

© M. FAURE/INRS.

Endotoxines en milieu de travail

I. Origine et propriétés toxiques des endotoxines. Métrologie

Les endotoxines sont des composants des parois des bactéries Gram négatif. Elles sont connues surtout en santé publique en raison des effets toxiques déclenchés lors des infections graves à bactéries Gram négatif ou lors de l'utilisation de produits médicaux contaminés (soluté de perfusion, liquide de dialyse...). Les effets sur la santé lors des expositions professionnelles sont de mieux en mieux connus.

Cet article fait le point sur les endotoxines, leurs effets sur la santé et les différentes méthodes de dosage.

Les risques inhérents aux endotoxines en milieu de travail et leur prévention, ainsi que la théorie dite « hygiéniste », seront abordés dans un deuxième article à paraître dans un prochain numéro de la revue Documents pour le Médecin du Travail.

En résumé

Les endotoxines, composants de la paroi des bactéries Gram négatif, sont libérées lors de la lyse de ces bactéries. Elles sont responsables des manifestations systémiques, telles qu'un choc septique, lors des infections à ce type de bactéries. Les lipopolysaccharides, éléments biologiquement actifs de ces endotoxines, ont des actions sur le système immunitaire, la coagulation et l'inflammation. Les endotoxines sont également impliquées dans la survenue d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) et de certaines maladies hépatobiliaires.

Leur présence dans les atmosphères de travail, évoquée par B. Ramazzini dès 1713, a été confirmée au milieu du vingtième siècle. Bien qu'il ne soit pas d'une pratique courante, le mesurage des endotoxines dans les bioaérosols se développe peu à peu. La contamination par voie respiratoire en milieu professionnel est à l'origine de toux, dyspnée, asthme souvent associé à un état fébrile.

frissons jusqu'au choc toxique. En outre, les endotoxines forment un bouclier rigide autour des bactéries qui les produisent, empêchant ainsi de nombreux antibiotiques d'atteindre leur cible.

Les bactéries sont dites « Gram négatif » quand elles ne fixent pas la coloration mise au point par le physicien danois Gram (*encadré 1*). Ces bactéries Gram négatif

La coloration de Gram [1]

Depuis la découverte de Gram, le monde des bactéries se divise en 2 : les bactéries Gram négatif qui se colorent en rouge-orange et les bactéries Gram positif qui apparaissent en violet.

La coloration de Gram comprend plusieurs étapes : coloration par le violet de gentiane, morçandage au lugol (solution d'iode iodo-iodurée), décoloration rapide à l'alcool et recoloration à la safranine ou à la fuchsine.

Les deux premières étapes colorent en violet le contenu de la bactérie. Le violet de gentiane se fixe sur les composants cytoplasmiques de toutes les bactéries. Le lugol permet de fixer cette coloration interne. La troisième étape est un lavage à l'alcool. Les bactéries qui sont dites « Gram négatif » ont une paroi riche en lipides mais pauvre en peptidoglycanes. Cette paroi laisse passer l'alcool qui décolore le cytoplasme en éliminant le violet de gentiane. Au contraire, la paroi des bactéries « Gram positif » est composée d'une importante couche de peptidoglycanes. De ce fait, elle est plus épaisse et constitue une barrière imperméable à l'alcool. Ces bactéries restent donc colorées en violet.

D. GÉHIN*,
C. LE BÂCLE**

* Interne en médecine
du travail, INRS

** Département Études
et assistance médicales,
INRS

ENCADRÉ 1

Les endotoxines (du grec : endon = intérieur et toxicon = poison), composants de la paroi des bactéries Gram négatif, sont des substances biologiques toxiques (toxines) libérées lors de la lyse de ces bactéries et, à un moindre degré, lors de leur multiplication. Dans un contexte d'infection, elles peuvent provoquer des symptômes variés, allant d'une fièvre accompagnée de

inrs

Documents
pour le Médecin
du Travail
N° 126
2^e trimestre 2011

225

sont présentes partout dans l'environnement. Dans l'eau stagnante, en milieu naturel ou anthropique (système de chauffage, de ventilation, d'humidification), elles se multiplient rapidement. Certaines ne requièrent que très peu de besoins nutritifs, par exemple *Pseudomonas*, *Enterobacter* et *Klebsiella* spp n'ont besoin que des quelques traces de sels minéraux présents dans l'eau du robinet pour croître et se multiplier.

Du fait de l'omniprésence des bactéries Gram négatif, les endotoxines sont elles aussi présentes partout dans l'environnement, notamment en raison de la présence de bactéries Gram négatif dans le tube digestif et les fèces de tous les animaux, y compris des plus petits insectes.

De nombreux secteurs professionnels sont concernés : monde agricole, première transformation des fibres végétales (coton, lin, chanvre, sisal...) et de la laine, travail dans les égouts, traitement des déchets, station de traitement des eaux usées, compostage mais aussi travail dans des locaux pourvus d'humidificateurs ou de climatiseurs... Bien qu'il ne soit pas d'une pratique courante, le mesurage des endotoxines dans les bioaérosols se développe peu à peu, ce qui devrait permettre de mieux caractériser les expositions professionnelles.

Leurs effets sur la santé en milieu professionnel sont variés. Le plus connu est l'effet pyrogène après une exposition aiguë intense mais les endotoxines peuvent aussi être à l'origine de symptômes respiratoires comme toux, dyspnée, asthme. Une exposition brutale et très intense peut conduire à un syndrome toxique des poussières organiques (ou ODTS pour *Organic Dust Toxic Syndrom*) apparaissant quelques heures après l'exposition et associant pic fébrile, courbatures, sensation d'oppression respiratoire sans aucun signe à l'auscultation, le tout disparaissant en 24 à 48 heures sans séquelle. Une exposition chronique ou trop souvent répétée peut conduire à l'installation d'une bronchopneumopathie chronique obstructive pouvant évoluer vers une insuffisance respiratoire.

Paradoxalement, ces mêmes endotoxines renforcent les défenses naturelles de l'organisme contre les bactéries, les virus et les cellules cancéreuses. Certains biologistes pensent que l'exposition à ces molécules pendant la petite enfance est essentielle pour le développement et le fonctionnement du système immunitaire chez l'homme.

Données historiques

En 1713, Ramazzini (1633-1714), médecin italien considéré comme le précurseur voire le père de la médecine du travail [2], décrit dans son œuvre « *De morbis artificum diatriba* » les symptômes pulmonaires aigus consécutifs à l'inhalation de poussières contenant des

débris végétaux chez les ouvriers des filatures de coton. « *La poussière âcre et nuisible qui voltige des matières qu'ils manient, pénétrant par la bouche et le gosier dans les poumons, excite chez ces ouvriers une toux continuelle et les conduit peu à peu à une affection asthmatique.* »

Ces symptômes ont depuis été régulièrement décrits et sont classiquement observés le jour de la reprise du travail (le plus souvent le lundi soir) et augmentent pendant toute la semaine. Une amélioration des symptômes apparaît lors des week-ends ou des vacances et la reprise du travail entraîne une rechute. L'ensemble de ces symptômes est regroupé sous le terme de byssinose, du grec *bussos* qui signifie « coton » ou de l'égyptien *bysan* qui signifie « petites fibres ».

L'aventure des endotoxines commence réellement vers la fin des années 1870, peu après que Koch eut proposé dans ses postulats que chaque maladie infectieuse est provoquée par un micro-organisme (**encadré 2**). En France, en Allemagne, aux États-Unis et dans quelques autres pays, des chercheurs de différentes disciplines découvrent que les bactéries exercent souvent leur pouvoir pathogène en produisant des toxines. Ils isolent d'abord les exotoxines, sécrétées par de nombreuses bactéries comme celles responsables de la diphtérie, du tétanos et du botulisme. On sait aujourd'hui que la plupart des exotoxines sont des protéines mais, au XIX^e siècle, elles n'étaient identifiées que grâce à leur inactivation par la chaleur.

