

→ G. Greff-Mirquet,  
Département Métrologie  
des polluants, Centre de Lorraine,  
INRS, Vandœuvre-lès-Nancy

## SAMPLING AND ANALYSIS OF AIRBORNE ENDOTOXINS. A REVIEW OF THE LITERATURE

The health risks linked to exposure to airborne bacteria and moulds, both in an occupational and domestic setting, are known. However, although numerous studies have attempted to estimate the level of exposure to endotoxins in various sectors of activity, the dose-effect relationship could not be established. Moreover, the results of the tests carried out by different laboratories, including those undertaken in the same sectors of activity, are poorly correlated. The diversity of the techniques employed according to sector of activity, both in terms of the methods of sampling and analysing endotoxins, explain this dispersion of results to a great extent. This literature review shows that different practices coexist at every stage of sampling and analysing airborne endotoxins, even if the LAL (Limulus Amebocyte Lysate) method of quantitative analysis largely predominates.

A number of recent studies have attempted to impose standard conditions of sampling, sample processing, storage and quantitative analysis. In this respect, a recent study (1998) showed that adding 0.05 % Tween 20 to apyrogen water increases endotoxin extraction efficiency without modifying the reaction kinetics of the LAL assay. Two older studies (1990 and 1995) obtained better extraction efficiency rates for samples collected on fibreglass filters than on other filters such as polycarbonate, cellulose acetate and PVC. These efficiencies depend also on the nature of the aerosol in question.

A ratio of 1 to 17 was calculated between two procedures, one using cellulose ester filters and apyrogen water for extraction and the other fibreglass filters and apyrogen water with 0.05 % Tween 20 added. In addition, these studies showed that the endotoxins extracted in apyrogen water with Tween added can only be stored at temperatures below -20 °C and cannot withstand being refrozen.

The adoption of a future European standard should bring to an end all these individual laboratory practices and impose stabilised sampling and quantitative analytical practices allowing inter-laboratory comparative tests. Hence, a better assessment of the real level of exposure to endotoxins in all sectors of activity should help to establish a more accurate dose-health effect relationship.

● endotoxin ● bioaerosol ● sampling  
● analysis ● technique ● LAL

# Échantillonnage et analyse des endotoxines dans l'air

## Étude bibliographique

Les risques pour la santé liés à l'exposition aux bactéries et aux moisissures aéroportées, tant en milieu professionnel que dans l'habitat, sont connus. Cependant, bien que de nombreuses études se soient attachées à estimer le niveau d'exposition en endotoxines dans divers secteurs d'activité, la relation dose-effet n'a pas pu être établie. De plus, les résultats des essais menés par des laboratoires différents, y compris dans les mêmes secteurs d'activité, sont mal corrélés. La diversité des techniques mises en œuvre selon les secteurs d'activité, à la fois pour les méthodes d'échantillonnage et celles d'analyse des endotoxines, expliquent une grande part de cette dispersion des résultats.

Cette étude bibliographique montre qu'à toutes les étapes d'échantillonnage et d'analyse des endotoxines dans l'air, différentes pratiques coexistent, même si la méthode de dosage par le LAL (lysate d'améboocytes de limule) prédomine largement.

Un certain nombre d'études récentes tentent d'imposer des conditions standard d'échantillonnage, de traitement des échantillons, de conservation et de dosage. C'est ainsi qu'une étude récente (1998) montre que l'ajout de Tween 20 (agent dispersant) à 0,05 % dans l'eau apyrogène augmente l'efficacité d'extraction des endotoxines sans modifier la cinétique de réaction des essais au test LAL. Deux études plus anciennes (1990 et 1995) obtiennent des rendements d'efficacité d'extraction meilleurs pour les prélèvements effectués sur filtre en fibres de verre que sur d'autres filtres tels que polycarbonate, acétate de cellulose et PVC. Ces rendements dépendent aussi de la nature de l'aérosol considéré.

Un rapport de 1 à 17 a pu être calculé entre deux procédures utilisant d'une part, des filtres en ester de cellulose et de l'eau apyrogène pour l'extraction et d'autre part, des filtres en fibre de verre et de l'eau apyrogène additionnée de 0,05 % de Tween 20.

Par ailleurs, ces études démontrent également que les endotoxines extraites dans l'eau apyrogène additionnée de Tween ne se conservent qu'à des températures inférieures à -20 °C et ne supportent aucune recongélation.

L'adoption d'une future norme européenne devrait mettre un terme à toutes ces pratiques individuelles des laboratoires et imposer des conditions d'échantillonnage et de dosages stabilisées permettant des essais comparatifs interlaboratoires. Ainsi, une meilleure estimation du niveau réel d'exposition aux endotoxines dans tous les secteurs d'activité devrait aider à établir une relation dose-effet sur la santé plus précise.

● endotoxine ● bioaérosol ● échantillonnage ● analyse ● technique ● LAL

Les micro-organismes, omniprésents dans l'environnement, peuvent être retrouvés à des concentrations élevées dans des locaux d'habitation humides ou insalubres, ainsi que dans les ambiances de travail où des produits contaminés sont manipulés ou transformés.

Les personnes qui vivent ou travaillent dans ces atmosphères sont exposées à ces micro-organismes, principalement par

inhalation. Cette exposition est reconnue comme cause possible de troubles respiratoires chroniques ou aigus, tels que asthme, rhinites, bronchites, pneumonie... Cependant, toutes les pathologies ne s'expliquent pas par l'infectiosité et la virulence des agents microbiens de la poussière. Les symptômes systémiques et bronchiques décrits - fièvre, irritation des voies aériennes, toux, oppression thoracique et difficultés respiratoires - restent constants, bien que les sources de poussières soient

multiples et parfois spécifiques (Rylander et coll., 1986, 1987, 1990, 1992).

Le mécanisme physiopathologique incriminé n'est pas connu avec précision mais fait probablement intervenir des médiateurs de l'inflammation ou de l'allergie.

Bien qu'évoquée depuis longtemps, c'est en 1942 que Neal et coll. (1942) ont attribué pour la première fois aux bactéries Gram(-) présentes dans l'air une responsabilité dans l'apparition de ces symptômes.

En 1961 déjà, Pernis et coll. (1961) avançaient le fait que les endotoxines étaient responsables des troubles observés chez le personnel exposé aux poussières de coton, symptômes qui disparaissaient rapidement après une éviction d'un ou deux jours, pour réapparaître dès la reprise du travail.

Depuis quelques années, des travaux ont été menés afin d'évaluer les risques liés à l'exposition aux poussières organiques dans plusieurs secteurs d'activité professionnelle (cf. annexe I) dans l'espoir de corréler les symptômes respiratoires allergiques et non-allergiques et le niveau d'exposition. Ces études ont été réalisées en milieu agricole (poulaillers, étables, porcheries, locaux où sont manipulés le grain et la paille...), dans l'industrie du bois, des textiles, dans le secteur du traitement des déchets et des eaux usées... L'exposition aux bactéries et aux composants de la paroi des cellules bactériennes, en particulier aux endotoxines, a été souvent incriminée dans tous ces secteurs

dans le déclenchement des affections respiratoires. Aujourd'hui encore, le rôle des différents composants microbiens sur la santé respiratoire n'est pas encore clairement établi. Il a été démontré expérimentalement chez l'homme et chez l'animal (Michel et coll., 1989, 1997 et Rylander et coll., 1993) que les endotoxines sont des agents pro-inflammatoires. Mais les études épidémiologiques n'ont jusqu'à présent pas permis de démontrer, de manière formelle, leur responsabilité exclusive dans l'apparition des maladies non-infectieuses, chez les travailleurs évoluant dans des ambiances empoussiérées. Une des limites de ces travaux réside dans la mesure des expositions ; seul un nombre limité de ces études fournit des données quantitatives.

L'objet de cette étude est de faire la synthèse des données bibliographiques relatives d'une part, aux méthodes de prélèvement des endotoxines dans l'air ambiant et d'autre part, à leur dosage.

Les conditions de collecte ainsi que le traitement et la conservation des échantillons prélevés représentent une partie importante de l'étude. Une seconde partie examine les différentes méthodes d'analyse et en particulier s'attache à étudier la méthode LAL, recommandée par le projet de norme européenne PrEN 14031 (1).

(1) prEN 14031 - Workplace atmosphere - Determination of airborne endotoxin. Final Draft for CEN Enquiry 2000-03-28. Bruxelles, CEN, 2000.

(\*) Les termes suivis d'un astérisque sont détaillés dans le glossaire ; cf. annexe II.

## 1. Structure

### 1.1. Structure chimique de la paroi des bactéries Gram(-)

Les endotoxines (\*) sont des éléments constitutifs de la paroi de toutes les bactéries Gram-négatif et de certaines algues bleues ou vertes (Lei et Morisson, 1988).

Cette paroi est constituée de trois couches (fig. 1) :

- une *membrane interne ou cytoplasmique* qui sert de barrière osmotique ;
- une *membrane intermédiaire*, à base de peptidoglycanes (fig. 2), qui maintient l'intégrité de la structure et la forme caractéristique de la bactérie ;
- une *membrane externe* contenant les lipopolysaccharides (LPS) (\*), identifiés dans toutes les bactéries Gram-négatif étudiées, responsable d'une partie de l'activité biologique.

Les termes « endotoxine » et « lipopolysaccharide » sont souvent indifféremment utilisés dans la littérature scientifique. Cependant, le terme « lipopolysaccharide » devrait être réservé pour désigner des substances chimiques pures, libres de tout autre composé chimique présent dans la membrane des bactéries Gram(-). Le terme « endotoxine » lui, devrait être réservé aux fragments de membrane des bactéries Gram(-) qui contiennent le lipopolysaccharide et les autres composés de la membrane cellulaire.

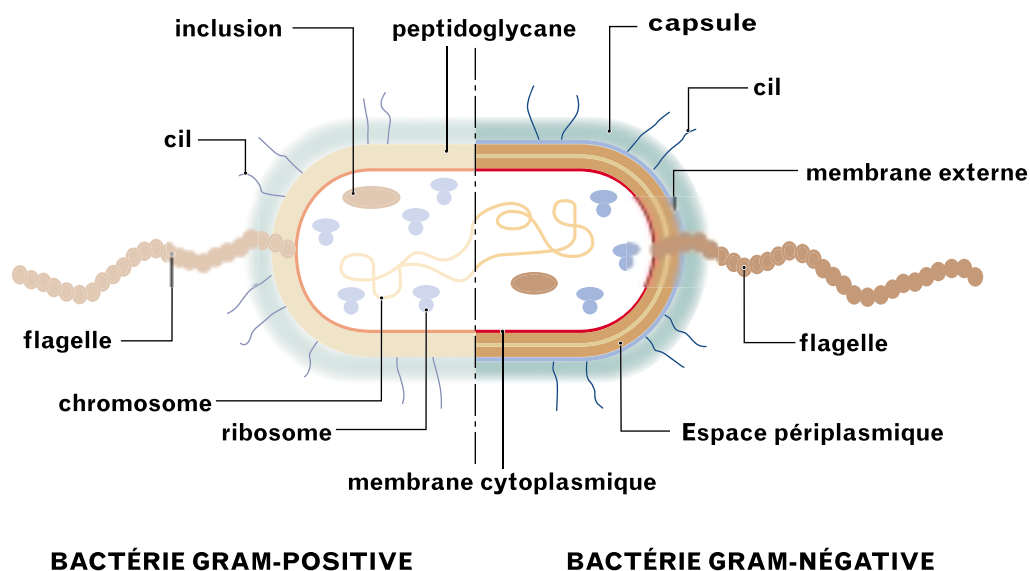


Fig. 1 : Comparaison des structures des cellules bactériennes Gram (+) et Gram (-)  
 - Comparison of gram positive and gram negative bacterial cell structures

