Institut National de Recherche et de Sécurité



Mesure des endotoxines dans les aérosols biologiques aux postes de travail

NS 293 NOTE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

Mesure des endotoxines dans les aérosols biologiques aux postes de travail

Philippe Duquenne
INRS, Laboratoire de Métrologie des Aérosols
France

Geneviève Marchand
IRSST, Service soutien à la recherche et à l'expertise
Québec

Caroline Duchaine
Université de Laval
Département de Biochimie et de Microbiologie
Québec

NS 293
mai 2011

Institut national de recherche et de sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles
Siège social : 30, rue Olivier-Noyer 75680 Paris cedex 14 • Tél. 01 40 44 30 00 • Fax 01 40 44 30 99
Centre de Lorraine : 1, rue du Morvan CS 60027 54519 Vandœuvre-les-Nancy cedex • Tél. 03 83 50 20 00 • Fax 03 83 50 20 97

Résumé :

Les endotoxines sont des lipopolysaccharides (LPS) présents dans la membrane externe de la plupart des bactéries à GRAM négatif et des cyanobactéries. L'exposition des salariés aux endotoxines a été mise en évidence pour de nombreuses situations de travail et elle a été associée à des pathologies à la fois respiratoires et systémiques. Le défaut de Valeur Limite d'Exposition Professionnelle est attribué, pour l'essentiel, à l'absence de protocole standard au niveau international pour le prélèvement et l'analyse des endotoxines dans l'air. La revue bibliographique présentée dans cet article fait un état des lieux exhaustif des connaissances actuelles sur la mesure des endotoxines dans l'air. Elle met en évidence que, malgré l'existence de plusieurs documents de référence au niveau international, les méthodes employées pour mesurer l'exposition aux endotoxines sont très différentes d'un laboratoire à un autre. Un effort de standardisation apparait indispensable pour réduire la variabilité inter-laboratoire et permettre, à terme, de meilleures possibilités d'exploitation des données inter-études. L'article constitue à la fois un document de référence pour tout opérateur désireux de mettre en œuvre la méthode et une base de travail pour une réflexion au niveau international en vue d'aboutir à un consensus sur la mesure des endotoxines dans l'air.

Mots clés : bioaérosols, endotoxines, prélèvement et analyse, méthode normalisée, dosage LAL, synthèse bibliographique

Table des matières

1 INTRODUCTION 6
2 LES METHODES STANDARDISEES DISPONIBLES 8
3 LE PRELEVEMENT DES ENDOTOXINES DANS L'AIR 11
3.1 Taille des particules associées aux endotoxines dans l'air 11
3.2 Les méthodes de prélèvement 12
3.2.1 La méthode de référence : le prélèvement par filtration 12
3.2.2 Les autres méthodes de prélèvement utilisables 14
3.3 Conditions et stratégie de prélèvement par filtration 16
3.3.1 La fraction échantillonnée 16
3.3.2 Type de prélèvements 17
3.3.3 La période de prélèvement (durée / position) 17
3.3.4 Les prélèvements de référence 20
4 TRANSPORT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS 22
5 EXTRACTION DES ENDOTOXINES A PARTIR DES FILTRES 25
5.1 Influence du type de filtre 27
5.2 Influence des conditions d'extraction 27
5.2.1 Le type de solution d'extraction 27
5.2.2 Les conditions d'agitation 28
5.3 Type d'aérosol prélevé 30
5.4 Conditions de conservation des extraits 30
6 DOSAGE DES ENDOTOXINES PAR LA METHODE AU LAL 33
6.1 Principe du dosage au LAL 33
6.2 Sensibilité de la méthode LAL 35
6.3 Sélectivité de la méthode LAL 36
6.3.1 Facteurs liés aux endotoxines 36
6.3.2 Facteurs liés à la réaction LAL 39
6.3.3 Facteurs liés à la lecture 40
6.4 Variabilité des réactifs 40
6.5 Mise en évidence et levée des interférences 42
6.6 Critères d'acceptabilité d'un dosage LAL 42
6.7 Les autres méthodes de dosage des endotoxines 42
7 EXPRESSION ET INTERPRETATION DES RESULTATS 45
7.1 Expression des résultats 45

7.2 Corrélation entre en endotoxines et dénombrement bactérien 45
7.3 Corrélation entre endotoxines et mesure pondérale des poussières ... 46
7.4 Endotoxines libres et endotoxines liées 47
7.5 Toxicité des endotoxines au niveau pulmonaire 47
7.6 Risques liés à l'exposition aux endotoxines 48
7.7 La relation dose-effet 49
7.8 Les recommandations existantes et leurs limites 50
8 CONCLUSIONS 51
9 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 53

Table des illustrations

Figure 1 : Les différentes étapes impliquées dans le prélèvement et l'analyse des endotoxines dans l'air (norme NF EN 14031).....8

Figure 2 : Réactions en cascade des composants du Lysat d'Amoebocytes de Limule (LAL) déclenchées en présence des endotoxines. Pour le dosage des endotoxines par la méthode au LAL par chromogénie cinétique, la réaction en cascade aboutie au développement d'une coloration jaune dans le milieu réactionnel. Dans certains cas, les glucanes peuvent également conduire au même résultat par une autre voie..... 34

Figure 3 : Mesure des endotoxines par la méthode au LAL. A : évolution de la densité optique dans les puits contenant des solutions de concentration en endotoxines différentes. B : évolution du temps de réaction en fonction de la concentration en endotoxines. 35

Figure 4 : Structures et organisation des endotoxines. A : Structure de l'endotoxine chez *Salmonella tiphimurium*. Kdo : acide 3-désoxy-D-manno-2 octulosique. B : Localisation des lipopolysaccharides dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif (d'après Prescott *et al.*, (117)). 38

Figure 5 : Réaction du « facteur-C recombinant » (rFC) déclenchée en présence des endotoxines. Pour le dosage des endotoxines par la méthode au rFC par fluorimétrie, la réaction aboutit au développement d'une fluorescence dans le milieu réactionnel. Le rFC ne réagit pas aux glucanes. 43

Tableau 1 : Recommandations des principales méthodes standardisées relatives au prélèvement et à l'analyse des endotoxines dans l'air des lieux de travail. *np* : non précisé ; *EPSA* : Eau Purifiée Stérile Apyrogène. Tamb : température ambiante....9

Tableau 2 : Méthodes employées dans la littérature pour le mesurage des endotoxines dans l'air des lieux de travail. np : paramètre non précisé par les auteurs. 15

Tableau 3 : Exemples de niveaux de concentration en endotoxines aéroportées mesurés en milieu professionnel. *: résultat exprimé en ng/m^3 dans l'article d'origine et

exprimé en UE/m^3 à l'aide du facteur de correction donné par les auteurs. **: résultat exprimé en ng/m^3 dans l'article d'origine et exprimé en UE/m^3 à l'aide du facteur 10 non donné par les auteurs. 21

Tableau 4 : Diversité des conditions utilisées dans la littérature pour extraire les endotoxines à partir des filtres. Les données sont issues d'études ayant pour objectif de mesurer l'exposition aux endotoxines dans différents secteurs d'activités et publiées après 2000. X : étape non comprise dans la méthode utilisée ; np : paramètre non précisén par les auteurs. 26

Tableau 5 : Description des principaux kits et réactifs commerciaux disponibles pour le dosage des endotoxines dans les échantillons d'air par la méthode en chromogénie cinétique. [a] : *Lpol* : *Limulus polyphemus* ; *Ttri* : *Trachypleus tridentatus* ; [b] : réactivité du LAL, E : réagit uniquement avec les endotoxines ; E/G : réagit avec les endotoxines et avec les glucanes ; [c] : Bactérie à partir de laquelle est préparée le CSE..... 36

Tableau 6 : Les facteurs agissants et interférents intervenants dans la réaction LAL..... 40

Tableau 7 : Résumés des principales recommandations pour la standardisation d'une méthode de mesure des endotoxines dans l'air. 52

Encart 1 : Calcul de la concentration en endotoxines dans l'air. Limite de détection et influence de la durée de prélèvement sur le résultat final. 29

1 Introduction

Les endotoxines sont des lipopolysaccharides (LPS) présents dans la membrane externe de la plupart des bactéries à GRAM négatif et des cyanobactéries. Elles jouent un rôle important à la fois dans l'intégrité de la cellule et les relations que cette dernière entretien avec le milieu extracellulaire. Les endotoxines sont des molécules complexes, de poids moléculaire important et constituées à la fois d'une partie polysaccharidique et d'une partie lipidique (18, 19, 46, 70). La partie lipidique, appelée « le lipide A », est responsable des activités toxiques du LPS et la partie polysaccharidique est responsable de ses activités antigéniques. Communément, l'appellation « LPS » désigne la forme purifiée tandis que le terme « endotoxines » désigne la forme LPS attachée à d'autres éléments de la membrane bactérienne. L'administration d'endotoxines peut, entre autres, provoquer de fortes fièvres, des chocs septiques et même des décès suite à une altération des fonctions des organes ou à une réponse inflammatoire systémique (73). Les endotoxines sont essentiellement libérées lors de la lyse cellulaire et peuvent être mises en suspension dans l'air des lieux de travail.

La quantification des endotoxines en suspension dans l'air a fait l'objet de beaucoup d'attention ces dernières années et de nombreuses études ont permis d'évaluer la concentration en endotoxines dans l'atmosphère de différents lieux de travail (89, 131, 147). L'exposition des salariés aux endotoxines est avérée dans de nombreux secteurs d'activité comme celui de l'agriculture et de l'élevage, de l'industrie agro-alimentaire, de l'industrie de la collecte et du traitement des déchets et des bureaux (Tableau 3). Les niveaux de concentrations atteints sont à la fois fonction du secteur d'activité et de la tâche des opérateurs. Chez les travailleurs exposés, l'inhalation des endotoxines a été associée à des symptômes à la fois respiratoires et généraux tels la fièvre, la toux, l'irritation des voies respiratoire et l'oppression thoracique (94, 131, 143).

En dépit de la réalité de l'exposition professionnelle aux endotoxines et de la reconnaissance de ses effets sur la santé des travailleurs, il n'existe toujours pas de Valeur Limite d'Exposition Professionnelle (VLEP) pour ces agents biologiques. Le défaut de VLEP est attribué, pour l'essentiel, à l'absence de protocole standard au niveau international pour le prélèvement et l'analyse des endotoxines dans l'air. En effet, les méthodes et protocoles employés lors du prélèvement et de l'analyse des endotoxines sont très variables d'une étude à l'autre et le manque de corrélation entre les données collectées ne permet pas encore d'établir de relation claire entre la dose et la réponse, ni de limite d'exposition sur les lieux de travail.

Le présent document a été rédigé dans le cadre de l'étude longue « Métrologie des Bioaérosols » de l'INRS. Il rapporte les résultats d'une étude bibliographique portant sur l'examen des normes existantes, des méthodes proposées par les différents instituts au niveau international et de la littérature scientifique. Il a pour objectifs :

- de définir le niveau actuel de standardisation de la méthode ;
- de faire le point des connaissances sur les méthodes de mesurage des endotoxines dans l'air ;
- de dégager les éléments importants à prendre en compte pour l'établissement d'une méthode standardisée ;

2 Les méthodes standardisées disponibles

La mesure de la concentration des endotoxines dans l'air des lieux de travail est composée de 3 étapes cruciales : le prélèvement d'air, le transport et la conservation des échantillons et l'analyse de ces derniers (Figure 1). L'étape d'analyse comprend le prétraitement des échantillons (extraction) puis le dosage des endotoxines. Plusieurs documents, publiés par des organismes de normalisation ou des instituts de santé au travail, décrivent des protocoles ayant des niveaux de précisions et de standardisation différents.

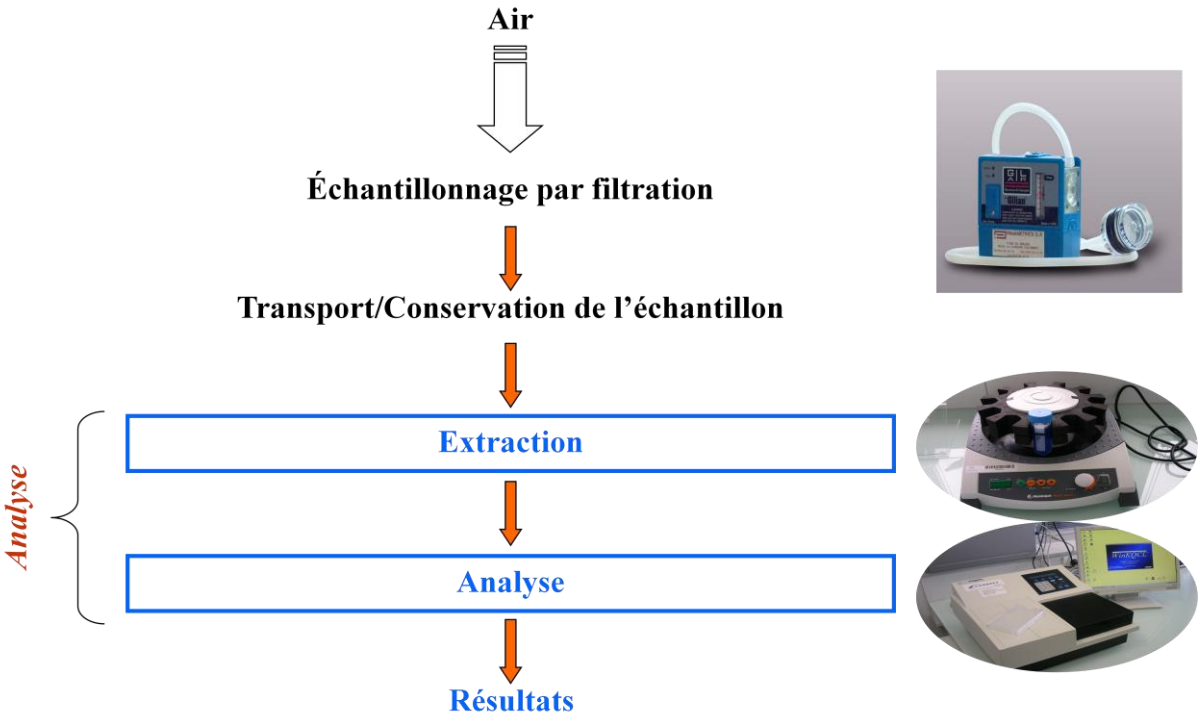


Figure 1 : Les différentes étapes impliquées dans le prélèvement et l'analyse des endotoxines dans l'air (norme NF EN 14031).

Deux normes existent au niveau Européen. La norme NF EN 13098 (22) décrit les règles de mesurage des microorganismes et des endotoxines dans l'air des lieux de travail mais aborde la mesure des endotoxines de façon superficielle. La norme NF EN 14031 (23) est entièrement dédiée à la détermination des endotoxines en suspension dans l'air des lieux de travail. Aux Etats Unis, la norme ASTM E2144-01 (8) décrit une méthode de mesures des endotoxines dans l'air dans le cas particulier des ateliers d'usinage des métaux dans lesquels sont générés des bioaérosols à partir des fluides de coupes. A côté de

ces normes, plusieurs instituts proposent des méthodes standardisées au niveau national. C'est le cas de l'IRSST (76) au Québec, de l'INRS (75) en France, du BGIA (12) en Allemagne et un document du NIOSH (78) donne quelques conseils sur le prélèvement et l'analyse. Des méthodes normalisées existent mais elles ne sont pas internationales.

Etapes	Norme NF EN 14031 (2003)	Norme ASTM E2144-01 (2007)	Méthode 332, IRSST (2009)	Méthode MetroPol 089/V2, INRS (2010)
Domaine d'application	Tout type d'environnement de travail	Fluides de coupes	Tout type d'environnement de travail	Tout type d'environnement de travail
Prélèvement				
Méthode	Filtration	Filtration	Filtration	Filtration
Dispositif	Cassette-3-pièces	Cassette-3-pièces	Cassette-3-pièces ou Porte filtre Button	Cassette-3-pièces
Nature du filtre	Fibre de verre	Fibre de verre	Fibre de verre	Fibre de verre
Traitement des filtres	180°C/4h00	*np*	180°C/4h00 ou 210°C/60 min.	250°C/90 min.
Débit/Fraction prélevée	Fraction inhalable	2 L/min.	2 à 10 L/min	2 L/min
Durée	*np*	*np*	1 à 4 heures	*np*
Transport des échantillons				
Température	Transport des filtres dans les cassettes d'échantillonnage	4°C (ne jamais congeler)	*Tamb*	4°C
Durée	Conditions sèches si le temps de transport est inférieur à 24h00	12h00	< *48h*	Le plus rapidement possible
Atmosphère	Conditions sèches ou congeler si le temps de transport dépasse 24h00	Non précisé	*Présence de dessicant*	*np*
Extraction				
Fluide d'extraction				
Nature du fluide	EPSA	EPSA	EPSA+Tween 20 à 0,05%	EPSA
Volume de fluide	5 ml	20 ml	20 ml	10 ml
Extraction				
Type d'extraction	Secoué agité	Sonication (40 kHz)	Bain ultra-son et agitation vortex 2500 rpm	Agitation vortex 2000 rpm
Durée d'extraction	60 min.	60 min.	60 min. / 30 min.	60 min.
Température d'extraction	ambiante	25+/-2°C	< 30°C	np
Centrifugation	1000 G, 10 min.	1000 G, 15 min	2000 rpm, 10 min 4°c	2000 G, 10 min. 4°C
Conservation des extraits	Conservation à -20°C si l'extraction ne peut être effectuée rapidement après le prélèvement.	4°C (durée non précisée)	Analyse le jour même si possible ; conservation 24-48h au plus.	np
Dosage				
	Dosage LAL cinétique chromogène	Dosage LAL cinétique chromogène	Dosage LAL cinétique chromogène	Dosage LAL cinétique chromogène
Expression des résultats	UE/m^3	UE/m^3	UE/m^3	UE/m^3
Références	(23)	(8)	(100)	(75)

Tableau 1 : Recommandations des principales méthodes standardisées relatives au prélèvement et à l'analyse des endotoxines dans l'air des lieux de travail.

np : non précisé ; **EPSA :** Eau Purifiée Stérile Apyrogène. **Tamb :** température ambiante.

L'examen des documents correspondant fait apparaître des divergences au niveau des protocoles expérimentaux choisis pour la réalisation des principales étapes qui composent la méthode. Par exemple, les normes NF EN 14031 et ASTM E2144-01 différent sensiblement au niveau des conditions de transport et de conservation des échantillons et de l'étape d'extraction (Tableau 1). De plus, la majorité de ces documents présentent des degrés très divers de précision concernant la description des matériels, des méthodes et parfois des réactifs utilisés. Les indications relatives à la stratégie de mesure sont assez peu nombreuses. Au final, les documents de référence existant laissent une part importante à l'interprétation des utilisateurs et des méthodes différentes sont utilisées d'un laboratoire à un autre.

Plusieurs études ont d'ailleurs révélé une variabilité dans les résultats obtenus lors de l'analyse d'échantillons d'air par des laboratoires utilisant des protocoles analytiques différents (127). Cette variabilité pouvait être réduite lorsque les laboratoires impliqués dans les essais inter-laboratoires utilisaient le même protocole (25-27). Ces essais ont été effectués dans le but de déterminer qu'elles étaient les étapes les plus déterminantes sur la variabilité des résultats obtenus sans toutefois optimiser les protocoles. En pratique les méthodes utilisées pour mesurer les endotoxines dans l'air varient beaucoup d'une étude à l'autre (Tableau 2).

3 Le prélèvement des endotoxines dans l'air

3.1 Taille des particules associées aux endotoxines dans l'air

La libération des endotoxines à partir des cellules bactériennes se produit lors de la lyse cellulaire et de la croissance. Elle conduit à des molécules de LPS pures ou associées à d'autres éléments de la paroi (protéines, phospholipides) dont elles sont issues (Figure 4). Dans les bioaérosols, la rupture des enveloppes cellulaires étant favorisée par la déshydratation et les actions mécaniques, la lyse cellulaire est vraisemblablement la source la plus importante d'endotoxines « libres ». On peut considérer que les endotoxines sont présentes dans l'air sous trois formes principales. La première correspond aux molécules de LPS purs de petites tailles, dont le poids moléculaire peut atteindre 2000 à 20 000 Da. Par exemple, les LPS purs extraits d'une souche de *Salmonella sp*. à phénotype lisse mesurent 5,6 nm de long pour 1,6 nm de large (73). La seconde correspond aux LPS purs associés à d'autres éléments de la paroi dont ils sont issus. On peut supposer que ces éléments ne sont guère plus grands qu'une cellule bactérienne classique et ont une taille inférieure à 1 ou 2 µm. Les LPS associés à une cellule bactérienne encore intègre sont classés dans cette catégorie. La troisième forme correspond aux endotoxines associées à d'autres particules de l'aérosol (biologiques et non-biologiques). La taille de ces « agglomérats » varie en fonction de l'origine de l'aérosol prélevé. Les deux dernières formes sont généralement considérées comme étant les plus représentées dans l'environnement.

En conditions réelles, les aérosols contenant des endotoxines ont un spectre de distribution en taille de particules relativement large. Dans l'air extérieur, les endotoxines ont été mesurées à la fois dans la fraction fine (< 2 µm) et la fraction plus grossière (2 µm< <10 µm) de l'aérosol (66, 73). A l'occasion de mesures effectuées dans un centre de tri d'ordures ménagères, nous avons montré que les endotoxines étaient majoritairement présentes dans les fractions particulaires supérieures à 3,5 µm. D'autres travaux montrent une répartition majoritaire dans la fraction 3,5-8,5 µm (10) et même dans les fractions plus fines, inférieures à 2 µm (5, 86) selon les environnements considérés. A l'occasion de mesures effectuées à un poste de travail exposé à des fluides de coupe, Wang *et al.*, (171) ont observé que les endotoxines étaient présentes dans les fractions comprises entre 0,4 et 2,45 µm. A l'évidence, la répartition des endotoxines dans les différentes fractions particulaires d'un aérosol échantillonné sur un site est étroitement liée à la distribution de la taille des particules par lesquelles elles sont portées dans cet environnement. Il est nécessaire de répéter les mesures dans un même environnement pour mieux apprécier cette distribution.

La profondeur de pénétration et le comportement des particules biologiques dans les voies respiratoires humaines sont fortement influencés par la taille, la forme, la densité ainsi que la composition chimique et la réactivité qui les caractérisent (167). La mesure de la distribution des endotoxines dans les fractions aérodynamiques des bioaérosols est donc une étape importante pour déterminer leur toxicité et leurs effets sanitaires. C'est également un élément essentiel pour développer des méthodes de mesure d'exposition adéquates et des moyens de protection efficaces.

3.2 Les méthodes de prélèvement

3.2.1 La méthode de référence : le prélèvement par filtration

La filtration de l'air à travers un support poreux est la méthode la plus employée dans la littérature pour l'échantillonnage des endotoxines dans l'air (Tableau 2). Toutefois, les dispositifs de prélèvement utilisés sont relativement nombreux. Le plus souvent, l'échantillonnage est effectué à l'aide d'un porte-filtre constitué d'une cassette en 3 pièces, fermée et reliée à une pompe de prélèvement. C'est d'ailleurs la méthode qui est préconisée par les principaux documents de référence au niveau international (Tableau 1). Le Button® sampler et l'IOM® sampler sont les deux autres systèmes les plus fréquemment utilisés (101, 145). D'autres porte-filtres, comme les systèmes GSP, PAS-6 et PGP sont employés plus rarement (Tableau 2).