En 1892, Pfeiffer, un élève de Koch, travaille sur le vibron cholérique, agent du choléra. Il remarque que ce vibron synthétise non seulement une exotoxine thermolabile mais aussi une substance thermorésistante qui n'est libérée que lors de la lyse du vibron. Les toxines thermorésistantes étaient déjà connues, mais Pfeiffer est le premier à remarquer qu'elles ne sont pas sécrétées par les bactéries. Pfeiffer suppose alors que cette toxine thermorésistante se trouve à l'intérieur de la bactérie et la nomme « endotoxine » [3].

ENCADRÉ 2

Le postulat de Koch

L'agent supposé être responsable d'une maladie doit répondre aux conditions suivantes :

1. être retrouvé chez tous les individus atteints de la maladie ;
2. pouvoir être cultivé en laboratoire ;
3. induire la même maladie lorsqu'il est inoculé à un organisme sain de la même espèce que l'organisme dont il provient (ou d'une espèce proche, humains et primates par exemple) ;
4. être retrouvé dans l'organisme expérimentalement inoculé et reconnu comme identique à l'agent causal original suspecté.

À la même époque, Centanni, à Bologne, travaille sur *Salmonella typhi*, bactérie responsable la fièvre typhoïde. Il isole une toxine thermorésistante qui déclenche de la fièvre chez le lapin et il la nomme pyrotoxine. Par la suite, il sera montré que l'endotoxine de Pfeiffer et la pyrotoxine de Centanni sont quasiment équivalentes. Ces toxines caractérisent le groupe des bactéries Gram négatif.

Le développement de la chimie va permettre de progresser dans la connaissance de ces toxines. Dans les années 30-40, A. Boivan, à l'Institut Pasteur de Paris, W. Morgan, à l'Institut Lister de Londres et W. Goebel, à l'Institut Rockefeller de New-York, montrent que ces toxines thermostables contiennent des polysaccharides, des lipides et des protéines [4].

Simultanément, dans un contexte de lutte contre les infections nosocomiales, Shear, des Instituts américains de la santé (NIH), étudie la bactérie Gram négatif *Serratia marcescens*. Colley, du Memorial Hospital de New-York, avait déjà constaté expérimentalement qu'un mélange de *Serratia marcescens* et de streptocoques faisait régresser certains cancers. En 1943, Shear démontre que la substance toxique et antitumorale de *Serratia marcescens* est essentiellement composée de polysaccharides et de lipides, il la nomme lipopolysaccharide (LPS) (cité dans [3]).

Ce lipopolysaccharide semblait identique à l'endotoxine et à la pyrotoxine précédemment étudiées, mais la similitude de ces trois molécules n'est définitivement établie qu'à la fin des années 40, lorsque les allemands Westphal et Lüderitz mettent au point une technique pour obtenir de grandes quantités d'extraits bactériens très purs. Analysant alors des extraits purifiés de *Salmonella*, de *Serratia*, de *Vibrio* et d'autres bactéries apparentées, ils démontrent que le composé toxique de toutes ces bactéries ne comporte que des polysaccharides, des lipides et du phosphore (qui active les deux premiers composés) [5].

Quelle que soit leur origine, il apparaît que toutes ces toxines bactériennes déclenchent les mêmes réactions chez l'animal, ce qui amène à penser qu'elles ont donc probablement des structures chimiques très voisines. De surcroît, Westphal et Lüderitz démontrent que seules les bactéries Gram négatif synthétisent des endotoxines. Il reste alors à comprendre le mécanisme d'action et à préciser leur structure chimique. Les endotoxines sont si complexes qu'il faudra environ 25 ans et la mobilisation d'un nombre considérable de chercheurs pour décrire leur structure.

Les biochimistes étudient principalement les entérobactéries qui constituent une partie de la flore normale de l'intestin mais provoquent parfois des troubles digestifs. Ils s'intéressent notamment aux genres *Salmonella* et *Escherichia*, et en particulier *Escherichia coli*. La plupart des souches d'*Escherichia coli* sont non pathogènes (du moins lorsqu'elles res-

tent dans le tube digestif) mais certaines produisent des maladies graves.

Longtemps après les premières constatations de Ramazzini, Neal en 1942 établit pour la première fois un lien entre la présence de bactéries Gram négatif et les symptômes pulmonaires présentés par les ouvriers d'une filature de coton [6]. Cette découverte relance l'intérêt pour les endotoxines en milieu de travail.

En 1961, Pernis et ses collaborateurs émettent l'hypothèse que les endotoxines peuvent être responsables des symptômes observés dans certaines maladies professionnelles causées par l'inhalation de poussières végétales. Selon eux, plusieurs maladies professionnelles pourraient être attribuables à l'inhalation d'endotoxines. Ils citent par exemple, la fièvre du lundi, la byssinose, la toux du tisserand, la fièvre des imprimeurs de bibles, la fièvre des fabricants de matelas, le poumon du fermier, la bagassosse, la fièvre du malt et la fièvre du grain. Certes, l'exposition professionnelle dans ces différentes professions est multiple et ne se résume pas à une exposition à des bactéries Gram négatif et à des endotoxines, mais ils considèrent que ces bactéries et leurs endotoxines jouent un rôle majeur dans la survenue de ces maladies [7].

Cavagna démontre, en 1969, que l'inhalation d'endotoxines peut produire chez certaines personnes (volontaires sains ou atteints de bronchite chronique) un abaissement du VEMS (volume expiré maximal par seconde) semblable à ce qui est expérimenté le lundi par certains travailleurs des salles de cardage du coton. Par ailleurs, il observe que l'inhalation répétée d'endotoxines induit chez le lapin un état d'hypersensibilité, une réaction inflammatoire des bronches et une altération des propriétés mécaniques des poumons [8].

Rylander met en évidence la présence d'endotoxines, d'abord dans les filatures de coton puis dans de nombreux milieux (dans l'eau de certains humidificateurs notamment) [9 à 11]. Une classification des symptômes variés dus à l'inhalation d'endotoxines (fièvre, frissons, malaises) est tentée avec de nombreuses études expérimentales tant chez l'animal que chez l'homme (sujets volontaires). Mattsby et Rylander [12] s'intéressent également aux conséquences sur le système immunitaire de l'exposition aux endotoxines.

Encore aujourd'hui, beaucoup de recherches sur ce sujet se poursuivent. De nombreux chercheurs considèrent que l'exposition aux endotoxines en milieu de travail comporte des risques pour la santé. La recherche d'endotoxines s'élargit graduellement, dès lors que des personnels se plaignent de manifestations respiratoires en rapport avec leur activité professionnelle. La structure, les méthodes de dosage des endotoxines et leurs effets chez l'animal et chez l'homme sont actuellement mieux connus. Les professions identifiées comme

concernées sont de plus en plus variées : personnels des stations d'épuration, des industries transformant les fibres végétales, de l'industrie agro-alimentaire, travail dans des locaux pourvus d'humidificateurs ou de climatiseurs, dans des serres...

