer une nouvelle méthode simplifiée, optimisée et pour laquelle des données de validation seront produites.

Rappel des caractéristiques de l'ancienne méthode M-154

Plusieurs méthodes de mesure des bioaérosols ont été développées par l'INRS, notamment pour mesurer les micro-organismes cultivables, les endotoxines et les mycotoxines [5].

L'ancienne méthode M-154 consistait à doser les endotoxines d'un échantillon prélevé à l'aide d'une pompe ayant un débit de 2 L.min⁻¹, reliée à une cassette 3 pièces fermée de 37 mm. Le prélèvement était réalisé exclusivement sur un filtre en fibres de verre (FV) apyrogène (c'est-à-dire exempt de substances pyrogènes, et notamment d'endotoxines) pendant un maximum de 8 heures. Les échantillons étaient

ensuite transportés le plus rapidement possible au laboratoire à température ambiante ou dans une enceinte réfrigérée à 4 °C, pour être analysés dans les 24 heures suivant la fin du prélèvement. Le filtre en fibres de verre était retiré de la cassette, placé dans un tube contenant de l'eau apyrogène et agité à forte vitesse afin d'extraire les endotoxines. L'extrait était ensuite centrifugé avant le dosage, effectué à l'aide d'une méthode spectrophotométrique cinétique avec le réactif LAL (lysate d'amœbocyte de limule).

Cette méthode comportait certaines limites. Premièrement, seul le filtre de collecte était extrait et analysé ; les endotoxines déposées sur les parois de la cassette lors du prélèvement, du transport ou de la manipulation des échantillons n'étaient donc pas prises en compte dans le processus analytique. Depuis 2005, l'existence de tels dépôts a été mise en évidence [6-8] et est désormais clairement mentionnée dans une annexe informative de la norme NF EN 14031 [9]. Cela conduisait donc à sous-estimer systématiquement, d'une manière aléatoire et potentiellement importante, les niveaux de concentrations mesurés dans l'air des lieux de travail.

Deuxièmement, l'analyse du filtre seul imposait des étapes supplémentaires d'ouverture de la cassette, de récupération du filtre et de centrifugation des extraits. Par ailleurs, seul le filtre en fibres de verre était préconisé, sans possibilité pour l'utilisateur d'employer une autre nature de filtre.

Troisièmement, en l'absence de données concernant les conditions acceptables de transport et de conservation des échantillons destinés à l'analyse des endotoxines, ils étaient habituellement transportés le plus rapidement possible au laboratoire à température ambiante ou dans une enceinte réfrigérée à 4 °C pour être analysés dans les 24 heures suivant la fin du prélèvement. Ce manque de latitude dans la conservation des échantillons impliquait de réaliser les dosages le jour même ou le lendemain du prélèvement et restreignait, de ce fait, le nombre de prélèvements qui pouvaient être réalisés sur le terrain, notamment ceux destinés à l'analyse des micro-organismes cultivables.

Description des travaux menés

L'étude conduite par l'INRS s'est appuyée sur la complémentarité entre des essais réalisés au laboratoire et en atmosphères professionnelles.