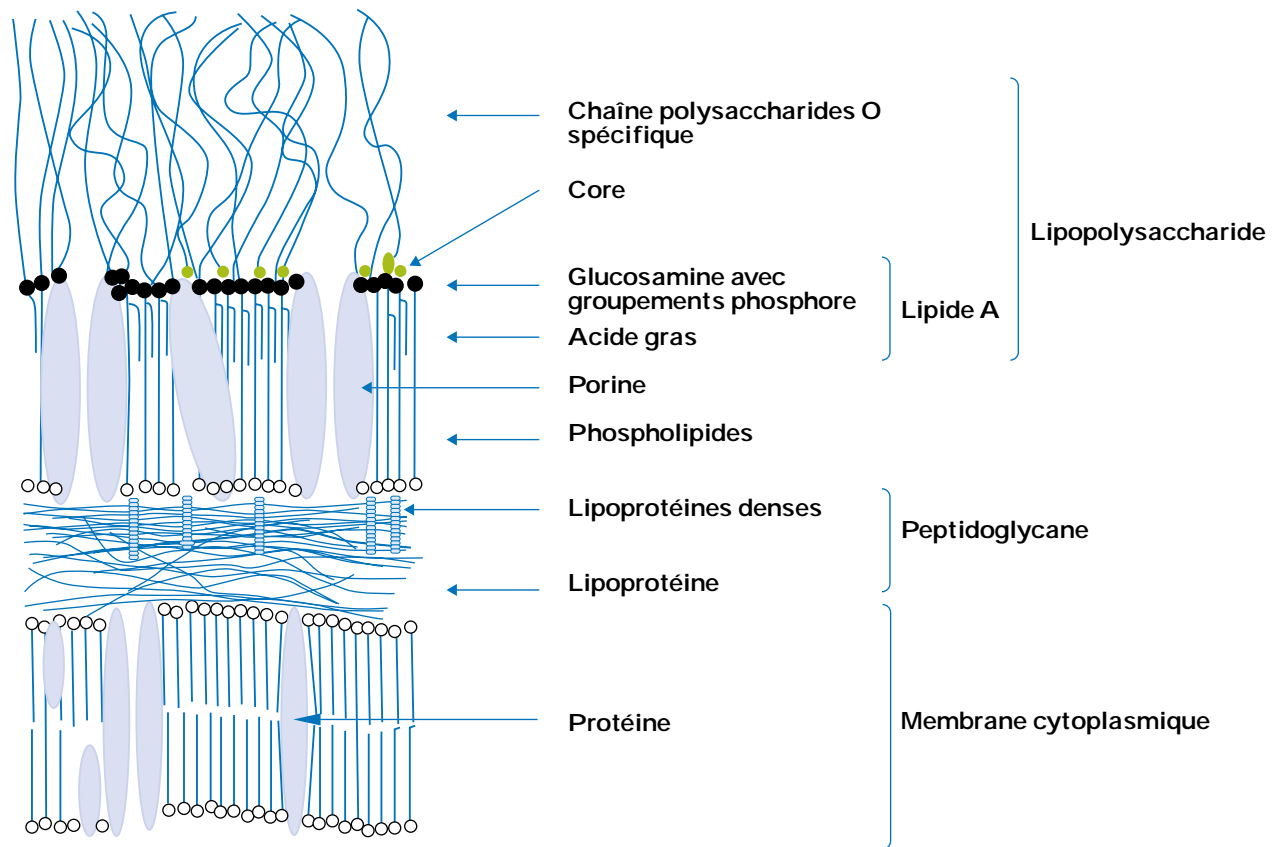


Fig. 2. La paroi des bactéries Gram(-) - *The wall of gram negative bacteria*

L'endotoxine est la forme trouvée usuellement dans la nature, bien que des lipopolysaccharides peuvent se trouver dans l'eau où se développent les bactéries Gram(-).

Une exception à cette règle est l'utilisation du terme « control standard endotoxin » (CSE) qui désigne le LPS chimiquement pur, utilisé comme étalon de référence dans la méthode LAL (\*).

## 1.2. Structure des endotoxines

Les endotoxines sont donc constituées d'un fragment de paroi de bactérie Gram(-) et du LPS. Le LPS n'est pas une molécule unique mais une famille de composés (Ulmer, 1997) ; chaque genre et chaque espèce de bactérie produit un LPS spécifique : les bactéries d'une même famille produisent des LPS de structures similaires, alors que les bactéries de familles différentes produisent des LPS différents.

(\*) Voir glossaire en annexe II.

Les LPS, parties biologiquement actives des endotoxines, sont eux-mêmes constitués de deux parties :

- une partie polysaccharidique (\*), fabriquée à partir d'un noyau oligosaccharidique, le « core » ou base, et d'une chaîne O spécifique ;
- une partie phospholipidique, le lipide A, siège de l'activité pro-inflammatoire (cf. § 1.2.3).

### 1.2.1. La chaîne O spécifique

Elle s'insère sur le « core » polysaccharidique ou base : cette chaîne O spécifique peut avoir une grande diversité de structure. Elle est composée « d'unités d'oligosaccharides » qui se répètent, chacune contenant 5 à 7 monosaccharides. Le nombre total d'unités d'oligosaccharides varie, selon l'espèce bactérienne, de 20 à 40. Des monosaccharides différents constituent les unités d'oligosaccharides des espèces différentes de bactéries Gram(-). De plus, la nature, la séquence, le type de liaison et le

groupe de fonction de substitution des monosaccharides varient avec chaque genre et chaque espèce de bactérie.

### 1.2.2. Le noyau d'oligosaccharide

Le noyau d'oligosaccharide est divisé en deux portions : le noyau interne, attaché au lipide A, en position 6 du *N*-acétylglucosamine, et le noyau externe qui est attaché à la chaîne polysaccharidique O spécifique. Les variations de structure du noyau polysaccharidique pour une même espèce bactérienne sont faibles (pour la famille des Enterobacteriaceae, seuls 5 types de noyaux sont connus).

Le noyau externe est fait de monosaccharides tels que D-glucose, D-galactose... On ne connaît pas d'autre rôle au noyau externe que de fournir un site de fixation à la chaîne O spécifique.

Le noyau interne pour toutes les bactéries de la famille des Enterobacteriaceae est fait de 2-céto-3-désoxyoctonate (KDO), molécule spécifique des LPS.

### 1.2.3. Le lipide A

Il est constitué d'un dimère de *N*-acétylglucosamine phosphorylé comprenant 6 ou 7 acides gras (le plus souvent 6). Tous les acides gras (\*) du lipide A sont saturés, certains sont liés directement au dimère, d'autres le sont par l'intermédiaire d'une fonction ester (fig. 3).

C'est par le lipide A que se fixe le LPS à la couche externe de la membrane cellulaire. Il constitue l'ultime spécificité des LPS car les molécules de lipide A sont différentes selon les espèces et à l'intérieur d'une même famille de bactéries.

La chaîne principale du lipide A des Enterobacteriaceae est le dissaccharide  $\beta$ -glycosaminyl-(1→6)- $\alpha$ -glucosamine (GlcNII). Ce dissaccharide phosphorylé en 1 et 4' n'a été identifié que dans le lipide A. Le noyau interne se fixe au groupement hydroxyle du GlcNII en 6' (fig. 4).

Les LPS issus des bactéries peuvent contenir des impuretés et en particulier des cations Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, mais aussi des amines telles que éthanolamine, putrescine, spermine, spermidine. Le rôle de ces substances n'est pas connu.

#### La structure physique des LPS semble avoir un rôle déterminant dans l'activité biologique

Le lipide A est la portion toxique déterminante. L'activité des endotoxines *in vivo* est déterminée par une molécule contenant des résidus de 2-glucosamine substitués en  $\beta$ -(1-6) et dont la chaîne principa-

le comprend deux groupes phosphoryl. La localisation des acides gras, le nombre de chaînes acylées, la longueur des chaînes acylées et la configuration des acides gras ont une incidence certaine sur l'activité toxique des endotoxines. Les molécules pour lesquelles un seul de ces critères n'est pas respecté auront une activité nettement inférieure, voire nulle (Castellan, 1987). Le maximum d'activité correspond à un lipide A biphosphorylé, possédant six résidus acyl ; ce composé correspond au lipide A des *E. coli*. (Ulmer, 1997).

## 2. Techniques de prélèvement des endotoxines dans l'air

La grande disparité des niveaux de concentrations en endotoxines en milieu professionnel, mais surtout dans les mêmes secteurs d'activités, peut s'expliquer en partie par :

- la mise en œuvre de méthodes d'échantillonnage différentes,
- l'utilisation de supports de prélèvement divers,
- l'utilisation de protocoles d'extraction et de conservation multiples.

Or plusieurs facteurs doivent être considérés lors d'un prélèvement d'aérosols effectué dans le but de doser les endo-

toxines : choix de la technique, d'un support de prélèvement exempt d'endotoxines et non-inhibiteur, du temps de prélèvement, de la fraction d'aérosol la mieux adaptée, etc. Si plusieurs études se sont attachées à l'observation de l'influence de l'un de ces paramètres, aucune étude à ce jour n'a permis d'établir des procédures généralisées et stabilisées : différentes habitudes continuent de coexister.

### 2.1. Mode de prélèvement

Les premiers prélèvements d'aérosols effectués dans le but de doser les endotoxines ont été réalisés dans l'industrie du coton où la byssinose, maladie pulmonaire sévère, affectait de nombreux travailleurs exposés.

Ainsi, des échantillons de poussière de coton ont été prélevés à l'aide d'un éluutriateur vertical (Lynch, 1970) à un débit de prélèvement fixé à 7,4 l/min, pour sélectionner les particules dont le diamètre aérodynamique équivalent est inférieur à 15  $\mu$ m (Mc Farland, 1987).

En fait, certaines études montrent que l'éluutriateur vertical échantillonne les particules à un diamètre de coupure  $D_{50}$  proche de 10  $\mu$ m au niveau de probabilité cumulée de 50 %. Ainsi, Rubow et Marple (1983) ont trouvé un  $D_{50}$  égal à 10,5  $\mu$ m et Görner et coll. (1994) un  $D_{50}$  égal à 10,7  $\mu$ m. Il représente ainsi une bonne approximation de la fraction thoracique ou de la fraction PM10 (Jacobs, 1997 ; norme NF EN 481).