Structure

Les endotoxines sont des éléments constitutifs de la paroi des bactéries Gram négatif. Cette paroi est constituée de trois parties :

- une membrane interne ou membrane plasmique qui sert de barrière osmotique,
- un espace périplasmique riche en peptidoglycane qui maintient l'intégrité de la structure et la forme caractéristique de la bactérie,
- une membrane externe constituée d'une double couche phospholipidique asymétrique dans laquelle sont insérées des protéines, la plus abondante étant la lipoprotéine de Braun. La couche interne de cette membrane est constituée de protéines et de phospholipides analogues à ceux de la membrane plasmique tandis que la couche externe est constituée de quelques protéines et surtout de lipopolysaccharides (figures 1 et 2).

Le terme « lipopolysaccharide » devrait être réservé pour désigner des substances chimiques pures, libres de tout autre composant de membrane. Le terme d'« endotoxine » devrait être réservé aux fragments de membrane qui contiennent le lipopolysaccharide et d'autres composants de la membrane cellulaire. L'endotoxine est la forme retrouvée habituellement à l'état naturel, comme par exemple dans les atmosphères de travail. En pratique, les termes « endotoxine » et « lipopolysaccharide » (LPS) sont souvent indifféremment utilisés dans la littérature.

Les endotoxines sont donc constituées d'un fragment de paroi de bactérie Gram négatif et du LPS. Chaque genre et chaque espèce de bactérie produit une variété de LPS spécifique. Les bactéries d'une même famille produisent des LPS similaires, alors que des bactéries de familles différentes produisent des LPS différents [13]. Les LPS ne sont pas une molécule unique mais une famille de composés essentiels à la croissance et à la survie de la bactérie [14].

Les LPS, parties biologiquement actives des endotoxines, sont ancrés dans la région hydrophobique de la membrane externe [15]. Ils sont formés de trois parties : la chaîne O-spécifique, longue chaîne de sucres formant la partie externe de l'endotoxine, le noyau d'oligosaccharides ou « core » et une partie phospholipidique, le lipide A, siège de l'activité pro-inflammatoire (figures 2 et 3, pages ci-contre et suivante).

Fig. 1 : Comparaison des structures des cellules bactériennes Gram négatif et Gram positif.

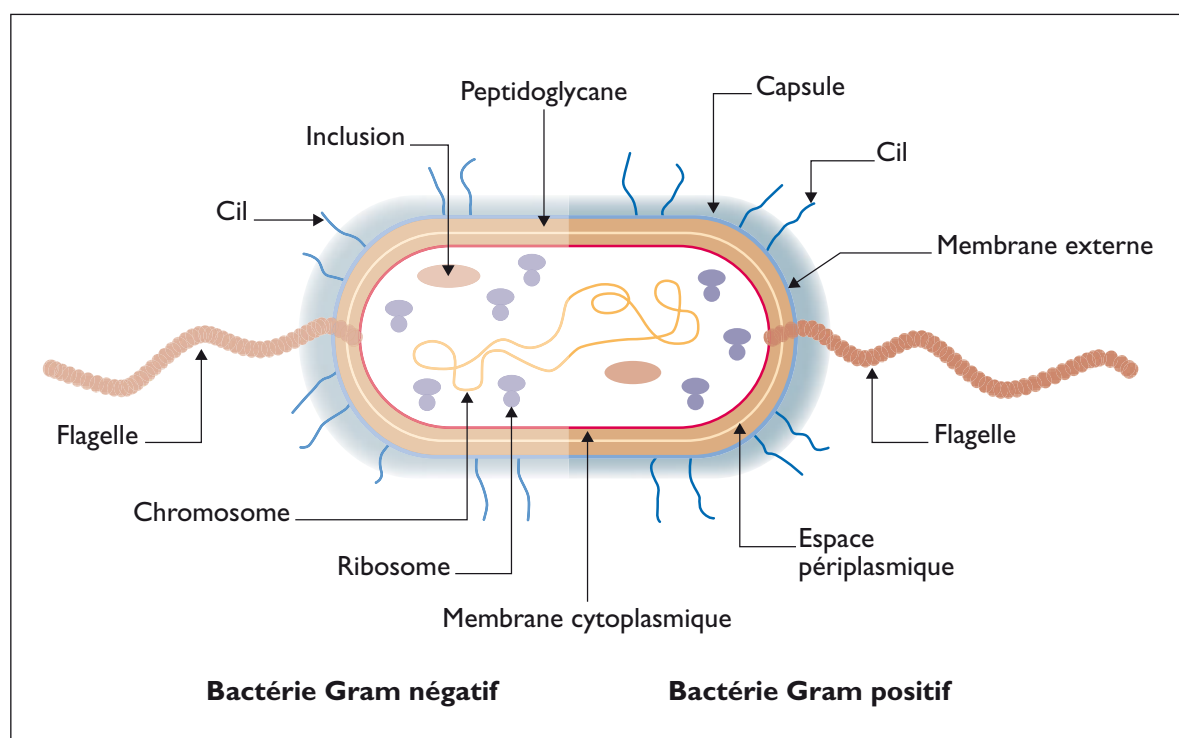
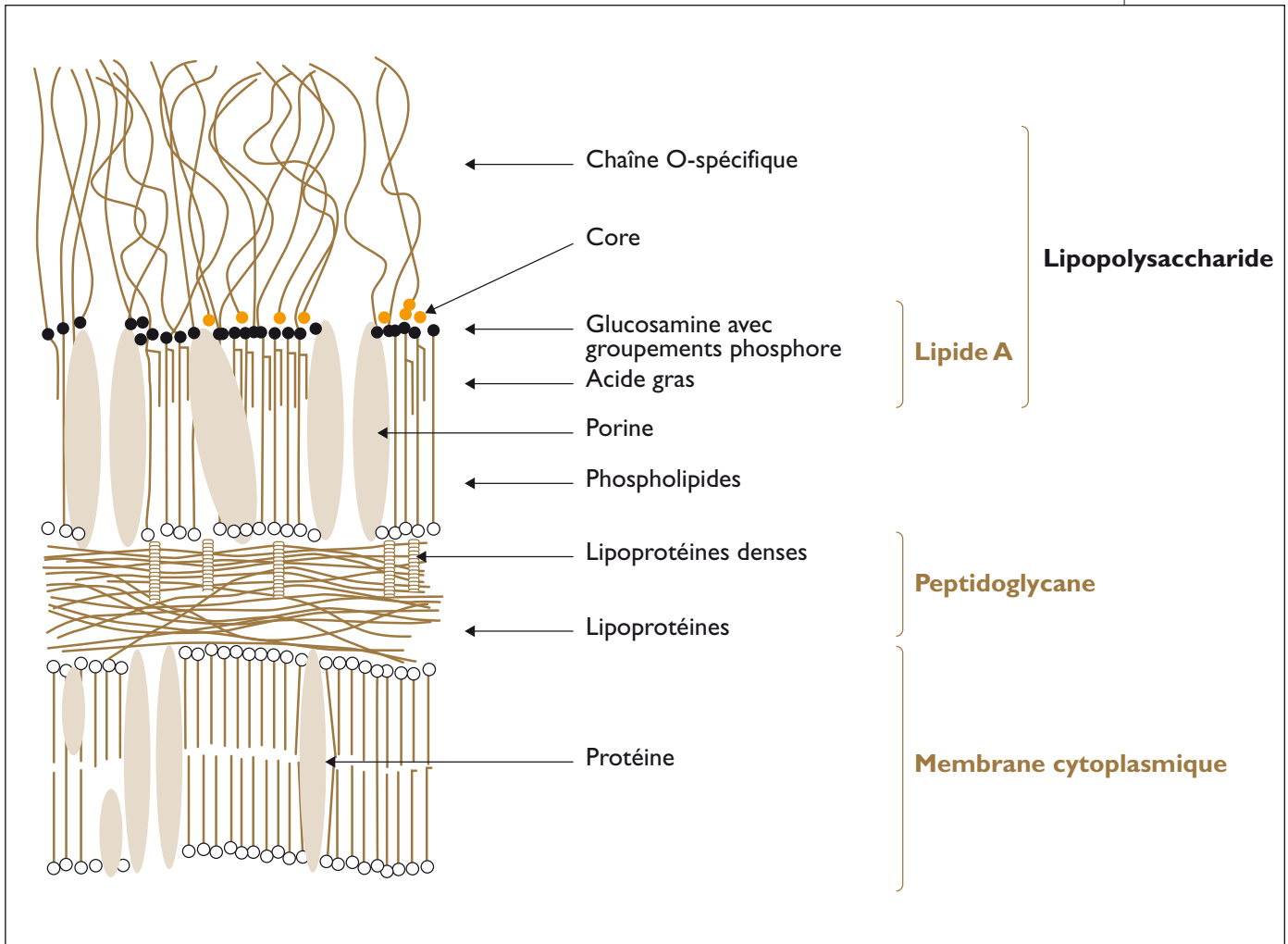


Fig. 2 : La paroi des bactéries Gram négatif.