Pourtant, le choix du dispositif de prélèvement peut avoir une influence non négligeable sur les mesures effectuées. En effet, ces porte-filtres sont utilisés pour le prélèvement et l'analyse des aérosols non biologiques et ont été adaptés pour les bioaérosols (83). Ce sont des éléments rigides qui assurent à la fois le maintien du filtre et la connexion à une pompe à vide. La configuration de ces supports intervient sur la facilité d'utilisation (manipulation, préparation, transport etc…) du dispositif de prélèvement. Leur géométrie constitue surtout un élément déterminant dans le captage des particules aéroportées et leur collecte sur le filtre. Plusieurs études comparatives, menées dans des tunnels aérauliques en laboratoire ou en conditions réelles d'exposition, ont ainsi montré que les performances physiques des principaux dispositifs utilisés pour le prélèvement par filtration pouvaient être très différentes (60, 81, 93, 126). Par exemple, les concentrations pondérales en poussières dans l'air mesurées dans l'industrie du bois avec l'IOM sampler peuvent être de 2 à 23 fois plus élevées que celles mesurées avec la cassette fermée (81). Les différences observées sont principalement liées à la distribution en taille des particules de l'aérosol prélevé. Toutefois, l'orientation de l'échantillonneur par rapport aux courants d'air, la vitesse de l'air et des paramètres physiques et environnementaux comme la forme des particules et les effets électrostatiques, sont d'autres facteurs qui interviennent sur

les performances des méthodes de prélèvement. La conformité du prélèvement par filtration aux fractions conventionnelles est discutée dans la section 3.3.1. Nous avons recensé un nombre limité d'études ayant comparé l'influence des trois principaux porte-filtres sur la mesure des endotoxines dans l'air. Dans une étude, les mesures ont été effectuées dans l'industrie du bois et ont montré que l'IOM® sampler conduisait à des valeurs plus élevées que celles obtenues avec le Button® sampler et la cassette fermée (63). Il faut cependant noter que les concentrations mesurées au cours de cette étude étaient relativement faibles (< 40 UE.m^{-3}) et que les échantillons ont été conservés pendant plusieurs mois avant l'analyse. Des résultats similaires ont été obtenus dans une étude plus récente, menée dans des bâtiments destinés à l'élevage du bétail et qui a montré un effet significatif de la méthode de prélèvement sur les concentrations mesurées (165).

Les méthodes de référence préconisent l'emploi de filtres en fibres de verre apyrogènes et la norme EN 14031 précise qu'il doivent être sans liants (44). En pratique, la nature et les caractéristiques des supports employés pour le prélèvement des endotoxines aéroportées sont très variables (Tableau 2). Si les filtres en fibre de verre sont les plus utilisés, on rencontre également des supports en polycarbonate, en téflon, en PVC (polychlorure de vinyle), ou à base de cellulose. De même, le diamètre (25 ou 37 mm) et la porosité (de 0,4 à 8,0 µm) de ces filtres varient d'une étude à l'autre. Plusieurs études ont comparé ces filtres. Les travaux font apparaître que, lorsque la méthode d'extraction et de dosage sont fixées, les résultats de mesurage dépendent à la fois des caractéristiques des supports employés et de la nature de l'aérosol prélevé (57, 127). A notre connaissance, aucune étude n'a réellement permis d'évaluer l'effet de ces différents supports sur l'efficacité de collecte des aérosols et les différences observées sont d'avantage attribuées à la capacité de ces supports à libérer les endotoxines lors de la phase d'extraction (voir section 5). En tout état de cause, la nature du filtre présent dans les cassettes de prélèvement peut avoir une influence importante sur les résultats de mesure. En particulier, plusieurs études montrent que l'utilisation de filtres en fibres de verre dans la cassette conduit à des concentrations mesurées supérieures à celles obtenues avec d'autres filtres (58, 88, 155). L'absence d'endotoxines sur les éléments utilisés pour le prélèvement doit également être prise en considération. Les filtres en fibre de verre peuvent contenir des endotoxines et doivent être décontaminés avant les mesures. Le caractère apyrogène des filtres en fibres de verre utilisés pour le prélèvement n'est pas toujours évoqué dans les études que nous avons revues. Des protocoles de décontamination des filtres par traitement thermiques sont proposés dans les méthodes de références (Tableau 1) et des données complémentaires sont disponibles par ailleurs (174). Les

données disponibles concernant la contamination des cassettes de prélèvements et l'effet de ces contaminations sur les résultats de mesure sont pratiquement inexistantes. Sur ce point, une seule étude, parmi toutes celles que nous avons recensé, propose un protocole de traitement des cassettes avant l'échantillonnage (72).

3.2.2 Les autres méthodes de prélèvement utilisables

D'autres méthodes sont utilisables pour le prélèvement des endotoxines. Parmi ces méthodes, l'utilisation des impingers permet une estimation satisfaisante de la quantité d'endotoxines présente dans l'air de locaux fermiers ou de scieries (38, 180). Ces appareils se montrent aussi efficaces que la filtration sur filtre en fibres de verre pour mesurer les endotoxines dans l'air d'une station d'épuration (155). Pour une autre étude dans le même secteur d'activité, les résultats sont moins probants (153). Le milieu de collecte des particules biologiques est généralement une eau apyrogène. Par ailleurs, ce liquide de collecte peut être utilisé pour la recherche d'autres marqueurs microbiens (microorganismes cultivables, ADN etc…). Il faut toutefois signaler que ce liquide peut subir une évaporation significative lors de prélèvements de longue durée.

Un autre appareil permettant la collecte des particules biologiques dans un liquide, le CIP 10-M a également été utilisé pour mesurer la concentration en endotoxines dans l'air. Les résultats obtenus avec le CIP 10-M montrent que cet appareil pourrait être utilisé pour l'échantillonnage des endotoxines dans l'air (39, 59, 139). Cependant, des essais complémentaires sont nécessaires pour en cerner les limites (préparation de coupelles rotatives apyrogènes, efficacité de récupération du liquide dans la coupelle, conditions de conservation des échantillons liquides…).

Les impacteurs en cascade peuvent également être utilisés pour mesurer la répartition des endotoxines dans les différentes fractions granulométriques des bioaérosols. Par exemple, l'impacteur « Marple » employé avec des supports de collecte Mylar® est applicable au mesurage des endotoxines dans l'air ; cependant, les résultats obtenus dépendent de l'environnement dans lequel l'aérosol a été prélevé (57). D'autre part, une attention particulière doit être apportée à la préparation des supports de collecte. En effet, la présence de graisse sur le support de collecte limite le rebond des particules collectées et leur réentraînement vers les étages inférieurs et confère, vraisemblablement, une meilleure représentativité de la distribution massique des particules collectées. En revanche, elle semble être défavorable à l'extraction des endotoxines à partir des disques d'impaction et à leur analyse (40, 84).

Méthode d'échantillonnage[1]		Nature aérosol	Support de collecte[2]	Conditions d'échantillonnage				Méthode dosage LAL	Unités	Références	
				Type[3]	Durée	Débit (L/min.)	Conservation des échantillons[4]				
Filtration	CF-37	Fabrication de cigarettes et de cigares	np (0,45 µm)	A	np	np	np	Kinetic Chromogenic	ng/m^3	Reiman et Uitti, 2000	(121)
		Industrie textile	PC (0,4 µm)	I	np	1,5 et 2,0	T = 4°C ; d= ? (dessicat[4])	Kinetic Chromogenic	ng/m^3	Su *et al.*, 2002	(157)
		Industrie du bois	PVC (5,0 µm)	I	1-5 h	2,0	T = Tamb[4] ; d = 3 ans	Kinetic Chromogenic	UE/m^3	Harper et Andrew, 2006	(63)
		Cabinets dentaires	PC (37 mm ; 0,4 µm)	I	2h30 min.	2 ,5	T = 4°C ; d =7 jours	Endpoint	UE/m^3	Singh *et al.*, 2010	(146)
		Cabinets dentaires	PC (37 mm ; 0,4 µm)	I	2h30 min.	2 ,5	T = 4°C ; d =7 jours	Endpoint	UE/m^3	Singh *et al.*, 2010	(146)
		Ateliers de scieries	PC (37 mm ; 0,4 µm)	A	np	1,5	T = -20°C ; d = 1-3 mois	Kinetic Chromogenic	UE/m^3	Oppliger *et al.*, 2005	(114)
		éboueurs	PC (37 mm ; 0,8 µm)	I	4 h	2,0	np	Kinetic Chromogenic	ng/m^3	Thorn, 2001	(161)
		Collecte des ordures ménagères	NiC	I	np	1,9	np	Kinetic Chromogenic	UE/m^3	Nielsen *et al.*, 2000	(109)
		Usinage des métaux (fluides de coupe)	FV (37 mm)	A	2 h	2,0	T = -20°C ; d = np	Endpoint	UE/m^3	Gilbert *et al.*, 2010	(53)
		8 environnements professionnels	FV	I/A	1-8 h	2,2	Analyse immédiate	Endpoint	ng/m^3	Laitinen *et al.*, 2001	(89)
		Air intérieur immeuble	FV	np	np	2,0	np	Endpoint	UE/m^3	Reynolds *et al.*, 2001	(122)
		Porcheries	FR (37 mm)	I	40-436 min.	2,0	T = -20°C ; d = np	Endpoint	UE/m^3	Bonlokke *et al.*, 2009	(14)
		Porcheries	PVC (37 mm, 0,8µm)	A	4 h	1,5	np	Endpoint	UE/m^3	Duchaine et al., 2001	(38)
		Elevage du bétail	PVC (37 mm, 5 µm)	A	8-12 h	2,0	np	Kinetic Chromogenic	UE/m^3	Thorne *et al.*, 2010	(165)
	CO-37	Traitement des déchets ménagers (tri)	PC (37 mm ; 0,8 µm)	I	4 h	2,0	np	Kinetic Chromogenic	ng/m^3	Gladding *et al.*, 2003	(54)
		Récolte du soja	FV (37 mm)	I/A	3 h	2,0	np	Endpoint	UE/m^3	Roy *et al.*, 2003	(129)
		Traitement des eaux usées (STEP)	PC (37 mm ; 0,8 µm)	I	1h40-7h24 min.	2,0	np	np	ng/m^3	Thorn *et al.*, 2002	(162)
		Traitement des eaux usées (STEP)	PC (37 mm ; 0,8 µm)	A	1-6h30 min.	5,0	np	np	ng/m^3	Thorn *et al.*, 2002	(162)
	IOM	Industrie du bois	PVC (5,0 µm)	I	1-5 h	2,0	T = Tamb ; d = 3 ans	Kinetic Chromogenic	UE/m^3	Harper et Andrew, 2006	(63)
		9 environnements industriels	FV	I	np	2,0	T = - 20°C ; d = ?	Kinetic Chromogenic	ng/m^3	Simpson *et al.*, 1999	(144)
		Industrie du coton	np	I	3 h	2,0	T = 4°C ; d < 60 jours	Kinetic Chromogenic	UE/m^3	Mehta *et al.*, 2008	(103)
		Industrie du coton	FV (25 mm)	I	4-8 h	2,0	T = Tamb[4] ; d = 90 jours	Kinetic Chromogenic	UE/m^3	Paudyal *et al.*, 2010	(116)
		Compostage des déchets	FV (GF/A)	I/A	4 h	2,0	np	Kinetic Chromogenic	UE/m^3	Sykes *et al.*, 2009	(160)
		Industrie textile (chanvre)	PC (25 mm ; 0,8 µm)	I	1-5 h	2,0	np	Kinetic Chromogenic	UE/m^3	Fishwick *et al.*, 2001	(50)
		Scierie	PVC (25 mm, 0,8µm)	A	6 h	2,0	np	Endpoint	UE/m^3	Duchaine *et al.*, 2001	(38)
		Elevage du bétail	PVC (25 mm, 5 µm)	A	8-12 h	2,0	np	Kinetic Chromogenic	UE/m^3	Thorne *et al.*, 2010	(165)
	BUTTON	Industrie du bois	PVC (5,0 µm)	I	1-5 h	4,0	T = Tamb[4] ; d = 3 ans	Kinetic Chromogenic	UE/m^3	Harper et Andrew, 2006	(63)
		Industrie du coton	FV (1,0 µm)	A	1 h	10,0	T = Tamb[4] d < 15 jours (dessicat[4])	Kinetic Chromogenic	UE/m^3	Marchand *et al.*, 2007	(101)
		Elevage du bétail	PVC (25 mm, 5 µm)	A	8-12 h	4,0	np	Kinetic Chromogenic	UE/m^3	Thorne *et al.*, 2010	(165)
	GSP	Industrie des bio-carburants	Tef (1,0 µm)	I	7 h	np	np	Kinetic Chromogenic	UE/m^3	Madsen *et al.*, 2006	(97)
		Culture de légumes	Tef (1,0 µm)	I	145-411 min.	np	np	Kinetic Chromogenic	UE/m^3	Madsen *et al.*, 2009	(98)
		Traitement des eaux usées (égouts)	FV (37 mm)	I	np	3,5	T = - 20°C ; d = ?	Kinetic Chromogenic	UE/m^3	Visser *et al.*, 2006	(168)
		Traitement des eaux usées (STEP)	FV (37 mm ; GF/A)	I/A	8 h	3,5	T = -20°C ; d = ?	Kinetic Chromogenic	UE/m^3	Spaan *et al.*, 2008	(153)
	PAS-6	Travail du grain	FV (25 mm ; GF/A)	I	10-60 min.	2,0	T = -20°C ; d = ?	Kinetic Chromogenic	UE/m^3	Halstensen *et al.*, 2007	(62)
		Traitement des eaux usées (STEP)	FV (25 mm ; GF/A)	I	np	np	np	np	UE/m^3	Heldal *et al.*, 2010	(67)
		Clinique vétérinaire	FV (37 mm)	I/A	np	2,0	np	Kinetic Chromogenic	UE/m^3	Samadi *et al., 2009*	(135)
		Elevage des chevaux	FV (25 mm)	I/A	8 h	2,0	T = -20°C ; d = ?	Kinetic Chromogenic	UE/m^3	Samadi *et al.*, 2009	(136)
	PGP	Fermes (étables)	PTFE (8µm)	A	1h11 min.	3,5	np	Endpoint	UE/m^3	Zucker *et al.*, 2000	(180)
	CIS	Industrie agricole	FV	I	np	3,5	T = -20°C ; d = 7 jours à plusieurs mois	Kinetic Chromogenic	UE/m^3	Spaan *et al.*, 2006	(154)
	EV	Industrie du coton	PVC (37 mm, 5 µm)	A	3 h	7,4	T = 4°C ; d < 60 jours	Kinetic Chromogenic	UE/m^3	Astrakianakis *et al.*, 2006	(9)
	HVS	Compostage des déchets	FV (20 x 25 cm)	I	6-8 h	3,0	T = congélation ; d = ? (sech[4])	Kinetic Chromogenic	ng/m^3	Hryhorczuk *et al.*, 2001	(71)
	UKAEA 7	Ateliers de scieries	FV (25 mm ; GF/A)	I	8 h	2,0	np	Kinetic Chromogenic	UE/m^3	Douwes et al., 2000	(36)
	AS-50	Transformation des produits agricoles	FV (37 mm ; 1,0 µm)	A	np	50,0	T = -20°C ; d = ?	Gel-Clot-Test	µg/m^3	Gora *et al.*, 2009	(56)
	SKC cyclone	Elevage du bétail	PVC (25 mm, 5 µm)	A	8-12 h	2,5	np	Kinetic Chromogenic	UE/m^3	Thorne *et al.*, 2010	(165)
	np	Elevages de volailles	Tef (37 mm ; 1,0 µm)	np	np	1,5	np	Endpoint	ng/m^3	Golbabaei et Islami, 2000	(55)
		Salles de cours	Tef (47 mm ; 0,5 µm)	I	5 h	18,0	T = - 20°C ; d = ?	Endpoint	UE/m^3	Sebastian *et al.*, 2006	(141)
Impingment	AGI-30	Cabinets dentaires	EPSA	A	np	np	np	Kinetic Chromogenic	UE/m^3	Huntington *et al.*, 2007	(72)
		Ateliers de scieries	EPSA+0,09% NaCl (20 ml)	A	15 min.	12,5	T = -20°C ; d = 1-3 mois	Kinetic Chromogenic	UE/m^3	Oppliger *et al.*, 2005	(114)
		Fermes (étables)	EPSA (50 ml)	A	20 min.	12,5		Endpoint	UE/m^3	Zucker *et al.*, 2000	(180)
		Porcheries	SSA (20 ml)	A	16 min.	12,5	T = congélation ; d = ?	Endpoint	UE/m^3	Duchaine *et al.*, 2001	(38)
		Scieries	SSA (20 ml)	A	16 min.	12,5	T = congélation ; d = ?	Endpoint	UE/m^3	Duchaine *et al.*, 2001	(38)
Impaction	Harvard	Air extérieur	Tef (37 mm ; 2,0 µm)	A	15 min.	10,0	T = -80°C ; d =2-3 ans	Kinetic Chromogenic	UE/m^3	Carty *et al.*, 2004	(20)
Autre	CIP 10-M	Compostage des déchets	EPSA + 0,05 % Tween 20	I/A	20-60 min.	10,0	T = réfrigérée ; d = 1-4 jours	Kinetic Chromogenic	UE/m^3	Schlosser *et al.*, 2009	(139)

Tableau 2 : Méthodes employées dans la littérature pour le mesurage des endotoxines dans l'air des lieux de travail. **np :** paramètre non précisé par les auteurs.

1 : **CF-37 :** Cassette fermée de 37 mm de diamètre ; **CO-37 :** Cassette ouverte de 37 mm de diamètre ; **IOM :** IOM sampler (25 mm de diamètre) ; **Button :** Button® sampler (25 mm de diamètre) ; **GSP :** Gesamtstaub-Probenahmesystem (37 mm) ; **PAS-6 :** Personal Aerosol Sampler-6 (25 mm) ; **PGP :** PersonenGetragenes Probenahmesystem ; **CIS :** Conical Inhalable Sampler (37 mm) ; **EV :** Elutriateur Vertical ; **HVS** : High volume Sampler ; **UKAEA :** UKAEA 7-hole sampler ; **AS-50 :** Aspirator filtracyjny aerozoli sampler ; **SKC cyclone :** SKC cyclone sampler ; **AGI-30** : AGI-30 ; **Harvard** : Harvard sampler. **2** : **PC :** membrane en Polycarbonate ; **PVC :** filtre en Polychlorure de Vinyle ; **NiC :** filtre en Nitrate de cellulose ; **FV :** filtre en Fibres de Verre ; **Tef :** membrane en Teflon ; **PTFE :** filtre en Polytetrafluoroéthylène ; **EPSA :** Eau Purifiée Stérile Apyrogène ; **SSA :** Solution Saline Apyrogène. Les caractéristiques des supports de collecte (dimension, volume, composition…) précisées par les auteurs sont reportées entre parenthèses. **3 : I :** prélèvement effectué en individuel ; **A :** prélèvement effectué en Ambiance ; **I/A :** prélèvement effectué soit en Individuel, soit en Ambiance. **4 :** Les conditions de transport et de conservation des échantillons précisées par les auteurs ; **Dessiccat :** conservation dans un dessiccateur ; **Sech :** Séchage préalable ; **Tamb** : température ambiante.

3.3 Conditions et stratégie de prélèvement par filtration

L'étape la plus importante avant d'entreprendre des mesures est de définir une stratégie de prélèvement. Cette étape consiste à établir un plan d'action pour la collecte des échantillons qui permettra la meilleure interprétation possible des résultats de mesure. Pour autant, la stratégie de prélèvement pour le mesurage des endotoxines aéroportées n'est pas très bien établie. En effet, pour de nombreux polluants chimiques, les concentrations mesurées sont comparées à une VLEP. Cette valeur peut être réglementaire et toute la stratégie de prélèvement est construite sur la base de cette comparaison. L'absence de telles valeurs de référence pour les agents biologiques ne permet pas de tirer totalement profit des progrès réalisés dans le cadre de l'évaluation des risques chimiques sur ce sujet. La stratégie pour la mesure des endotoxines est donc spécifique et prend une importance particulière. Par ailleurs, même s'il existe des ouvrages et des documents auxquels il est possible de se référer (2, 4, 106), les connaissances qui permettraient d'établir cette stratégie ne sont pas toutes stabilisées. Compte tenu de la complexité du sujet, il n'est pas possible de traiter de la stratégie de prélèvement de façon exhaustive dans cet article. Aussi, cette partie sera t'elle consacrée à évoquer les critères stabilisés et ceux qui méritent d'être approfondis et expérimentés.

3.3.1 La fraction échantillonnée

Les quatre méthodes de référence donnent des précisions sur la fraction qui doit être échantillonnée (Tableau 1). Ces méthodes précisent soit que le mesurage porte sur la fraction inhalable de l'aérosol, soit que le prélèvement doit être effectué avec la cassette fermée au débit de 2 $L.min^{-1}$. La fraction inhalable est définie par la norme EN 481 (21) comme étant « *la fraction massique des particules totales en suspension dans l'air inhalée par le nez et par la bouche* ». Elle a été définie pour le mesurage des particules dans l'air en général et est utilisée pour les bioaérosols à défaut de convention cible spécifique. La toxicité des endotoxines inhalées s'exprime, à priori, tout au long de l'arbre respiratoire. L'échantillonnage doit donc être représentatif de la totalité des endotoxines susceptibles de pénétrer dans l'appareil respiratoire et de s'y déposer. Au regard des connaissances actuelles, l'échantillonnage de la fraction inhalable est donc acceptable pour l'évaluation des risques liés à l'exposition aux endotoxines aéroportées. A cette fraction correspond une convention inhalable qui détermine les spécifications cibles pour les appareils d'échantillonnage en terme de performances (21). Les efficacités d'échantillonnage et de collecte de la cassette en fonction de la taille des particules ont été étudiées à plusieurs reprises et pour différentes conditions opératoires (17, 60, 82, 93). Ces performances ont

été résumées dans l'annexe d'une norme entièrement dédiée au prélèvement d'aérosol à l'aide d'une cassette (1). En résumé, lorsqu'elle est utilisée au débit de 2 $L.min^{-1}$, la cassette fermée sous-estime la fraction échantillonnée pour les particules supérieures à 20 µm (vitesses de vent comprises entre 0,5 et 4 $m.s^{-1}$). Il faut noter que les performances de la cassette sont peu influencées par le débit.

3.3.2 Type de prélèvements

Pour évaluer l'exposition aux endotoxines sur les lieux de travail, la norme EN 14031 précise que l'échantillonnage individuel doit être utilisé (44). Ce type de prélèvement consiste à placer le capteur dans la zone respiratoire du salarié et permet d'obtenir une bonne représentativité de l'exposition. L'échantillonnage d'ambiance, ou à poste fixe, peut être utilisé pour identifier les sources d'exposition ou établir une cartographie de l'exposition à poste fixe.

D'autres paramètres affectant directement l'efficacité globale de la méthode de mesurage mériteraient d'être précisés dans les méthodes de références pour le prélèvement des endotoxines dans l'air. D'abord, l'orientation de l'orifice de captage par rapport à la source d'exposition est rarement indiquée dans les études qui ont été consultées dans le cadre de notre revue et aucune indication n'est donnée dans les méthodes standardisées à ce sujet. Ce premier point concerne uniquement les prélèvements effectués en ambiance. Ensuite, l'inclinaison de la cassette par rapport à l'axe horizontal influence les résultats de mesure. En particulier, l'efficacité de prélèvement décroît fortement lorsque l'axe de la cassette est incliné vers le bas d'un angle de 45° et diminue d'avantage pour des angles supérieurs (17, 60). La cassette doit donc rester en position horizontale lors du prélèvement des endotoxines. Par ailleurs, un intérêt particulier doit être apporté au serrage de la cassette qui doit assurer une étanchéité parfaite entre les pièces de la tête de prélèvement. En effet, une mauvaise étanchéité peut être à l'origine de pertes importantes de particules et contribuer à sous estimer l'exposition (11). Enfin, il faut signaler que des particules contenant des endotoxines peuvent se déposer sur les parois de la cassette lors du prélèvement, du transport ou de la manipulation des échantillons.