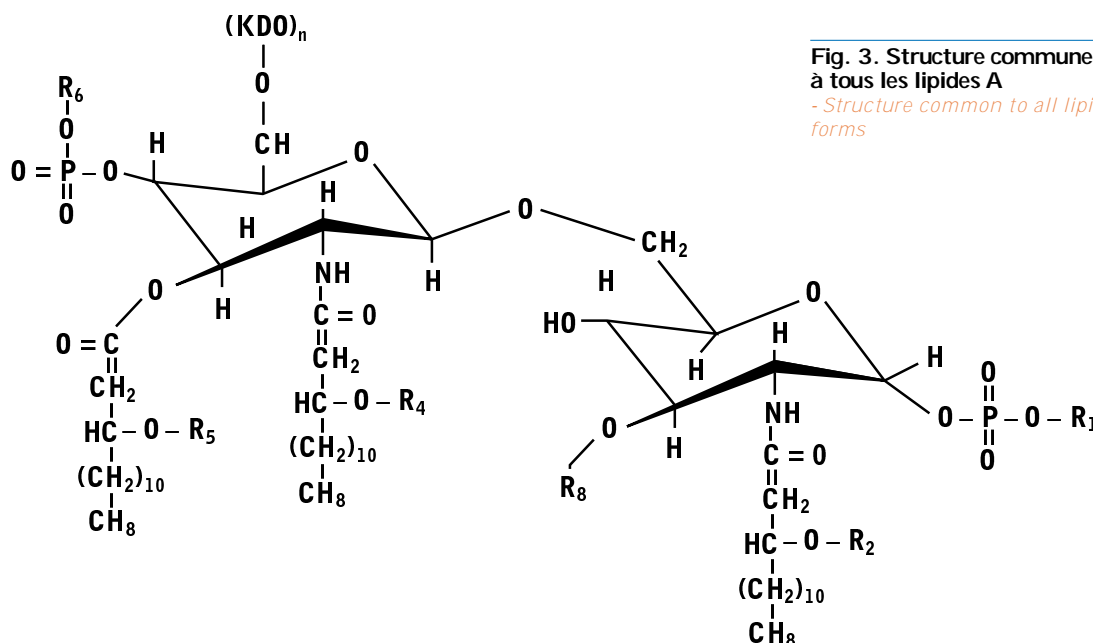


Fig. 3. Structure commune à tous les lipides A  
- Structure common to all lipid A forms

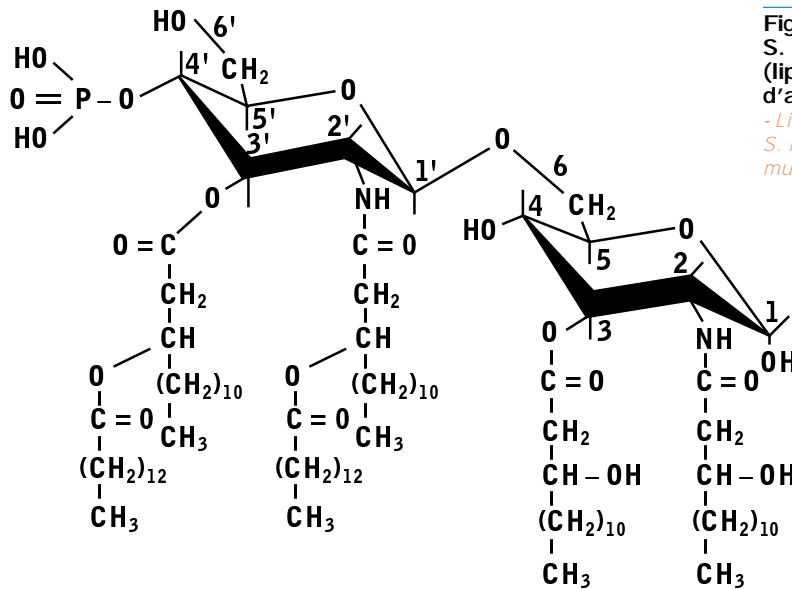


Fig. 4. Lipide A d'*E. coli*, *S. typhimurium*, *S. minnesota* (lipide A ayant le maximum d'activité)

- Lipid A of *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. minnesota* (lipid A with the maximum activity)

Les aérosols contenant les endotoxines ont des spectres larges de distribution en taille des particules (Jacobs, 1997). L'auteur affirme que c'est la partie fine de l'aérosol qui contient le plus d'endotoxines par unité de poids. Cependant, puisque l'activité biologique des endotoxines ne se limite pas à la région d'échange gazeux de l'appareil respiratoire, l'échantillon doit être représentatif de la totalité des endotoxines ayant pénétré dans l'appareil respiratoire.

Néanmoins, des techniques diverses ont été utilisées dans le but d'échantillonner les endotoxines : des sélecteurs de particules prélevant soit la fraction « totale », inhalable ou alvéolaire, et des impacteurs en cascade. Le plus souvent, la technique de prélèvement des endotoxines choisie est celle qui est d'usage dans tel ou tel secteur d'activité :

- Dans l'industrie du coton, on a pu montrer que la pathogénèse de la byssinose semblait justement liée à une fraction de poussières correspondant à la fraction thoracique (Rylander, 1990).

- Des prélèvements de la fraction inhalable sont préconisés dans l'industrie du bois où la plus grande proportion des particules a un diamètre aérodynamique supérieur à 10 µm et où par ailleurs on surveille la fréquence des cancers des voies aériennes supérieures.

- Des prélèvements de poussières « totales » sont effectués sur cassettes d'échantillonnage de 25 ou 37 mm (Millipore) ouvertes ou fermées, munies

de filtres, lors de l'exposition aux poussières de grain, etc. (Milton, 1990).

Des prélèvements effectués à l'aide d'impacteurs en cascade ont été exploités, afin de déterminer la concentration en endotoxines selon la répartition granulométrique des particules.

En se basant sur les données dose/réponse issues des études utilisant un éluuteur vertical et sur la connaissance du site d'activité biologique des endotoxines au niveau du poumon, certains auteurs recommandent de doser les endotoxines dans la fraction thoracique ou à la limite inhalable (Gordon et coll., 1992). Les prélèvements de la fraction alvéolaire ne permettent pas d'évaluer avec précision le rôle des endotoxines qui peuvent agir en dehors des zones d'échanges pulmonaires.

D'une manière générale, il convient d'effectuer des prélèvements d'ambiance pour identifier les sources et les zones d'exposition et des prélèvements individuels pour évaluer l'exposition individuelle, tous deux sur la fraction inhalable, comme cela est préconisé dans la norme EN en préparation (prEN 14031).

## 2.2. Durée du prélèvement

Le temps de prélèvement peut varier de 5 minutes à 8 heures selon qu'il s'agit d'un prélèvement individuel (débit faible de l'ordre du litre par minute) ou d'ambiance (débit élevé de plusieurs dizaines de litres

par minute). Les seuls inconvénients d'un prélèvement trop long, compte tenu de la possibilité de diluer les extraits pour l'analyse, restent une augmentation de la perte de charge lors du prélèvement et une perte éventuelle de matière.

## 2.3. Support de prélèvement

Plusieurs types de filtres ont été utilisés pour échantillonner les endotoxines : esters de cellulose, PVC (polychlorure de vinyle), fibres de verre, polytétrafluoroéthylène (Téflon®), polycarbonate. Aucune étude n'a pu mettre en évidence des différences d'efficacité de collecte de particules en fonction de la nature des filtres, pour des filtres de 25 ou 37 mm de diamètre avec des pores de diamètre moyen variant de 0,2 à 1,4 µm ; par contre, l'efficacité d'extraction semble liée à la fois au filtre utilisé et à l'aérosol ambiant.

En effet, Milton et coll. et Douwes et coll. (1995) ont montré que certains filtres « inactifs » ou adsorbent les endotoxines. Des filtres de PVC, Téflon®, Polyflon® et d'esters de cellulose ont été placés dans des solutions d'endotoxines de concentrations connues, dont l'extrait a été dosé après un délai de 60 minutes d'incubation sans agitation. Les rendements d'extraction varient de 11 à 42 %. Une partie des endotoxines a donc été adsorbée par le filtre (perte de 89 % pour les filtres en PVC et de 58 % pour les filtres de cellulose).

(\* Voir glossaire en annexe II.



Par ailleurs, Gordon et coll. (1992) ont mis en évidence le fait que les rendements de récupération des endotoxines issues de poussières de coton étaient meilleurs pour trois sortes de filtres utilisés : fibre de verre, acétate de cellulose et PVC. Par contre, le rendement est meilleur d'un facteur 10 sur acétate de cellulose par rapport au PVC et de plus d'un facteur 2 par rapport à un filtre de fibre de verre pour un aérosol d'huile de coupe.

Pour des aérosols de sels contenant des endotoxines, les filtres en fibres de verre donnent de meilleurs rendements.

Les autres filtres testés dans ces expériences (polysulfone, polytétrafluoroéthylène, polycarbonate, argent et nylon) sont à écarter pour les ambiances étudiées.

Enfin Douwes et coll. (1995) étudient les rendements dans les usines de traitement de la pomme de terre ; ils sont significativement plus élevés sur fibre de verre, polytétrafluoroéthylène et polycarbonate que sur acétate de cellulose.

Dans une étude plus récente, Laitinen (1999) confirme des rendements d'extraction plus élevés pour des filtres en fibre de verre que pour des filtres en esters de cellulose, polycarbonate ou de PVC.

En absence d'étude spécifique, il est donc recommandé d'utiliser des filtres de fibres de verre sur lesquels il convient néanmoins de vérifier le rendement de récupération des endotoxines dans l'aérosol prélevé.

## 2.4. Extraction et conservation des échantillons

### 2.4.1. Solutions d'extraction

La plupart des laboratoires utilise de l'eau ou des solutions tampon apyrogènes, avec ou sans agent dispersant (Tween 20, Tween 80, Triton X100, etc.), mais aucune méthode stabilisée n'existe.

Milton (1990) utilise un tampon phosphate triéthylamine apyrogène (pH = 7,5).

Des essais comparatifs de solutions d'extraction des échantillons ont été réalisés par Douwes et coll. (1995) ; ils aboutissent à des rendements 7 fois meilleurs pour de l'eau apyrogène contenant 0,05 % de Tween 20 que pour de l'eau apyrogène seule.

Pour des extractions réalisées au maximum 8 heures après le prélèvement

conservé à 4 °C, Laitinen (1999) obtient des rendements supérieurs avec de l'eau stérile non apyrogène qu'avec des solutions tampon phosphate triéthylamine ou trisma.

### 2.4.2. Conditions d'extraction

De manière plus intéressante, Laitinen démontre qu'il est préférable de faire une extraction immédiatement après le prélèvement, ou au pire dans un délai de 8 heures avec conservation du filtre à 4 °C, puis de congeler ou maintenir l'extrait à 4 °C, que de conserver les filtres dans ces mêmes conditions. En effet, il a constaté une perte de 30 % des endotoxines au bout d'une semaine, et une perte de 70 % en deux semaines, pour des prélèvements conservés sur filtre à + 4 °C.

Les échantillons sont agités ou « soniqués », mais là encore il n'existe pas de règle précise.

Le plus souvent, l'extraction se fait pendant des durées variant de 10 à 120 minutes à température ambiante mais certains auteurs travaillent cependant à + 4 °C (Jacobs, 1997).

Des études menées par Olenchock et coll. (1989) montrent que dans la poussière de grain, la concentration d'endotoxines extraites passe par un maximum au bout de 2 heures d'agitation.

Quand les extraits contiennent des particules, ils sont habituellement centrifugés à 1 000 g pendant 10 minutes pour effectuer le dosage des endotoxines dans le surnageant.

### 2.4.3. Conditions de conservation

Par ailleurs, si l'échantillon ne peut pas être analysé dans les 24 heures suivant le prélèvement, les différents auteurs concluent à une température de conservation de -20 °C pour des durées très longues (supérieure à 1 an) mais interdisent toute recongélation, qui provoque à chaque cycle une perte de 25 % des endotoxines pour des solutions de concentrations connues (Gordon et coll., 1992). Par contre une conservation à + 4 °C est recommandée en attendant l'analyse, certains essais ayant montré que la conservation de LPS est même possible pendant plusieurs mois à + 7 °C sans modifier les concentrations en endotoxines, à condition d'y ajouter des bactéricides et des fongicides afin d'inhiber le développement de micro-organismes (Douwes et coll. 1995). Mais dans ce cas, il convient de vérifier

préalablement que ces additifs ne perturbent pas la réaction de dosage.