CHAÎNE O-SPÉCIFIQUE

Dans les années 1960, Westphal et Lüderitz montrent que cette chaîne O-spécifique diffère selon les espèces bactériennes. Ainsi chaque souche de *Salmonella* comporte une chaîne O-spécifique particulière qui induit la synthèse d'un anticorps différent [5]. En fait, selon l'espèce bactérienne, une chaîne O-spécifique est composée de 20 à 40 unités d'oligosaccharides qui se répètent, chacune composée de 5 à 7 monosaccharides pouvant être des hexoses classiques (glucose, galactose...) mais aussi des sucres plus rarement rencontrés (tyvélose, paratose...).

Du fait de sa composition, la chaîne O-spécifique, partie la plus variable du LPS, est spécifique des espèces de bactéries Gram négatif et déclenche une réaction immunitaire en faisant produire à l'organisme infecté des anticorps qui la reconnaissent spécifiquement. La chaîne O-spécifique s'insère sur le « core ».

NOYAU D'OLIGOSACCHARIDES OU CORE

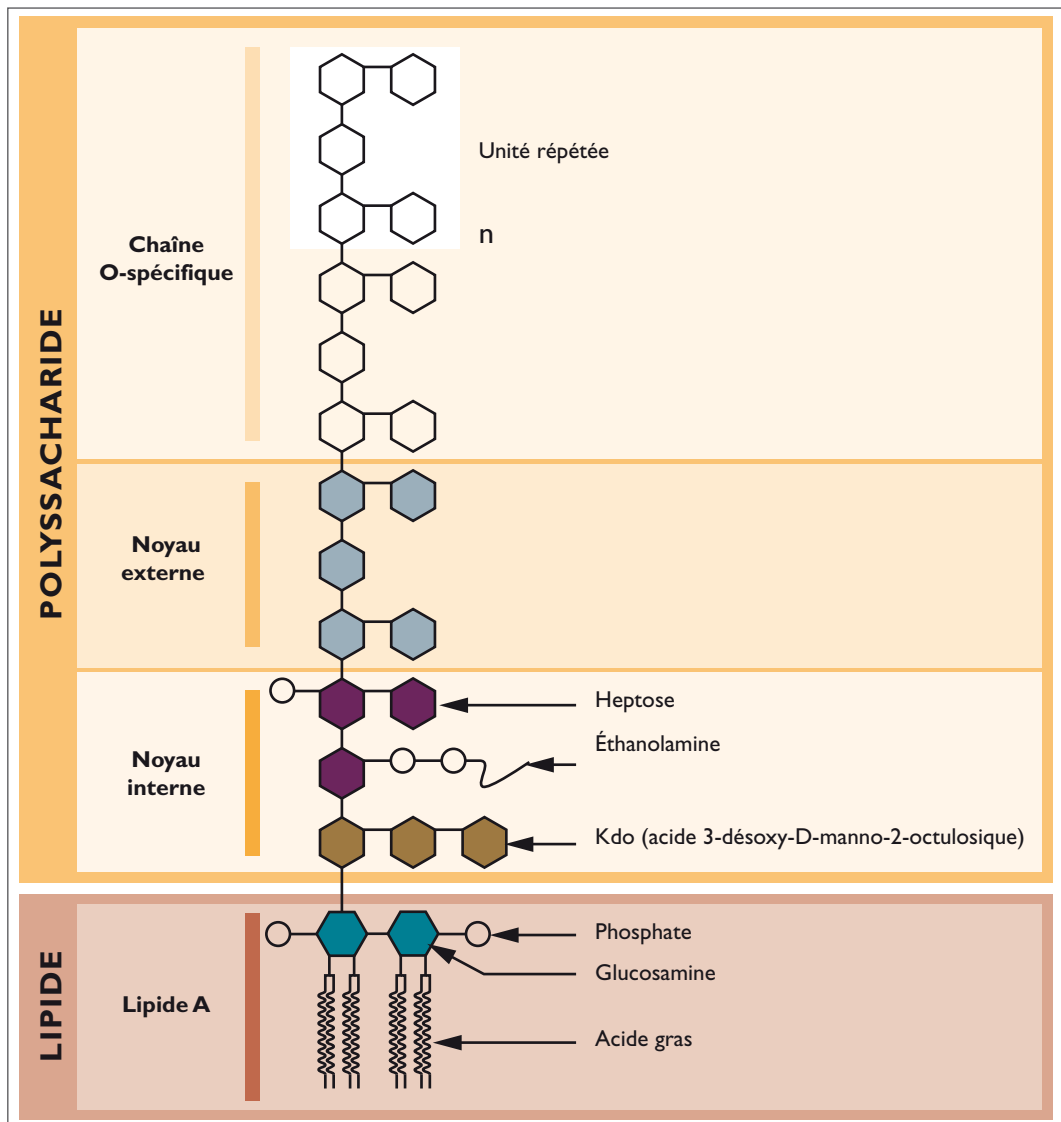
Le core varie moins que la chaîne O-spécifique et joue un rôle moins important dans la réponse immunitaire, sauf quand il appartient à une endotoxine mutante dépourvue de chaîne O-spécifique. La structure du core est semblable pour les souches d'une même espèce mais varie selon les espèces [1].

Le noyau d'oligosaccharides est divisé en deux parties : le noyau interne attaché au lipide A, et le noyau externe attaché à la chaîne O-spécifique.

Le noyau interne comporte deux sucres inhabituels :

- un heptose possédant sept atomes de carbone, alors que la plupart des sucres naturels ne contiennent que six atomes de carbone,
- un octose, le Kdo ou acide 3-désoxy-D-manno-2-octulosonique, n'existant naturellement que chez les bactéries à endotoxines. Le Kdo relie le polysaccharide au lipide A.

Fig. 3 : Structure de l'endotoxine chez *Salmonella typhimurium*.



Le noyau externe, quant à lui, est fait de monosaccharides tels que D-glucose, D-galactose... Il semble que le core n'ait pas d'autre rôle que de fournir un site de fixation à la chaîne O-spécifique.

LIPIDE A

Le lipide A est constitué de deux sucres aminés liés à des acides gras, hydroxylés sur leur troisième atome de carbone, ainsi qu'à un ou deux autres acides gras non hydroxylés. La nature des sucres aminés (glucosamine ou parfois 3-aminoglucosamine) ainsi que la nature et le nombre des acides gras sont variables selon les espèces bactériennes. Le lipide A reste néanmoins la région la moins variable du LPS.