3.3.3 La période de prélèvement (durée / position)

Le choix de la période au cours de laquelle sont effectuées les mesures constitue une étape importante lors de la conception d'une stratégie pour évaluer l'exposition. Ce choix conditionne en grande partie la représentativité des mesures et la pertinence de leur interprétation. Il s'agit de déterminer à quel moment (dans la journée de travail ou au

cours de l'année), pendant combien de temps et, éventuellement, combien de fois doivent être effectuées les mesures.

Ce choix suppose de connaitre la variabilité de l'exposition à l'agent recherché et ces déterminants. Les niveaux de concentration en endotoxines dans l'air au poste de travail ont été documentés pour de nombreuses situations professionnelles et les principaux déterminants de l'exposition ont été identifiés. Pour autant, la variabilité statistique de l'exposition aux endotoxines et aux agents biologiques aéroportés en général est peu documentée dans la littérature. Sur ce point, seules deux études récentes ont été publiées par une équipe hollandaise. La première a exploité des données collectées à l'occasion d'une dizaine de compagnes de mesure d'exposition individuelle menées dans différents secteurs d'activité et rassemblées dans une base de données (152). Cette étude montre une variabilité importante des mesures en fonction du secteur d'activité, de l'industrie, de l'usine, de la tâche ou du travail effectué et aussi du salarié. Elle souligne que la variabilité inter-employés est plus importante que celle mesurée à des jours différents pour un même travailleur. La seconde étude s'est focalisée sur des salariés travaillant dans une installation de traitement des eaux usées et, à l'inverse, met en évidence une plus grande variabilité de l'exposition d'un jour à l'autre (153). La variabilité calculée pour les endotoxines dans la première étude apparait supérieure à celle calculée pour les poussières inhalables et, plus généralement, à ce qui est connu pour les agents chimiques. L'importance de la variabilité des concentrations en endotoxines aéroportées est attribuée aux fluctuations des populations microbiennes dans les réservoirs. Les populations microbiennes s'y développent ou déclinent rapidement en fonction des conditions de température et d'humidité et du type de matières introduites dans les procédés. Certaines études ont permis de mettre en évidence une variation saisonnière des concentrations en endotoxines dans l'air avec, généralement, des concentrations plus élevées en été et au printemps (14, 20, 31, 66, 96, 109). Dans d'autres études, ces variations n'ont pas été observées (113, 153, 161). Si les données bibliographiques sont plutôt contradictoires à ce sujet, il apparait nécessaire de considérer la saison comme un paramètre à prendre compte dans la stratégie de mesure des endotoxines aéroportées.

La durée de prélèvement pour la mesure des endotoxines dans l'air est un paramètre sur lequel il y a peu de recommandations et aucun consensus. D'une part, une seule des méthodes standardisées disponibles aborde le sujet (Tableau 1). D'autre part, la durée des prélèvements effectués pour mesurer la concentration en endotoxines dans l'air peut s'étendre de quelques minutes à plusieurs heures selon l'étude considérée (Tableau 2). Dans le cadre de cet article, il n'est donc pas possible de donner des recommandations

précises concernant le choix de la durée des prélèvements. A la fois une réflexion plus approfondie et des recherches supplémentaires sont encore nécessaires afin de progresser sur ce point. Néanmoins, il est envisageable d'évoquer les critères qui devront être défini pour choisir une durée de prélèvement adaptée. Premièrement, la durée de prélèvement est une composante de la représentativité du prélèvement au regard des profils et de la variabilité de l'exposition. Deuxièmement, elle devrait correspondre aux effets sanitaires recherchés (aigus et chroniques). Sur ces deux points, il serait possible de se référer aux polluants chimiques, pour lesquels, l'interprétation des résultats est généralement faite en comparaison des valeurs mesurées à une VLEP réglementaire ou non. En général, ces VLEP sont définies pour des prélèvements effectués sur une période de référence de 8 heures (VLEP-8h) ou de 15 minutes (VLEP-ct). La durée de prélèvement est également liée à l'effet chronique ou aigu que peut avoir le polluant mesuré sur la santé des travailleurs. L'inhalation d'endotoxines est suspectée de déclencher des symptômes respiratoires (toux, dyspnée) et des maladies pulmonaires obstructives chroniques. Troisièmement, la durée de prélèvement est étroitement liée à la sensibilité globale de la méthode de mesure (Encart 1). Elle doit donc être déterminée de manière à ce que la concentration minimale en endotoxines mesurable dans l'air par la méthode soit compatible avec la concentration attendue en endotoxines dans l'air de l'environnement investigué. Sur ce point, la méthode de dosage au LAL est suffisamment sensible pour permettre de mesurer des niveaux d'endotoxines faibles (< 10 UE/m^3) que l'on peut retrouver dans des zones peu contaminées comme l'air extérieur (108). Quatrièmement, un consensus sur la durée de prélèvement devrait tenir compte de l'efficacité biologique de la méthode de prélèvement par filtration. En effet, plusieurs études ont montré que la durée du prélèvement par filtration pouvait avoir un effet sur la viabilité des microorganismes collectés sur le filtre (92, 172). Cet effet est très marqué pour les formes cellulaires végétatives et, en particulier, pour les bactéries à Gram négatif déjà connues comme étant sensibles au prélèvement par filtration (30, 79). L'effet observé s'expliquerait par le stress associé au passage de l'air à travers la porosité du filtre et qui soumettrait les microorganismes collectés à une déshydratation. L'efficacité biologique de la méthode de prélèvement par filtration n'a jamais été étudiée pour les endotoxines et il apparait judicieux d'approfondir ce sujet.

A notre connaissance, le nombre d'échantillons qui devront être collectés est précisé dans un seul document récent englobant tous les agents biologiques aéroportés (4). Toutefois, ce document a été rédigé par des équipes allemandes et il n'a pas, à priori, été validé au niveau international. Le nombre de prélèvements à effectuer est donc très peu documenté et des travaux sont encore nécessaires sur ce point. Compte tenu de la

variabilité, il sera probablement nécessaire de multiplier les prélèvements pour une meilleure représentativité des expositions mesurées.

3.3.4 Les prélèvements de référence

En l'absence de VLEP, il est indispensable d'effectuer des prélèvements de référence. Certains auteurs préconisent un prélèvement extérieur systématique au titre de référence qui peut permettre de vérifier que les endotoxines détectées dans l'atmosphère sont bien générées par l'environnement du salarié. En l'absence de source, l'air extérieur est considéré comme un milieu peu contaminé (Tableau 3). Il est également utile d'intégrer dans le plan de prélèvement des mesures effectuées dans des zones supposées non contaminées ou sur des populations de salariés avec ou sans plaintes. Au même titre, la constitution de blancs de terrain est recommandée.

Environnement / Secteur / Activité		Endotoxines (UE/m^3) Min	Endotoxines (UE/m^3) Max	Références
Agriculture				
Cultures végétale en serre				
Toutes activités		0,4*	4130	Spaan *et al.,* 2006 (154) ; Radon *et al.,* 2002 (119)
Champignons		10	1300	Simpson *et al.,* 1999 (144) ;
Tomates et concombres		5,4**	4002**	Madsen *et al.,* 2009 (98) ;
Utilisation des composts		14	191430	Spaan *et al.,* 2006 (154) ;
Culture végétale en extérieur		< LQ	377 500	Spaan *et al.,* 2006 (154) ; Roy *et al.,* 2003 (129)
Elevage				
Ferme laitière		62	2230	Spaan *et al.,* 2006 (154) ;
Elevage de poulets		152	719950	Simpson *et al.,* 1999 (144) ; Golbabaei et Islami, 2000 (55) ; Radon *et al.,* 2002 (119)
Elevage de poules pondeuses		1716	2550	Spaan *et al.,* 2006 (154) ;
Elevage de volailles		360	8120	Spaan *et al.,* 2006 (154)
Elevage bétail		444	3860	Spaan *et al.,* 2006 (154) ;
Elevage de porcs		0,08*	149230	Simpson *et al.,* 1999 (144) ; Radon *et al.,* 2002 (119) ; Radon *et al.,* 2002 (119) ; Bonlokke *et al.,* 2009 (14) ;
Animaux divers		60	850	Simpson *et al.,* 1999 (144) ;
Chevaux		< LQ	9846	Samadi *et al.,* 2009 (136) ;
Travail du grain				
Manipulation des grains		30	22470	Simpson *et al.,* 1999 (144) ;
Toutes activités		3	600000	Halstensen *et al.,* 2007 (62) ;
Agrotransformation / agroalimentaire				
Fabrication des farines		19	28240	Spaan *et al.,* 2006 (154) ;
Aliments pour animaux		24	4930	Spaan *et al.,* 2006 (154) ;
Broyage		257	35940	Spaan *et al.,* 2006 (154) ;
Transformation des végétaux				
Trituration du riz		35	149060	Spaan *et al.,* 2006 (154) ;
Transformation du mais		36	30720	Spaan *et al.,* 2006 (154) ;
Transformation herbes et grains		41	15626000	Gora *et al.,* 2009 ; (56)
Séchage des herbes		179	20180	Spaan *et al.,* 2006 (154) ;
Café et thé		12	2030	Spaan *et al.,* 2006 (154) ;
Sucreries		9	2520	Spaan *et al.,* 2006 (154) ;
Malteries		291	20030	Spaan *et al.,* 2006 (154) ;
Transformation de la pomme de terre		0,91*	1578250*	Dutkiewicz *et al.,* 2002 (41)
Transport des grains		113	131480	Spaan *et al.,* 2006 (154) ;
Boulangerie		2	3030	Spaan *et al.,* 2006 (154) ;
Abattoirs				
Volailles		27	6230	Spaan *et al.,* 2006 (154) ;
Veaux		3	3480	Spaan *et al.,* 2006 (154) ;
Bovins		2	820	Spaan *et al.,* 2006 (154) ;
Porcs		2	220	Spaan *et al.,* 2006 (154) ;
Transformation de la viande		3	1420	Spaan *et al.,* 2006 (154) ;
Collecte et traitement des déchets				
Traitement des eaux usées				
Travail dans les égouts		4	887	Visser *et al.,* 2006 (168) ;
Travail dans les STEP		< LQ	1850	Thorn *et al.,* 2002 (162) ;
Collecte des ordures ménagères				
éboueurs		< LQ	100	Thorn , 2001 (161) ; Nielsen *et al.,* 2000 (109) ;
Tri des déchets ménagers		1,9	1981,7	Gladding *et al.,* 2003 (54) ;
Compostage des déchets		0,1	15000000	Schlosser *et al.,* 2009 (139) ; Sykes et al., 2009 (160) ; Hryhorczuk *et al.,* 2001 (71) ;
Industrie du bois				
Ateliers de scieries		0,4	2660	Harper et Andrew, 2006 (63) ; Simpson *et al.,* 1999 (144) ; Douwes *et al.,* 2000 (36) ; Oppliger *et al.,* 2005 (114) ;
Industrie textile				
Travail du coton		2	69360	Su *et al.,* 2002 (157) ; Marchand *et al.,* 2007 (101) ; Simpson *et al.,* 1999 (144) ; Mehta *et al.,* 2008 (103) ; Oldenbourg *et al.,* 2007 (112) ; Paudyal *et al.,* 2010 (116) ;
Travail de la laine		< LQ	30450	Simpson *et al.,* 1999 (144) ;
Travail du chanvre		4734	59801	Fishwick *et al.,* 2001 (50) ;
Autres industries				
Fluides de coupe		< 2,1	183	Gilbert *et al.,* 2010 (53) ; Bracker *et al.,* 2003 (15) ;
Industrie des bio-carburants		< 50	119 000	Madsen *et al.,* 2006 (97) ;
Fabrication de cigarettes/cigares		3	1060	Reiman et Uitti, 2000 (121) ;
Secteurs médical et vétérinaire				
Cabinets dentaires		< LQ	556	Huntington *et al.,* 2007 (72) ; Singh *et al.,* 2010 (146) ;
Clinique vétérinaire		< LQ	75	Samadi *et al.,2009* (135) ;
Bâtiment publique tertiaire				
Bureaux		NC	< 10	Reynolds *et al.,* 2001 (122) ;
Classes de cours		< LQ	< LQ	Sebastian *et al.,* 2006 (141) ;
Habitations				
	Avec sources	6	1002	Semple *et al.,* 2010 (142) ;
	Sans sources	0,01	10	Park *et al.,* 2000 (115) ;
Air extérieur				
Tout environnement		0,0005	5,44	Carty *et al.,* 2004 (20) ; Muller-anneling *et al.,* 2004 (108) ;
Environnement urbain		0,02	10	Madsen, 2006 (96) ; Morgenstern *et al.,* 2005 (17) ;

Tableau 3 : Exemples de niveaux de concentration en endotoxines aéroportées mesurés en milieu professionnel. *: résultat exprimé en ng/m^3 dans l'article d'origine et exprimé en UE/m^3 à l'aide du facteur de correction donné par les auteurs. **: résultat exprimé en ng/m^3 dans l'article d'origine et exprimé en UE/m^3 à l'aide du facteur 10 non donné par les auteurs.

4 Transport et conservation des échantillons

L'examen des quelques méthodes standardisées disponibles suffit à montrer l'absence de consensus concernant les conditions de transport et de conservation des échantillons d'air destinés à l'analyse des endotoxines (Tableau 1). La norme Européenne est la plus complète sur ce point. Elle précise que les filtres doivent être transportés dans un containeur scellé ou dans une cassette de prélèvement et en atmosphère sec. Au delà d'une durée de 24 heures, les échantillons doivent être transportés en atmosphère sec ou être congelés.

Dans la littérature relative aux mesures de l'exposition professionnelle aux endotoxines, les conditions de transport et de conservation des échantillons avant extraction et analyse sont extrêmement variables d'une étude à l'autre (Tableau 2). D'autre part, tous les auteurs ne précisent pas les conditions de conservation des filtres. Dans la majorité des études recensées, il semble que les filtres soient conservés dans leurs cassettes de prélèvement. Hormis les travaux apportant très peu de précisions à ce sujet, il y a pratiquement autant de modes opératoires qu'il y a d'études. En résumé, ces modes opératoires se distinguent par la forme sous laquelle l'échantillon est conservé (filtre ou solution d'extraction), la température (température ambiante, 4°C, et -20°C), la durée de conservation (quelques heures à plusieurs mois) et l'humidité relative de l'air dans l'enceinte de transport.

Bien qu'il soit reconnu que les conditions de transport et de conservation des échantillons biologiques avant analyse puissent avoir une influence importante sur le résultat final, les travaux portant sur les échantillons destinés à l'analyse des endotoxines sont relativement peu nombreux. Aussi, l'absence de consensus repose t'elle, pour l'essentiel, sur le manque de données scientifiques. Trois points méritent d'être précisés afin de faire un état des connaissances existantes sur le sujet. D'abord, il faut rappeler que les conditions de transport et de conservation doivent assurer la protection des échantillons contre toute contamination par des endotoxines exogènes. Sur ce point, le transport des filtres dans la cassette de prélèvement peut constituer une pratique plus adaptée dans la mesure où elle limite les risques liés à la manipulation des filtres sur le terrain (environnement non confiné). Ensuite, des dépôts de particules sur les parois de la cassette de prélèvement ont été mis en évidence à l'occasion d'études sur les polluants atmosphériques chimiques, microbiens et sur les endotoxines. Ces dépôts s'effectueraient lors du prélèvement, du transport ou de la manipulation des échantillons. En conséquence, si les dépôts ne sont pas pris en considération dans l'analyse, il convient de faire en sorte que la manipulation des échantillons n'accentue pas leur importance. Enfin, l'évolution de

la quantité d'endotoxines collectées sur les filtres en fonction des conditions de conservation des échantillons revêt une importance particulière. La conservation des extraits étant abordée dans la section 5.4, seule la conservation des filtres sera traitée dans cette partie. Laitinen a étudié la conservation de filtres en fibres de verre ayant servi à prélever de l'air dans une station de traitement des eaux usées (88). Il a observé que les échantillons d'air extraits et analysés le jour du prélèvement conduisaient à des teneurs en endotoxines supérieures à celles observées dans les échantillons conservés à 4°C sans extraction. La teneur en endotoxines dans ces échantillons diminuait de 10 % et de 70 % au bout de 2 et 14 jours de conservation, respectivement. Morgenstern *et al.*, (107) ont observé une augmentation de l'ordre de 20 % de la quantité d'endotoxine mesurable dans des échantillons d'air urbain après conservation sans extraction à 4°C, pendant plus de 1 an, par rapport à des échantillons analysés sans conservation. Dans deux autres études, au contraire, des échantillons de poussières prélevées dans des habitations ont pu être conservés à 4°C ou à -20°C pendant quelques semaines à plusieurs mois sans évolution significative de leur contenu en endotoxines (48, 105). Dans une autre étude (150), les concentrations mesurées après conservation des filtres à -20°C était de 10 % supérieures à celles observées après conservation à 4°C. Par ailleurs, les quelques essais inter-laboratoires organisés au niveau international n'ont pas pris en considération ce paramètre. En effet, les essais portaient sur des poussières de coton dont le contenu en endotoxines était suffisamment stable dans le temps pour ne pas interférer sur les résultats de dosage (25, 26, 127). Au regard de ces résultats contradictoires, il est recommandé de transporter les échantillons dans une enceinte réfrigérée à environ 4°C pour une analyse dans les 24 heures après le prélèvement. Si l'analyse ne peut être effectuée immédiatement après leur arrivée au laboratoire, il est conseillé de les congeler à -20°C. L'humidité relative de l'air contenu dans l'enceinte de transport est l'un des autres paramètres à prendre en considération lors du transport des échantillons. Mais il est très peu étudié. Dans une étude, l'utilisation d'un produit déshydratant comme le gel de silice n'a pas montré d'effet particulier sur la conservation des échantillons (151). Sur ce point malgré tout, l'utilisation de ce type de produit comme précisé dans la norme NF EN 14031 et la méthode 322 de l'IRSST peut constituer un compromis intéressant pour la conservation des cassettes.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'évolution de la quantité d'endotoxines au cours de la conservation des échantillons. D'un côté, l'évolution des propriétés physiques des endotoxines ou des particules prélevées et la modification des interactions entre les endotoxines et la surface de filtres peuvent agir sur la quantité d'endotoxines actives disponibles. D'un autre côté, l'évolution de l'activité biologique

(multiplication ou lyse cellulaire) des microorganismes piégés sur le filtre peut faire évoluer la quantité d'endotoxines initialement présente dans l'échantillon. Ces hypothèses sont développées dans la section 5.4. Les connaissances sont donc encore parcellaires sur ce sujet et des travaux complémentaires sont nécessaires pour définir les conditions de conservation des échantillons et ce quelque soit l'environnement dans lequel ils ont été prélevés.

5 Extraction des endotoxines à partir des filtres

L'étape d'extraction a pour objectif de remettre en suspension les endotoxines qui ont été piégées sur le filtre lors du prélèvement dans une solution aqueuse. Les protocoles d'extraction préconisés par les normes et ceux utilisés en pratique lors des études de terrain montrent des différences sensibles au niveau de toutes les opérations qui les composent (Tableau 1 et Tableau 4). Cette étape clé peut être à l'origine d'une variabilité importante dans les concentrations en endotoxines aéroportées mesurées d'un laboratoire à un autre. En effet, lors de l'analyse d'échantillons de poussières de coton par des laboratoires utilisant des protocoles d'extraction différents, les résultats obtenus varient d'un facteur 100 à 1400 (27). Cette variabilité inter-laboratoire pouvait être réduite à un facteur 5 lorsque les laboratoires impliqués dans les essais utilisaient le même protocole d'extraction (27). Dans les deux cas, la variabilité intra-laboratoire était réduite (CV < 12 %). L'extraction est donc une étape qu'il est important de standardiser et un travail est doit être entrepris pour harmoniser les pratiques au niveau international.

En outre, les conditions opératoires doivent assurer une extraction efficace des endotoxines à partir de l'échantillon. Sur ce point, les protocoles d'extraction employés ou préconisés concernent essentiellement les endotoxines collectées sur le filtre. Le support de collecte est retiré de sa cassette de prélèvement puis subit un traitement visant à en extraire les endotoxines. A l'heure actuelle, les endotoxines déposées sur les parois de la cassette lors du prélèvement, du transport ou de la manipulation des échantillons ne sont pas pris en considération dans le processus analytique. Pourtant, de tels dépôts ont été mis en évidence pour les polluants atmosphériques chimiques (32), microbiens (43) et même pour les endotoxines (170). Un travail apparait nécessaire pour traiter cette problématique des dépôts qui est d'actualité pour les polluants chimiques (16).

Les études focalisées sur la méthode d'extraction des endotoxines à partir des filtres mettent en évidence que, à côté des méthodes de prélèvement et d'analyse, les éléments affectant le plus les résultats sont le type d'aérosol prélevé, le type de filtre utilisé, les conditions d'extraction, et les conditions de conservation des filtres. Dans tous les cas, les réactifs et les consommables utilisés doivent être exempts d'endotoxines et les opérateurs doivent s'assurer que les LPS ne s'adsorbent pas sur les matériaux utilisés.