### 3.4.4. Recommandations

Le projet de norme prEN 14031 recommande l'utilisation de filtres de fibres de verre ou le cas échéant, de filtres validés par rapport aux filtres de fibre de verre. L'extraction se fait dans de l'eau apyrogène (\*), au minimum 5 ml pour des filtres de diamètre inférieur à 50 mm et 10 ml dans le cas contraire ; les échantillons doivent être agités vigoureusement pendant une heure à température ambiante. Les extraits doivent être congelés à -20 °C au moins pour être conservés plusieurs années mais aucune « recongélation » ne doit être pratiquée. Toute pratique différente doit impérativement être validée par rapport à la méthode de référence.

## 3. Méthodes de dosage

De nombreuses méthodes d'analyse ont été décrites au cours du temps pour détecter la présence ou l'absence d'endotoxines. Ces méthodes peuvent être regroupées en deux grandes catégories :

- celles qui mesurent la concentration totale en endotoxines ou « endotoxines liées » dans un échantillon ;
- celles qui mesurent les endotoxines biologiquement actives ou libres.

Les endotoxines biologiquement actives représentent la proportion des endotoxines totales qui répond à un test biologique déterminé ; pour un même échantillon, plusieurs tests biologiques différents conduisent à des taux d'endotoxines différents, tous inférieurs au taux d'endotoxines totales (Rylander et coll., 1989).

### 3.1. Méthodes d'analyse « traditionnelles »

#### 3.1.1. Historique

Plusieurs méthodes d'évaluation des endotoxines, essentiellement dans les liquides biologiques ou dans les solutions injectables, ont été essayées mais n'ont pas donné satisfaction car elles n'étaient pas assez sensibles, pas répétables et peu fiables. Parmi ces techniques, on peut citer :

- la décoloration du permanganate de potassium,

- la mortalité chez les embryons de poulet,
- l'augmentation de la mortalité des souris par l'acétate de plomb,
- l'augmentation de la sensibilité aux histamines et aussi des tests cutanés.

Nous ne développerons pas ces méthodes, qui sont aujourd'hui totalement abandonnées.

Différentes méthodes ont été ensuite développées pour déterminer la composition chimique des LPS. Récemment, on s'est particulièrement intéressé au dosage de certains composés chimiques des LPS en temps que marqueurs biochimiques des endotoxines. L'acide gras  $\beta$ -3-hydroxylé, composé spécifique des lipides A du LPS, a par exemple été étudié pour estimer la concentration en endotoxines environnementales. Cet acide gras a été dosé par chromatographie en phase gazeuse, associée à la spectrométrie de masse dans des suspensions d'*Escherichia coli* ; les résultats obtenus étaient environ dix fois supérieurs à ceux obtenus lors d'essais biologiques. Ces différences confirment les conclusions établies précédemment, à savoir que les taux des endotoxines actives (pour un test biologique précis) sont très inférieurs aux taux d'endotoxines totales (Sonesson et coll., 1990).

Le développement d'une méthode immunologique, utilisant des anticorps anti-lipides A, a également échoué (Bogard et Dunn, 1985).

### 3.1.2. Dosage des substances pyrogènes

En 1945, la collaboration aux États-Unis de la Food and Drug Administration (FDA) et du National Institute of Health (NIH) aboutit à l'élaboration d'une méthode fiable de dosage des substances pyrogènes (\*), qui restera pendant plusieurs années la méthode de référence (Weiss, 1978).

Les endotoxines bactériennes faisant partie du groupe des substances pyrogènes, elles sont aussi détectées par cette méthode dite « des substances pyrogènes chez le lapin », susceptible de détecter d'autres substances pyrogènes d'origine bactérienne telle que les toxines de *Staphylococcus aureus*, de *Pseudomonas aeruginosa* ou des Streptocoques du groupe D qui sont thermolabiles, ou d'autres d'origine virale ou fongique.

A l'origine, ce test a été mis au point essentiellement pour minimiser les risques de choc pyrétique (accès de fièvre) lors de

l'injection de produits médicamenteux. Son principe repose sur la mesure de l'augmentation de la température interne des lapins après injection d'un produit test, en estimant que les doses minimales de substances pyrogènes par kilo de masse corporelle sont les mêmes pour l'homme et le lapin (Greismann et Hornick, 1979).

En raison de « faux positifs » fréquents et de la lourdeur de cette technique, son usage s'est pratiquement limité à un test de *pass or fail* (présence ou absence) pour les produits pharmaceutiques.

Ce test a néanmoins été longtemps le seul utilisé, mais son manque de spécificité et de sensibilité, son coût élevé et sa lourdeur ont entraîné ces dernières années le remplacement progressif de l'essai pyrogène sur le lapin par l'essai LAL (Milton et coll., 1987, 1990).

## 3.2. L'essai au lysat d'améboocytes de limule (LAL)

Le dosage des endotoxines bactériennes se fait par une réaction enzymatique réalisée in vitro à l'aide d'un réactif, le lysat d'améboocytes de limule (LAL), obtenu à partir des cellules circulantes du *Limulus polyphemus* (fig. 5) ; un système enzymatique contenu dans le LAL est activé pour obtenir de la coagulase, enzyme qui va scinder une protéine, le coagulogène, contenue dans le réactif LAL en un gros fragment la coaguline et en un petit peptide. C'est la coaguline formée qui est proportionnelle à la concentration en endotoxines.

### 3.2.1. Le réactif au lysat d'améboocytes de limule (LAL)

Un des aspects les plus intéressants du LAL est sa source. Le LAL est produit à partir du sang ou hémolymphe d'un animal marin : *Limulus polyphemus* ou *Xyphosura polyphemus*, communément appelé limule ou crabe en fer à cheval.



Fig. 5. *Limulus polyphemus* ou *Xyphosura polyphemus* - *Limulus polyphemus* or *Xyphosura polyphemus*

Ce n'est pas un crustacé, mais un arthropode marin américain de la classe des Mérostomes, c'est-à-dire plus proche des araignées ou des scorpions que des crabes (Campbell, 1987).

Ces animaux sont des fossiles marins dont les ancêtres ont environ 400 millions d'années. Les limules vivent dans les eaux côtières de l'Atlantique, du Canada jusqu'en Floride. Il existe en fait quatre espèces de crabe en fer à cheval utilisées pour la production du LAL : *Limulus polyphemus*, *Tachypleus tridentatus*, *Tachypleus gigas*, et *Carcinoscorpius rotundicauda*.

Les Arachnides ont la particularité d'avoir un « système circulatoire ouvert » maintenant les organes dans le sang ou hémolymphe et les échanges (gaz, nutriments, déchets) s'y opèrent par simple diffusion (Berzofsky et coll., 1991).

L'hémolymphe est composée de plasma contenant l'oxygène lié à l'hémocyanine (équivalent de l'hémoglobine chez l'homme) et des cellules appelées améboocytes. Ces dernières sont de forme ovoïde, granuleuses et nucléées, de la taille d'un macrophage humain (jusqu'à plusieurs microns).

Quand le crabe en fer à cheval est agressé, les améboocytes perdent leur forme ovoïde pour devenir polylobulés ; ils s'agrègent et forment un caillot protecteur à l'endroit de l'agression.

Ce phénomène se produit aussi quand les limules sont agressés par les LPS des bactéries Gram(-).

Le sang de limule est extrêmement sensible à la présence de bactéries Gram négatif ou de LPS, de sorte que la coagulation du sang se produit au contact de très faibles quantités de LPS injectées.

C'est Howell en 1885 qui, pour la première fois, note le rôle primordial des améboocytes dans la coagulation de l'hémolymphe de limule, en contact avec les endotoxines bactériennes provenant de la paroi des bactéries Gram négatif. En effet, infectés par des bactéries Gram(-), les limules mouraient par coagulation intravasculaire (Levin, 1987).

Ce phénomène de coagulation de l'hémolymphe de *Limulus polyphemus* est à la base de l'essai au lysat d'améboocytes de limule (LAL) pour la détection in vitro des endotoxines bactériennes.

(\*) Voir glossaire en annexe II.

### Préparation du lysat

Les amébocytes du sang de limule sont séparés par centrifugation, le culot est lavé puis lysé. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation et le surnageant est stocké à + 4 °C pendant plusieurs mois, ou congelé à - 20 °C pendant plusieurs années. Le lysat est lyophilisé. La sensibilité de chaque lot est déterminée et parfois ajustée par élimination totale ou partielle d'un facteur inhibiteur par extraction chloroformique. Celle-ci a comme inconvénient de provoquer la précipitation de certaines protéines. Certains lysats sont tamponnés et des cations divalents, en particulier  $Mg^{2+}$ , sont ajoutés à différentes concentrations selon les réactifs.

Pour les techniques utilisant un substrat chromogène, le lysat est modifié en éliminant partiellement la protéine coagulogène. Des études ont montré qu'une purification trop poussée du lysat diminue la sensibilité de la réaction, sans doute par élimination de certains facteurs activateurs.

### 3.2.2. Principe de la méthode LAL

Lors de la mise en présence du LAL et d'endotoxines, la formation de coaguline s'accompagne de l'apparition d'un trouble qui est à la base des méthodes LAL par turbidimétrie, tandis que les molécules de coaguline vont s'agréger pour former un gel qui est à la base des techniques LAL par gélification (fig. 6).

En fait, le mécanisme de coagulation du sang de limule en présence d'endotoxines fait suite à une série de réactions enzymatiques. Les facteurs C et G, présents dans les amébocytes, sont des facteurs initiateurs de la réaction et se lient respectivement avec les endotoxines et les (1→3)-β-

D-glucanes (composés de la paroi cellulaire des moisissures). L'étape limitante de la réaction est le seuil d'activation du facteur C par le LPS (Levin et Bang, 1968), ce seuil étant directement lié à la concentration d'endotoxine. En plus du facteur C réagissant aux endotoxines, les amébocytes contiennent du facteur G qui réagit avec le (1→3)-β-D-glucane. De ce fait, les préparations commerciales de lysat contiennent pour la plupart des facteurs C et G mais le dosage des (1→3)-β-D-glucanes nécessite un traitement spécial. Afin d'éviter toute ambiguïté, certains laboratoires préfèrent retirer le facteur G par chromatographie.

La protéine coagulogène peut être éliminée du réactif LAL et remplacée par un substrat chromogène spécifique de la coagulase ; la coagulase va scinder ce substrat en libérant une substance colorée, la paranitroaniline. C'est le principe des méthodes chromogéniques (fig. 7).

Pour toutes ces méthodes, la quantité de coagulase activée est proportionnelle à la quantité d'endotoxines présentes, ce qui permet selon les méthodes une détermination semi-quantitative (gel) ou quantitative (méthodes cinétiques turbidimétrique et chromogénique).

Les résultats obtenus par cette méthode LAL étaient historiquement donnés en unités de masse par volume de liquide ou d'air (ng/ml ou ng/m<sup>3</sup>) ou en masse par masse (ng / mg). Cependant des résultats très dispersés ont été obtenus pour des essais de dosages LAL avec des préparations de LPS différents mais aussi pour des endotoxines identiques mais avec des lots de LAL différents. Ceci rend les essais comparatifs interlaboratoires impossibles.

Pour éliminer ces problèmes, la FDA a mis au point une endotoxine étalon de référence (RSE) à partir d'*Escherichia coli*. Cette préparation nommée EC-5 a un potentiel fixé à 10 unités d'endotoxines (EUs) par échantillon ce qui est équivalent à 10 EU/ng d'*Escherichia coli*. Ainsi la FDA a exigé que tous les fabricants indiquent la sensibilité de chaque lot de LAL par rapport à l'étalon EC-5 RSE. Les fabricants incluent généralement dans leur kit de dosage une endotoxine étalon de contrôle (CSE) calibrée à l'aide de RSE pour chaque lot de lysat. Les résultats des dosages sont donnés par rapport au RSE ce qui permet des essais comparatifs interlaboratoires. D'autres références ont été proposées par exemple au Japon, par l'Organisation mondiale de la santé ou par la pharmacopée européenne (EC-6), mais celles-ci ne sont pas clairement définies comme l'est EC-5.