En laboratoire

Un bioaérosol a été produit de manière expérimentale (Cf. Figure 1) à partir de trois bactéries à Gram négatif modèles (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens* et *Pseudomonas aeruginosa*). Des générations à différents niveaux de concentrations d'endotoxines (20 à > 1000 UE.m⁻³) ont permis d'échantillonner des cassettes fermées, en vue de comparer plusieurs natures de supports de collecte. Les concentrations d'endotoxines mesurées avec des membranes en polycarbonate (PC) et en Teflon (PTFE) étaient comparables à celles obtenues avec le filtre FV préconisé dans la méthode M-154. La possibilité de choisir entre plusieurs types de filtres procure ainsi plus de souplesse aux utilisateurs. Les membranes PC et PTFE sont naturellement apyrogènes ; cependant, elles nécessitent impérativement d'être supportées par un filtre en fibres de verre dépyrogénéisé (rendu apyrogène), pour éviter leur déformation lors du prélèvement et assurer l'étanchéité de la cassette. Trois paramètres de la phase de récupération des endotoxines prélevées ont été investigués avec les trois types de support de collecte : l'extraction directe dans la cassette, la durée d'agitation et le volume de l'eau apyrogène utilisée comme solution d'extraction. À l'instar de résultats précédemment obtenus dans des plateformes de compostage [7] ou en laboratoire [8], les essais d'extraction directe dans la cassette ont montré qu'une proportion, parfois importante, des endotoxines était déposée sur la paroi des cassettes. Il apparaît nécessaire de prendre en compte ces dépôts pour l'évaluation de la concentration en endotoxines représentative de la fraction inhalable dans l'atmosphère des lieux de travail [10-11]. Une durée d'agitation réduite à 20 minutes (au lieu de 60) n'a eu aucune influence sur l'efficacité d'extraction des endotoxines, quel que soit le support de prélèvement utilisé, ce qui permet un



© INRS

gain de temps conséquent. La diminution de moitié du volume de solution d'extraction (5 mL au lieu de 10 mL) est également sans effet avec les membranes en PC et en PTFE. En revanche, avec le filtre en fibres de verre présentant une structure fibreuse, cette diminution de volume a permis d'augmenter jusqu'à 10 fois le taux de récupération des endotoxines. Ce résultat s'explique probablement par l'énergie d'agitation plus forte engendrée par un volume d'éluant plus petit au sein du volume interne de la cassette de ≈15 cm³. Dans le cas de filtres fibreux comme le filtre FV, les forces d'agitation nécessaires à l'extraction des endotoxines collectées sont probablement plus élevées, comparées à celles devant être employées avec des membranes de surfaces uniformes (PTFE ou PC).

L'étude de la conservation des cassettes prélevées a été réalisée à trois températures différentes : ambiante (environ 20 °C), 4 °C et -20 °C. Quels que soient la température de conservation, la nature

↑ FIGURE 1
Banc d'essai
utilisé pour
valider
les paramètres
de la nouvelle
méthode M-454.

Techniciens
en intervention
sur une station
d'épuration
d'eaux usées.