Type de filtre			Solution d'extraction		Conditions d'extraction				Centrifugation		Autre étape[4]	Méthode de dosage LAL	Nature Aérosol	Références	
Nature[1]	*Diamètre*	*Porosité*	*Type*[2]	*Volume*	*Type d'agitation*[3]	*Température*	*Durée*	*Puissance*	*Puissance*	*Durée*					
FV	25 mm	1,0 µm	EPSA	20 ml	Sonic + AO	< 30°C	60+30min.	2500 rpm	1500 rpm	10 min.	X	Kinetic Chromogenic	Industrie textile (coton)	Marchand *et al.*, 2007	(101)
		np	EPSA + 0,05 % Tween 20	10 ml	AO	np	60 min.	25 rpm	3000 g	10 min.	X	Kinetic Chromogenic	Compostage des déchets	Sykes *et al.*, 2009	(160)
		np	EPSA + 0,05 % Tween-20	5 ml	AO	np	60 min.	quiet	1000 g	10 min.	X	Kinetic Chromogenic	Ateliers de scieries	Douwes *et al.*, 2000	(36)
		np	EPSA	5 ml	np	ambiante	60 min.	np	1420 g	30 min.	X	Kinetic Chromogenic	Industrie textile (coton)	Paudyale *et al.*, 2010	(116)
		0,7 µm	EPSA + 0,05 % Tween-20	NP	Ao	22°C	60 min.	np	600 g	20 min.	X	Kinetic Chromogenic	Habitation	Semple *et al.*, 2010	(142)
		GF/A	EPSA + 0,05 % Tween-20	5 ml	AO	np	60 min.	quiet	1000 g	10 min.	X	Kinetic Chromogenic	Travail du grain	Halstensen *et al.*, 2007	(62)
		np	EPSA + 0,05 % Tween 20	5 ml	AO	np	60 min.	vigoureux	1000 g	15 min.	A	Endpoint	Elevage des chevaux	Samadi *et al.*, 2009	(136)
	37 mm	np	EPSA + 0,05 % Tween 20	5 ml	AO	np	60 min.	vigoureux	1000 g	15 min.	X	Kinetic Chromogenic	Industrie agricole	Spaan *et al.*, 2006	(154)
		np	EPSA + 0,05 % Tween-20	5 ml	AO	np	60 min.	np	1000 g	15 min.	X	Kinetic Chromogenic	Traitement des eaux usées	Visser *et al.*, 2006	(168)
		1,0 µm	EPSA	10 ml	np	ambiante	60 min.	np	X	X	B	Gel-Clot-Test	Agro-industrie	Gora *et al.*, 2009	(56)
		Np	Solution saline apyrogène+0,05% Tween 20	20 ml	AO	np	60 min.	vortex	1500 rpm	5 min.	X	Endpoint	Porcheries	Bonlokke *et al.*, 2009	(14)
		np	EPSA + 0,09 Nacl+ 0,025 % Tween 20	20 ml	Vortex	np	60 min.	np	500 g	10 min.	X	Endpoint	Fluides de coupes	Gilbert *et al.*, 2010	(53)
		np	EPSA + 0,05 % Tween 20	10 ml	AO	22°C	60 min.	np	np	np	np	Kinetic Chromogenic	Récolte du soja	Roy *et al.*, 2003	(129)
	np	np	Eau	10 ml	AO	ambiante	60 min.	np	3000 g	15 min.	X	Kinetic Turbidimetric	9 environnements industriels	Simpson *et al.*, 1999	(144)
NiC	25 mm	8,0 µm	EPSA	10 ml	AO	np	15 min.	300 rpm	X	X	C	Kinetic Chromogenic	Collecte des OM	Nielsen *et al.*, 2000	(109)
PC	25 mm	0,8 µm	EPSA	5 ml	np	np	np	np	np	np	np	Kinetic Chromogenic	Industrie textile (chanvre)	Fishwick *et al.*, 2001	(50)
	37 mm	0,4 µm	KH_2PO_4 (0,005 %)+triéthylamine (0,01 %)	np	np	20°C	60 min.	Bain	X	X	X	Kinetic Chromogenic	Industrie textile	Su *et al.*, 2002	(157)
		0,8 µm	EPSA	10 ml	AO	np	10 min.	np	X	X	X	Kinetic Chromogenic	Traitement des OM (tri)	Gladding *et al.*, 2003	(54)
		0,8 µm	EPSA	10 ml	AO	np	10 min.	np	X	X	X	Kinetic Chromogenic	Traitement des eaux usées	Thorn *et al.*, 2002	(162)
		0,4 µm	EPSA + 0,05 % Tween 20	6 ml	AO modérée	ambiante	180 min.	np	X	X	D	Endpoint	Cabinets dentaires	Singh *et al.*, 2010	(146)
		0,8 µm	EPSA	10 ml	AO	np	10 min.	X	X	X	X	Kinetic Chromogenic	éboueurs	Thorn, 2001	(161)
		0,4 µm	EPSA	10 ml	AO	ambiante	60 min.	np	X	X	X	Kinetic Chromogenic	Ateliers de scieries	Oppliger *et al.*, 2005	(114)
PVC	25 mm	5 µm	EPSA + 0,05 % Tween 20	10 ml	AO	22°C	60 min.	np	600 g	15 min.	np	Kinetic Chromogenic	Elevage du bétail	Thorne *et al.*, 2010	(165)
	37 mm	5,0 µm	EPSA	10 ml	AO	np	60 min.	np	2200 rpm	10 min.		Kinetic Chromogenic	Industrie du bois	Harper et Andrew, 2006	(63)
		5 µm	EPSA	10 ml	AO + sonic	np	60 min.	np	1000 g	15 min.	X	Kinetic Chromogenic	Industrie textile (coton)	Astrakianakis *et al.*, 2006	(9)
		5 µm	EPSA + 0,05 % Tween 20	10 ml	AO	22°C	60 min.	np	600 g	15 min.	np	Kinetic Chromogenic	Elevage du bétail	Thorne *et al.*, 2010	(165)
Q	20 x 25 cm	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	Kinetic Chromogenic	Compostage des déchets	Hryhorczuk *et al.*, 2001	(71)
Tef	37 mm	2,0 µm	EPSA	4 ml	Sonic + AO	np	2+10 min.	np	3500 g	10 min.	X	Kinetic Chromogenic	Air extérieur	Carty *et al.*, 2004	(20)
	37 mm	1,0 µm	EPSA	10 ml	AO	np	60 min.	np	np	10 min.	X	Endpoint	Elevages de volailles	Golbabaei et Islami, 2000	(55)
	47 mm	0,5 µm	EPSA + triéthylamine (0,01 %)	1,8 ml	Sonic	np	np	np	X	X	X	Kinetic Chromogenic	Classes de cours	Sebastian *et al.*, 2006	(141)
	np	1,0 µm	EPSA+ 0,05 % Tween 20	10 ml	AO	np	60 min.	300 rpm	1000 g	15 min.	X	Kinetic Chromogenic	Industrie des bio-carburants	Madsen *et al.*, 2006	(97)
np	np	np	EPSA	10 ml	vortex	np	60 min	np	2200 rpm	10 min.	X	Kinetic Chromogenic	Industrie textile (coton)	Mehta *et al.*, 2008	(103)

Tableau 4 : Diversité des conditions utilisées dans la littérature pour extraire les endotoxines à partir des filtres. Les données sont issues d'études ayant pour objectif de mesurer l'exposition aux endotoxines dans différents secteurs d'activités et publiées après 2000. **X :** étape non comprise dans la méthode utilisée ; **np :** paramètre non précisé par les auteurs.

1 : **PC :** membrane en Polycarbonate ; **PVC :** filtre en Polychlorure de Vinyle ; **NiC :** filtre en Nitrate de cellulose ; **FV :** filtre en Fibres de Verre ; **Tef :** membrane en Téflon ; **Q :** filtre en quartz. 2 : **EPSA :** Eau Purifiée Stérile Apyrogène. 3 : **Sonic :** Sonication par passage au bain à ultra son ; **AO :** Agitation orbitale. 4 : **A :** Extraits conservés à -20°C jusqu'à l'analyse ; **B :** Les extraits sont chauffés à 100°C ; **C :** Conservation des extraits à -80°C pendant une durée indéterminée ; **D :** Filtration des extraits, cryo-concentration et conservation à -70°C pendant 30 j.

5.1 Influence du type de filtre

L'efficacité d'extraction des endotoxines à partir des filtres dépend de la nature des matériaux qui entrent dans la composition de ces derniers. Ceci a été démontré avec des filtres contaminés à l'aide des endotoxines pures dans les travaux de Laitinen (89). L'auteur a déposé une solution d'endotoxines pures sur des filtres de natures différentes qu'il a laissé sécher pendant 90 minutes à température ambiante. Après extraction, l'auteur a observé des taux de récupération de 90, 80, 40 et 5%, dans les filtres en fibres de verre, en ester de cellulose, en polycarbonate et en PVC, respectivement. Des différences ont également été observées lorsque l'extraction est effectuée sur des filtres utilisés pour l'échantillonnage des bioaérosols. Dans certaines études, les filtres en fibres de verre permettent une meilleure extraction des endotoxines que les filtres en polycarbonate, en téflon, en esters de cellulose mixtes et en chlorure de polyvinyle (88, 150, 166). Dans un autre essai, (37), les mesures de l'efficacité d'extraction donnent des valeurs comparables pour les filtres en fibres de verre, en polycarbonate et en téflon mais inférieures pour les filtres en ester de cellulose. Les travaux de Gordon *et al.,* (57) mettent également en évidence la supériorité des filtres en fibres de verre par rapport à sept autres filtres mais l'efficacité d'extraction varie avec la nature de l'aérosol prélevé (voir section 5.3).

L'origine de ces différences n'est pas clairement établie. D'un côté, il est supposé que les endotoxines interagissent avec la surface des filtres, en particulier, en s'y adsorbant. Certains filtres tels les filtres en fibre de verre ne seraient pas favorables à cette adsorption. D'un autre côté, les filtres peuvent libérer des substances inhibitrices ou activatrices de la réaction LAL (104). D'autre part, plusieurs auteurs rapportent la présence d'endotoxines sur des blancs de terrain constitués de filtres ou de pré-filtres non utilisés (88, 164).

Les méthodes de référence préconisent, à juste titre, l'utilisation pour le prélèvement de filtres en fibres de verre à partir desquels les endotoxines sont extraites avec une plus grande efficacité (Tableau 1). A nôtre connaissance aucune étude n'a porté sur l'incidence du diamètre ou de la porosité du filtre sur l'efficacité d'extraction.

5.2 Influence des conditions d'extraction

5.2.1 Le type de solution d'extraction

Les deux solutions d'extraction les plus couramment utilisées dans la littérature et préconisées par les méthodes de référence sont l'eau purifiée stérile apyrogène (EPSA) et l'EPSA amendé de tween 20 (Tableau 1 ; Tableau 4). D'autres solutions d'extraction sont

utilisées plus rarement (tampon tris, tampon phosphate etc..). Toutes ces solutions d'extraction ont été testées dans la littérature mais leurs effets sur l'efficacité d'extraction sont contrastés. Dans certains essais, par exemple, l'ajout de détergent (Tween 20 , SDS…) à l'EPSA peut améliorer l'efficacité d'extraction de façon significative (37, 95, 150) alors que dans d'autres ce n'est pas le cas (105, 164). Le détergent agirait en facilitant la remise en suspension des particules biologiques, la rupture des interactions hydrophobes entre les endotoxines et le filtre, la désagrégation des micelles formées par les endotoxines ou encore la dissociation des endotoxines à partir des parois cellulaires. Spaan *et al.*, (150) ont proposé, dans un premier temps, d'ajouter néanmoins du Tween 20 à la concentration de 0,05 % et de modifier le protocole décrit dans la norme Européenne NF EN 14031. A la concentration utilisée, le détergent ne semblait pas interférer avec le dosage LAL. Mais deux études récentes ont montré que le Tween 20 pouvait inhiber la réactivité des endotoxines au LAL (95, 149). En définitif, l'intégration du détergent dans le protocole apparait souhaitable mais les interactions du tween 20 doivent être éclaircies afin d'aboutir à un meilleur consensus sur la composition de la solution d'extraction.

Les volumes généralement employés pour l'extraction sont de 2 à 20 ml (Tableau 4) et les méthodes standardisées différent sensiblement sur ce point (Tableau 1). Il n'y a donc pas vraiment de consensus sur le choix de ce paramètre pourtant identifié comme facteur important de l'efficacité d'extraction (95). La norme Européenne propose d'adapter le volume de solution d'extraction en fonction des dimensions du filtre. Il est important de signaler que la sensibilité de la méthode de mesure des endotoxines dans l'air dépend en partie du volume de solution d'extraction utilisé (Encart 1).

5.2.2 Les conditions d'agitation

Les conditions d'extraction détaillées dans la littérature sont très variées, à la fois dans le type, la durée et la température d'agitation (Tableau 4). Il n'a pas pu être mis en évidence d'effet sur l'efficacité d'extraction dans les essais faisant varier ces différents paramètres (127) et lorsque des effets sont observés, l'interprétation n'est pas possible (123). D'une manière générale, il est recommandé d'opérer un traitement (agitation, sonication, voire les deux) vigoureux afin d'éviter la formation de micelles ou l'adsorption des endotoxines sur les parois de la verrerie. La majorité des protocoles effectue une extraction d'une durée de 1 heure à température ambiante ou entre 20-25°C. Une extraction à 68°C est parfois employée pour éviter les interférences dues aux protéines (voir section 6.5). Au regard des données disponibles, le protocole de la norme européenne avec une agitation de type orbitale à l'aide d'un agitateur standard, pendant 1 heure et à

température ambiante semble être un bon compromis pour extraire les endotoxines à partir des filtres (Tableau 1).

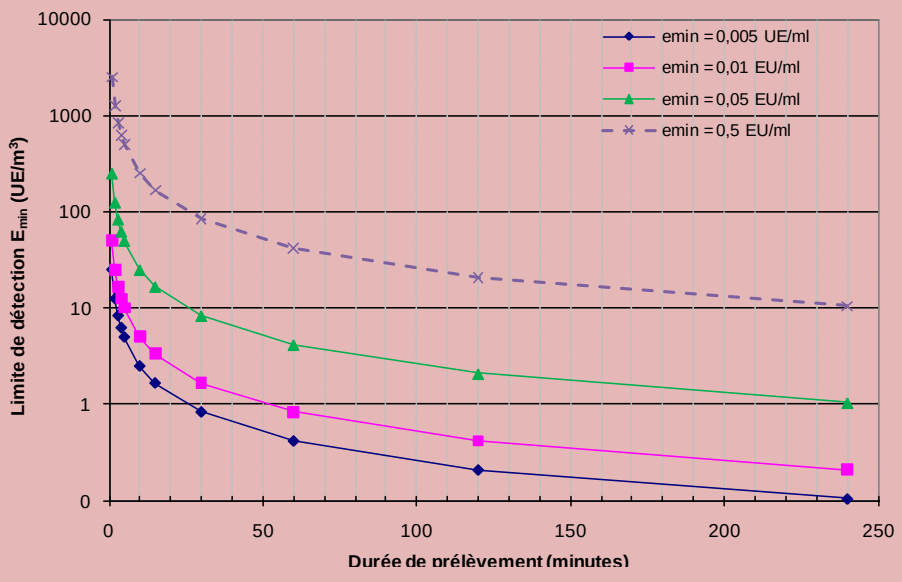
La concentration en endotoxines dans l'air est calculée grâce à l'équation (1). Pour des valeurs fixes de v_0 et de Q, elle est directement proportionnelle à la concentration en endotoxines mesurée dans l'extrait « e », au taux de dilution « d » et à l'inverse de la durée de prélèvement.

(1) $\mathbf{E} = [(\mathbf{e} \times \mathbf{v_0} \times \mathbf{d}) / (\mathbf{Q} \times \mathbf{t})] \times 10^3$

Équation 1 : Calcul de la concentration en endotoxines dans l'air. **E :** concentration en endotoxines dans l'air (UE/m^3), $\mathbf{v_0}$: volume de solution d'extraction (ml), **e :** concentration en endotoxines dans l'extrait (UE/ml), **t** : durée du prélèvement (min.), **Q :** débit de l'appareil de prélèvement (L/min.), **d** : taux de dilution de l'extrait.

La limite de détection de la méthode de mesure, $\mathbf{E_{min}}$, est définie comme la concentration minimum en endotoxines mesurable dans l'air. Elle est obtenue pour la concentration la plus faible d'endotoxines, $\mathbf{e_{min}}$, mesurable avec une variabilité acceptable par la méthode au LAL. En général, cette concentration $\mathbf{e_{min}}$ est obtenue pour le dernier point de gamme. Pour **d** = 1, $\mathbf{V_0}$ = 10 ml, et $\mathbf{e_{min}}$ = 0,01 UE/ml on a, $\mathbf{E_{min}} = 5 \times 10^1 / \mathbf{t}$.

La limite de détection $\mathbf{E_{min}}$ est donc inversement proportionnelle à la durée de prélèvement. Elle augmente à mesure que la limite de détection de la méthode LAL ($\mathbf{e_{min}}$) augmente. La représentation graphique est donnée ci-dessous.



Encart 1 : Calcul de la concentration en endotoxines dans l'air. Limite de détection et influence de la durée de prélèvement sur le résultat final.

Une étape de centrifugation est généralement ajoutée en fin d'extraction afin d'éliminer les particules les plus grosses. Elle permet également d'accélérer la sédimentation des fibres de verre issues de la désagrégation des filtres pendant l'extraction et qui peuvent induire des difficultés de pipetage. Un consensus, vraisemblablement empirique, incluant une centrifugation à 1000 g pendant 10 minutes semble se dégager dans la littérature.

5.3 Type d'aérosol prélevé

A côté des éléments évoqués ci-dessus, plusieurs travaux rapportent que, pour un même protocole, l'efficacité d'extraction peut varier en fonction de la nature de l'aérosol prélevé (58, 127). Ainsi, Gordon *et al.* (58) ont évalué l'efficacité d'extraction des endotoxines à partir de différents filtres et ce pour des aérosols d'origines différentes. Dans leurs essais, les conditions d'extraction étaient fixées et à la fois la nature de l'aérosol et le type de filtre employé variaient. Les résultats montrent que les filtres en fibres de verre présentent une efficacité d'extraction supérieure aux autres filtres lorsque l'aérosol prélevé est composé de particules minérales. En revanche, lorsque l'aérosol prélevé est composé de poussières de coton ou est issu de fluides de coupe, les filtres en acétate de cellulose et en PVC présentent une efficacité d'extraction supérieure à celle des filtres en fibres de verre. Dans cette même étude, aucune endotoxine n'avait pu être extraite à partir des filtres Mylar® utilisés pour le prélèvement d'aérosols de fluides de coupe. Des observations similaires ont été faites dans des travaux plus récents (127). On peut supposer que la nature particulière des bioaérosols issus des fluides de coupes a justifié la création d'une norme spécifique aux Etats Unis. Le nombre restreint d'études concernant ce problème ne permet pas de modifier les protocoles selon l'aérosol prélevé mais il sera peut être nécessaire de préciser le domaine d'application des méthodes à l'avenir.

5.4 Conditions de conservation des extraits

Plusieurs études se sont focalisées sur les modalités de conservation des extraits et, plus généralement, des solutions contenant des endotoxines avant le dosage. Ces études ont montré que les principaux facteurs affectant la quantité d'endotoxines dans l'échantillon lors de sa conservation étaient, la température et la durée de conservation, la nature de la verrerie employée pour conserver l'extrait ou encore la présence du filtre dans l'extrait lors de la conservation.

La température est l'un des paramètres clé de la conservation des extraits. Les travaux de Douwes *et al.*, (37) ont montré que la conservation à basse température (7°C)

de solutions d'endotoxines préparées à partir de produit pur n'affectait pas la teneur en endotoxines sur une durée de un an. Cependant, les fournisseurs de réactifs conseillent de ne pas conserver une solution d'endotoxines trop longtemps au réfrigérateur. En outre, des résultats contradictoires ont été observés dans la littérature lorsque des extraits préparés à partir d'échantillons d'air sont conservés à 4°C ou à -20°C. Ainsi, la concentration en endotoxines dans des extraits préparés à partir de filtres utilisés pour échantillonner de l'air dans une station de traitement des eaux usées augmente fortement dans les premiers jours de leur conservation à 4°C. Nous avons fait des observations similaires dans nos laboratoires. La congélation à -20°C de solutions d'extraction ou de solutions pures d'endotoxines conduit à une diminution de 20 à 25 % de l'activité initiale mesurable par la méthode LAL (37, 88). Une diminution de l'ordre de 28 % a été observée dans des extraits préparés à partir d'échantillons d'air prélevés dans différents environnements professionnels et conservés à - 70°C (95). Au contraire, une légère augmentation a été observée dans des extraits préparés à partir d'échantillons d'air urbain et conservés à -20°C (107). Dans leurs travaux, Spaan *et al.*, (150) n'ont observé aucune évolution de la quantité d'endotoxines présente dans des extraits d'échantillons prélevés dans des porcheries et dans des usines de préparation de graines, que ceux-ci soient conservés à 4°C ou à –20°C.

Plusieurs arguments peuvent être avancés pour expliquer ces observations. D'un côté, la température est un facteur important du contrôle de l'activité microbienne mais certains microorganismes psychrophiles seraient capables de se multiplier à basse température dans l'échantillon. Or, les endotoxines peuvent être libérées lors de la multiplication microbienne. D'un autre côté, il est reconnu qu'une population microbienne naturelle décline lorsqu'elle est conservée en dehors de son milieu naturel. Les causes de ce déclin sont multiples mais il a été montré qu'il conduisait à la lyse de cellules microbiennes. Or, c'est la lyse cellulaire qui est à l'origine de la libération d'endotoxines en grande quantité dans le milieu. Etant donnés qu'il n'est pas possible de prévoir l'évolution des extraits à 4°C, il est déconseillé de les conserver dans ces conditions. Les effets de la congélation sur les résultats de dosage s'expliquent par des changements de conformation des endotoxines que nous avons décrits dans la section 6.3.1. Toutefois, la congélation permet de conserver l'échantillon pendant un an sans évolution significative de sa teneur en endotoxines. Par contre, si l'échantillon subi plusieurs cycles de congélation / décongélation, la quantité d'endotoxines mesurable par la méthode LAL diminue fortement à raison de 25 % par cycle (37).

Comme il a été signalé dans les sections précédentes, la nature du filtre peut agir sur les endotoxines remises en suspension (adsorption) et leur analyse (inhibition, activation). Au même titre, on peut supposer que la présence du filtre dans la solution d'extraction peut agir sur la conservation de l'échantillon. Enfin, il a été démontré que la nature de la verrerie employée pour conserver l'extrait influençait les résultats du dosage LAL. Ceci est développé dans la section 6.3.1.

Au regard des données contradictoires de la littérature, il semble préférable de ne pas conserver un extrait à 4°C plus de quelques heures. En dernier recourt, la congélation à -20°C peut constituer une solution alternative envisageable sur laquelle il semble important d'obtenir un consensus.

6 Dosage des endotoxines par la méthode au LAL

La méthode de dosage des endotoxines retenue dans tous les documents de référence est la méthode au Lysat d'Amoebocytes de Limule (LAL) dite par chromogénie cinétique (Tableau 1).

6.1 Principe du dosage au LAL

La technique du Lysat d'Amoebocytes de Limule (LAL) est une méthode de dosage des endotoxines très sensible. Elle exploite les propriétés particulières et naturelles des amoebocytes de Limules. Les amoebocytes sont des cellules contenues dans l'hémolymphe d'un crabe, le Limulus, et qui ont la propriété de former un gel intracellulaire en présence d'endotoxines. La gélification est considérée comme une réaction de défense face à une infection de l'animal par des bactéries à Gram négatif.

Les composants du cytoplasme des amoebocytes de Limule ont été extraits dans le but de préparer un réactif pour la détection et le dosage des endotoxines. La technique de dosage des endotoxines au LAL est fondée sur le principe de la formation d'un caillot gélatineux lorsque les endotoxines entrent en contact avec le réactif préparé à partir des amoebocytes de limules. Le LAL contient des substances chimiques indispensables à la réaction. Ces substances sont des enzymes (procoagulase), des ions (Ca^{2+}, Mg^{2+}), une protéine coagulogène, et des facteurs d'activation (facteurs B, C et G). En présence d'endotoxines, le LAL est à l'origine d'un ensemble de réactions chimiques conduisant à la formation de coaguline, une protéine coagulante. Il existe plusieurs méthodes permettant de détecter et de quantifier les endotoxines à l'aide de l'essai au LAL. Le principe de ces différentes méthodes, toutes fondées sur la réaction évoquée ci-dessus, a déjà été décrit par ailleurs (61, 73, 99, 131) et ne sera pas développé dans ce chapitre.

Pour le dosage au LAL en chromogénie cinétique, la dernière étape est remplacée par une réaction enzymatique qui permet la dégradation d'un substrat peptidique incolore (par exemple, Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA) en un peptide d'une part et la p-nitroaniline (pNA) de couleur jaune d'autre part (Figure 2). La mise en contact des endotoxines avec le réactif LAL conduit au développement d'une couleur jaune dans le milieu réactionnel qui peut être suivi par spectrophotométrie à 405 nm (Figure 3A). Cette variante de la méthode LAL présente trois caractères essentiels. La courbe réactionnelle est une sigmoïde avec une phase de latence, une phase d'accélération et une phase stationnaire (plateau). La valeur absolue en densité optique est déterminée par la concentration du LAL en protéine coagulante. La vitesse d'accroissement de la densité optique est déterminée par la concentration en endotoxines. Le dosage par chromogénie cinétique conduit à une

meilleure estimation de la concentration en endotoxines dans des échantillons de poussières de coton (77).