L'utilisation du lipide A obtenu par synthèse a permis de démontrer que le lipide A est bien responsable du pouvoir toxique du LPS. Néanmoins, les dérivés de synthèse modifiés sont toujours moins actifs que la molécule originale. Des études complémentaires ont permis de prouver que, malgré sa complexité, le lipide A tout entier est nécessaire à l'activité biologique optimale des endotoxines [16, 17].

Dès 1954, ayant constaté que les polysaccharides variaient trop d'une endotoxine à l'autre pour pouvoir induire des effets constants, Westphal et Lüdering font l'hypothèse que le lipide A est responsable et du pouvoir pathogène et du pouvoir immunostimulant. À la fin des années 60, plusieurs équipes démontrèrent que les endotoxines ne comportant que le lipide A et le Kdo sont aussi toxiques et aussi pyrogènes que les molécules complètes, qui comportent un polysaccharide : la

chaîne O-spécifique et la plus grande partie du noyau ne jouent donc aucun rôle dans l'expression de la toxicité et du pouvoir pyrogène. En 1984, Shiba et Kusumoto de l'Université d'Osaka réalisent la synthèse du lipide A d'*Escherichia coli*. Plusieurs équipes montrent alors que la molécule synthétisée produit les mêmes effets que le lipide A d'origine bactérienne. L'injection de lipide A synthétique à des animaux stimule leur système immunitaire et déclenche une fièvre importante, suivie d'un choc toxique mortel. Dès lors, il était établi que le lipide A est bien le principe actif des endotoxines (cité dans [3]).

Propriétés physico-chimiques

Les endotoxines sont très solubles dans l'eau ; leur effet toxique est accru par le chauffage qui dénature les protéines de la paroi bactérienne et leur permet alors d'accéder plus facilement aux récepteurs cellulaires.

Leur résistance à la chaleur est très élevée : pour détruire l'activité endotoxinique, il faut atteindre 126 °C pendant 7 heures ou 145 °C pendant 30 minutes en chaleur humide, et 170 °C pendant 7 heures ou 250 °C pendant 30 minutes en chaleur sèche.

Les endotoxines sont très résistantes à de nombreux agents physiques ou chimiques. Elles ne peuvent pas être détoxifiées par l'action conjointe du formaldéhyde et de la chaleur. Elles ne sont donc pas transformables en anatoxine contrairement à ce qui est observé pour certaines toxines protéiques. Leur hydrolyse par les acides ou les bases ou l'oxydation (par le permanganate, les hypochlorites...) est possible, mais il faut utiliser les agents chimiques dans des conditions telles qu'ils altèrent les autres constituants biologiques et qu'ils modifient l'antigénicité des LPS.

Mécanismes d'action dans les infections à bactéries Gram négatif

Les mécanismes d'action des endotoxines sont surtout connus lors de leur production au cours d'une infection grave à bactéries Gram négatif.

Les mécanismes d'action des endotoxines inhalées lors d'expositions professionnelles sont moins connus et font l'objet d'un paragraphe spécifique.

Les endotoxines n'agissent sur l'organisme que lorsqu'elles sont libérées par les bactéries, lors de leur multiplication ou de leur lyse, éventuellement sous

l'effet d'une antibiothérapie efficace. Une fois libérées, les endotoxines ne sont pas directement toxiques pour les cellules de l'hôte. Leur action est le résultat de la sécrétion de médiateurs par les cellules de l'organisme infecté. Ces médiateurs agissent localement ou à distance après passage dans la circulation sanguine. Les macrophages tissulaires ou sanguins sont les cellules les plus sollicitées. Activés, ils sécrètent différentes molécules qui agissent de concert, de façon séquentielle ou indépendante, pour initier ou amplifier une réponse immunitaire, spécifique ou non, dirigée contre l'intrus [3].

POUVOIR PATHOGÈNE CHEZ L'HOMME [1]

Lors d'une infection bactérienne, les LPS jouent un rôle important dans l'activation du système immunitaire et, en conséquence, dans le contrôle de l'infection. Toutefois, ils peuvent devenir toxiques pour l'hôte, notamment lorsqu'ils induisent une production excessive de cytokines. Au cours du processus infectieux, les LPS participent au développement de l'inflammation tissulaire en activant le système du complément, ce qui entraîne une production importante du composant C3b, lequel se fixe à la surface de la bactérie, mais également à celle des cellules eucaryotes. Ces cellules opsonisées par C3b deviennent alors la cible des cellules phagocytaires (*encadré 3*).

L'opsonisation

L'opsonisation est la capacité d'une molécule (dite opsonine) à recouvrir une cellule cible (généralement infectée par un pathogène) pour augmenter sa phagocytose par une cellule dotée de récepteurs pour les opsonines. On distingue 2 types d'opsonines qui agissent de façon synergique :

- les anticorps qui participent à un complexe RfC-anticorps-antigène sur la cible (reconnaissance dirigée de la cible en raison d'antigènes à sa surface),
- les opsonines non spécifiques capables de se fixer sur les structures microbiennes, telles le facteur C3 du complément, qui participent à un complexe substance microbienne activatrice-opsonine-récepteur pour l'opsonine (exemple : paroi bactérienne-C3b du complément-RC3b du neutrophile).

Ce processus d'opsonisation fait partie de l'immunité innée et est réalisé principalement par les cellules présentatrices d'antigènes (cellule dendritique, macrophage et lymphocyte B).

ENCADRÉ 3

 inrs

Documents pour le Médecin du Travail
N° 126
2^e trimestre 2011

231

Dans certaines infections graves, les bactéries peuvent passer dans la circulation sanguine où elles se multiplient. Les LPS libérés se lient, par l'intermédiaire du lipide A, à la protéine plasmatique LBP (*LPS Binding Protein*). Le complexe LBP-LPS reconnaît la protéine membranaire CD14 présente sur les macrophages, les monocytes et les polynucléaires neutrophiles. Les cellules épithéliales, surtout celles de l'endothélium vasculaire, dépourvues du récepteur CD14, peuvent toutefois répondre au LPS grâce à la présence dans le sang d'une forme soluble du CD14. L'interaction des LPS avec ces différents types cellulaires va induire trois événements majeurs qui peuvent conduire à l'état de choc septique : la production de cytokines par les monocytes, les macrophages et les cellules endothéliales, l'activation du système du complément et l'activation du système de la coagulation.

Les cytokines produites (interleukines IL-6, IL-8, *Tumor Necrosis Factor* TNF α et facteur d'activation des plaquettes PAF), ainsi que les composants du complément activés (C3a et C5a) vont endommager les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. En effet, les facteurs C3a et C5a, en synergie avec l'IL-8, favorisent l'action des leucocytes avec les cellules endothéliales puis leur diapédèse ⁽¹⁾. Associée à la libération d'enzymes lysosomales par les leucocytes, la diapédèse contribue à l'altération des cellules endothéliales.

En favorisant les mécanismes de coagulation, les LPS entraînent une coagulation intravasculaire disséminée. La formation de caillots dans les vaisseaux sanguins et la perte de la partie aqueuse du plasma sanguin lors de la diapédèse induisent une diminution de la pression artérielle et, en conséquence, une hypoxogénéation des tissus des poumons, des reins et du cerveau.

La libération d'endotoxines en grandes quantités dans la circulation sanguine, notamment à la suite d'une septicémie à bactéries Gram négatif, peut conduire à un choc endotoxinique et à la mort. Les antibiotiques eux-mêmes, en début de traitement de la maladie, peuvent avoir un effet préjudiciable pour le patient en induisant une libération massive de LPS dans la circulation sanguine.