© Fabrice Dimer pour l'INRS/2023

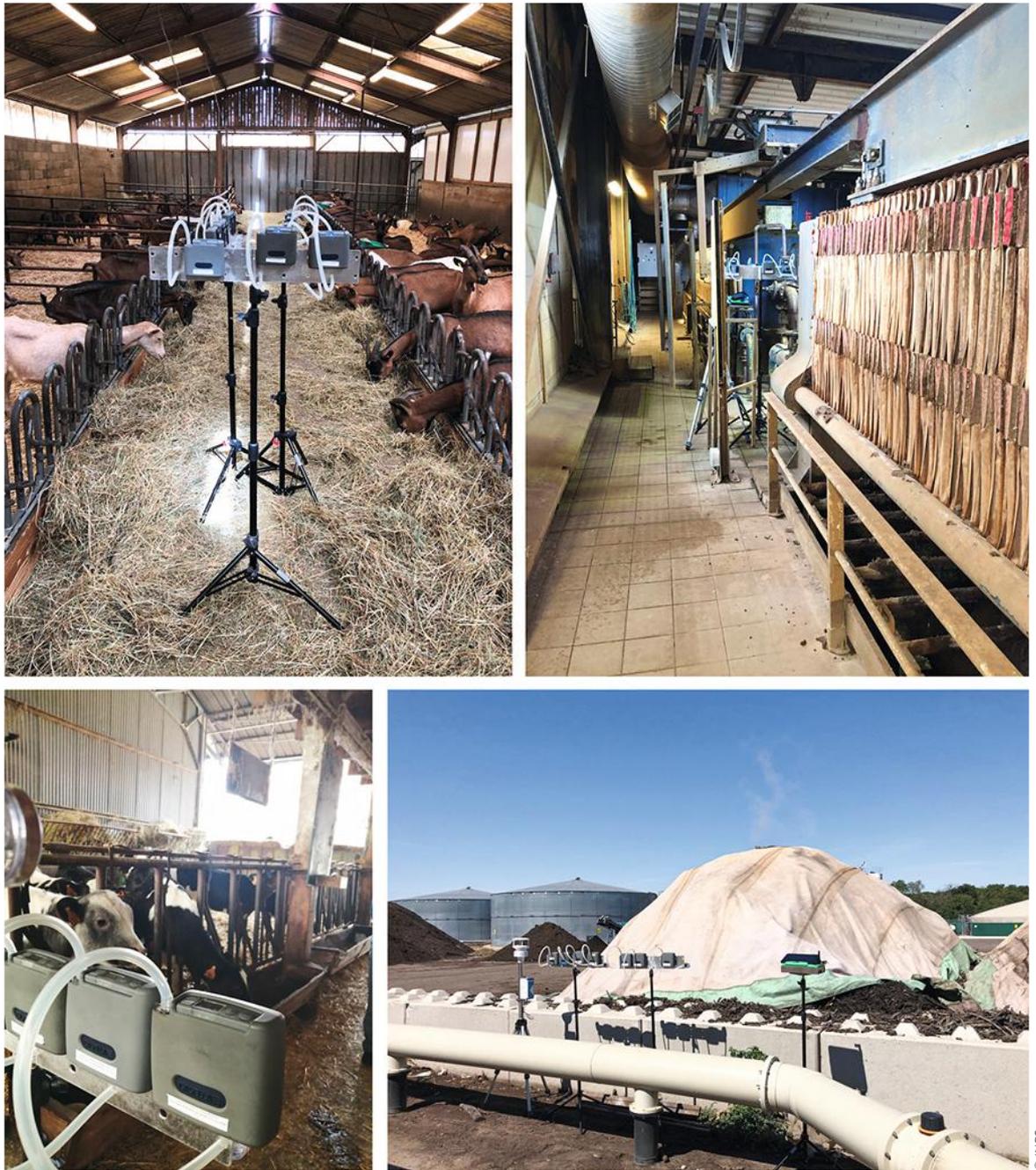


FIGURE 2 → Prélèvements d'endotoxines dans différentes atmosphères professionnelles (chèvrerie, station d'épuration, étable de vaches et plateforme de compostage) pour la validation des paramètres de la méthode M-454.

du filtre et le niveau de concentration ciblé, une conservation jusqu'à huit jours après le prélèvement ne modifiait pas les concentrations d'endotoxines mesurées.