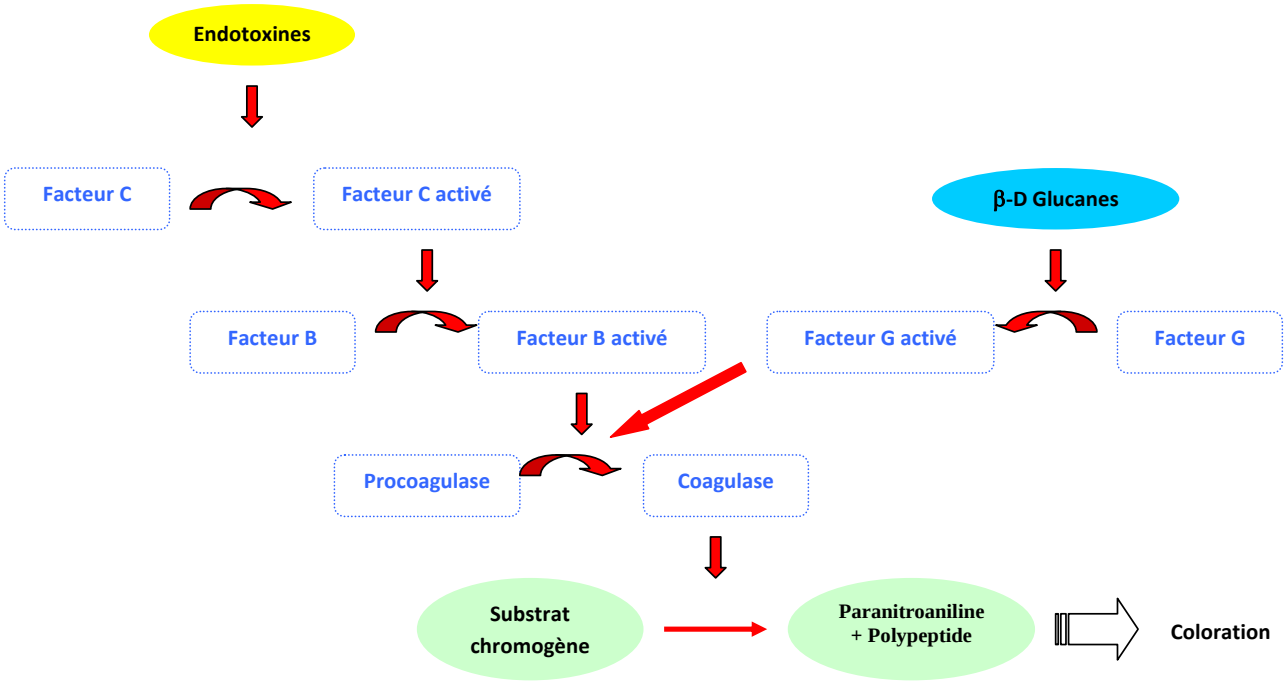


Figure 2 : Réactions en cascade des composants du Lysat d'Amoebocytes de Limule (LAL) déclenchées en présence des endotoxines. Pour le dosage des endotoxines par la méthode au LAL par chromogénie cinétique, la réaction en cascade aboutie au développement d'une coloration jaune dans le milieu réactionnel. Dans certains cas, les glucanes peuvent également conduire au même résultat par une autre voie.

Le dosage repose sur des mesures successives de la densité optique à 405 nm dans le milieu réactionnel (DO_{405}) et sur le calcul du temps de réaction. Le temps de réaction correspond à la durée d'incubation requise pour que la DO_{405} augmente de 0,2 unité dans le milieu réactionnel. En pratique, le dosage est le plus souvent effectué à l'aide de plaques de microtitration de 96 puits et d'un spectrophotomètre assurant à la fois la lecture de la DO_{405} et l'incubation. La quantité d'endotoxine présente dans un puits est obtenue en comparant le temps de réaction mesuré dans celui-ci (Figure 3B) avec les temps de réaction mesurés dans les puits contenant la gamme étalon (solutions de concentration connue en endotoxines). Les réactifs nécessaires au dosage sont proposés

par des fournisseurs spécialisés (Tableau 5) et les résultats sont exprimés en unités endotoxines (UE) par millilitre d'échantillon.

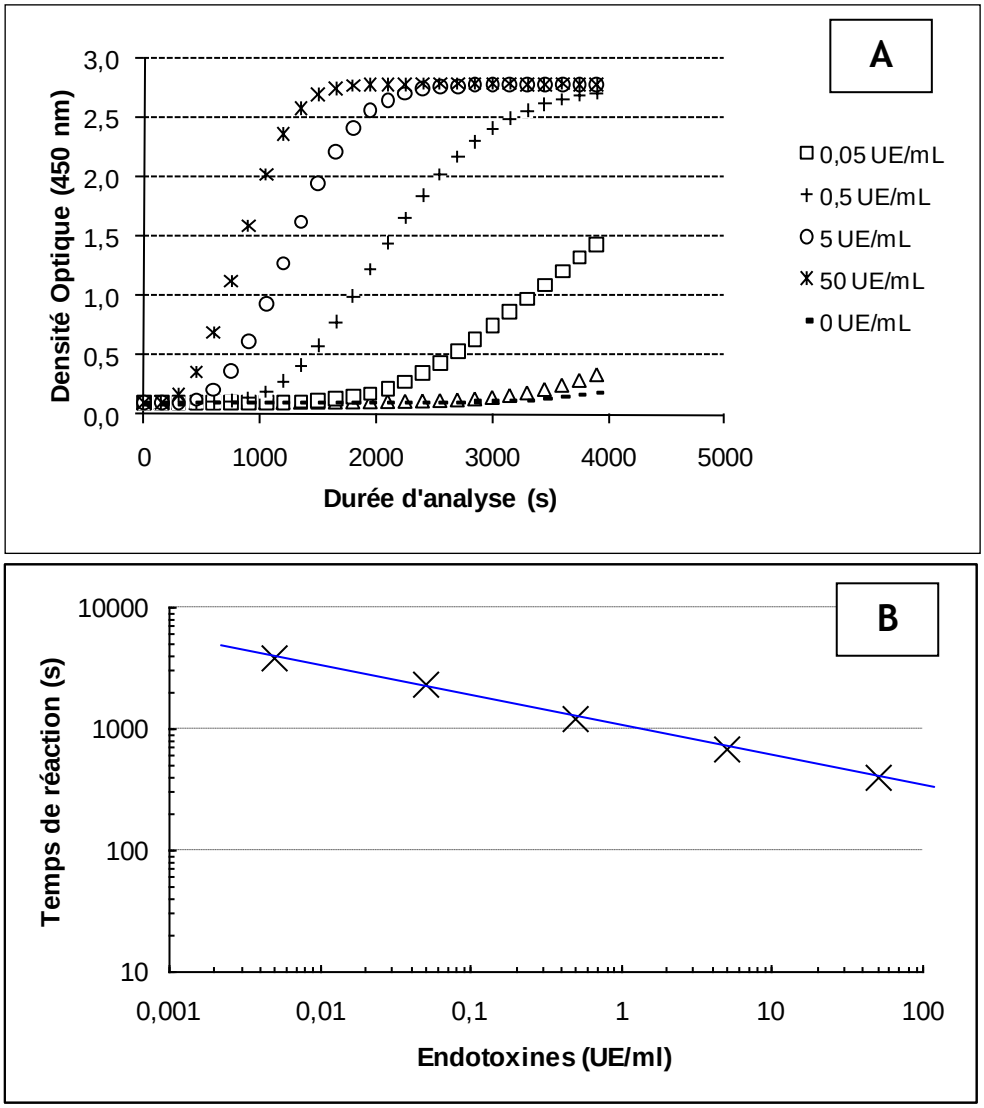


Figure 3 : Mesure des endotoxines par la méthode au LAL. **A :** évolution de la densité optique dans les puits contenant des solutions de concentration en endotoxines différentes. **B :** évolution du temps de réaction en fonction de la concentration en endotoxines.

6.2 Sensibilité de la méthode LAL

La méthode de dosage au LAL est très sensible. Selon les fournisseurs et la gamme étalon choisie et validée pour le dosage, il est possible de quantifier les endotoxines dans une solution contenant entre 0,005 voire 0,001 UE/ml (10 EU ~1 ng) et 20 à 50 UE/ml. Dans

l'air, la limite de quantification des endotoxines dépend du volume d'air prélevé (Encart 1).

Nom du Kit	Fabricant	Lysat[a]	Spécificité[b]	CSE[c]
Kinetic-QCL®	Lonza	*Lpol*	E/G	*E. coli* 055:B5
Endosafe®, Endochrome-K™	Charles-River	*Lpol*	E/G	*E. coli* 055:B5
Chromo-LAL	Associates of Cape Cod Inc	*Lpol*	E/G	*E. coli* O113:H10
Endospecy®	Seikagaku corp	*Ttri*	E	*E. coli* O133:H10
Toxicolor	Seikagaku corp	*Ttri*	E/G	*E. coli* O133:H10
ToxinSensor™	GenScript	*Lpol*	E	*E. coli* 055:B5

Tableau 5 : Description des principaux kits et réactifs commerciaux disponibles pour le dosage des endotoxines dans les échantillons d'air par la méthode en chromogénie cinétique. [a] : ***Lpol*** : *Limulus polyphemus* ; ***Ttri*** : *Trachypleus tridentatus* ; [b] : réactivité du LAL, **E** : réagit uniquement avec les endotoxines ; **E/G** : réagit avec les endotoxines et avec les glucanes ; [c] : Bactérie à partir de laquelle est préparée le CSE.

6.3 Sélectivité de la méthode LAL

La mise en contact des endotoxines avec les composants du réactif LAL déclenche une série de réactions enzymatiques en cascade (Figure 2). Certains facteurs tels le pH, la température ou la concentration en cations divalents agissent directement sur les composants du réactif et ont une influence importante sur le déroulement de la réaction et donc, sur le résultat final. Par ailleurs, la réaction LAL n'est pas totalement spécifique pour les endotoxines et des résultats positifs peuvent être observés avec d'autres substances. Le Tableau 6 présente une liste, non exhaustive, des facteurs et interférents décrits dans la littérature. Les effets des principaux facteurs et interférents sont détaillés dans la suite.

6.3.1 Facteurs liés aux endotoxines

6.3.1.1 Diversité de structure et activité

Le résultat de l'essai LAL est obtenu en comparant l'activité d'une quantité connue d'endotoxine d'activité connue (le standard) avec l'activité d'une quantité inconnue d'endotoxine dans un échantillon. La structure des endotoxines possède un schéma général que l'on retrouve quelque soit leur origine (Figure 4). Au delà de ce schéma général, cette structure montre des variations en fonction de la souche bactérienne dont les endotoxines sont issues (18, 85). Ces variations de structure ont un impact direct sur la toxicité des

endotoxines et leur réactivité à l'essai LAL (19, 46, 51). Ainsi, il a été démontré que les endotoxines ont des activités très différentes si elles sont extraites à partir de bactéries appartenant à des espèces différentes et même à partir de souches appartenant à une même espèce.

6.3.1.2 Agglutination

Les endotoxines sont des lipopolysaccharides dont la structure moléculaire présente un pôle hydrophile (partie polysaccharidique) et un pôle hydrophobe (lipide A). En raison de cette structure, les endotoxines sont susceptibles de réagir entre elles mais aussi avec de nombreuses autres substances chimiques. En solution aqueuse, elles peuvent s'agglutiner entre elles et former des structures de poids moléculaire plus important, appelées superstructures ou micelles (46). Ces structures diminuent leur réactivité vis à vis du LAL. Parmi les facteurs de l'agglutination, la concentration en cations est l'un des plus cités (28).

6.3.1.3 Pollution par des endotoxines exogènes

Le test LAL est un test très sensible ; la présence d'une faible quantité résiduelle d'endotoxine suffit à provoquer une réaction positive au test. Pour cette raison, il est essentiel d'utiliser des consommables et de la verrerie sans endotoxines et d'appliquer des modes opératoires limitant les risques de contamination. De plus, des contrôles négatifs doit être effectués tout au long du processus analytique afin de vérifier l'absence de contamination.

6.3.1.4 Adhésion sur les surfaces

Plusieurs auteurs ont mis en évidence les possibilités d'adsorption des endotoxines sur les parois de la verrerie utilisée lors des dosages. Ainsi, l'utilisation de tubes en verre minimise les phénomènes d'adsorption alors que d'autres matériaux tels le polypropylène les favorisent (111). Le verre est d'ailleurs cité comme matériaux de référence dans les différentes normes et autres méthodes standardisées. Le polypropylène peut être utilisé mais il est généralement recommandé d'évaluer au préalable le comportement de ce matériaux vis à vis des endotoxines (28, 44). Lors d'essais de conservation (4°C et -20°C) de solutions d'endotoxines pures dans des tubes en verre borosilicaté, en verre lisse et polypropylène apyrogènes, Douwes *et al.*, n'observent pas d'effet de la verrerie (37). Outre la composition chimique de la matière constituant la verrerie, des éléments chimiques issus de l'échantillon lui même ont un effet sur l'adsorption des endotoxines. En particulier, les protéines cationiques favorisent l'adsorption des endotoxines sur certaines surfaces (68, 176). Dans tous les cas, l'agglutination des endotoxines ou leur adhésion sur des parois diminuent leur réactivité vis à vis du LAL (46).

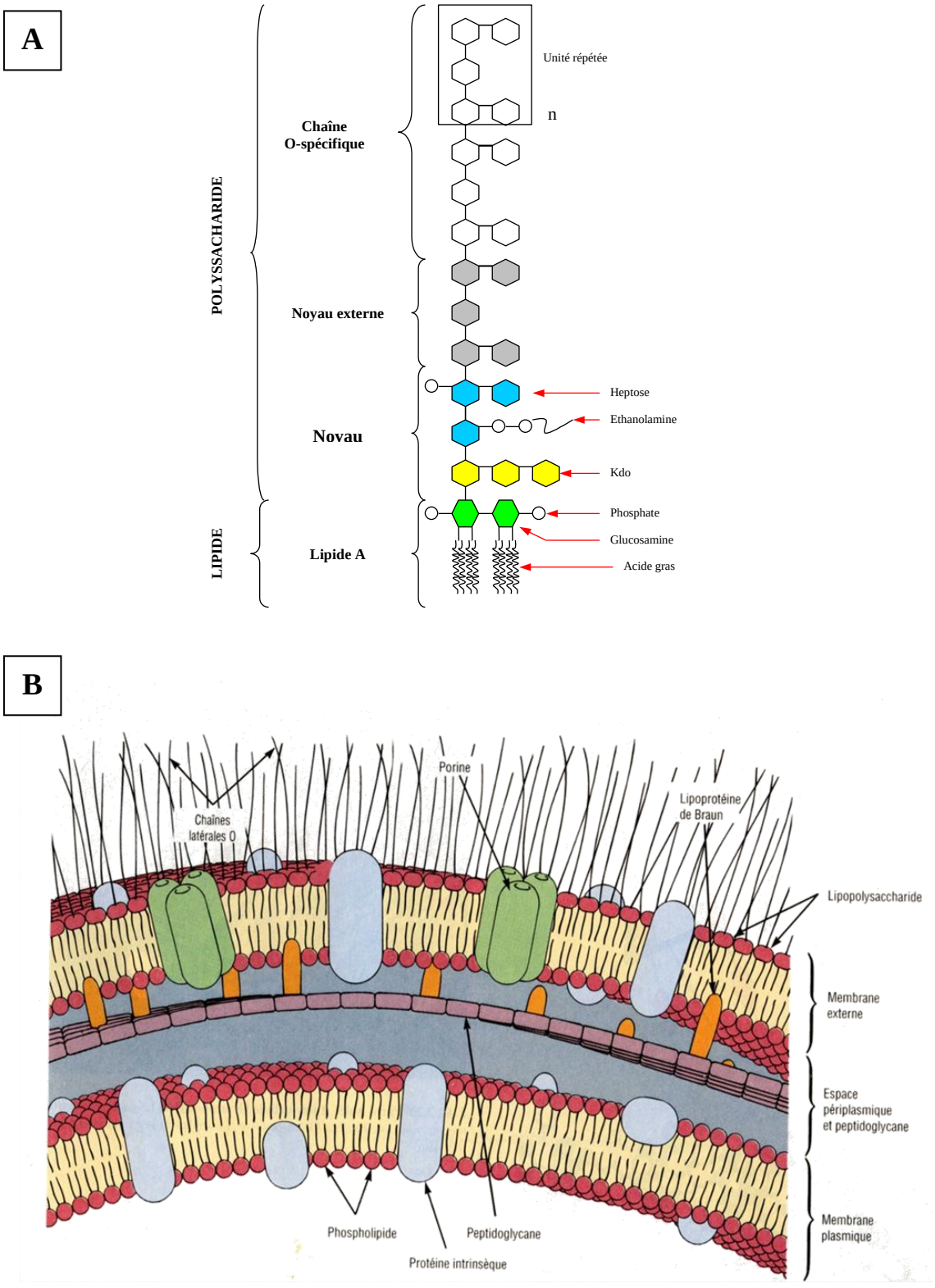


Figure 4 : Structures et organisation des endotoxines. **A :** Structure de l'endotoxine chez *Salmonella tiphimurium*. Kdo : acide 3-désoxy-D-manno-2 octulosique. **B :** Localisation des lipopolysaccharides dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif (d'après Prescott *et al.*, (117)).

6.3.2 Facteurs liés à la réaction LAL

6.3.2.1 Effets du pH et de la Température

La température optimale pour que la réaction se déroule correctement compris entre 36 et 38°C. A 25°C, la sensibilité du test est presque nulle et au delà de 45°C, l'activité enzymatique est détruite. La valeur optimale de pH pour la réalisation du test est comprise entre 6,4 et 8. Dans la pratique, les spectrophotomètres utilisés et préconisés permettent de maintenir la température d'incubation autour de 37°C. Pour le pH, le réactif LAL proposé par les différents fournisseurs est généralement tamponné. Il peut être utile de mesurer le pH des échantillons présentant des problèmes de dosage.

6.3.2.2 Effets de la concentration en ions

La réaction LAL est une réaction enzymatique qui possède des exigences particulières concernant la nature et la concentration des sels et des cations divalents qui doivent être présents dans le milieu réactionnel. Si ces conditions ne sont pas respectées, la réaction peut ne pas être optimale et le dosage devient alors imprécis voire impossible (Tableau 6). Le rôle des ions et la gestion des interférences qui leurs sont attribuées ont été abordés à plusieurs reprises dans la littérature (28, 61).

6.3.2.3 Les β-D-glucanes et autres composés cellulosiques

Les β-D-glucanes sont des polymères de D-glucose entrant dans la composition de la paroi des cellules de la plupart des champignons, des levures (S*accharomyces cerevisiae*) et des végétaux. Ils sont également présents dans le périplasme de certaines bactéries (*Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium loti*, *Azorhizobium caulinodans*, *Azospirillum brasilense, Agrobacterium* spp. *Rhizobium* et *Cellulomonas spp.*). Lorsque les β-D-glucanes sont présents dans le milieu réactionnel, ils sont susceptibles de déclencher la réaction LAL par l'intermédiaire de la voie du facteur G (Figure 2) et d'entraîner une surestimation de la concentration en endotoxines (128, 178). Cependant, les concentrations en glucanes nécessaires au déclenchement de la réaction LAL sont de 1000 à 400 000 fois supérieures aux concentrations en endotoxines activant la réaction LAL (128). La laminarine est une substance capable de bloquer la voie « facteur G » activée par les glucanes (177) et certains fournisseurs proposent des tampons bloquant la voie G.

Paramètres	Effets sur la réaction LAL	Valeur de référence	Références
Température	Contrôle de la cascade des réactions enzymatiques	*Réaction :* *- Optimale pour 36°C< T°<38°C* *- Nulle si 25°C<T°>45°C*	(28)
pH	Contrôle de la cascade des réactions enzymatiques	*Réaction optimale si 6.4<pH<8*	(28)
Cations			
Ca^{2+}	Interviennent dans la réaction enzymatique et la conformation des molécules d'endotoxines	*Réaction :* *- Optimale pour 25ppm< $[Ca^{2+}]$<50 ppm* *- Inhibée si $[Ca^{2+}]$>250 ppm*	(28)
Mg^{2+}		*Réaction :* *- Inhibée pour 25ppm< $[Mg^{2+}]$<50 ppm* *- Optimale pour $[Mg^{2+}]$>50 ppm*	
Na^{+}			
SDS	Inhibe la réaction en dénaturant les protéines	*Inhibition sensible à 0.01 %* *Inhibition sensible à 0.1 %*	(105, 158)
Urée	Inhibe la réaction en dénaturant les protéines	*Fortement inhibiteur*	(158)
EDTA	Inhibe la réaction en modifiant la structure des LPS Agit également comme agent chélateur des ions	*Réaction :* *- Non inhibée $[EDTA]=10^{-3}$ M* *- Inhibée pour $[Mg^{2+}]=10^{-2}$ M*	(158)
Citrate de Na **Glycine**	Inhibe la réaction LAL par un mécanisme inconnu	*Fortement inhibiteur à 100m/l*	(158)
Pénicilline G	Inhibe la réaction LAL par un mécanisme inconnu	*Agit à partir de 20 mg/l mais variable en fonction de la structure du LPS*	(158)
Polymixin B	Inhibe la réaction LAL par un mécanisme inconnu		(105)

Tableau 6 : Les facteurs agissants et interférents intervenants dans la réaction LAL.

6.3.3 Facteurs liés à la lecture

La méthode LAL par chromogénie met en œuvre une lecture par spectrophotométrie (405 nm). En conséquence, toute substance susceptible d'absorber dans ce domaine constitue un interférent potentiel.

6.4 Variabilité des réactifs

Les réactifs nécessaires au dosage comprennent l'endotoxine purifiée et le réactif LAL lyophilisé. Plusieurs auteurs soulignent qu'il existe des variations dans la préparation des réactifs susceptibles d'influencer les résultats du dosage LAL (33, 91, 173). Ceci concerne à la fois les réactifs provenant de différents fournisseurs et, pour un même

fournisseur, les réactifs provenant de lots différents. Ces variations sont imputées à la standardisation insuffisante des procédés de fabrication des réactifs disponibles sur le marché et à la variabilité biologique des organismes vivants à partir desquels ils sont produits.

La variabilité liée à l'endotoxine purifiée a, en grande partie, été éliminée par la création d'un étalon international. En effet, la méthode au LAL mesure la réactivité du LAL lorsqu'il est mis en contact avec les endotoxines (plus précisément avec le lipide A). Comme il a été précisé dans la section 6.3.1.1, la réactivité des endotoxines varie d'une souche bactérienne à l'autre. Il a donc été nécessaire de définir un étalon interne afin de standardiser la méthode au LAL. Cet étalon interne, appelé RSE (Reference Standard Endotoxin), a été défini aux Etats-Unis par la FDA (Food and Drug Administration) et au niveau international par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé). Cet étalon international correspond à une endotoxine purifiée à partir d'*Escherichia coli* souche EC-5 et pour laquelle la réactivité du LAL est connue. Comme le RSE ne peut pas être diffusé à grande échelle, les kits commerciaux contiennent un autre étalon interne, appelé CSE (Control Standard Endotoxin) dont l'activité par rapport au RSE est mesurée par les fournisseurs. Le CSE correspond à une endotoxine purifiée à partir d'une bactérie à GRAM négatif, généralement *Escherichia coli*, dont l'activité par rapport au RSE est précisée (en général 1 ng ≈ 10 UE).

La variabilité liée au réactif LAL est plus délicate à appréhender. En effet, le réactif LAL est préparé à partir de l'hémolymphe des limules dont il existe quatre espèces à l'heure actuelle (*Limulus polyphemus*, *Trachypleus tridentatus*, *Trachypleus gigas* et *Carcinoscorpius rotundicauda*). A l'heure actuelle, l'essentiel des lysats disponibles et nécessaires au dosage des endotoxines est préparé à partir de *L. polyphemus* (Tableau 5). Dans le passé, des lysats étaient également préparés à partir de *T. tridentatus* par l'un des fournisseurs, mais il semble que cela ne soit plus le cas. Toutefois, des différences de composition entre les réactifs préparés à partir d'animaux différents sont suspectées.