ACTIVATION DE MOLÉCULES CIRCULANTES

Les endotoxines activent le facteur XII ou facteur de Hageman avec comme conséquence la conversion du fibrinogène en fibrine. Une libération d'endotoxines prolongée ou importante peut conduire à une thrombose et à une consommation excessive de plaquettes et des facteurs de coagulation II, V et VII pouvant entraîner une coagulation intravasculaire disséminée.

L'activation du système complémentaire par les LPS est à l'origine d'une augmentation de la vasoperméabilité et d'un effet chimiotactique pour les granulocytes neutrophiles, pouvant contribuer à un syndrome de détresse respiratoire.

Les endotoxines peuvent aussi se lier aux protéines présentes dans le plasma sanguin, telles que la LBP, les lipoprotéines, en particulier les lipoprotéines de haute densité, et le récepteur CD14 soluble. Ces molécules modulent donc la disponibilité des endotoxines et leur élimination de la circulation [18, 19].

ACTIVATION CELLULAIRE

Les cibles immédiates des LPS sont les cellules exprimant les récepteurs CD14 et TLR-4 (*Toll-like-receptor-4*) telles que les lymphocytes, les granulocytes, les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les fibroblastes gingivaux, les cellules endothéliales, les cellules de Kupffer et les cellules microgliales. Les endotoxines se lient au récepteur CD14 et conduisent ensuite à l'activation du récepteur TLR-4.

Les récepteurs TLR jouent un rôle important dans l'immunité innée et notamment dans les défenses contre les micro-organismes. Ils peuvent reconnaître des motifs moléculaires, dénommés PAMPs (*pathogen-associated microbial patterns*), uniquement présents chez des micro-organismes pathogènes. Ces PAMPs peuvent être de l'ADN bactérien, de l'ARN viral double brin, plus souvent des composants des parois bactériennes comme les lipopolysaccharides (LPS) et les peptidoglycanes, de la flagelline composant du flagelle de certaines bactéries.

L'interaction des molécules de LPS avec leur récepteur initie une cascade d'événements de transduction du signal qui se termine par la translocation du facteur de transcription NF-kB dans le noyau. NF-kB induit ensuite des changements transcriptionnels et la synthèse de différents composés : les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , les IL-1 et IL-6, les cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10, des médiateurs lipidiques tels que les prostaglandines, thromboxanes, leucotriènes ou le PAF.

L'action du TNF- α et de l'IL-1 sur les cellules endothéliales conduit à une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion portées par les neutrophiles et les monocytes. L'adhésion des neutrophiles, suivie de leur dissémination dans les tissus, joue un rôle majeur dans les phénomènes inflammatoires, rôle démontré par l'effet protecteur d'une déplétion expérimentale des neutrophiles.

In vivo, les LPS peuvent aussi affecter indirectement les cellules avoisinantes qui n'expriment pas le CD14 et le TLR-4. Par exemple, les cytokines libérées par les

(1) La diapédèse est le passage d'un phagocyte (polynucléaire, monocyte) à travers la paroi capillaire vers la lymphe interstitielle.

cellules de Küpffer peuvent stimuler la production de monoxyde d'azote (NO) par les cellules hépatiques voisines [20], propageant et amplifiant ainsi le signal des LPS.

La sensibilité des individus aux LPS dépend d'éléments génétiques. Un polymorphisme du promoteur TNF- α est associé à la susceptibilité au choc septique et est corrélé à un taux de mortalité élevé dû à une production excessive de TNF- α [21]. Des polymorphismes du TLR-4 et du CD14 sont aussi impliqués dans les variations interindividuelles de susceptibilité aux endotoxines [22].

MODIFICATIONS BIOCHIMIQUES INDUITES PAR LE LPS

Les macrophages activés par les LPS libèrent des protéines, des lipides et des radicaux libres. Le TNF- α génère à lui seul certaines réactions attribuées aux endotoxines, notamment la fièvre, et, injecté à des doses massives, il provoque un choc irréversible ; mais il peut aussi attirer des cellules défensives sur un site d'infection et détruire des cellules cancéreuses.

D'autres protéines, dont l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-8, reproduisent certains des effets du TNF- α . Parmi les médiateurs lipidiques produits, la prostaglandine E2, le thromboxane A2 et le PAF⁽²⁾ participent à la fièvre et à la régulation du système immunitaire. Des radicaux libres sont formés (oxygène O₂, peroxyde d'hydrogène H₂O₂, oxyde nitrique NO).

Le TNF- α amplifie la synthèse des médiateurs tandis que la prostaglandine E2 la freine.

Les endotoxines auraient un effet stimulant sur la prolifération des lymphocytes B ; elles activeraient le complément par la voie alterne.

En pratique, les effets sont fonction de la quantité d'endotoxines impliquées et, par voie de conséquence, du taux de médiateurs libérés. Si ce dernier est modéré, les effets sont bénéfiques : fièvre modérée, stimulation générale du système immunitaire et lutte antibactérienne. S'il est très élevé, les effets sont néfastes : fièvre élevée, hypertension, coagulation intravasculaire disséminée, choc léthal.

ACTIONS SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE

Les différents auteurs travaillant sur les endotoxines leur reconnaissent un effet à la fois adjuvant et immunostimulant sur le système immunitaire. Ainsi, l'adjonction de l'ancien vaccin TAB (typhoïde et paratyphoïde A et B) à une autre vaccination était connue depuis longtemps comme augmentant de fa-

çon importante la réponse immunitaire vis-à-vis de cette vaccination concomitante. Quel que soit l'antigène, un effet adjuvant, dû au lipide A, est obtenu lorsque des endotoxines sont administrées moins de six heures après l'injection de l'antigène. L'action immunostimulante résulte d'un effet sur les lymphocytes B et sur les macrophages. Ainsi, les LPS libérés par les bactéries commensales du tube digestif joueraient un rôle important dans la maturation du système immunitaire [23].

RÔLE DES ENDOTOXINES DANS LE CHOC SEPTIQUE

Le choc septique est la pathologie la plus étudiée quant à l'implication des endotoxines. La pathogénèse du choc septique débute avec la multiplication de microorganismes à un site d'infection suivi de la dissémination par la circulation sanguine à d'autres organes. Les bactéries Gram négatif sont à l'origine d'environ la moitié des cas de choc septique. À l'échelon moléculaire, les endotoxines induisent la synthèse et la libération des médiateurs endogènes du choc septique, à l'origine de la défaillance multiviscérale et de la mort. L'effet pro-inflammatoire des LPS est aussi suggéré par la réduction d'un facteur 100 de la quantité de TNF- α produit par un mutant de *Neisseria meningitidis* dépourvu de lipide A, par rapport à une souche sauvage [24].

Le rôle des endotoxines dans le bouleversement du système de coagulation durant le choc septique s'explique par leur action procoagulante et antifibrinolytique [25]. Dans des modèles animaux, les endotoxines sont couramment utilisées pour induire une coagulation intravasculaire disséminée conduisant souvent à la défaillance multiviscérale [26]. Les interactions entre la réponse inflammatoire et les anomalies de coagulation montrent que les cytokines, en aval des endotoxines, sont impliquées dans la réponse procoagulante à une infection systémique [27 à 29].

Lors d'un choc septique, le taux d'endothéline-1 (principal représentant des endothélines) est élevé et corrélé avec le syndrome de défaillance multiviscérale et un pronostic défavorable. Un certain nombre de facteurs présents dans le sang, dont la thrombine-1, l'IL-1 et le TNF- α , augmente le niveau d'endothélines dans le plasma et ces facteurs sont eux-mêmes augmentés par les endotoxines.