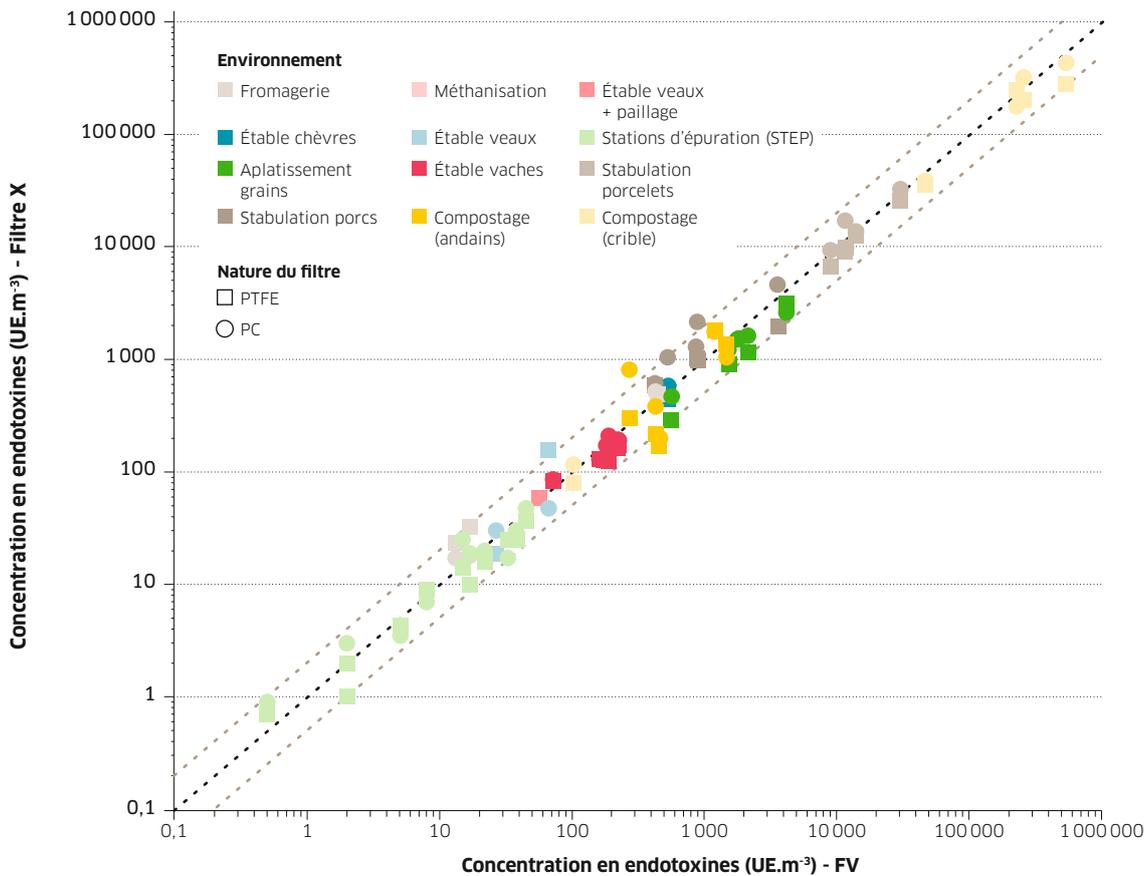
En milieu professionnel

Des essais de terrain ont ensuite été menés dans 11 environnements professionnels différents en concentration et en composition microbienne (stables de chèvres, porcs, vaches ; station d'épuration [STEP] ; plateforme de compostage, etc.), comme illustré sur la *Figure 2*.

Toutes les extractions d'endotoxines ont été réalisées directement dans la cassette avec un volume de

solution d'extraction de 5 mL et une durée d'agitation de 20 minutes. Comme pour les essais de laboratoire, les supports de prélèvement en FV, PC et PTFE se sont révélés équivalents pour les environnements investigués (Cf. *Figure 3*) et ont permis de mesurer des concentrations d'endotoxines sur une gamme très étendue, allant de 0,5 à 540 000 UE.m⁻³.

Les expérimentations en laboratoire n'ayant montré aucune différence de concentration liée à la température de conservation, les prélèvements de terrain ont été conservés à température ambiante. Cette température a l'avantage de faciliter le transport et la conservation des échantillons. Il est apparu qu'une conservation jusqu'à huit jours était sans influence



← FIGURE 3
Exemple de résultats de mesures pour la validation de la méthode M-454. Influence du type de filtre sur la concentration en endotoxines, en comparaison du filtre FV dans différents secteurs d'activités. Les droites en pointillés correspondent à $\pm 50\%$.

sur la concentration d'endotoxines mesurée, quel que soit le secteur d'activité étudié. Cette possibilité de conservation des échantillons au-delà de 24 heures avant dosage laisse davantage de latitude à l'analyste et autorise un plus grand nombre de prélèvements sur le terrain.

Données de validation

Trois paramètres ont été étudiés pour valider la méthode analytique : l'incertitude globale, la répétabilité du dosage et la limite de quantification.