Cette stratégie a été mise au point initialement pour les tests pyrogènes en industrie pharmaceutique et Pependorf (1986) l'a recommandée également pour les dosages d'endotoxines environnementales.

### Méthode par gélification

Cette méthode repose sur la propriété qu'ont les endotoxines en très faible quantité de coaguler du LAL (Levin et coll., 1968 ; Seigel et coll., 1977 ; Sullivan et coll., 1976).

Des quantités équivalentes de LAL et de solution à tester sont placées dans des tubes en verre apyrogène, mélangées puis mises en incubation à 37 °C pendant une heure. A la fin de l'incubation les tubes sont retournés : si un gel s'est formé, la réaction est positive.

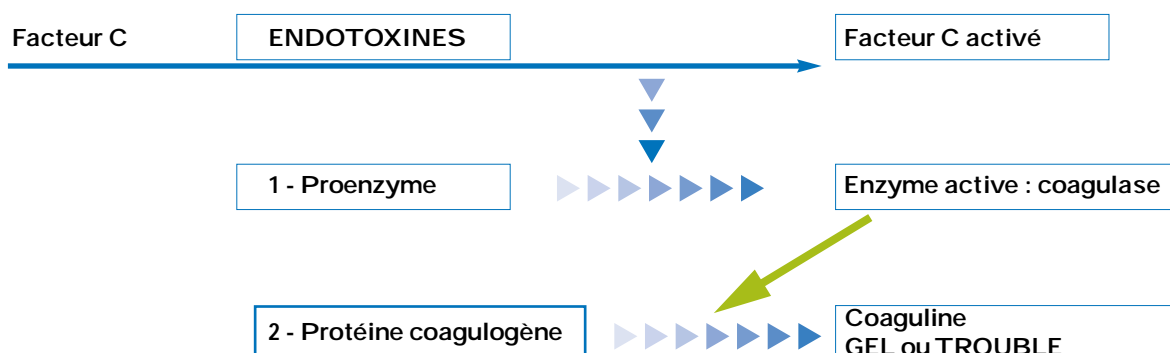


Fig. 6. Schéma du principe de la réaction permettant les dosages par gélification et turbidimétrie  
- Diagram of the principle of the reaction allowing quantitative analyses by gelation and turbidimetry



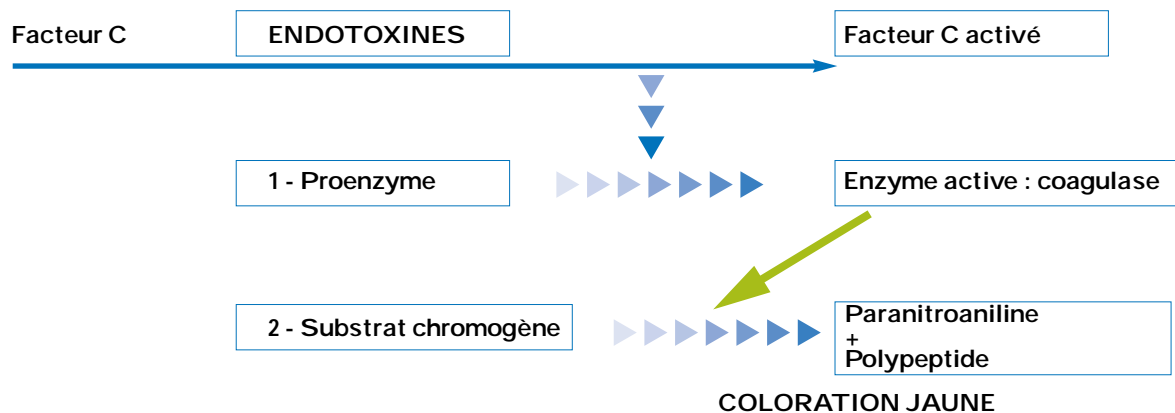


Fig. 7. Schéma du principe de la réaction permettant les dosages chromogéniques

-Diagram of the principle of the reaction allowing chromogenic quantitative analyses

Ce test permet, après avoir déterminé la sensibilité du LAL (Sullivan et coll., 1976), d'évaluer la concentration minimale d'endotoxine produisant la coagulation du LAL. Par dilutions successives d'une endotoxine de référence dont la concentration est connue, on détermine le plus grand facteur de dilution pour lequel la coagulation se produit. En divisant ce facteur par la concentration d'endotoxine standard, on obtient la sensibilité du LAL. Une procédure similaire permet de calculer la concentration d'endotoxine dans un échantillon. En multipliant le plus grand facteur de dilution pour lequel la gélification se produit par la sensibilité du LAL, on peut extrapoler la concentration maximale d'endotoxine dans l'échantillon.

Les dilutions successives rendent ce test semi-quantitatif, et pour en réduire l'imprécision, il est préférable de faire des dilutions successives au 1/2 plutôt qu'au 1/10<sup>e</sup> (Sullivan et coll., 1976).

Ce test est donc limité car :

- semi-quantitatif,
- peu précis (coefficient de variation de plus de 50 %),
- donnant des faux négatifs si la réaction est perturbée,
- et enfin, ne permettant pas d'essais comparatifs.

#### Méthode turbidimétrique

Ce test repose sur le même principe que le précédent : la turbidimétrie d'un liquide augmente quand il coagule (Sullivan et coll., 1976). Le LAL est dilué de sorte qu'il n'y ait pas de coagulation possible. Quand les endotoxines sont ajoutées au LAL dilué, la solution floccule et sa turbidité est fonction de la concentration en endotoxines.

Une courbe étalon est réalisée à l'aide de dilutions successives d'une endotoxine de référence, cette courbe permettant de déterminer la concentration en endotoxines dans un échantillon.

Le principe de cette méthode peut être appliqué soit à une méthode dite en « point final » si la mesure est faite au bout d'un temps d'incubation déterminé, soit à une méthode cinétique, si les mesures de densité optique sont faites en continu, ou au moins périodiquement pendant la réaction.

La plus grande source d'erreur en « point final » est le choix du moment de la lecture car la réaction se poursuit même si l'échantillon est refroidi. Une mesure de densité anticipée minimise la concentration en endotoxines alors qu'une mesure tardive augmente artificiellement la concentration.

La méthode turbidimétrique en cinétique s'affranchit de ces problèmes en fixant arbitrairement le début de la réaction à une augmentation déterminée de densité optique.

Elle offre plusieurs avantages par rapport à la méthode par gélification :

- l'appréciation de la turbidimétrie n'est pas subjective ;
- les mesures de concentration peuvent être continues, par opposition à la méthode par gélification où la réaction est instantanée ;
- la méthode est plus rapide et plus économique car elle consomme moins de LAL.

#### chromogénique

Dans cette méthode, le LAL est combiné à une substance chimique : le 5-aminoacid-polypeptide (5-pep) lié à la paranitroaniline (pNA). Sous l'action de la coagulase activée (Berzofsky et coll., 1991) la liaison 5-pep-pNA est coupée, libérant ainsi le pNA, qui peut être mesuré par spectrophotométrie (à 545 nm).

La vitesse de libération du pNA est fonction de la concentration en endotoxines dans l'échantillon (Friberger et coll., 1982, 1987).

La méthode chromogénique peut être adaptée en cinétique ou en « point final ».

■ ■ **En point final**, le LAL et l'échantillon sont incubés en même temps à 37 °C de 10 à 30 minutes, puis on ajoute le substrat chromogène. Après 3 minutes, la réaction est stoppée en ajoutant de l'acide acétique. L'absorbance est déterminée par spectrométrie.

■ ■ **En cinétique**, le LAL, l'échantillon et le substrat chromogène sont incubés en même temps. La réaction est suivie par spectrométrie pour déterminer le temps nécessaire à un changement d'absorbance. De même qu'en turbidimétrie, des courbes étalons sont réalisées, à l'aide de solutions de concentrations connues, pour évaluer ensuite la concentration en endotoxines dans l'échantillon (Martin et coll. 1986).

La précision des résultats obtenus par la méthode chromogénique est au moins égale à celle des essais réalisés en turbidimétrie.

### 3.2.3. La méthode « KLARE »

Une méthode spécialement dédiée au dosage des endotoxines dans les aérosols ambiants a été mise au point : la méthode KLARE (Kinetic limulus assay with resistant-parallel line estimation) (Milton et coll. 1987, 1990).

Cette méthode diffère de la méthode classique au LAL par la réalisation en routine, de séries de dilutions, à la fois pour la solution étalon et la solution à doser, afin d'estimer la variance de chaque échantillon. L'étude des courbes « dose/réponse » pour l'étalon et la solution à doser a permis de mettre en évidence des interférences et différents phénomènes d'inhibition et d'activation, sans pour autant multiplier les essais.

La méthode préconise la préparation des échantillons dans une solution tampon, afin de limiter les problèmes d'activation et afin d'améliorer également la validité et la précision des mesures de concentration.

L'intérêt de l'emploi d'un tampon lors des dosages avec la méthode KLARE a été mis en évidence à l'aide de 3 LPS étalon et du LPS de référence (EC5), à la fois pour les méthodes LAL turbidimétriques et chromogéniques.

Les avantages de cette méthode sont nombreux :

- la méthode fournit un contrôle interne pour chaque essai (D.K. Milton et coll., 1987) ;
- l'utilisation de toutes les données augmente la précision et la validité, et permet l'estimation de la variance pour chaque essai ;
- la fréquence et la généralisation des mesures des endotoxines environnementales sont facilitées par le contrôle des conditions d'analyse, en particulier l'utilisation d'un tampon, qui de plus favorise les essais comparatifs ;
- la rapidité de la méthode et la sensibilité sont suffisantes pour traiter un grand nombre d'échantillons par exemple lors d'études épidémiologiques.

Dans une étude comparative, (Milton et coll., 1987) la limite de détection de 2,2 pg/m<sup>3</sup> a été déterminée pour une quantité d'endotoxine active de 14 pg/m<sup>3</sup>. Une concentration d'endotoxine comprise entre 100 et 500 pg/m<sup>3</sup> peut être mesurée avec un intervalle de confiance de 95 % à +/- 32 % alors que la méthode classique pour une fourchette variant de 270 à 620 ng/m<sup>3</sup> ne permet d'atteindre au même niveau de confiance qu'un intervalle de +/- 43 % de la valeur moyenne.

Par ailleurs, il est important de noter que cette méthode permet de dire plus facilement s'il y a activation ou inhibition au sein de l'échantillon étudié. En effet, il suffit de doser parallèlement des dilutions successives, avec et sans ajout dosé.

D'autres études ont proposé des méthodes différentes pour évaluer l'activation ou l'inhibition du LAL par des échantillons environnementaux (Hollander et coll, 1993).

## 3.3. Interférences dans le test LAL

La plupart des essais utilisant le LAL ont été réalisés avec des substances pharmaceutiques et médicales. Il est admis que ce test bien que précis demeure sensible aux interférences (Cooper, 1990).

Les principales causes d'interférences sont :

1. la température,
2. les conditions de pH,
3. l'adsorption des endotoxines,
4. la présence de certains cations,
5. la modification de l'enzyme ou de la protéine coagulase,
6. l'activation du LAL,
7. les conséquences de la stérilisation.