Certaines études indiquent qu'il existe une corrélation entre l'état clinique des patients atteints de choc septique et le niveau d'endotoxines dans leur sang [30 à 33]. Le risque de décès semble augmenter avec le niveau d'endotoxines circulantes, d'où l'effet parfois paradoxal de certaines familles d'antibiotiques. Selon leur mode d'action, l'effet thérapeutique recherché, s'il est trop rapide et important, peut être

(2) Facteur d'activation des plaquettes ou Platelet Activating Factor.

associé à une détérioration de l'état clinique du patient du fait de la libération massive d'endotoxines dans la circulation [34, 35].

RÔLE DES ENDOTOXINES DANS LE SYNDROME DE DÉTRESSE RESPIRATOIRE AIGUË (SDRA)

Le SDRA correspond à une hypoxie sévère aiguë ou progressive, un œdème pulmonaire et une accumulation de neutrophiles dans les poumons. Il est caractérisé par une réaction inflammatoire massive et un collapsus alvéolaire conduisant à une hospitalisation dans des unités de réanimation et à une mise sous ventilation assistée. L'infection bactérienne entraîne la mise en jeu de systèmes de défense (la réponse inflammatoire) qui vont dépasser leur but et continuer à évoluer pour leur propre compte même si l'agression causale a disparu. Il existe une diffusion de l'atteinte à l'ensemble des deux poumons et à tout l'organisme, avec possibilité d'une défaillance multiviscérale (rein, cerveau, tube digestif, foie, cœur...).

Pour Amoureux [25], « il apparaît que le choc septique et le syndrome de détresse respiratoire aiguë ont des voies de signalisation moléculaires communes, en particulier une réaction inflammatoire systémique ». Comme dans le choc septique, l'interaction entre les LPS et les récepteurs CD14 entraîne une activation des macrophages. Ces macrophages pulmonaires activés, équivalents des monocytes présents dans la circulation, produisent des cytokines impliquées dans la réaction inflammatoire telles que le TNF- α , l'IL-1 ou l'IL-8 [36]. Le TNF- α est fréquemment présent dans les lavages broncho-alvéolaires des patients atteints de ce syndrome [37]. La concentration d'endothélines dans la circulation sanguine est élevée [38]. L'endothéline-1 est en particulier essentielle dans ce syndrome [39]. Le blocage des récepteurs CD14 atténue la production de NO par les poumons [40].

L'ensemble de ces observations montre que les endotoxines jouent un rôle important dans le syndrome de détresse respiratoire aiguë, qui semble dès lors être plus une maladie systémique qu'une simple atteinte respiratoire [41].

RÔLE DES ENDOTOXINES DANS LES MALADIES HÉPATO-BILIAIRES

Le foie joue un rôle essentiel dans la détoxification des molécules provenant entre autres du tube digestif. Lorsque des endotoxines sont administrées par injection, elles sont retrouvées dans le foie en quelques heures [42, 43].

Dans les années 1970, le rôle des endotoxines a été démontré dans le cas de cirrhose expérimentale [44] et chez les patients cirrhotiques [45]. Soixante-dix-neuf pour cent des patients cirrhotiques sont endotoxémiques. La présence d'endotoxines à des niveaux plus élevés dans le sang de la veine porte que dans le sang de l'artère hépatique reflète une mauvaise élimination des endotoxines par le foie [46]. Des études supplémentaires ont confirmé que l'endotoxémie augmente lorsque le fonctionnement du foie diminue [47].

La perméabilité de l'intestin grêle est augmentée par un taux élevé de LPS [48]. Inversement, l'administration d'antibiotiques et de *Lactobacillus* réduit la présence de bactéries Gram négatif dans la flore intestinale et permet d'atténuer les dommages hépatiques induits par l'alcool [49, 50].

Les cellules de Kuppfer dans le foie expriment les récepteurs TLR, sont capables de répondre aux endotoxines et d'induire la production de cytokines [50, 51]. Les dépôts de lipide A dans les hépatocytes sont très fréquents chez les patients atteints de cirrhose biliaire ; dans un modèle animal de dommage hépatique induit par l'administration d'*E. coli*, les phagocytes du foie produisent des anions superoxydes qui, en excès, sont toxiques envers les hépatocytes [52].

Ces circonstances peuvent également se produire dans le cas d'hépatites virales chez l'homme. Les cytokines pro-inflammatoires et les radicaux libres induits par les LPS ont été documentés au cours de l'hépatite C et la fibrinogénèse leur est attribuée. Il a aussi été suggéré que les endotoxines aggravent l'hépatite C chronique. Des études ont montré une corrélation entre la concentration d'endotoxines dans le sang et le degré de nécrose intralobulaire au cours des infections par les virus des hépatites B et C [53]. Dans le cas de l'hépatite B, des anticorps dirigés contre les endotoxines et le lipide A sont détectés. Une étude récente indique que 62 % des patients ayant une hépatite C chronique sont endotoxémiques, avec une incidence plus élevée de macrophages positifs pour l'IL-1 β et le TNF- α chez les patients endotoxémiques que chez les patients non endotoxémiques [54].

Mécanismes d'action lors de l'inhalation d'endotoxines

En milieu de travail, l'exposition aux endotoxines est le fait d'une contamination de l'air respiré par des poussières plus ou moins « chargées » en endotoxines en fonction du milieu de travail et de l'activité professionnelle.

L'inhalation des LPS induit une augmentation du métabolisme et de la phagocytose du macrophage alvéolaire, ainsi qu'une augmentation de la perméabilité capillaire. [55, 56]. L'IL-1 et le TNF- α provoquent un afflux de neutrophiles dans l'alvéole et le parenchyme pulmonaire, qui pourraient être responsables des modifications du tonus bronchique [57, 58]. Les LPS inhalés peuvent provoquer une hyperréactivité bronchique, mais également une hyporéactivité bronchique, en fonction de la voie d'apport, de la dose et de la durée d'administration des LPS [59].

La réponse inflammatoire pulmonaire aux endotoxines a été expérimentée chez une dizaine de volontaires sains non-fumeurs exposés à des concentrations calibrées d'endotoxines purifiées : une réduction du volume expiratoire forcé (VEMS) et une augmentation des marqueurs d'inflammation mesurés dans les crachats, le sang et les urines ont été observées. Ces effets sont statistiquement significatifs et « dose-dépendants » [60].

Les endotoxines peuvent aussi potentialiser le relargage d'histamine. Ainsi, une exposition conjointe à des allergènes de moisissures et à des endotoxines serait susceptible d'augmenter la réaction allergique chez des individus prédisposés [61]. En cas d'expositions répétées à de courts intervalles, on observe une déplétion des médiateurs et un ajustement du métabolisme du macrophage alvéolaire. Ces modulations de réponse à l'exposition ont été reliées au développement d'anticorps anti-endotoxiques. L'exposition chronique aux endotoxines serait corrélée avec une plus faible incidence des cancers pulmonaires au sein de la population exposée [62] ; ce phénomène s'explique par la production de médiateurs de l'inflammation et, en particulier du TNF- α [3].

Métrologie des endotoxines et valeur limite

Détails disponibles sur le site de l'INRS dans :

- La note documentaire ND 2170 [63].
- La fiche n° 89 consacrée au mesurage des endotoxines disponible dans la base de données MetroPol [64].

En santé au travail, lors de mesurage de l'exposition à des bioaérosols, des relations ont pu être établies entre le dénombrement de bactéries Gram négatif et la teneur atmosphérique en endotoxines [65]. Mais, comme les endotoxines conservent leur activité bien après la mort des bactéries, les mesures portant sur les bactéries viables ne sont pas toujours un bon reflet de la réalité et de l'importance de l'exposition.