Pour autant les études comparatives publiées sont assez peu nombreuses. Une étude montre que l'analyse d'échantillons d'air issus de différents environnements professionnels peut conduire à des résultats 2,7 à 5 fois plus élevées selon le fournisseur choisi (95). Des différences ont également été observées sur des poussières d'habitation (105) et sur des cultures pures de microorganismes (137). Dans les essais inter-laboratoires publiés, les auteurs ont privilégié l'analyse avec des mêmes lots de manières à limiter la variabilité inter-lots. Il est donc recommandé de comparer des résultats de dosage LAL sur les bases

de réactifs « identiques ». Il est donc important de prendre en considération l'origine des réactifs lors de la comparaison des résultats.

6.5 Mise en évidence et levée des interférences

Les interférences sont mises en évidence par la méthode des ajouts dosés. Cette méthode consiste à ajouter une quantité connue d'endotoxines à chaque puits et à vérifier en fin d'analyse que le dosage permet bien de retrouver cette même quantité. En général, une interférence est mise en évidence lorsque le recouvrement des endotoxines à partir des ajouts dosés n'est pas compris entre 50 et 150 %, voire 200%. Pour lever ces interférences, l'analyse doit être refaite en diluant l'échantillon concerné. D'autres moyens peuvent être utilisés pour lever ces interférences (chauffage, neutralisation etc…), mais ceux-ci ne sont pas standardisés pour les échantillons d'air et doivent être validés (28, 69).

6.6 Critères d'acceptabilité d'un dosage LAL

Les critères de validité des dosages au LAL ne sont pas évoqués dans toutes les méthodes de références. Ces critères sont généralement rappelés par les fournisseurs et correspondent à ceux imposés par la pharmacopée (42). En résumé, la validation d'une analyse est conditionnée par la validité de la courbe d'étalonnage (valeur absolue du coefficient de corrélation supérieure à 0,98), l'absence d'interférences, l'absence d'endotoxines dans les témoins négatifs et un coefficient de variation entre deux répétitions inférieur à 10%.

6.7 Les autres méthodes de dosage des endotoxines

Bien que la méthode de dosage au LAL soit la plus répandue et la plus utilisée, il existe d'autres méthodes permettant de quantifier les endotoxines dans une solution.

Parmi les méthodes biologiques, la méthode ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay) a été utilisée. La sensibilité de la méthode est très bonne (0,001 UE/ml) mais sa spécificité n'a pas été étudiée (178, 179). Une autre méthode, dite « au facteur C recombinant » (rFC), a également été développée ces dernières années. Le facteur C est le premier composant de la cascade enzymatique de la réaction LAL (Figure 2). Au contact de la molécule d'endotoxine, il est converti de sa forme zymogène en une protéase sérine active. Le facteur C de la limule *Trachypleus tridentatus* a été purifié et cloné afin de produire un test de fluorescence (33, 34). Le facteur rFC est activé par le contact avec les endotoxines et catalyse le clivage d'un substrat peptide-coumarine et la coumarine émet de la fluorescence lorsqu'elle est excitée à la longueur d'onde adéquate (Figure 5). La

fluorescence émise est proportionnelle à la concentration en endotoxines dans le milieu réactionnel et le signal est linéaire dans la gamme 0,01-10 UE/ml. Le test est plus rapide (environ une heure), n'est pas sensible aux glucanes et ne subit pas de variabilité d'un lot à l'autre. Deux études ont montré une bonne corrélation entre les résultats de mesure obtenus avec les deux méthodes d'analyses au LAL et au rFC bien que la méthode au LAL conduise à des valeurs parfois plus élevées (6, 165). A notre connaissance, un seul kit est commercialisé à l'heure actuelle (Pyrogene®, Lonza).

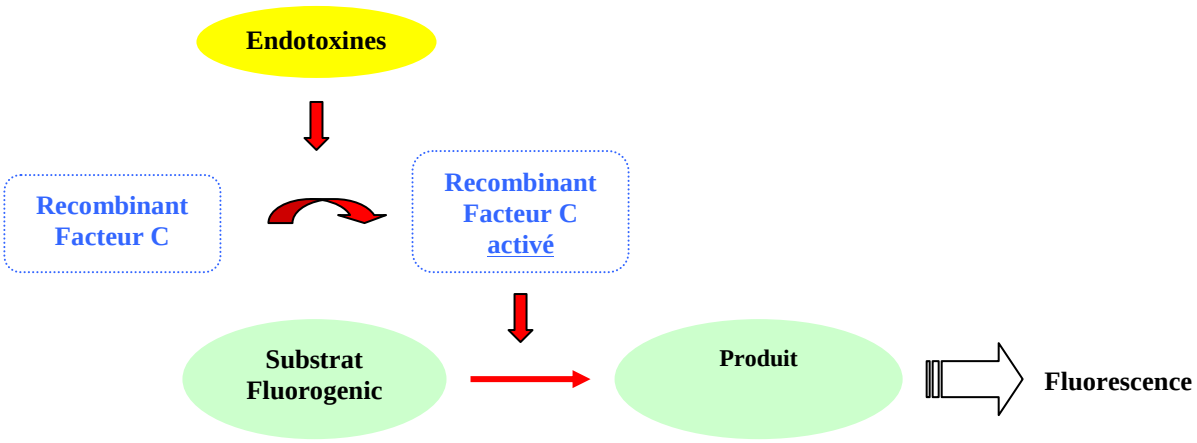


Figure 5 : Réaction du « facteur-C recombinant » (rFC) déclenchée en présence des endotoxines. Pour le dosage des endotoxines par la méthode au rFC par fluorimétrie, la réaction aboutit au développement d'une fluorescence dans le milieu réactionnel. Le rFC ne réagit pas aux glucanes.

Parmi les méthodes chimiques, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) est également proposée comme méthode alternative à la méthode au LAL. La GC-MS quantifie les extrémités 3-OH des acides gras constituants le lipide A des molécules d'endotoxines. L'analyse comprend une séparation des composés selon leur volatilité puis une détection des molécules selon leur rapport masse/charge. Une étape d'ionisation des composés volatilisés est nécessaire avant passage dans le détecteur ; elle peut se faire par voie chimique (CI) ou par voie électronique (EI). La quantité est effectuée en référence à une gamme étalon d'endotoxines et les résultats sont exprimés en pg ou en ng par échantillon. Plusieurs méthodes ont été étudiées ou développées (13, 138). La comparaison de ces méthodes chimiques avec la méthode au LAL (148) ou au recombinant (134) révèle des corrélations relativement faibles et des résultats

obtenus en GC/MS souvent majorés par rapport à ceux obtenus avec les méthodes biologiques. Un essai inter-laboratoires a montré que les méthodes chimiques étaient insuffisamment standardisées pour l'analyse des endotoxines (125). Les méthodes fondées sur la GC/MS demandent un temps de préparation plus long pour les échantillons, concernent des séries d'échantillons plus restreintes et sont plus coûteuse et nécessites un équipement lourd. La mise en œuvre des protocoles analytiques est relativement lourde et la sensibilité est relativement mauvaise. En revanche elles apportent des données précieuses sur la biochimie des endotoxines et permettent de quantifier à la fois les endotoxines libres et les endotoxines liées à la membrane, non nécessairement accessibles avec les autres méthodes.

Remarque : Une réflexion est actuellement en cours concernant le devenir des populations de limules, qui semblent décliner progressivement (49), et leur exploitation pour la préparation du réactif LAL (169). Les autres méthodes utilisables pour le dosage des endotoxines pourraient constituer des méthodes alternatives à la méthode au LAL.

7 Expression et interprétation des résultats

A l'heure actuelle, il n'existe pas de Valeur Limite d'Exposition Professionnel définie pour les endotoxines au niveau international. De ce fait, l'interprétation des données de mesure reste un point non encore élucidé et la plupart des méthodes de référence ne proposent pas d'indication dans ce sens. Pour autant dans cette partie, nous avons tenté de rassembler l'essentiel des connaissances.

7.1 Expression des résultats

Toutes les méthodes de références préconisent une expression des résultats de mesure en unités endotoxines (UE) par mètre cube d'air prélevé (Tableau 1). Dans la plupart des études recensées dans le Tableau 2, la quantité d'endotoxines est exprimée en unité UE. L'expression en unité de masse (nanogrammes) semble disparaitre progressivement mais reste encore utilisée. L'unité endotoxines ou UE est l'unité de mesure de la réactivité du LAL. L'utilisation de l'unité UE plutôt que l'unité de masse est plus adaptée dans la mesure où l'activité biologique des endotoxines, à masse identique, varie fortement d'une souche bactérienne à l'autre. Elle reflète l'activité des endotoxines vis à vis du LAL et pourrait correspondre d'avantage à une mesure de toxicité. L'unité internationale (UI) d'endotoxine est définie comme l'activité spécifique d'une masse donnée de l'étalon international ; elle est équivalente à l'UE.

7.2 Corrélation entre en endotoxines et dénombrement bactérien

Les informations disponibles concernant la quantité d'endotoxines présente dans une cellule bactérienne à gram négatif sont relativement limitées. Toutefois, deux revues bibliographiques rapportent qu'une cellule bactérienne contient entre 10 et 40 femtogrammes de LPS (7, 73). Les mesures d'endotoxines au LAL sont généralement corrélées aux concentrations en bactéries à gram négatif dans des cultures bactériennes pures ou des échantillons apparentés (7, 74). Pour les échantillons d'air, la corrélation est moins évidente. Plusieurs études de terrain menées dans différents environnements professionnels ont permis d'investiguer la corrélation entre les niveaux de concentration en endotoxines mesurés et les concentrations en bactéries dans l'air. Parmi celles-ci, plusieurs montrent une bonne corrélation entre les niveaux d'endotoxines mesurés par la méthode au LAL et les concentrations en bactéries à gram négatif cultivables (5, 56) en bactéries totales cultivables (5, 87, 157), ou en bactéries totales par épifluorescence (170). Au contraire, dans d'autres études, ces corrélations n'ont pas été observées (114,

124) ou sont relativement faibles (110). Dans l'étude de Rieman et Uitti (121), les concentrations en endotoxines dans l'air ne sont pas corrélées à celles des bactéries à gram négatif mais elles sont corrélées aux concentrations en microorganismes cultivables totaux. Enfin, dans une autre étude, les auteurs n'ont pas calculé de corrélation mais signalent que les concentrations en endotoxines et en bactéries cultivables évoluent dans le même sens (90).

La mesure des endotoxines aéroportées avec la méthode au LAL témoigne de la présence de bactéries gram-négatives dans l'environnement investigué à un moment donné. Rappelons que les LPS sont également présents chez les cyanobactéries (120, 156). En revanche, elle ne donne aucune information sur la viabilité des bactéries et n'est pas systématiquement corrélée aux mesures des bactéries dans l'air. L'absence de corrélation peut être expliquée soit par la persistance de LPS issus des microorganismes morts et lysés soit par l'inadéquation de la méthode et des milieux choisis pour le dénombrement des microorganismes.

7.3 Corrélation entre endotoxines et mesure pondérale des poussières

La relation entre les endotoxines et les poussières inhalables a été étudiée par de nombreux auteurs. Des corrélations significatives ont ainsi été mises en évidence dans différents secteurs d'activité comme le compostage des déchets (45, 139, 160), l'agriculture, l'agro-industrie et l'élevage du bétail (98, 129, 154, 165) et l'industrie du bois (63, 114). Par ailleurs, des corrélations modérées et faibles ont également été observées dans l'industrie du coton (9, 116) et dans des scieries (36) respectivement. Pour les activités peu génératrices d'empoussièrement comme le traitement des eaux usées ou les fluides de coupes, peu de données de corrélation sont disponibles.

Cependant, les corrélations calculées au niveau global peuvent cacher des disparités lorsque l'on considère des activités plus spécifiques à l'intérieur des secteurs d'activité et même des usines. Les travaux récemment publiés par une équipe Hollandaise illustrent bien cette remarque. Spaan *et al.*, (152) ont mené une étude statistique sur plus de 2000 mesures d'exposition individuelles rassemblées dans une base de données. Les données avaient été collectées à l'occasion d'une dizaine de campagnes de mesure menées dans différents secteurs d'activité (culture et transformation des denrées agricoles, élevage, abattoirs…). L'exploitation statistique de ces données montre un coefficient de corrélation, tous secteurs confondus, relativement important (r = 0,75). Cependant, les corrélations entre les poussières inhalables et les endotoxines aéroportées varient

beaucoup d'un secteur d'activité à l'autre et, pour un même secteur, d'une industrie à l'autre pouvant aboutir, tantôt à une forte corrélation, tantôt à l'absence de corrélation. Des observations similaires ont été effectuées dans une étude plus ancienne.

Des corrélations entre les endotoxines et les poussières inhalables ont été identifiées dans certains secteurs d'activité. Toutefois dans ces secteurs, la mesure des poussières inhalables ne constitue pas systématiquement une approximation de la mesure des endotoxines dans toutes les situations. Aussi, les mesures de prévention prises pour réduire les poussières seront-elles utiles dans certains cas, mais elles ne pourront probablement pas réduire les expositions aux endotoxines de manière systématique et à tous les postes de travail (98).

7.4 Endotoxines libres et endotoxines liées

Comme il a déjà été précisé, l'activité des endotoxines sur le réactif LAL dépend de la forme sous laquelle elles se présentent dans le milieu réactionnel. Sur ce point, des études anciennes menées sur des cultures bactériennes pures, suggèrent que la méthode au LAL ne permet pas de doser totalement les endotoxines liées à la membrane cellulaire (80, 102). En effet, le lipide A ne pourrait pas activer les enzymes nécessaires au déclanchement de la réaction LAL lorsque la molécule de LPS est encore enchâssée dans la membrane plasmique. Cette limite est invoquée par certains auteurs pour expliquer, en partie, les différences observées entre les résultats donnés par les méthodes chimiques et par la méthode biologique pour le dosage des endotoxines dans les échantillons d'air (125, 153). La méthode au LAL sous-estimerait donc la quantité d'endotoxines effectivement présente dans les échantillons d'air. Ces observations sont d'autant plus importantes que des données expérimentales suggèrent que l'activité biologique (i.e. la toxicité) des endotoxines inhalées reste élevée lorsque celles-ci sont liées (133). Toutefois, aucune étude n'a été menée récemment sur ce sujet et l'impact de cette limite de la méthode au LAL sur les résultats de mesure n'est pas bien élucidé. Des études complémentaires semblent encore nécessaires pour en préciser la portée.

7.5 Toxicité des endotoxines au niveau pulmonaire

Bien qu'ils ne soient pas encore totalement élucidés, les mécanismes de la toxicité des endotoxines au niveau pulmonaire sont relativement bien connus et documentés (24, 163). Comme il a été précisé dans la section 3.1, les endotoxines sont présentes dans les aérosols sous la forme de particules de tailles très variables. Une fois inhalées, ces particules sont susceptibles de se déposer sur les parois des voies respiratoires avec une probabilité étroitement liée à leur taille (175). Les dépôts s'effectuent dans trois régions

anatomiques distinctes du système respiratoire, identifiées comme la région extra-thoracique (nez, bouche larynx et pharynx), la voie trachéo-bronchique (trachée, bronches) et la région alvéolaire (bronchioles et alvéoles pulmonaires). Le dépôt préférentiel des particules dans l'une ou l'autre de ces régions anatomiques est lui même directement dépendant de leur taille. Au niveau des régions extra-thoracique et trachéo-bronchique, les LPS déposés sont, en grande partie, éliminés mécaniquement par le transport muco-ciliaire. En revanche, les particules déposées dans la région alvéolaire sont éliminées par les macrophages après phagocytose.

Au niveau pulmonaire, les effets connus des endotoxines sont surtout inflammatoires. Les LPS sont pris en charge par les protéines du surfactant qui sont sécrétées par les cellules épithéliales (pneumocytes de type II) de l'appareil respiratoire (notamment par les alvéoles pulmonaires). Le complexe « LPS / protéines du surfactant » interagit alors avec des récepteurs membranaires spécifiques des macrophages alvéolaires dont les principaux sont TLR4 et mCD14. Cette interaction provoque l'activation des macrophages qui, entre autre, sécrètent de façon accrue des médiateurs de l'inflammation comme certains radicaux libres (NO) et des cytokines (les interleukines IL-1, IL-6 ; le facteur de nécrose tumorale TNF-α). Les LPS provoquent une réaction inflammatoire au niveau local mais également des effets systémiques après diffusion des cytokines dans le sang.

Enfin, les progrès récents en toxicologie suggèrent que le polymorphisme des gènes codants pour les récepteurs membranaires, impliqués dans la reconnaissance des composés bactériens, puisse expliquer les différences de sensibilité qui peuvent être observées entre les individus. Concernant les endotoxines, un polymorphisme des gènes codants pour le récepteur de type « Toll » TLR4 (Toll Like Receptor 4) et portant sur un seul nucléotide est associé à une réaction réduite chez les sujets exposés à des LPS (47, 140).

7.6 Risques liés à l'exposition aux endotoxines

Les propriétés inflammatoires des endotoxines inhalées sont impliquées dans plusieurs types de pathologies observées en milieu professionnel. L'exposition aux endotoxines a ainsi pu être associée à des effets sur la santé des travailleurs dans des secteurs professionnels aussi diversifiés que l'industrie du coton (112), l'élevage des animaux (64) et le traitement des eaux usées (147).

Les effets délétères directs sur la santé consécutifs à l'inhalation d'endotoxines ont été bien décrits par Rylander (130, 132). Ainsi, une exposition aigüe et massive à des endotoxines et à des poussières organiques est mise en cause dans la genèse du syndrome toxique des poussières organiques ou ODTS. Ce syndrome pseudo-grippal se caractérise par

une augmentation de la température corporelle, des frissons, une toux sèche et des douleurs musculaires et au niveau des articulations. La maladie apparaît six à dix heures après l'exposition, dure peu de temps et les symptômes disparaissent quelques jours après l'exposition. Un phénomène d'adaptation peut se produire suite à des expositions répétées. Des effets ont également été observés au niveau systémique (fièvre, douleurs musculaires et articulaires, fatigue importante). Par ailleurs, une exposition durable aux endotoxines peut dégrader la fonction respiratoire et conduire à la bronchite chronique et ses complications. De même, l'inhalation d'endotoxines pourrait également avoir des effets délétères indirects sur la santé. En particulier, les endotoxines favoriseraient le développement et la persistance de certaines maladies allergiques comme la pneumopathie d'hypersensibilité et l'asthme allergique. Ces effets indirects ne sont pas clairement démontrés et sont attribués à la fois au fort pouvoir adjuvant qui est conféré aux endotoxines par leur caractère antigénique et à leurs propriétés inflammatoires (159). En marge de ces effets négatifs, une hypothèse dite « hygiéniste » défend la thèse selon laquelle l'exposition aux endotoxines aurait des effets positifs sur la santé. Les endotoxines agiraient sur le développement de la sensibilité aux maladies allergiques et comme antagonistes à la prolifération des cellules cancéreuses (118). Cette hypothèse « hygiéniste » est encore controversée.

7.7 La relation dose-effet

Les informations précises concernant la relation dose-réponse entre l'exposition aux endotoxines et les symptômes observés ne sont pas disponibles. Les études expérimentales d'exposition visant à évaluer la relation dose-effet pour les endotoxines ont été nombreuses (52). Pour autant, les concentrations en endotoxines à partir desquelles apparaissent des symptômes précis sont assez variables d'une étude à une autre. A titre d'exemple, des atteintes pulmonaires ont été observées à partir de 450 UE/m^3 lors d'une étude menée dans l'industrie du coton (112) et à 100 UE/m^3 pour une autre étude menée dans des porcheries (64). Par ailleurs, la revue bibliographique de Douwes et Heederik (35) montre un « niveau sans effet » calculé compris entre approximativement 90 et 1700 UE/m^3.

Les raisons invoquées pour expliquer cette difficulté à établir une relation dose-effet stable à partir des études de terrain sont multiples. D'abord, l'absence de consensus sur le choix de la méthode et des stratégies utilisées pour mesurer l'exposition des salariés rend les résultats des études épidémiologiques parfois difficilement comparables. Ensuite, les symptômes liés à une exposition aux endotoxines ne sont pas spécifiques et ils pourraient être attribués à l'exposition à d'autres polluants atmosphériques pouvant agir en tantôt en

synergie, tantôt en antagonistes. Effectivement, les salariés exposés aux endotoxines peuvent également être exposés à d'autres composés de l'enveloppe cellulaire microbienne (1,3-β-D-glucanes ; acide muramique ; acide lipoteichoïque ; peptydoglycanes, mannan, chitine…) suspectés eux-mêmes d'être à l'origine de pathologies. Ensuite, d'autres raisons comme la sensibilité variable d'un individu à l'autre ou les effets contradictoires possibles des endotoxines sur la santé peuvent également être incriminés.

7.8 Les recommandations existantes et leurs limites

En dépit des difficultés rencontrées pour établir une relation dose-effet reconnue, plusieurs recommandations ont été formulées ou proposées afin de faciliter l'interprétation des données de mesure. Rylander (132) a ainsi suggéré un niveau « sans effets » (*i.e.* : absence d'inflammation des voies respiratoires) de l'ordre de 10 ng/m^3 (soit environ 100 UE/m^3), niveau. Il a également proposé un niveau de 100 ng/m^3 (soit environ 1000 UE/m^3) pour l'apparition des effets systémiques et de 200 ng/m^3 (soit environ 2000 UE/m^3) pour l'apparition des symptômes liés à l'ODTS. Malgré ces recommandations, aucune valeur réglementaire n'est disponible actuellement. Dans un premier temps, une VLEP de 50 EU/m^3 a bien été proposée dès 1998 aux Pays-Bas (65). Finalement en 2001, le ministère Néerlandais des affaires sociales a ramené cette valeur à 200 UE/m^3, valeur qui a constitué une référence pendant quelques années mais qui a finalement été abandonnée. En juillet 2010, un comité d'expert du ministère de la santé des Pays-Bas a publié un rapport proposant une nouvelle VLEP à 90 UE/m^3 (29).

Une approche alternative consiste à utiliser une valeur limite d'exposition relative. Cette méthode a été proposée par l'AGCIH et elle est utilisée par l'IRSST (2). Elle consiste à comparer les valeurs mesurées au poste de travail à celles mesurées à un point de prélèvement référent (niveau de base). La valeur limite utilisée lorsque des problèmes de santé sont reconnus parmi les salariés est de 10 fois la valeur mesurée au point référent. Lorsqu'aucun problème n'est recensé, cette valeur limite correspond à 30 fois ce niveau de base. La principale difficulté liée à cette approche réside dans le choix du point de prélèvement référent, souvent situé à l'extérieur, et dans la reconnaissance de symptômes pertinents au sein de la population de salariés. Il faut noter que l'AGCIH ne propose plus de guide d'interprétation (3).

8 Conclusions

La mesure des endotoxines dans l'air a fait l'objet de nombreux travaux de recherche au cours de la dernière décennie et la littérature disponible sur ce sujet est importante. Des méthodes normalisées existent également et constituent un progrès indéniable. Toutefois, ces méthodes de références ne sont pas internationales et présentent des divergences et des imprécisions au niveau des protocoles décrits. En pratique, toutes les méthodes employées pour mesurer les endotoxines dans l'air des lieux travail ne tiennent pas comptes des recommandations formulées dans les documents de référence. De ce fait, les protocoles utilisés dans les travaux correspondants présentent des différences relativement importantes d'une étude à l'autre et ceci, sur toutes les étapes du processus de mesurage (méthode de prélèvement, transport des échantillons, extraction, analyse…).