- **L'incertitude globale** associée à l'ensemble de la méthode de mesure (prélèvement et analyse) a été évaluée pour chaque type de filtre (FV, PTFE et PC) à différentes concentrations en endotoxines obtenues à l'aide d'un bioaérosol expérimental similaire à celui utilisé pour les essais de laboratoire. Le coefficient de variation (CV) a été calculé à partir de l'analyse des résultats de dosage issus de 10 cassettes de prélèvements différentes. Pour l'ensemble des essais et quelle que soit la nature du filtre, les CV obtenus étaient tous compris entre 10 et 20 %.
- **La répétabilité de la méthode** a été évaluée en calculant le CV obtenu en dosant 10 fois le même éluat issu d'une cassette, prélevée également à partir d'un bioaérosol expérimental pour les trois types de filtres. Les valeurs du coefficient de variation sont

respectivement de 7 %, 13 % et 8 % pour les filtres FV, PTFE et PC.

- **La limite de quantification (LQ)** de l'ensemble de la méthode a été calculée à partir de la concentration minimale analytique de la méthode utilisant le réactif LAL, indiquée à $0,005 \text{ UE.mL}^{-1}$ par le fournisseur des réactifs. Ainsi, pour un prélèvement de 4 heures à 2 L.min^{-1} , la LQ est de $0,05 \text{ UE.m}^{-3}$.

Conclusions

Les résultats de ces travaux permettent de transférer une méthode optimisée, simplifiée et validée pour le dosage des endotoxines émises dans les atmosphères professionnelles. L'ancienne méthode Métropol M-154 est donc désormais remplacée par la méthode Métropol M-454, dont les principales étapes et modalités sont présentées sur la Figure 4. Cette méthode suit en grande partie les recommandations de la norme NF EN 14031 [9], révisée en 2021. Ses apports principaux portent sur les éléments suivants :

- L'utilisateur dispose d'une plus grande flexibilité concernant le filtre à employer : PC ou PTFE en plus du filtre FV, qui était le seul à être proposé précédemment. Pour les filtres de type membrane (PC et PTFE), un filtre en FV dépyrogénéisé doit être utilisé en tant que support. Il est également à noter que l'ensemble des expérimentations (en laboratoire



	<p style="text-align: center;">PRÉLÈVEMENT</p> <p>Dispositif : cassette 3 pièces 37 mm – filtre FV, PC ou PTFE</p> <p>Conditions : débit de 2 L.min⁻¹ max 8 h</p>
	<p style="text-align: center;">TRANSPORT ET CONSERVATION (dans la cassette)</p> <p style="text-align: center;">Durée : ≤ 8 jours</p> <p style="text-align: center;">Température : 20°C ± 5°C (éviter les T° extrêmes)</p>
	<p style="text-align: center;">ANALYSE</p> <p style="text-align: center;">EXTRACTION : dans la cassette.</p> <p>Modalités d'extraction : Eau apyrogène, 5 mL, 20 min</p> <p>Conservation des extraits : non précisée</p> <p style="text-align: center;">DOSAGE</p> <p>Méthode : cinétique et chromogénique LAL.</p>

↑ **FIGURE 4**
Méthode de mesure des endotoxines optimisée (Métropol M-454). Les principales modifications par rapport à la méthode M-154 sont indiquées en vert.

et sur le terrain) a permis de vérifier l'absence de contamination (< à la LQ de la méthode d'analyse) des filtres PC et PTFE.

- La cassette fermée à un débit de 2 L.min⁻¹, bien connue des préleveurs/hygiénistes partout en France, est maintenue et confortée comme dispositif de prélèvement. Des mesures, aussi bien en individuel qu'à poste fixe, sont donc réalisables et permettent ainsi de mettre en œuvre des stratégies de mesures variées permettant de répondre à de nombreux objectifs de prévention.
- La gestion des échantillons est simplifiée, car ils peuvent désormais être analysés jusqu'à huit jours après le prélèvement, avec un transport et une

conservation non contraignants des cassettes à température ambiante (environ 20 °C). Les préleveurs peuvent ainsi s'autoriser, quand cela est opportun pour le diagnostic, à collecter un plus grand nombre d'échantillons.