### 3.3.1. Interférences de la température et du pH

La température d'incubation doit rester comprise entre 36 et 38 °C : la sensibilité du test est quasi nulle à 25 °C. Le LAL est détruit à une température supérieure à 45 °C (Cooper, 1990).

Les conditions optimales de pH pour l'utilisation du LAL sont comprises entre un pH égal à 6,4 et un pH égal à 8 (Roslansky et coll., 1991) ; en dehors de cette fourchette, la sensibilité du LAL est altérée. Certains contaminants présents au cours des échantillonnages réduisent ou augmentent le pH de l'échantillon. De ce fait, il est recommandé de mesurer le pH d'un aliquot d'une solution de LAL en présence de l'échantillon à doser. Si besoin est, le pH peut être ajusté par ajout de tampon acide ou basique, mais, chaque fois que cela est possible, il est recommandé de travailler sur des solutions diluées, pour lesquelles les variations de pH sont moindres.

Certains extraits cellulotiques activent le réactif LAL, les filtres en acétate de cellulose ne semblent néanmoins pas activer la réaction. Dans tous les cas, il convient de

vérifier que le filtre de prélèvement utilisé n'active pas la réaction en dosant systématiquement des « blancs » de filtres.

### 3.3.2. Interférences avec certaines protéines

Compte tenu des mécanismes de réaction, des interférences sont possibles avec certaines protéines. En effet, certaines études ont confirmé que la présence de protéases (enzymes à activité lytique sur les protéines) telles que trypsine, thrombine, thromboplastine..., réagissent positivement avec le LAL en absence d'endotoxine. Friberger et coll. (1987) ont montré qu'une dilution au 1/10<sup>e</sup> du plasma et une incubation à 70 - 80 °C pendant 5 minutes détruit les protéases.

Le LAL peut être activé par d'autres composants des bactéries Gram(-) que les endotoxines, et même par ceux des moisissures. De nombreux composés tels que les exotoxines, le (1→3)-β-D-glucane, les peptidoglycanes, les lipides du plasma humain..., donnent des résultats positifs au dosage en l'absence d'endotoxines. Dans tous les cas, ces substances sont réactives en présence de LAL à des concentrations faibles, de l'ordre du µg/ml. Ces interférences, une fois identifiées, peuvent être éliminées par des techniques enzymatiques ou thermiques qui dénaturent ces protéines.

Cooper (1990) estime que 90 % des interférences peuvent être éliminées par simple dilution et chauffage des échantillons. Hollander et coll. (1993) suggèrent qu'un facteur de dilution optimum pour chaque échantillon ou chaque ambiance pourrait être déterminé pour les dosages réalisés par la méthode Klare.

### 3.3.3. Interférences modifiant les endotoxines

Les endotoxines sont susceptibles de réagir avec de nombreuses variétés de substances et ainsi de modifier leur conformation. Elles peuvent, en particulier, s'agglomérer pour former des molécules de poids moléculaire important. Ces modifications entraînent une diminution de la réactivité du LAL. La présence de cations monovalents et de certains anions polyvalents favorisent la formation d'agrégats, et réduisent les concentrations d'endotoxines à des valeurs inférieures à 1 EU/ml (Cooper, 1990 ; Roslansky et coll., 1991) (voir annexe I).

Une source fréquente de contamination des échantillons réside dans le matériel de laboratoire utilisé. Pour la verrerie et les

plastiques, en particulier, il est important de noter que les procédures habituelles de stérilisation n'éliminent pas toutes les substances contenant des endotoxines. Les matériaux exempts d'endotoxines à la fabrication résultent de processus à très haute température. La stérilisation à l'oxyde d'éthylène ne peut pas être utilisée car elle inhibe le LAL (Roslansky et coll., 1991).

Le matériel de laboratoire optimal et les conditions de travail ont fait l'objet de nombreuses études. Les LPS ont tendance à adhérer aux parois des récipients en verre et en plastique (Cooper, 1990 ; Roslansky et coll., 1991) mais ils peuvent être décrochés de ces parois par agitation.

Différents matériaux ont été testés. Des inhibiteurs ont été mis en évidence dans certains lots de tubes en polypropylène, qui a par ailleurs une forte capacité d'adsorption ; dans ce cas l'utilisation de solution tampon à la place de l'eau augmente la récupération. Les études faites sur les tubes de polystyrène donnent de bons pourcentages de récupération des endotoxines ; son pouvoir activateur reste négligeable. Ces matériels peuvent être utilisés sans risque d'adsorption. Les meilleurs résultats sont obtenus pour le matériel en borosilicate (Novitsky et coll., 1986).

En raison des possibilités de réutilisation et de stérilisation à des températures « apyrogénisantes » soit 4 heures à 180 - 190 °C, il est recommandé de préparer les solutions d'endotoxines dans du matériel en borosilicate, mais il faut s'assurer qu'il est dépourvu de toute trace de détergent. Les microplaques en polystyrène peuvent être utilisées en routine.

### 3.3.4. Rôle des cations

Les cations divalents  $Ca^{++}$  et  $Mg^{++}$  interviennent dans le mécanisme de réaction du LAL en transformant la proenzyme en enzyme active. La réaction du LAL peut être activée ou inhibée par des concentrations en  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  et  $Na^{+}$  excessives (Sullivan et Watson, 1974 ; Steindler et coll., 1981). En réalité, plusieurs études ont permis de déterminer une fourchette de concentrations pour lesquelles la réaction se produit normalement, mais en dehors de cette fourchette, les cations peuvent être activateurs ou inhibiteurs.

Pour le calcium, la concentration optimale se situe entre 25 et 55 mM ; des niveaux supérieurs à 250 mM sont inhibi-

teurs. Des études similaires ont été réalisées pour le sodium et pour le magnésium, ce dernier présentant une interaction bimodale : il est inhibiteur pour des concentrations de 25 à 50 mM, activateur à 25 mM, et fortement activateur de 50 à 65 mM (Hollander et coll., 1993 ; Tsuji et Steindler, 1983).

Par dilutions successives, il est souvent possible de limiter les interférences pour les cations en excès. Pour les cations déficients, des études ont été menées, et permettent selon les cas de combler les manques : le calcium est ajouté sous forme de  $CaCl_2$  apyrogène.

### 3.4. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Actuellement, certains auteurs (Martensson et coll., 1997) préfèrent doser les endotoxines dans l'air par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les concentrations moyennes en endotoxines par ces techniques sont 30 à 50 fois plus élevées que par la méthode LAL. Cet essai a mis en évidence qu'un certain nombre de LPS collectés subsistent sur les filtres après extraction dans une solution tampon :

- 21 % sur des filtres d'acétate de cellulose,
- 26 % sur des filtres polycarbonate.

Par ailleurs, (Saraf et coll., 1997) démontrent que les résultats des dosages obtenus par la méthode LAL sont bien corrélés à la concentration déterminée en CPG en acides gras 3-hydroxylé, si on ne prend en compte que les acides gras en  $C_{12}$  et  $C_{14}$ . La corrélation est mauvaise si on considère l'ensemble des chaînes d'acides gras dosé par CPG-SM.

## CONCLUSION

Les risques pour la santé liés à l'exposition aux bactéries et aux moisissures aéroportées, tant en milieu professionnel que dans l'habitat, sont connus. Cependant, bien que de nombreuses études se soient attachées à estimer le niveau d'exposition en endotoxines dans divers secteurs d'activité, la relation dose-effet n'a pas pu être établie. De plus, les résultats des essais menés par des laboratoires différents, y compris, dans les mêmes secteurs d'activité sont mal corrélés. La diversité des techniques mises en œuvre selon les secteurs

d'activité, à la fois pour les méthodes d'échantillonnage et d'analyse des endotoxines expliquent une grande part de cette dispersion des résultats.

Un certain nombre d'études récentes tentent d'imposer des conditions standards d'échantillonnage, de traitement des échantillons de conservation et de dosage. C'est ainsi que Zock et coll. (1998) montrent que l'ajout de Tween 20 à 0,05 % dans l'eau apyrogène augmente l'efficacité d'extraction des endotoxines ; Douwes et coll. (1995) confirment les travaux de Milton et coll. (1990) :

- les rendements d'efficacité d'extraction sont meilleurs pour les prélèvements effectués sur filtre en fibres de verre que sur d'autres filtres tels que polycarbonate, acétate de cellulose et PVC,
- ces rendements dépendent de la nature de l'aérosol considéré.

Un rapport de 1 à 17 a pu être calculé entre deux procédures utilisant d'une part des filtres en ester de cellulose et de l'eau apyrogène pour l'extraction et, d'autre part, des filtres en fibre de verre et de l'eau apyrogène additionnée de 0,05 % de Tween 20. L'utilisation de l'eau apyrogène, additionnée de 0,05 % de Tween 20, augmente les rendements d'extraction par rapport à l'utilisation de l'eau apyrogène sans modifier la cinétique de réaction des essais au test LAL. À l'inverse, un prélèvement réalisé sur ester de cellulose sous-estime le niveau d'endotoxines par rapport à un prélèvement réalisé sur filtres en fibre de verre. Par ailleurs, une succession de congélation et décongélation des échantillons réduit considérablement la concentration en endotoxines de ces échantillons.

Enfin, ces études démontrent également que les endotoxines extraites dans l'eau apyrogène additionnée de Tween ne se conservent qu'à des températures inférieures à -20 °C, et ne supportent aucune recongélation.

Cette étude bibliographique montre qu'à toutes les étapes d'échantillonnage et d'analyse des endotoxines dans l'air, différentes pratiques coexistent, même si la méthode de dosage par le LAL prédomine largement. L'élaboration de la norme devrait mettre un terme à toutes ces pratiques individuelles des laboratoires, et imposer des conditions d'échantillonnage et de dosages stabilisées, permettant des essais comparatifs interlaboratoires. Ainsi, une meilleure estimation du niveau réel d'exposition aux endotoxines, dans tous les secteurs d'activité, devrait aider à établir une relation dose-effet sur la santé plus précise.