Un effort de standardisation est donc indispensable pour réduire la variabilité inter-laboratoire et permettre, à terme, de meilleures possibilités d'exploitation des données inter-études. Le processus de mesurage des endotoxines dans l'air comprend différentes étapes qui influencent les résultats et leur interprétation. Le prélèvement, le transport, la conservation et l'analyse des échantillons sont des opérations indissociables dont il faut tenir compte pour la mise en place et la standardisation de la méthode. Ceci passe d'abord par une amélioration de la précision du protocole de façon à limiter les possibilités d'interprétation des opérateurs concernant les paramètres qui pourraient être source de variabilité. Ensuite, les recherches récentes apportent des connaissances importantes qui doivent être intégrées dans un document de référence. Les recommandations qui peuvent être formulées à la lumière des derniers progrès effectués ont été rassemblées dans le Tableau 7.

Pour autant, un effort de recherche est également nécessaire afin d'améliorer les connaissances encore insuffisantes sur plusieurs sujets. Concernant la méthode de mesure, des études complémentaires sont nécessaires afin de mieux définir des paramètres comme la durée de prélèvement, les conditions de conservation des échantillons et la nécessité de prendre en compte les dépôts dans le processus analytique. Les recherches devraient également s'orienter vers la définition d'une méthode alternative à la méthode au LAL qui exploite les populations de limules sujettes au déclin. Ces travaux sur la méthode doivent être accompagnés d'une réflexion sur la stratégie de mesure de l'exposition et, la variabilité de l'exposition aux endotoxines doit être investiguée d'avantage. Par ailleurs, des recherches complémentaires en toxicologie, en épidémiologie ainsi que la constitution de bases de données, devraient faciliter l'interprétation des résultats de mesures.

Etapes / paramètres	Recommandations	Commentaires
Domaine d'application	Tout type d'environnement de travail	La méthode devra être validée sur des types d'aérosols différents
Prélèvement		
Méthode		
Principe	Filtration	-
Dispositif	Cassette fermée-3-pièces	-
Nature du filtre	Fibre de verre sans liant	Préciser le type de filtre (GF/A etc..)
Traitement des filtres	250°C/90 min.	Ou tout autre traitement thermique démontré efficace
Préparation des cassettes		Assurer l'étanchéité des cassettes. Caractère apyrogène ?
Conditions de prélèvement et éléments de stratégie		
Débit / fraction prélevée	2 L/min	Le prélèvement doit permettre d'échantillonner la fraction inhalable (long et court)
Durée	A expérimenter	
Type de prélèvement	Individuel	Le prélèvement individuel doit être privilégié pour les mesures d'exposition
	Ambiance	Le prélèvement en ambiance est réservé à l'identification des sources et à la cartographie des niveaux de concentration. Dans ce cas, l'orifice de captage de la cassette doit être orienté vers l'activité.
Nombre de prélèvements	Indéterminé	Multiplier le nombre de mesures pour une meilleure représentativité.
Autres paramètres	Prélèvement de référence	Les prélèvements de référence sont effectués dans des zones supposées non contaminées (extérieur, bureau etc…).
	Blancs de terrain	Les blancs de terrains sont constitués de cassettes emmenées sur le terrain, non utilisées pour le prélèvement et analysées comme un échantillon.
	Effets saisonniers	Il eut être nécessaire d'effectuer les mesures à des saisons différentes.
Transport des échantillons		
Forme de transport	Les filtres sont transportés dans leur cassette et dans une enceinte réfrigérée	-
Température	4°C	Les échantillons sont conservés à -20°C si les échantillons ne peuvent pas être acheminés au laboratoire sous 24h00.
Durée	24h00	A expérimenter dans différents secteurs d'activité.
Atmosphère	*Atmosphère déshydratée*	Utiliser un produit déshydratant comme un gel de silice.
Conservation avant analyse	*-20°C*	-
Extraction		
Fluide d'extraction		
Nature du fluide	EPSA+Tween 20 à 0,05%	-
Volume de fluide	10 ml	Volume à adapter selon la taille du filtre.
Paramètres d'extraction		
Type d'extraction	Agitation vortex 2000 rpm	-
Durée d'extraction	60 min.	-
Température d'extraction	25°C +/- 2°C	-
Centrifugation	1000 G, 10 min., 4°C	-
Conservation des extraits	Analyse le jour même	Conservation à -20°C si l'extraction ne peut être effectuée rapidement après le prélèvement.
Dosage		
Méthode	Dosage LAL cinétique chromogène	Noter le numéro de lot des kits utilisés.
Consommables	Apyrogènes et en matériaux non adsorbants	Privilégier le verre pour les tubes et les consommables valider par les fournisseurs.
Autres paramètres	Vérification des interférences	Les interférences sont mises en évidence par la méthode des ajouts dosés.
Expression des résultats	UE/m^3	-

Tableau 7 : Résumés des principales recommandations pour la standardisation d'une méthode de mesure des endotoxines dans l'air.

Le travail bibliographique réalisé dans le cadre de cet article apporte des informations qui permettent à l'opérateur de mieux appréhender la mise en œuvre de la méthode. Il permet de faire le point sur l'état d'avancement de la standardisation de la méthode de mesure des endotoxines dans l'air des lieux de travail et sur les recherches nécessaires. Il constitue une base de travail (Tableau 7) pour mener la réflexion nécessaire au niveau international en vue d'aboutir à un consensus sur cette méthode.

9 Références Bibliographiques

1. **AFNOR (Association Francaise de Normalisation).** 2008. Air des lieux de travail : prélèvement d'aérosol à l'aide d'une cassette (orifice 4 mm).
2. **AGCIH.** 1999. Bioaerosols : Assessment and control. AGCIH, Cincinnati.
3. **AGCIH.** 2010. TLVs® and BEIs® - Threshold Limit Values for Chemical Substances and Biological Exposure Indices, Cincinnati.
4. **Albrecht, A., K. Kiel, and A. Kolk.** 2007. Strategies and Methods for Investigation of Airborne Biological Agents From Work Environments in Germany. *International Journal of Occupational Safety and Ergonomics* **13:**201–213.
5. **Alwis, K. U., J. Mandryk, and A. D. Hocking.** 1999. Exposure to Biohazards in Wood Dust: Bacteria, Fungi, Endotoxins, and (1 3)-beta-D-Glucans. Applied Occupational and Environmental Hygiene **14:**598-608.
6. **Alwis, K. U., and D. K. Milton.** 2006. Recombinant factor C assay for measuring endotoxin in house dust: Comparison with LAL, and (1,3)-beta-D-glucans. American Journal of Industrial Medicine **49:**296-300.
7. **Anderson, W. B., R. M. Slawson, and C. I. Mayfield.** 2002. A review of drinking-water-associated endotoxin, including potential routes of human exposure. Canadian journal of microbiology **48:**567-87.
8. **ASTM International (American Society for Testing and Material).** 2007. E2144-1 - Standard Practice for Personal Sampling and Analysis of Endotoxin in Metalworking Fluid Aerosols in Workplace Atmospheres. ASTM International (American Society for Testing and Material).
9. **Astrakianakis, G., N. Seixas, J. Camp, T. J. Smith, K. Bartlett, and H. Checkoway.** 2006. Cotton Dust and Endotoxin Exposure Levels in Three Shanghai Textile Factories: A Comparison of Samplers. Journal of Occupational and Environmental Hygiene **3:**418 - 427.
10. **Attwood, P., P. Versloot, D. Heederik, R. I. De Wit, and J. S. M. Boleij.** 1986. Assessment of dust and endotoxin levels in the working environment of dutch pig farmers : a preliminary study. Annals of Occupational Hygiene **30:**201-208.
11. **Baron, P. A., A. Khanina, A. B. Martinez, and S. A. Grinshpun.** 2002. Investigation of Filter Bypass Leakage and a Test for Aerosol Sampling Cassettes. Aerosol Science and Technology **36:**857 - 865.
12. **BGIA.** 2002. 9450 - Verfahren zur Bestimmung der Endotoxinkonzentration in der luft am arbeitsplatz. BGIA-Arbeitsmappe, Kennzahl **28:**1-7.
13. **Binding, N., S. Jaschinski, S. Werlich, S. Bletz, and U. Witting.** 2004. Quantification of bacterial lipopolysaccharides (endotoxin) by GC-MS determination of 3-hydroxy fatty acids. Journal of environmental monitoring **6:**65-70.
14. **Bonlokke, J. H., A. Meriaux, C. Duchaine, S. Godbout, and Y. Cormier.** 2009. Seasonal variations in work-related health effects in swine farm workers. Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM **16:**43-52.
15. **Bracker, A., E. Storey, C. Yang, and M. J. Hodgson.** 2003. An Outbreak of Hypersensitivity Pneumonitis at a Metalworking Plant: A Longitudinal Assessment of

Intervention Effectiveness. Applied Occupational and Environmental Hygiene **18:**96 - 108.

16. **Brisson, M. J., and M. M. Archuleta.** 2009. The Real Issue with Wall Deposits in Closed Filter Cassettes : What's the Sample? Journal of Occupational and Environmental Hygiene **6:**783 - 788.

17. **Buchan, R. M., S. C. Soderholm, and M. I. Tillery.** 1986. Aerosol Sampling Efficiency of 37 mm Filter Cassettes. American Industrial Hygiene Association Journal **47:**825 - 831.

18. **Caroff, M., and D. Karibian.** 2003. Structure of bacterial lipopolysaccharides. Carbohydrate Research **338:**2431-47.

19. **Caroff, M., D. Karibian, J. M. Cavaillon, and N. Haeffner-Cavaillon.** 2002. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. Microbes and Infection **4:**915-26.

20. **Carty, C. L., U. Gehring, J. Cyrys, W. Bischof, and J. Heinrich.** 2003. Seasonal variability of endotoxin in ambient fine particulate matter. Journal of environmental monitoring **5:**953-8.

21. **CEN (Comité Européen de Normalisation).** 1993. Atmosphères des lieux de travail - Définitions des fractions de taille pour le mesurage des particules en suspension dans l'air. Norme Europènne EN 481. Classement AFNOR X43-276.

22. **CEN (Comité Européen de Normalisation).** 2000. EN 13098 - Air des lieux de travail - Règles pour le mesurage des micro-oorganismes et d'endotoxine en suspension dans l'air. Indice de classement X 43-247.

23. **CEN (Comité Européen de Normalisation).** 2003. NF EN 14031 - Atmosphère des lieux de travail - Détermination des endotoxines en suspension dans l'air. Norme Européenne.

24. **Chaby, R.** 2010. Des endotoxines aux lipopolysaccharides : structure, activité cellulaire et effets physiopathologiques, Paris.

25. **Chun, D. T., V. Chew, K. Bartlett, T. Gordon, R. Jacobs, B. M. Larsson, D. M. Lewis, J. Liesivuori, O. Michel, R. Rylander, P. S. Thorne, E. M. White, V. C. Gunn, and H. Wurtz.** 2002. Second inter-laboratory study comparing endotoxin assay results from cotton dust. Annals of Agriculture and Environmental Medecine **9:**49-53.

26. **Chun, D. T., V. Chew, K. Bartlett, T. Gordon, R. R. Jacobs, B. M. Larsson, L. Larsson, D. M. Lewis, J. Liesivuori, O. Michel, D. K. Milton, R. Rylander, P. S. Thorne, E. M. White, and M. E. Brown.** 2000. Preliminary report on the results of the second phase of a round- robin endotoxin assay study using cotton dust. Applied occupational and environmental Hygiene **15:**152-7.

27. **Chun, D. T. W., K. Bartlett, T. Gordon, R. R. Jacobs, B.-M. Larsson, L. Larsson, D. M. Lewis, J. Liesivuori, O. Michel, D. K. Milton, R. Rylander, P. S. Thorne, E. M. White, M. E. Brown, V. S. Gunn, and H. Würtz.** 2006. History and results of the two inter-laboratory round robin endotoxin assay studies on cotton dust. American Journal of Industrial Medicine **49:**301-306.

28. **Cooper, J. F.** 1990. Resolving LAL Test interferences. Journal Of Parenteral Science And Technology **44:**13-15.

29. **DECOS, D. E. C. o. O. S.** 2010. Endotoxines : Health-based recommended occupational limit.

30. **Deloge-Abarkan, M., T.-L. Ha, E. Robine, D. Zmirou-Navier, and M. Mathieu.** 2007. Detection of airborne Legionella while showering using liquid impingement and fluorescent in situ hybridization (FISH). Journal of Environmental Monitoring **9:**91-97.

31. **Delucca, A. J., and M. S. Palmgren.** 1987. Seasonal variation in aerobic bacterial populations and endotoxin concentrations in grain dusts. American Industrial Hygiene Association journal **48:**106-110.

32. **Demange, M., P. Gorner, J.-M. Elcabache, and R. Wrobel.** 2002. Field Comparison of 37-mm Closed-Face Cassettes and IOM Samplers. Applied Occupational and Environmental Hygiene **17:**200 - 208.

33. **Ding, J. L., and B. Ho.** 2001. A new era in pyrogen testing. Trends in Biotechnology **19:**277-281.

34. **Ding, J. L., M. A. Navas, 3rd, and B. Ho.** 1995. Molecular cloning and sequence analysis of factor C cDNA from the Singapore horseshoe crab, Carcinoscorpius rotundicauda. Molecular marine biology and biotechnology **4:**90-103.

35. **Douwes, J., and D. Heederik.** 1997. Epidemiologic Investigations of Endotoxins. International Journal of occupational and Environmental Health **3:**S26-S31.

36. **Douwes, J., D. McLean, E. v. d. Maarl, D. Heederik, and N. Pearce.** 2000. Worker exposures to airborne dust, endotoxin and beta(1,3)-glucan in two New Zealand sawmills. American Journal of Industrial Medicine **38:**426-430.

37. **Douwes, J., P. Versloot, A. Hollander, D. J. Heederik, and G. Doekes.** 1995. Influence of various dust sampling and extraction methods on the measurement of airborne endotoxin. Applied and Environmental Microbiology **61:**1763-1769.

38. **Duchaine, C., P. S. Thorne, A. Meriaux, Y. Grimard, P. Whitten, and Y. Cormier.** 2001. Comparison of Endotoxin Exposure Assessment by Bioaerosol Impinger and Filter-Sampling Methods. Applied and Environmental Microbiology **67:**2775-2780.

39. **Duquenne, P., P. Gorner, D. Ambroise, J.-F. Fabries, and G. Greff-Mirguet.** 2004. Presented at the 20ème Congrès Français sur les Aérosols (CFA 2004), Paris, 7-8 décembre 2004.

40. **Duquenne, P., R. Wrobel, G. Greff-Mirguet, and P. Gorner.** 2006. Presented at the 22ème Congrès Français sur les Aérosols (CFA 2006), Paris (France), 29-30 novembre 2006.

41. **Dutkiewicz, J., E. Krysinska-Traczyk, C. Skorska, G. Cholewa, and J. Sitkowska.** 2002. Exposure to airborne microorganisms and endotoxin in a potato processing plant. Annals of agricultural and environmental medicine **9:**225-235.

42. **EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare).** 2010. Pharmacopée Européenne - 6ième Edition - 2.6.14. Essai des endotoxines bactériennes.

43. **Eduard, W., J. Lacey, S. Karls, U. Palmgren, G. Ström, and G. Blomquist.** 1990. Evaluation of Methods for Enumerating Microorganisms in Filter Samples from Highly Contaminated Occupational Environments. American Industrial Hygiene Association journal **51:**427-436.

44. **EN14031.** 2003. Atmosphère des lieux de travail - Détermination des endotoxines en suspension dans l'air.

45. **Epstein, E., N. Wu, C. Youngberg, and G. Croteau.** 2001. Dust and bioaerosols at a biosolids composting facility. Compost science & utilization **9:**250-255.

46. **Erridge, C., E. Bennett-Guerrero, and I. R. Poxton.** 2002. Structure and function of lipopolysaccharides. Microbes and Infection **4:**837-851.

47. **Fageras-Böttcher, M., M. Hmani-Aifa, A. Lindström, M. C. Jenmalm, X.-M. Mai, L. Nilsson, H. A. Zdolsek, B. Björkstén, P. Söderkvist, and O. Vaarala.** 2004. A TLR4 polymorphism is associated with asthma and reduced lipopolysaccharide-induced interleukin-12(p70) responses in Swedish children. The Journal of allergy and clinical immunology **114:**561-567.

48. **Fahlbusch, B., A. Koch, J. Douwes, W. Bischof, U. Gehring, K. Richter, H.-E. Wichmann, and J. Heinrich.** 2003. The effect of storage on allergen and microbial agent levels in frozen house dust. Allergy **58:**150-153.

49. **Faurby, S., T. L. King, M. Obst, E. M. Hallerman, C. Pertoldi, and P. Funch.** 2010. Population dynamics of American horseshoe crabsâ€"historic climatic events and recent anthropogenic pressures. Molecular Ecology **19:**3088-3100.

50. **Fishwick, D., L. J. Allan, A. Wright, and A. D. Curran.** 2001. Assessment of Exposure to Organic Dust in a Hemp Processing Plant. The Annals of Occupational Hygiene **45:**577-583.

51. **Friberger, P.** 1985. The design of a reliable endotoxin test. Progress in Clinical and Biological Research **189:**139-49.

52. **Gehin, D.** 2009. Les endotoxines en milieu de travail. Doctorat en médecine. Université Paris Descartes, Paris.

53. **Gilbert, Y., M. Veillette, A. Meriaux, J. Lavoie, Y. Cormier, and C. Duchaine.** 2010. Metalworking fluid-related aerosols in machining plants. Journal of occupational and environmental hygiene **7:**280-9.

54. **Gladding, T., J. Thorn, and D. Stott.** 2003. Organic dust exposure and work-related effects among recycling workers. American Journal of Industrial Medicine **43:**584-591.

55. **Golbabaei, F., and F. Islami.** 2000. Evaluation of workers' exposure to dust, ammonia and endotoxin in poultry industries at the province of Isfahan, Iran. Industrial health **38:**41-6.

56. **Gora, A., B. Mackiewicz, P. Krawczyk, M. Golec, C. Skorska, J. Sitkowska, G. Cholewa, L. Larsson, M. Jarosz, A. Wojcik-Fatla, and J. Dutkiewicz.** 2009. Occupational exposure to organic dust, microorganisms, endotoxin and peptidoglycan among plants processing workers in Poland. Annals of agricultural and environmental medicine **16:**143-50.

57. **Gordon, T., K. Galdanes, and L. Brosseau.** 1992. Comparaison of sampling media for endotoxin-contaminated aerosol. Applied Occupational and Environmental Hygiene **7:**472-477.

58. **Gordon, T., K. Galdanes, and L. Brosseau.** 1992. Comparison of sampling media for endotoxin-contaminated aerosol. Applied Occupational and Environmental Hygiene **7:**472-477.

59. **Görner, P., J.-F. Fabries, P. Duquenne, O. Witschger, and R. Wrobel.** 2006. Bioaerosol sampling by a personal rotating cup sampler CIP 10-M. Journal of Environmental Monitoring **8:**43-48.

60. **Gorner, P., X. Simon, R. Wrobel, E. Kauffer, and O. Witschger.** 2010. Laboratory Study of Selected Personal Inhalable Aerosol Samplers. The Annals of Occupational Hygiene **54:**165-187.

61. **Greff-Mirguet, G.** 2002. Echantillonnage et analyse des endotoxines dans l'air. Cahier de notes documentaires - Hygiène et sécurité du travail**:**73-87.

62. **Halstensen, A. S., K. C. Nordby, I. M. Wouters, and W. Eduard.** 2007. Determinants of Microbial Exposure in Grain Farming. The Annals of Occupational Hygiene **51:**581-592.

63. **Harper, M., and M. E. Andrew.** 2006. Airborne endotoxin in woodworking (joinery) shops. Journal of environmental monitoring **8:**73-8.

64. **Heederik, D., R. Brouwer, K. Biersteker, and J. S. M. Boleij.** 1991. Relationship of airborne endotoxin and bacteria levels in pig farms with the lung function and respiratory symptoms of farmers. International Archives of Occupational and Environmental Health **62:**595-601.

65. **Heederik, D., and J. Douwes.** 1997. Towards an occupational exposure limit for endotoxins ? Annals of Agriculture and Environmental Medecine **4:**17-19.

66. **Heinrich, J., M. Pitz, W. Bischof, N. Krug, and P. Borm.** 2003. Endotoxin in fine (PM2.5) and coarse (PM2.5-10) particle mass of ambient aerosols. A temporo-spatial analysis. Atmospheric Environment **37:**3659-3667.

67. **Heldal, K. K., L. Madso, P. O. Huser, and W. Eduard.** 2010. Exposure, symptoms and airway inflammation among sewage workers. Annals of agricultural and environmental medicine **17:**263-268.

68. **Hirayama, C., and M. Sakata.** 2002. Chromatographic removal of endotoxin from protein solutions by polymer particles. Journal of Chromatography B **781:**419-432.

69. **Hollander, A., D. Heederik, P. Versloot, and J. Douwes.** 1993. Inhibition and enhancement in the analysis of airborne endotoxin levels in various occupational environments. American Industrial Hygiene Association Journal **54:**647-53.

70. **Holst, O., A. J. Ulmer, H. Brade, H. Flad, and E. T. Rietschel.** 1996. Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. FEMS Immunology and Medical Microbiology **16:**83-104.

71. **Hryhorczuk, D., L. Curtis, P. Scheff, J. Chung, M. Rizzo, C. Lewis, N. Keys, and M. Moomey.** 2001. Bioaerosol emissions from a suburban yard waste composting facility. Annals of Agriculture and Environmental Medecine **8:**177-185.

72. **Huntington, M. K., J. F. Williams, and C. D. Mackenzie.** 2007. Endotoxin contamination in the dental surgery. Journal of Medical Microbiology **56:**1230-1234.

73. **Hurley, J. C.** 1995. Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. Clinical Microbiological Reviews **8:**268-92.

74. **Hurley, J. C., and F. A. Tosolini.** 1992. A quantitative micro-assay for endotoxin and correlation with bacterial density in urine. Journal of Microbiological Methods **16:**91-99.

75. **INRS.** 2010. Fiche METROPOL 089/V02 : Endotoxines. Recueil -Métropol : http://www.inrs.fr/.

76. **IRSST.** 2009. Analytical Method 322 - Endotoxin analysis.

77. **Jacobs, R. R., and D. T. Chun.** 2004. Inter-laboratory analysis of endotoxin in cotton dust samples. American Journal of Industrial Medicine **46:**333-337.

78. **Jensen, P. A., and M. P. Schafer.** 1998. Sampling and characterization of bioaerosols. NIOSH Manual of analytical methods**:**84-112.

79. **Jensen, P. A., W. F. Todd, G. N. Davis, and P. V. Scarpino.** 1992. Evaluation of eight bioaerosol samplers challenged with aerosols of free bacteria. American Industrial Hygiene Association Journal **53:**660 - 667.

80. **Jorgensen, J. H., and R. F. Smith.** 1974. Measurement of bound and free endotoxin by the Limulus assay. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine **146:**1024-31.

81. **Kauffer, E., R. Wrobel, P. Gorner, C. Rott, M. Grzebyk, X. Simon, and O. Witschger.** 2010. Site Comparison of Selected Aerosol Samplers in the Wood Industry. The Annals of Occupational Hygiene **54:**188-203.

82. **Kenny, L. C., A. R., C. C., J. F. Fabries, E. Gonzalez-Fernandez, H. Kromhout, G. Liden, D. Mark, G. Riediger, and V. Prodi.** 1997. A collaborative European study of personal inhalable aerosol sampler performance. The Annals of Occupational Hygiene **41:**135-153.