- Les étapes analytiques ont été simplifiées : l'extraction est désormais réalisée directement dans la cassette (avec un volume d'eau apyrogène de 5 mL et pendant seulement 20 minutes), ce qui permet de s'affranchir des étapes de retrait du filtre et de centrifugation des extraits. Le nouveau protocole d'extraction permet, de plus, de prendre en compte l'ensemble des particules captées dans la cassette fermée. Il répond ainsi aux préconisations de mise en œuvre de la cassette fermée [10-11] et permet d'assurer un prélèvement pleinement représentatif de la fraction inhalable.
- Les données de validation permettant d'estimer l'incertitude globale associée à l'ensemble de la méthode de mesure (prélèvement et analyse) et l'incertitude liée à la seule analyse, pour chaque type de filtre, ont été produites.

Ces évolutions renforcent la fiabilité des mesures de concentrations en endotoxines et participeront à une appropriation plus aisée de cette méthode de mesure par un grand nombre d'utilisateurs, en facilitant les modalités de transport et de conservation qui pouvaient précédemment être perçues comme des contraintes. Ces nouvelles modalités permettent également une meilleure gestion des échantillons de bioaérosols par l'analyste, qui pourra prendre en charge rapidement les analyses sensibles qui ne peuvent pas attendre (micro-organismes cultivables, par exemple) et analyser ultérieurement les échantillons d'endotoxines. ●

BIBLIOGRAPHIE

[1] MATINET B., ROSANKIS E. – Les expositions aux risques professionnels dans la fonction publique et le secteur privé en 2017. Enquête Sumer 2017. *Synthèse Stat'*, 2019, pp. 31-33.

[2] BALTU I., BERTRAND N. ET AL. – Valeurs guides endotoxines. Interprétation des résultats de métrologie des bioaérosols. *Hygiène & sécurité du travail*, 2015, 239, NT 25, pp. 46-50. Accessible sur : <https://www.inrs.fr/media.html?refINRS=NT%2025>

[3] INRS – *Endotoxines en milieu de travail*. ED 4412, 2018. Accessible sur : <https://www.inrs.fr/media.html?refINRS=ED%204412>

[4] FAROKHI A., HEEDERIK D. ET AL. – Respiratory health effects of exposure to low levels of airborne endotoxin: a systematic review. *Environ Health*, 2018, 17 (1), p. 14.

[5] DUQUENNE P., BURZONI S., SIMON X. – Les méthodes disponibles pour la mesure des bioaérosols aux postes de travail. In : Dossier – Risques biologiques au travail. *Hygiène & sécurité du travail*, 2018, DO 22, pp. 38-42. Accessible sur : <https://www.inrs.fr/media.html?refINRS=DO%2022>

[6] SIMON X., DUQUENNE P. ET AL. – Aerosolisation of *Escherichia coli* and associated endotoxin using an improved bubbling bioaerosol generator. *Journal of aerosol science*, 2011, 42 (8), pp. 517-531.

[7] DUQUENNE P., SIMON X. ET AL. – Endotoxin deposits on the inner surfaces of closed-face cassettes during bioaerosol sampling: a field investigation at composting facilities. *Annals of occupational hygiene*, 2015, 59 (4), pp. 504-513.

[8] DUQUENNE P., COULAIS C., BAU S., SIMON X. – Performances of the BC-112 NIOSH cyclone for the measurement of endotoxins in bioaerosols: a study in laboratory conditions. *Journal of aerosol science*, 2018, 116, pp. 92-105.

[9] NORME NF EN 14031 – *Exposition sur les lieux de travail – Mesure quantitative des endotoxines aéroportées*. Afnor, 2021.

[10] SIMON X., WITSCHGER O. – Mesure de l'exposition aux aérosols en fraction inhalable : avantages et limites de la « cassette fermée ». *Hygiène & sécurité du travail*, 2019, 257, NT 78, pp. 58-64. Accessible sur : <https://www.inrs.fr/media.html?refINRS=NT%2078>

[11] NORME NF X 43-257 – *Air des lieux de travail. Qualité de l'air – Prélèvement d'aérosol à l'aide d'une cassette (orifice 4 mm)*. Afnor, 2016.