## BIBLIOGRAPHIE

- Projet de norme européenne prEN 14031 - *Workplace atmosphere - Determination of airborne endotoxins. Final Draft for CEN Enquiry 2000-03-28. Bruxelles, CEN/TC 137/WG 5, 2000.*
- Norme NF EN 481 - Atmosphère de lieux de travail. Définition des fractions de taille pour le mesurage des particules en suspension dans l'air. *Bruxelles, CEN.*
- ATTWOOD P., BROUWER R., RUIGEWAARD P., VERSLOOT P., DE WIT R., HEEDERICK D., BOLEIJ J.S.M. - A study of the relationship between airborne contaminants and environmental factors in dutch swine confinement buildings. *American Industrial Hygiene Association. Journal, 1987, 48, pp. 745-751.*
- ATTWOOD P., VERSLOOT P., HEEDERICK D., DE WIT R., BOLEIJ J.S.M. - Assessment of dust and endotoxin levels in the working environment of dutch pig farmers: a preliminary study. *Annals of Occupational Hygiene, 1986, 30, 2, pp. 201-208.*
- BERZOFKY, R.N., MCCULLOUGH, K.Z. - Applications of LAL in pharmaceuticals and medical devices. In : Gupta A.P. (ed.) - *Immunology of insects and other arthropods. Ann Arbor (USA), CRC Press, 1991, pp. 430-444.*
- BOGARD W.C., DUNN D.L. - Isolation and characterization of murine monoclonal anti bodies specific of Gram-negative bacterial lipopolysaccharides: association of cross-genus reactivity with lipid A specificity. *Infect. Immunol., 1985, 55, pp. 899-908.*
- CAMPBELL, N.A. - *Biology. Benjamin Cumming, Menlo park (CA, USA), 1987, pp. 621-624.*
- CARVALHEIRO M.F., MARQUES-DOMES M.J., SANTOS O. - Symptoms and exposures to endotoxin among brewery employees. *American Journal of Industrial Medicine, 1994, 25, pp. 113-115.*
- CASTELLAN R.M., OLENCHOCK S.A., KINSLEY K.B., HANKINSON J.L. - Inhaled endotoxin and decreased spirometric values, an exposure-response relation for cotton dust. *New England Journal of Medicine, 1987, 317, pp. 605-610.*
- CHRISTIANI D.C., VELAZQUEZ A., WILCOX M., OLENCHOCK S.A. - Airborne endotoxin concentrations in various work areas within a cotton mill in central. *Am. Env. Research, 1993, 60, pp. 187-192.*
- CHRISTIANI D.C., YE T.T., ZHANG S., WEGMAN D.H., EISEN E.A., RYAN L.A., OLENCHOCK S.A., POTHIER L., DAI H.L. - Cotton dust and endotoxin exposure and long term decline in lung function : results of a longitudinal study. *American Journal of Industrial Medicine, 1999, 35, pp. 321-331.*
- CLARK S., RYLANDER R. - Airborne bacteria, endotoxin and fungi in dust in poultry and swine confinement buildings. *American Industrial Hygiene Association. Journal, 1983, 7, pp. 537-541.*
- COOPER J.F. - Resolving LAL test interferences. *Journal of Parenteral Science and Technology, 1990, 44, pp. 13-15.*
- DELUCCA A.J., GODSHALL M.A. - Gram negative bacterial endotoxins in grain elevator dusts. *American Industrial Hygiene Association. Journal, 1984, 45, 5, pp. 336-339.*
- DONHAM K.J., HAGLIND P., PETERSON Y., RYLANDER R., BELIN L. - Environmental and health studies of farm in Swedish swine confinement buildings. *British Journal of Industrial Medicine, 1989, 46, 1, pp. 331-337.*
- DONHAM K.J., MERCHANT J.A., LASSISE D., POPENDORF W., BURMEISTER L.F. - Preventing respiratory disease in swine confinement workers: intervention through applied epidemiology, education, and consultation. *American Journal of Industrial Medicine, 1990, 18, pp. 241-261.*
- DONHAM K.J., POPENDORF W., PALMGREN U., LARSSON L. - Characterization of dusts collected from swine confinement buildings. *American Journal of Industrial Medicine, 1986, 10, pp. 294-297.*
- DOUWES J., VERSLOOT P., HOLLANDER A., HEEDERICK D., DOECKES G. - Influence of various dust sampling and extraction methods on the measurement of airborne endotoxin. *Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61, pp. 1763-1769.*
- FRIBERGER P. - A new method of endotoxin determination. *American Clin. Products Rev., 1987, 13, pp. 12-17.*
- FRIBERGER P., KNOS M., MELLSTRAM I. - A quantitative endotoxin assay utilizing LAL and a chromogenic substrate. In : Stanley WW, Levin J. (eds) - *Endotoxins and their detection with the Limulus Amebocyte Lysate test. New York, Alan R. Liss, 1982, pp. 195-206.*
- GORDON T., GALDANES K., BROSSEAU L. - Comparison of sampling media for endotoxin contaminated aerosols. *Applied Occupational and Environmental Hygiene, 1992, 7, pp. 472-477.*
- GÖRNER P., FABRIÈS J.F., WRÖBEL R. - Thoracic fraction measurement of cotton dust. *Journal of Aerosol Science, 1994, 25, Suppl 1, pp. s487-s488.*
- GREISMANN S.H., HORNICK R.B. - Comparative pyrogenic reactivity of rabbit and man to bacterial endotoxin. *Proceedings. Society for Experimental Biology and Medicine, 1979, 131, pp. 1154-1158.*
- HAGMAR L., SCHÜTZ T., HALLBERG T., SJÖHOLM A. - Health effects of exposure to endotoxin and organic dust in poultry slaughter house workers. *International Archives of Occupational and Environmental Health, 1990, 62 S, pp. 159-164.*
- HOLLANDER A., HEEDERICK D., VERSLOOT P., DOUWES J. - Inhibition and enhancement in the analysis of airborne endotoxin levels in various occupational environments. *American Industrial Hygiene Association. Journal, 1993, 54, pp. 647-653.*
- JACOBS R. - Environmental monitoring of endotoxins. *International Journal of Occupational and Environmental Health, 1997, 3, pp. 375-415.*
- JACOBS R., HEEDERICK D., DOUWES J., ZÄHRINGER U. - Endotoxin structure. *International Journal of Occupational and Environmental Health, 1997, 3, pp. 65-75.*
- JONES W., MORING K., OLENCHOCK S.A., WILLIAMS T., HICKEY J. - Environmental study of poultry confinement buildings. *American Industrial Hygiene Association. Journal, 1984, 45, 84 S, pp. 760-766.*
- KATEMAN E., HEEDERICK D., PAL T.M. - Relationship of airborne microorganisms with the lung function and leucocyte levels of workers with a history of humidifier fever. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health, 1990, 16, pp. 428-433.*
- KENNEDY S.M., CHRISTIANI D.C., EISEN E.A., WEGMAN D.H. - Cotton dust and endotoxin exposure-response relationships in cotton textile workers. *American Review of Respiratory Diseases, 1987, 135, S pp. 194-200.*
- LAITINEN S.K. - Importance of sampling, extraction and preservation for the quantitation of biologically active endotoxin. *Annals of Agriculture and Environment Medicine, 1999, 6, 1, pp. 33-38.*
- LEI M.G., MORISSON D.C. - Specific endotoxin lipopolysaccharide binding proteins on murine splenocytes. *Journal of Immunology, 1988, 141, pp. 996-1005.*
- LENHART S.W., MORRIS P.D. - Organic dust endotoxin, and ammonia exposures in the North Carolina poultry processing industry. *Applied Occupational and Environmental Hygiene, 1990, 5, 9, S pp. 611-618.*
- LEVIN J. - The limulus amebocyte lysate test perspectives and problems. In : Stanley WW, Levin J. (eds) - *Detection of bacterial endotoxins with the limulus amebocyte lysate test. New York, Alan R. Liss, 1987, pp. 1-23.*
- LEVIN J., BANG F.B. - Clottable protein in limulus : its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thromb. Diath. Haemorrh., 1968, 19, pp. 186-197.*
- LYNCH J.R. - Evaluation of size selective presampler: theoretical cyclone and elutriator relationships. *American Industrial Hygiene Association. Journal, 1970, 31, 5, pp. 548-551.*
- MARTENSSON L., GRADOWSKA W., LARSSON L. - Use of chromatography-mass spectrometry versus the Limulus Amebocyte Lysate test for the determination of airborne endotoxin in confined swine buildings. *Aerobiologia, 1997, 13, pp. 99-107.*
- MARTIN P.A., GAUNAC G.L., Tsuji K. - Automation of microtiter plate-chromogenic substrate LAL endotoxin assay method by use of a modified procedure express system. *Journal of Parenteral Science and Technology, 1986, 40, pp. 61-66.*
- MC FARLAND A., HICKMAN P.D., PARNELI C.B. - A new cotton dust sampler for PM10 aerosol. *American Industrial Hygiene Association. Journal, 1987, 48, pp. 293-297.*
- MELBOSTAD E., EDUARD W., SKOGSTAD A. - Exposure to bacterial aerosols and work related symptoms in sewage workers. *American Journal of Industrial Medicine, 1994, 25, pp. 59-63.*
- MICHEL O., DUCHATEAU J., SERGYSELS R. - Effect of inhaled endotoxin on bronchial reactivity in asthmatics and normal subjects. *Journal of Applied Physiology, 1989, 66, pp. 1059-1064.*
- MICHEL O., NAGY A., SCHROEVEN M., DUCHATEAU J., NEVE J., FONDU P., SERGYSELS R. - Dose-response relationship to inhaled endotoxin in normal subjects. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine, 1997, 156, pp. 1157-1164.*
- MILTON D.K., FELDMAN H., NEUBERG D.S., BRUCKNER R.J., GREAVES I.A. - Environmental endotoxin measurement: description of the kinetic-turbidimetric limulus assay with resistant-parallel-estimate method. *Environmental Research, 1992, 57, pp. 331-337.*