83. **Kenny, L. C., J. D. Stancliffe, B. Crook, S. Stagg, W. D. Griffiths, I. W. Stewart, and S. J. Futter.** 1998. The adaptation of existing personnal inhalable aerosol samplers for bioaerosol sampling. American Industrial Hygiene Association Journal **59:**831-841.

84. **Kirychuk, S. P., S. J. Reynolds, N. Koehncke, J. Nakatsu, and J. Mehaffy.** 2009. Comparison of endotoxin and particle bounce in marple cascade samplers with and without impaction grease. Journal of Agromedicine **14:**242-9.

85. **Kosma, P.** 1999. Chlamydial lipopolysaccharide. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease **1455:**387-402.

86. **Kunjundzic, E., M. Hernandez, and S. L. Miller.** 2006. Particle size distributions and concentrations of airborne endotoxin using novel collection methods in homes during the winter and summer seasons. Indoor air **16:**216-226.

87. **Laitinen, S., A. Nevalainen, M. Kotimaa, J. Liesivuori, and P. J. Martikainen.** 1992. Relationship between bacterial counts and endotoxin concentrations in the air of wastewater treatment plants. Appl Environ Microbiol **58:**3774-6.

88. **Laitinen, S. K.** 1999. Importance of sampling, extraction and preservation for quantification of biologically active endotoxin. Annals of Agriculture and Environmental Medecine **6:**33-38.

89. **Laitinen, S. K., J. Kangas, K. Husman, and P. Susitaival.** 2001. Evaluation of exposure to airborne bacterial endotoxins and peptidoglycans in selected work environments. Annals of Agriculture and Environmental Medecine **8:**213-219.

90. **Laitinen, S. K., J. Kangas, M. Kotimaa, J. Liesivuori, P. J. Martikainen, A. Nevalainen, R. Sarantila, and K. Husman.** 1994. Workers' Exposure to Airborne Bacteria and Endotoxins at Industrial Wastewater Treatment Plants. American Industrial Hygiene Association journal **55:**1055-1060.

91. **Lane, S., P. Nicholls, and R. Sewell.** 2004. The Measurement and Health Impact of Endotoxin Contamination in Organic Dusts from Multiple Sources: Focus on the Cotton Industry. Inhalation Toxicology **16:**217-229.

92. **Li, C.-S.** 1999. Evaluation of Microbial Samplers for Bacterial Microorganisms. Aerosol Science and Technology **30:**100-108.

93. **Li, S.-N., D. A. Lundgren, and D. Rovell-Rixx.** 2000. Evaluation of Six Inhalable Aerosol Samplers. AIHAJ - American Industrial Hygiene Association **61:**506 - 516.

94. **Liebers, V., T. Brüning, and M. Raulf-Heimsoth.** 2006. Occupational endotoxin-exposure and possible health effects on humans (review). American Journal of Industrial Medicine **49:**474-491.

95. **Liebers, V., M. Raulf-Heimsoth, G. Linsel, N. Goldscheid, M. Duser, H. Stubel, and T. Bruning.** 2007. Evaluation of Quantification Methods of Occupational Endotoxin Exposure. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: **70:**1798 - 1805.

96. **Madsen, A. M.** 2006. Airborne endotoxin in different background environments and seasons. Annals of Agriculture and Environmental Medecine **13:**81-6.

97. **Madsen, A. M.** 2006. Exposure to Airborne Microbial Components in Autumn and Spring During Work at Danish Biofuel Plants. Annals of Occupational Hygiene **50:**821-831.

98. **Madsen, A. M., V. M. Hansen, S. H. Nielsen, and T. T. Olsen.** 2009. Exposure to Dust and Endotoxin of Employees in Cucumber and Tomato Nurseries. Annals of Occupational Hygiene **53:**129-138.

99. **Marchand, G.**? Les endotoxines en milieu de travail. Document de l'IRSST**:**1-37.

100. **Marchand, G., M. C. Barrette, and J. Lesage.** 2009. Analytical Method 322 - Endotoxin analysis. **http://www.irsst.qc.ca/media/documents/PubIRSST/M-332-en.pdf:**15p.

101. **Marchand, G., M. Lalonde, Y. Beaudet, G. Boivin, S. Villeneuve, and C. Pepin.** 2007. Documentation of the endotoxins present in the ambient air of cotton fiber textile mills in Quebec. Journal of environmental monitoring **9:**869-76.

102. **Mattsby-Baltzer, I., K. Lindgren, B. Lindholm, and L. Edebo.** 1991. Endotoxin shedding by enterobacteria: free and cell-bound endotoxin differ in Limulus activity. Infection and Immunity **59:**689-695.

103. **Mehta, A. J., X. R. Wang, E. A. Eisen, H. L. Dai, G. Astrakianakis, N. Seixas, J. Camp, H. Checkoway, and D. C. Christiani.** 2008. Work Area Measurements as Predictors of Personal Exposure to Endotoxin and Cotton Dust in the Cotton Textile Industry. The Annals of Occupational Hygiene **52:**45-54.

104. **Milton, D. K., R. J. Gere, H. A. Feldman, and I. A. Greaves.** 1990. Endotoxin measurement: aerosol sampling and application of a new Limulus method. American Industrial Hygiene Association Journal **51:**331-7.

105. **Milton, D. K., D. K. Johnson, and J. H. Park.** 1997. Environmental endotoxin measurement: interference and sources of variation in the Limulus assay of house dust. American Industrial Hygiene Association Journal **58:**861-7.

106. **Morey, P. R.** 2007. Microbiological sampling strategies in indoor environments, p. 273. *In* C. S. a. H. P. Yang (ed.), Sampling and analysis of indoor microorganisms. John Woley and sons, Hoboken.

107. **Morgenstern, V., W. Bischof, A. Koch, and J. Heinrich.** 2006. Measurements of endotoxin on ambient loaded PM filters after long-term storage. Science of The Total Environment **370:**574-579.

108. **Mueller-Anneling, L., E. Avol, J. M. Peters, and P. S. Thorne.** 2004. Ambient Endotoxin Concentrations in PM10 from Southern California. Environmental Health Perspectives **112:**583-8.

109. **Nielsen, B. H., E. M. Nielsen, and N. O. Breum.** 2000. Seasonal variation in bioaerosol exposure during biowaste collection and measurements of leaked percolate. Waste management and research **18:**64-72.

110. **Nielsen, M., H. Würtz, B. H. Nielsen, N. O. Breum, and O. M. Poulsen.** 1997. Relationship between different bioaerosol parameters sampled from the breathing zone of waste collectors - identification of the most important parameters. Annals of Agriculture and Environmental Medecine **4,:**81-85.

111. **Novitsky, T. J., J. Schmidt-Gengenbach, and J. F. Remillard.** 1986. Factors affecting recovery of endotoxin adsorbed to container surfaces. Journal of parenteral science and technology **40:**284-286.

112. **Oldenburg, M., U. Latza, and X. Baur.** 2007. Exposure-response relationship between endotoxin exposure and lung function impairment in cotton textile workers. International Archives of Occupational and Environmental Health **80:**388-395.

113. **Oppliger, A., S. Hilfiker, and T. Vu Duc.** 2005. Influence of Seasons and Sampling Strategy on Assessment of Bioaerosols in Sewage Treatment Plants in Switzerland. Ann Occup Hyg **49:**393-400.

114. **Oppliger, A., S. Rusca, N. Charriere, T. Vu Duc, and P.-O. Droz.** 2005. Assessment of Bioaerosols and Inhalable Dust Exposure in Swiss Sawmills. The Annals of Occupational Hygiene **49:**385-391.

115. **Park, J. H., D. L. Spiegelman, H. A. Burge, D. R. Gold, G. L. Chew, and D. K. Milton.** 2000. Longitudinal study of dust and airborne endotoxin in the home. Environmental health perspectives **108:**1023-8.

116. **Paudyal, P., S. Semple, R. Niven, G. Tavernier, and J. G. Ayres.** 2010. Exposure to Dust and Endotoxin in Textile Processing Workers. The Annals of occupational hygiene**:**1-7.

117. **Prescott, M. L., J. P. Harley, and D. A. Klein.** 2010. Microbiologie, Deuxième éditon Française (2ieme tirage 2007) ed. Deboeck.

118. **Radon, K.** 2006. the tow sides of the "endotoxins coin". Occupational and Environmental Medicine **63:**73-78.

119. **Radon, K., B. Danuser, M. Iversen, E. Monso, C. Weber, J. Hartung, K. J. Donham, U. Palmgren, and D. Nowak.** 2002. Air contaminants in different European farming environments. Annals of agricultural and environmental medicine **9:**41-8.

120. **Rapala, J., K. Lahti, L. A. Rasanen, A.-L. Esala, S. I. Niemela, and K. Sivonen.** 2002. Endotoxins associated with cyanobacteria and their removal during drinking water treatment. Water Research **36:**2627-2635.

121. **Reiman, M., and J. Uitti.** 2000. Exposure to microbes, endotoxins and total dust in cigarette and cigar manufacturing: an evaluation of health hazards. The Annals of Occupational Hygiene **44:**467-473.

122. **Reynolds, S. J., D. W. Black, S. S. Borin, G. Breuer, L. F. Burmeister, L. J. Fuortes, T. F. Smith, M. A. Stein, P. Subramanian, P. S. Thorne, and P. Whitten.** 2001. Indoor environmental quality in six commercial office buildings in the midwest United States. Applied Occupational and Environmental Hygiene **16:**1065-77.

123. **Reynolds, S. J., and D. K. Milton.** 1993. Comparaison of methods for analysis of airborne endotoxin. Applied Occupational and Environmental Hygiene **9:**761-767.

124. **Reynolds, S. J., and D. K. Milton.** 1993. Comparison of methods for analysis of airborne endotoxin. Applied Occupational and Environmental Hygiene **9:**761-767.

125. **Reynolds, S. J., D. K. Milton, D. Heederik, P. S. Thorne, K. J. Donham, E. A. Croteau, K. M. Kelly, J. Douwes, D. Lewis, M. Whitmer, I. Connaughton, S. Koch, P. Malmberg, B. M. Larsson, J. Deddens, A. Saraf, and L. Larsson.** 2005. Interlaboratory evaluation of endotoxin analyses in agricultural dusts--comparison of LAL assay and mass spectrometry. Journal of environmental monitoring **7:**1371-7.

126. **Reynolds, S. J., J. Nakatsu, M. Tillery, T. Keefe, J. Mehaffy, P. S. Thorne, K. Donham, M. Nonnenmann, V. Golla, and P. O'shaughnessy.** 2009. Field and Wind Tunnel Comparison of Four Aerosol Samplers Using Agricultural Dusts. Annals of occupational hygiene:mep021.

127. **Reynolds, S. J., P. S. Thorne, K. J. Donham, E. A. Croteau, K. M. Kelly, D. Lewis, M. Whitmer, D. J. Heederik, J. Douwes, I. Connaughton, S. Koch, P. Malmberg, B. M. Larsson, and D. K. Milton.** 2002. Comparison of endotoxin assays using agricultural dusts. American Industrial Hygiene Association Journal **63:**430-8.

128. **Roslansky, P. F., and T. J. Novitsky.** 1991. Sensitivity of Limulus amebocyte lysate (LAL) to LAL-reactive glucans. Journal of Clinical Microbiology **29:**2477-83.

129. **Roy, C. J., and P. S. Thorne.** 2003. Exposure to Particulates, Microorganisms, beta, (1-3)-Glucans, and Endotoxins During Soybean Harvesting. American Industrial Hygiene Association Journal **64:**487-495.

130. **Rylander, R.** 2006. Endotoxin and occupational airway disease. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology **6:**62-6.

131. **Rylander, R.** 2002. Endotoxin in the environment--exposure and effects. Journal of Endotoxin Research **8:**241-52.

132. **Rylander, R.** 1997. Evaluation of the Risks of Endotoxin Exposures. International Journal of occupational and Environmental Health **3:**S32-S35.

133. **Rylander, R., B. Bake, J. J. Fischer, and H. I.M.** 1989. Pulmonary function and symptoms after inhalation of endotoxin. The American review of respiratory disease **140:**981-6.

134. **Saito, R., B. K. Cranmer, J. D. Tessari, L. Larsson, J. M. Mehaffy, T. J. Keefe, and S. J. Reynolds.** 2009. Recombinant Factor C (rFC) Assay and Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) Analysis of Endotoxin Variability in Four Agricultural Dusts. The Annals of Occupational Hygiene **52:**1-10.

135. **Samadi, S., D. J. Heederik, E. J. Krop, A. R. Jamshidifard, T. Willemse, and I. M. Wouters.** 2010. Allergen and endotoxin exposure in a companion animal hospital. Occupational and environmental medicine **67:**486-92.

136. **Samadi, S., I. M. Wouters, R. Houben, A.-R. Jamshidifard, F. Van Eerdenburg, and D. J. J. Heederik.** 2009. Exposure to Inhalable Dust, Endotoxins, {beta}(1->3)-Glucans, and Airborne Microorganisms in Horse Stables. The Annals of Occupational Hygiene **53:**595-603.

137. **Saraf, A., L. Larsson, H. Burge, and D. Milton.** 1997. 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 amebocyte lysate assay. Applied and Environmental Microbiology **63:**2554-2559.

138. **Saraf, A., J. H. Park, D. K. Milton, and L. Larsson.** 1999. Use of quadrupole GC-MS and ion trap GC-MS-MS for determining 3-hydroxy fatty acids in settled house dust: relation to endotoxin activity. Journal of environmental monitoring **1:**163-8.

139. **Schlosser, O., A. Huyard, K. Cartnick, A. Yaez, V. Catan, and Z. Do Quang.** 2009. Bioaerosol in Composting Facilities: Occupational Health Risk Assessment. Water Environment Research **81:**866-877.

140. **Schröder, N. W., and R. R. Schumann.** 2005. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. The Lancet Infectious Diseases **5:**156-164.

141. **Sebastian, A., C. Pehrson, and L. Larsson.** 2006. Elevated concentrations of endotoxin in indoor air due to cigarette smoking. Journal of environmental monitoring **8:**519-22.

142. **Semple, S., D. Devakumar, D. G. Fullerton, P. S. Thorne, N. Metwali, A. Costello, S. B. Gordon, D. S. Manandhar, and J. G. Ayres.** 2010. Airborne endotoxin concentrations in homes burning biomass fuel. Environmental health perspectives **118:**988-91.

143. **Sigsgaard, T., E. C. Bonefeld-Jorgensen, H. J. Hoffmann, J. Bonlokke, and T. Kruger.** 2005. Microbial cell wall agents as an occupational hazard (Living in a Safe Chemical World. Proceedings of the 10th International Congress of Toxicology 11-15 July, 2004, Tampere, Finland). Toxicology and Applied Pharmacology **207:**310-319.

144. **Simpson, J. C., R. M. Niven, C. A. Pickering, L. A. Oldham, A. M. Fletcher, and H. C. Francis.** 1999. Comparative personal exposures to organic dusts and endotoxin. The Annals of Occupational Hygiene **43:**107-15.

145. **Simpson, J. C., R. M. Niven, C. A. Pickering, L. A. Oldham, A. M. Fletcher, and H. C. Francis.** 1999. Comparative personal exposures to organic dusts and endotoxin. The Annals of Occupational Hygiene **43:**107-15.

146. **Singh, T. S., B. Bello, O. D. Mabe, K. Renton, and M. F. Jeebhay.** 2010. Workplace Determinants of Endotoxin Exposure in Dental Healthcare Facilities in South Africa. The Annals of Occupational Hygiene **54:**299-308.

147. **Smit, L. A. M., S. Spaan, and D. Heederik.** 2005. Endotoxin exposure and symptoms in wastewater treatment workers. American Journal of Industrial Medicine **48:**30-39.

148. **Sonesson, A., L. Larsson, A. Schutz, L. Hagmar, and T. Hallberg.** 1990. Comparison of the limulus amebocyte lysate test and gas chromatography-mass spectrometry for measuring lipopolysaccharides (endotoxins) in airborne dust from poultry-processing industries. Applied and Environmental Microbioliology **56:**1271-1278.

149. **Spaan, S., G. Doekes, D. Heederik, P. S. Thorne, and I. M. Wouters.** 2008. Effect of Extraction and Assay Media on Analysis of Airborne Endotoxin. Applied and Environmental Microbiology **74:**3804-3811.

150. **Spaan, S., D. J. J. Heederik, P. S. Thorne, and I. M. Wouters.** 2007. Optimization of airborne endotoxin exposure assessment: effects of filter type, transport conditions, extraction solutions and storage of samples and extracts. Applied and Environmental Microbiolology:AEM.00851-07.

151. **Spaan, S., D. J. J. Heederik, P. S. Thorne, and I. M. Wouters.** 2007. Optimization of airborne endotoxin exposure assessment: effects of filter type, transport

conditions, extraction solutions and storage of samples and extracts. Applied and Environmental Microbiology **73:**6134-6143.

152. **Spaan, S., J. Schinkel, I. M. Wouters, L. Preller, E. Tielemans, E. T. Nij, and D. Heederik.** 2008. Variability in Endotoxin Exposure Levels and Consequences for Exposure Assessment. The Annals of Occupational Hygiene **52:**303-316.

153. **Spaan, S., L. A. Smit, W. Eduard, L. Larsson, H. J. Arts, I. M. Wouters, and D. J. Heederik.** 2008. Endotoxin exposure in sewage treatment workers: investigation of exposure variability and comparison of analytical techniques. Annals of agricultural and environmental medicine **15:**251-61.

154. **Spaan, S., I. M. Wouters, I. Oosting, G. Doekes, and D. Heederik.** 2006. Exposure to inhalable dust and endotoxins in agricultural industries. Journal of environmental monitoring **8:**63-72.

155. **Stephenson, D. J., D. R. Lillquist, F. D. DeRosso, D. D. Greene, and G. White.** 2004. Side-by-side comparison of three sampling methods for aerosolized endotoxin in a wastewater treatment facility. Journal of Environmental Health **67:**16-9.

156. **Stewart, I., P. Schluter, and G. Shaw.** 2006. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health - a review. Environmental Health: A Global Access Science Source **5:**7.

157. **Su, H.-J. J., H.-L. Chen, C.-F. Huang, C.-Y. Lin, F.-C. Li, and D. K. Milton.** 2002. Airborne Fungi and Endotoxin Concentrations in Different Areas within Textile Plants in Taiwan: A 3-Year Study. Environmental Research **89:**58-65.

158. **Sullivan, J. D., F. W. Valois, and S. W. Waston.** 1976. Endotoxins : the limulus amoebocyte lysate system, p. 218-236. *In* A. W. Bernheimer (ed.), Mechanisms in bacterial toxicology. John Wiley and Sons,, New York and London.

159. **Swan, J. R. M., P. Beckett, D. Fishwick, K. Oakley, N. Raza, R. M. Niven, A. M. Fletcher, H. Francis, C. A. C. Pickering, R. Rawbone, B. Crook, and A. D. Curran.** 2002. A review of the use of CD14: a biomarker for workplace airborne endotoxin exposure? International Biodeterioration & Biodegradation **50:**127-134.

160. **Sykes, P., J. A. Allen, J. D. Wildsmith, and K. P. Jones.** 2009. An analysis of employee exposure to organic dust at large-scale composting facilities. Journal of Physics: Conference Series **151:**012064.

161. **Thorn, J.** 2001. Seasonal variations in exposure to microbial cell wall components among household waste collectors. The Annals of Occupational Hygiene **45:**153-156.

162. **Thorn, J., L. Beijer, T. Jonsson, and R. Rylander.** 2002. Measurement strategies for the determination of airborne bacterial endotoxin in sewage treatment plants. The Annals of Occupational Hygiene **46:**549-54.

163. **Thorn, J., and R. Rylander.** 1998. Inflammatory response after inhalation of bacterial endotoxin assessed by the induced sputum technique. Thorax **53::**1047-1052.

164. **Thorne, P. S., K. H. Bartlett, J. Phipps, and K. Kulhankova.** 2003. Evaluation of five extraction protocols for quantification of endotoxin in metalworking fluid aerosol. The Annals of Occupational Hygiene **47:**31-6.

165. **Thorne, P. S., S. S. Perry, R. Saito, P. T. O'Shaughnessy, J. Mehaffy, N. Metwali, T. Keefe, K. J. Donham, and S. J. Reynolds.** 2010. Evaluation of the Limulus Amebocyte Lysate and Recombinant Factor C Assays for Assessment of Airborne Endotoxin. Applied and Environmental Microbiology **76:**4988-4995.

166. **Thorne, P. S., S. J. Reynolds, D. K. Milton, P. D. Bloebaum, X. Zhang, P. Whitten, and L. F. Burmeister.** 1997. Field evaluation of endotoxin air sampling assay methods. American Industrial Hygiene Association Journal **58:**792-9.

167. **Vincent, J. H.** 2005. Health-related aerosol measurement: a review of existing sampling criteria and proposals for new ones. Journal of Environmental Monitoring **7:**1037-53.

168. **Visser, M. J., S. Spaan, H. J. J. M. Arts, L. A. M. Smit, and D. J. J. Heederik.** 2006. Influence of Different Cleaning Practices on Endotoxin Exposure at Sewage Treatment Plants. The Annals of Occupational Hygiene **50:**731-736.

169. **Walls, E. A., and J. Berkson.** 2003. Effects of blood extraction on horseshoe crabs (Limulus polyphemus). Fishery Bulletin **101:**457-459.

170. **Walters, M., D. K. Milton, L. Larsson, and T. Ford.** 1994. Airborne environmental endotoxin: a cross-validation of sampling and analysis techniques. Applied and Environmental Microbiology **60:**996-1005.

171. **Wang, H., T. Reponen, S.-A. Lee, E. White, and S. A. Grinshpun.** 2007. Size Distribution of Airborne Mist and Endotoxin-Containing Particles in Metalworking Fluid Environments. Journal of Occupational and Environmental Hygiene **4:**157 - 165.

172. **Wang, Z., T. Reponen, A. S. Grinshpun, L. R. Gorny, and K. Willeke.** 2001. Effect of sampling time and air humidity on the bioefficiency of filter samplers for bioaerosol collection. Journal of Aerosol Science **32:**661-674.

173. **White, E. M.** 2002. Environmental endotoxin measurement methods: standardization issues. Applied occupational and environmental Hygiene **17:**606-9.

174. **Williams, K. L., K. Robert, and N. A. Nnalue.** 2001. Endotoxins, Pyrogens, LAL testing and Depyrogenation, second ed, Wilmington.

175. **Witschger, O., and J.-F. Fabries.** 2005. Particules ultra-fines et santé au travail - Caractéristiques et effets potentiels sur la santé. Hygiène et Sécurité du Travail **199 - 2ième trimestre 2005:**22-35.

176. **Yokota, H., H. Kiyonaga, H. Kaniwa, and T. Shibanuma.** 2001. Adsorption of endotoxins on glass in the presence of cationic proteins. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **25:**1001-1007.

177. **Zhang, G. H., L. Baek, O. Buchardt, and C. Koch.** 1994. Differential blocking of coagulation-activating pathways of Limulus amebocyte lysate. Journal of Clinical Microbiology **32:**1537-41.

178. **Zhang, G. H., L. Baek, and C. Koch.** 1988. New microassay for quantitation of endotoxin using Limulus amebocyte lysate combined with enzyme-linked immunosorbent assay. Journal of Clinical Microbiology **26:**1464-70.

179. **Zhang, G. H., L. Baek, P. E. Nielsen, O. Buchardt, and C. Koch.** 1994. Sensitive quantitation of endotoxin by enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibody against Limulus peptide C. Journal of clinical microbiology **32:**416-22.

180. **Zucker, B.-A., A. M. Draz, and W. Muller.** 2000. Comparison of filtration and impingement for sampling airborne endotoxin. Journal of Aerosol Science **31:**751-755.