- MILTON D.K., GERE R., FELDMAN H., GREAVES I.A. - Endotoxin measurement: aerosol sampling and applications of a new limulus method. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 1990, 51, pp. 331-337.
- MILTON D.K., JOHNSON D.K., PARK J.H. - Environmental endotoxin measurement: interference and sources of variation in the limulus assay of house dust. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 1997, 58, pp. 861-867.
- MILTON D.K., GOULD M.C., ROSLANDSKY P.D., NOVITSKY T.J. - New estimates of endotoxin content of cotton dust : SDS suspension and kinetic LAL test. In : Jacobs R.R. and Wakelyn P.J. (eds) - *Proceedings. Twelfth Cotton Dust Research Conference. Memphis, National Cotton Council*, 1987.
- NEAL P.A., SCHNEITER R., CAMINITA B.H. - Report on acute illness among rural mattress makers using low grad, stained cotton. *Journal of American Medical Association*, 1942, 119, pp. 1074-1082.
- NOVITSKY T.J., SCHMIDT-GEIGENBACH J., REMILLARD J.F. - Factors affecting recovery of endotoxin adsorbed to container surfaces. *Journal of Parenteral Science and Technology*, 1986, 40, pp. 284-286
- OLENCHOCK S.A., MAY J.J., PRATT D.S., MOREY P.R. - Endotoxins in the agricultural environment. *American Journal of Industrial Medicine*, 1986, 10, pp. 323-324.
- OLENCHOCK S.A., LEWIS D.M., MULL J.C. - Effects of different extraction protocols on endotoxin analysis of airborne grain dust. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*, 1989, 15, pp. 430-435.
- PERNIS B., VIGLIANI E.C., CAVAGNA C., FINULLI M. - The role of bacterial endotoxins in occupational diseases caused by inhaling vegetable dusts. *British Journal of Industrial Medicine*, 1961, 18, pp. 120-129.
- POPENDORF W. - Report on agents. *American Journal of Industrial Medicine*, 1986, 10, pp. 251-259.
- PRELLER L., HEEDERICK D., KROMHOUT H., BOLEIJ J.S.M., TIELEN M.J.M. - Determinants of dust and endotoxin exposure of pig farmers: development of a control strategy using empirical modelling. *Annals of Occupational Hygiene*, 1995, 39, 5, pp. 545-547.
- RATNEY R.S. - The threshold limit value for grain dust. In : Dosman J.A., Cockcroft D.W. (eds) - *Principles of health in agriculture. Boca Raton (USA), CRC Press*, 1989, pp. 147-152.
- ROSLANSKY P.F., DAWSON M.F., NOVITSKY T.J. - Plastics, endotoxins, and the limulus amoebocyte lysate test. *Journal of Parenteral Science and Technology*, 1991, 45, pp. 83-87.
- RUBOW L., MARPLE V.A. - Vertical elutriator sampling characteristics. *Aerosol Science and Technology*, 1983, 2, p. 232.
- RYLANDER R. - Health effects of cotton dust exposures. *American Journal of Industrial Medicine*, 1990, 17, pp. 39-45.
- RYLANDER R., BAKE B., FISCHER J.J., HELLANDER I.M. - Pulmonary function and symptoms after inhalation of endotoxins. *American Review of Respiratory Diseases*, 1989, 140, pp. 981-986.
- RYLANDER R., BERGSTRÖM R. - Bronchial reactivity among cotton workers in relation to dust and endotoxin exposure. *Annals of Occupational Hygiene*, 1993, 37, 1, pp. 57-63.
- RYLANDER R., DONHAM K.J., PETERSON Y. - Organic dust and lung diseases. *American Journal of Industrial Medicine*, 1990, 17, pp. 1-148.
- RYLANDER R., DONHAM K.J., PETERSON Y. - Health effects of organic dusts in the farm environment. *American Journal of Industrial Medicine*, 1986, 10, pp. 193-340.
- RYLANDER R., DONHAM K.J., PETERSON Y. - Causative agents for organic dust related disease. *American Journal of Industrial Medicine*, 1992, 25, pp. 1-146.
- RYLANDER R., DONHAM K.J., PETERSON Y., ONG S.G., LIAO S. - Byssinosis in the far East. *American Journal of Industrial Medicine*, 1987, 12, pp. 647-802.
- RYLANDER R., MOREY P. - Airborne endotoxin in industries processing vegetable fibers. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 1982, 43, 11, pp. S 811-812.
- SARAF A., LARSSON L., BURGE H., MILTON D. - Quantification of ergosterol and 3-hydroxy fatty acids in settled house dust by gas chromatography mass spectrometry: comparison with fungal culture and determination of endotoxin by a limulus amoebocyte lysate assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63, 7, pp. 2554-2559.
- SCHWARTZ D.A., THORNE S.P., YAGLA S.J., BURMEISTER L.F., OLENCHOCK S.A., WATT J.L., QUINN T.J. - The role of endotoxin in grain dust-induced lung disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1995, 152, pp. 603-608.
- SEIGEL S.E., NACHUM R. - Use of the limulus amoebocyte lysate assay (LAL) for the detection and the quantification of the endotoxin. In : Bernheimer A.W. (ed) *Perspectives in toxicology. New York, John Wiley and Sons*, 1977, pp. 61-87.
- SIGSGAARD T., MALMROS P., NERSTING L. - Respiratory disorders and atopy in Danish refuse workers. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, 1994, 149, pp. S1407-1412.
- SIGSGAARD T., PEDERSEN O.F., JUUL S., GRAVESSEN S. - Respiratory disorders and atopy in cotton, wool, and other textile mill workers in Denmark. *American Journal of Industrial Medicine*, 1992, 22, pp. 163-184.
- SMID T., HEEDERICK D., HOUBA R. - Dust and endotoxin-related respiratory effects in the animal feed industry. *American Review of Respiratory Diseases*, 1992, 146, pp. S1474-1479.
- SMID T., HEEDERICK D.G. - Exposure to dust, endotoxins and fungi in the animal feed industry. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 1992, 53, 6, pp. S362-368.
- SONNESSON A., LARSSON L., SCHULTZ A., HAGMAR L., HALLENBERG T. - Comparison of the limulus amoebocyte lysate test and gas - chromatography - mass spectrometry for measuring lipopolysaccharides (endotoxins) in airborne dust from poultry processing industries. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56, pp. 1271-1278.
- STEINDLER K.A., TSUJI K., ENZINGER R.M. - Potentiating effect of calcium gluconate on the limulus amoebocyte lysate (LAL) gelation end-point assay for endotoxin. *Journal of Parental Science and Technology*, 1981, 35, pp. 242-247
- SULLIVAN J.D., VALOIS F.B., WATSON S.B. - Endotoxins : the limulus amoebocyte lysate system. In : Bernheimer A.W. (ed) *Mechanism in bacterial toxicology. New York, John Wiley and Sons*; 1976, pp. 218-236.
- Sullivan J.D., Watson S.B. - Factors affecting the sensitivity limulus lysate. *Applied Microbiology*, 1974, 28, pp. 1023-1026.
- THELIN A., TEGLER Ö., RYLANDER R. - Lung reactions during poultry handling related to dust and bacterial endotoxin levels. *European Journal of Respiratory Diseases*, 1989, 65, pp. S 266-271.
- TSUJI K., STEINDLER K.A. - Use of magnesium to increase sensitivity of limulus amoebocyte lysate for detection of endotoxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, 45, pp. 1342-1350.
- ULMER A.J. - Biochemistry and cell biology of endotoxins. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 1997, 3, pp. 8s-17s.
- VELD F. - Een bedrijfshygiënisch onderzoek naar de slachtkuiken houderij. *Wageningen, Vakgroep Luchthygiëne en verontreiniging IV 100, 1986 (en Hollands)*.
- VOGELZANG P.F.J., VAN DER GULDEN J.W.J., FOLGERING H., KOLK J.J., HEEDERICK D., PRELLER L., TIELEN M.J.M., VAN SCHAYCK C.P. - Endotoxin exposure as a major determinant of lung function decline in pig farmers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1998, 157, pp. 15-18.
- WALTERS M., MILTON D.K., LARSSON L., FORD T. - Airborne environmental endotoxin: a cross validation of sampling and analyses techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60, pp. 996-1005.
- WEISS P.J. - Pyrogen testing. *Journal. Parental Drug Association*, 1978, 32, pp. 236-41.
- ZOCK J.P., HEEDERICK D., KROMHOUT H. - Exposure to dust, endotoxin and micro-organisms in the potato processing industry. *Annals of Occupational Hygiene*, 1995, 39, 6, pp. 841-854.
- ZOCK J.P., HOLLANDER A., HEEDERICK D., DOUWES J. - Acute lung function changes and low endotoxin exposures in the potato processing industry. *American Journal of Industrial Medicine*, 1998, 33, pp. 384-391.

Annexes : pp. suivantes

&gt; &gt; &gt;

## ANNEXE I

## LES ENDOTOXINES ET L'ENVIRONNEMENT PROFESSIONNEL

Des ambiances très variées où le personnel est exposé à des aérosols d'endotoxines ont fait l'objet d'études (*tableau ci-dessous*):

Milieux professionnels	Fraction de poussières étudiées	Concentration de poussières (mg/m <sup>3</sup> )	Concentration moyenne en endotoxines (EU / m <sup>3</sup> ) (*)	Références bibliographiques
<b>Milieu agricole</b>				
● Céréales	Alvéolaire	< 0,3	Non-déetectable – 7,4	Delucca et coll. (1984)
	Inhalable		50 – 1 320	Olenchock et coll. (1986)
	Totale		120 – 8 850	Schwartz et coll. (1995)
	Inhalable		2 860 83	
● Aliments pour animaux	Inhalable	0,8 – 9,8 0,8	12 – 285 19	Smid et coll. (1992-1992)
● Porcheries	Totale	1,8 – 5,2	400 – 2 800	Clark et coll. (1983)
	Totale		627	Attwood et coll. (1986)
	D <sub>50</sub> < 8,5 µm		248	Attwood et coll. (1987)
	Totale	6,8	1 200 – 1 280	
	D <sub>50</sub> < 8,5 µm	0,34	1 050 – 1 150	Donham et coll. (1989)
	Totale		2 400	
	Alvéolaire		2 300	Preller et coll. (1995) Vogelzang et coll. (1998)
	Inhalable		1 300 1 050	
● Volailles Abattoir à poules	Totale	1,0 – 3,7	1 200 – 5 000	Clark et coll. (1983)
	?	5,8 – 28,1	1 300 – 10 900	Thelin et coll. (1989)
	D <sub>50</sub> < 8,5 µm	0,8 – 4,9	1 450 – 8 710	Veld et coll. (1986)
	Totale	2,5 – 13,1	2 250 – 13 400	
	Totale	10	240 – 590	Jones et coll. (1984)
	Alvéolaire	0,5	38 – 98	Lenhart et coll. (1990)
	Inhalable	20,2	2 500	
	Alvéolaire	1,75	130	Hagmar et coll. (1992)
Totale	3,1 – 7,7	400 – 7 800		
<b>Milieu industriel</b>				
● Industrie du coton	< 15 µm	0,59 – 1,17	20 – 5 300	Kennedy et coll. (1987)
			200 – 3 700	Rylander et coll. (1982)
	Totale		20 – 3 200	Rylander et coll. (1993)
	Totale		330 – 3 250	Sigsgaard et coll. (1992)
	Inhalable		90 – 1 260	
	Totale	1,73	18 – 3 138	Christiani et coll. (1993)
● Industrie de la pomme de terre	< 15 µm	0,2 – 1,6	3 – 65 879	Christiani et coll. (1999)
	Inhalable	0,4 – 21,1	90 – 1 020 100 – 40 000	Zock et coll. (1995)
	Inhalable		21 – 56	Zock et coll. (1998)
● Brasserie	?	28	600 – 9 270	Carvalho et coll. (1994)
<b>Traitement des déchets</b>				
● Déchetterie	Totale	0,62 – 0,74	8 – 25	Sigsgaard et coll. (1994)
	Inhalable			
● Eaux usées	?	?	300	Melbostad et coll. (1994)
<b>Bureaux</b>				
	Inhalable	0,5 – 0,6	0,18 – 0,64	Kateman et coll. (1989)

Les concentrations sont des concentrations moyennes en endotoxines résultant soit d'un calcul de moyenne arithmétique, soit de moyenne géométrique.  
(\*) La concentration en endotoxines en EU/m<sup>3</sup> a été calculée à partir des données en ng/m<sup>3</sup> de l'auteur multipliées par un facteur 10 (1 ng/m<sup>3</sup> = 10 EU/m<sup>3</sup>).  
Les dosages d'endotoxines ont tous été réalisés par la méthode LAL.

## ANNEXE II

## GLOSSAIRE

**Acide gras (voir LPS, Lipoprotéine ; fig. 2)**

Acide organique constitué d'une chaîne aliphatique d'au moins 4 carbones, saturée (sans double liaison) ou non (avec une ou plusieurs doubles liaisons, dite aussi insaturée). Leur caractéristique physique principale est leur hydrophobie, ce qui en fait des constituants essentiels des membranes cellulaires.

**Antigène (voir LPS, Polysaccharide ; §§ 1.1 et suiv.)**

Substance qui, introduite dans un organisme animal, provoque la formation d'anticorps spécifiques et réagit avec eux, aussi bien in vitro qu'in vivo. L'antigène est souvent une (ou un mélange de plusieurs) molécule complexe, de poids moléculaire élevé : protéine, polysaccharide...

**Apyrogène, Pyrogène (§§ 2.4 et 3.2)**

Substance ou mélange qui provoque (pyrogène) ou non (apyrogène), sur un organisme animal, par son exposition, l'apparition de fièvre.

**Endotoxine (voir LPS ; § 1.1)**

Fragment de la membrane externe des bactéries Gram(—) qui contient le LPS et d'autres composés membranaires.

**LAL (§ 3.2)**

Signifie : lysat d'amébocytes (cellules circulantes) de limule (arthropode marin). Méthode de dosage par réaction enzymatique.

**LPS ou Lipopolysaccharide (voir Acide gras, Antigène, Polysaccharide ; § 1.1)**

Polysaccharide associé par des liaisons chimiques et/ou physiques à des lipides (acides gras).

**Lipoprotéine (voir Acide gras ; § 1.2, fig. 2)**

Protéine (polymère d'acides aminés naturels, de poids moléculaire élevé) associée par des liaisons chimiques et/ou physiques à des lipides (acides gras).

**Polysaccharide (voir Antigène, LPS ; § 1.2)**

Macromolécule glucidique (polymère de glucides simples ou monosaccharides), de poids moléculaire élevé. Les polysaccharides capsulaires font partie de la membrane externe (capsule) des bactéries et déterminent leur spécificité antigénique.