HISTORIQUE DES MÉTHODES DE DOSAGE « TRADITIONNELLES »

Les endotoxines résistant aux très hautes températures, la stérilité d'un produit ne garantit pas qu'il soit exempt d'endotoxines. Avec les progrès des moyens thérapeutiques en médecine, la détection des endotoxines est rapidement devenue un impératif pour les pharmacies hospitalières puis pour l'industrie pharmaceutique, afin de pouvoir garantir aux patients des produits non pyrogènes. Encore aujourd'hui, les nombreux contrôles effectués sur les solutés de perfusion, de dialyse, de nutrition parentérale, ou sur les dispositifs médicaux (seringues...), conduisent parfois à un retrait du marché ou un rappel des produits déjà mis en circulation.

Décoloration du permanganate de potassium, mortalité chez les embryons de poulet, augmentation de la mortalité des souris par l'acétate de plomb..., plusieurs méthodes d'évaluation des endotoxines ont été essayées pour tester les liquides biologiques ou les solutions injectables. Ces méthodes sont aujourd'hui totalement abandonnées par manque de sensibilité et de spécificité.

Compte tenu de leurs propriétés pyrogènes, les endotoxines ont aussi été détectées par la méthode dite « des substances pyrogènes chez le lapin » [66]. Mis au point pour réduire les risques de pic fébrile avec ses conséquences lors de l'injection de produits médicamenteux, l'usage de ce test était pratiquement limité à un résultat *pass or fail* (accepté ou refusé). Ce test a néanmoins été longtemps utilisé, mais son coût élevé, sa lourdeur, l'utilisation d'animaux et surtout son manque de spécificité et de sensibilité, ont entraîné son remplacement par le test sur lysat d'amœbocytes de limule ou LAL (*cf. infra*).

Les biochimistes se sont intéressés au dosage de certains composés des LPS en tant que marqueurs des endotoxines, en particulier l'acide gras β -3-hydroxylé, composé spécifique du lipide A. Les résultats obtenus par cette méthode sont dix fois supérieurs à ceux obtenus avec les méthodes classiques dites au LAL, confirmant que les taux d'endotoxines actives mesurés par un test biologique sont très inférieurs aux taux d'endotoxines réellement présentes [67].

TEST SUR LYSAT D'AMŒBOCYTES DE LIMULE (LAL)

C'est la méthode la plus utilisée et la plus reconnue malgré toutes ses imperfections. Suite à une première constatation faite par Howell en 1885, ce test repose sur la coagulation de l'hémolymphe de *Limulus polyphemus* ou *Xyphosura polyphemus* après administration d'endotoxines [68]. La limule, encore appelée

crabe des Moluques, crabe en fer à cheval ou crabe au sang bleu, n'est pas un crustacé, mais un arthropode de la classe des mérostomes, animaux marins à respiration branchiale, protégés par une épaisse carapace articulée.

Malgré leur nom courant, les limules, sont donc plus proche des araignées ou des scorpions que des crabes [69] (*photos ci-dessous*). Ces animaux sont restés quasiment identiques à leurs ancêtres fossiles âgés de plus de 400 millions d'années. Les limules vivent le long de la côte est de l'Amérique du Nord, de la Nouvelle-Écosse au Yucatán, et dans la zone orientale de l'océan Pacifique, de l'Inde aux Philippines.

Comme les arachnides, les limules ont la particularité d'avoir un « système circulatoire ouvert » maintenant les organes dans le sang ou hémolymphe et les échanges (gaz, nutriments, déchets) s'y opèrent par simple diffusion [70]. Cette hémolymphe apparaît de couleur bleue du fait de la présence d'hémocyanine comme transporteur d'oxygène au lieu d'hémoglobine. Des amœbocytes, cellules de forme ovoïde, granuleuses et nucléées, de la taille d'un macrophage humain, baignent dans cette hémolymphe.

Suite à une agression, y compris la mise en présence de LPS ou d'endotoxines, les amœbocytes perdent leur forme ovoïde pour devenir polyglobulées et s'agrègent en formant un caillot protecteur à l'endroit de l'agression. Cette réaction est due à des enzymes situés dans les granules des amœbocytes et réagissant avec les lipopolysaccharides. Ce mécanisme de coagulation du sang de limule en présence d'endotoxines est à la base de différentes méthodes avec une détermination semi-quantitative (méthode par gélification) ou quantitative (méthodes turbidimétrique ou chromogénique). Plus récemment, une méthode a été spécialement mise au point pour le dosage des endotoxines dans les aérosols ambiants : la méthode KLARE (*Kinetic Limulus Assay with Resistant-parallel Line Estimation*). Elle permet de traiter rapidement, et avec une sensibilité suffisante, un grand nombre d'échantillons [63].

ANALYSE CHIMIQUE

Une méthode chimique plus récente est basée sur la détection d'un marqueur. Ce marqueur chimique choisi doit se retrouver dans l'unité bactérienne responsable de la toxicité et lui être spécifique. La région du lipide A, responsable de la toxicité de la molécule d'endotoxine et de la coagulation de la réaction du LAL, est souvent utilisée. Cette région contient l'acide 3-hydroxymyristique ou β -hydroxymyristique (BHM). Le BHM est l'acide gras saturé le plus abondant du lipide A et il est spécifique aux endotoxines [71]. La détection du BHM peut se faire par chromatographie en phase gazeuse (CPG) souvent couplée à un spectromètre de masse.

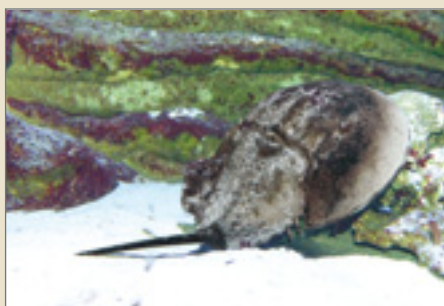
VALEUR LIMITE D'EXPOSITION PROFESSIONNELLE

Les résultats de mesure sont donnés de plus en plus souvent en unités d'endotoxines par mètre-cube d'air (UE.m^{-3}) en remplacement des dosages en nanogrammes par mètre-cube (ng.m^{-3}). Le coefficient de conversion varie selon l'espèce bactérienne à l'origine des endotoxines. Pour faciliter la conversion, il est généralement admis un facteur 10 : $1 \text{ ng.m}^{-3} = 10 \text{ UE.m}^{-3}$.

Depuis mai 2003, le mesurage des endotoxines dans les bioaérosols doit respecter la norme NF EN 14031 sur la détermination des endotoxines en suspension dans l'air [72]. Cette norme fixe les prescriptions techniques et analytiques mais ne donne aucun renseignement sur les critères d'interprétation des résultats.

Les Pays-Bas sont le seul pays à s'être doté d'une valeur limite d'exposition professionnelle (VLEP) pour les endotoxines depuis 1998, non sans quelques difficultés (*encadré 4*). Depuis juillet 2010, leur VLEP « endotoxines » est fixée à 90 UE.m^{-3} , sachant qu'ils

Photos : *Limulus polyphemus* debout sur ses pattes et renversé sur le dos.



© P. DUQUENNE/INRS

Historique de la valeur limite d'exposition endotoxines aux Pays-Bas (d'après J.L. Wannepain, Eurogip, communication personnelle)

1998 : Suite à un avis du DECOS (*Dutch Expert Committee on Occupational Safety*), le Conseil sanitaire néerlandais adopte, pour les endotoxines, une valeur limite d'exposition sur 8 heures (VME) de 50 UE/m³.

2000 : En juin 2000, après consultation des professionnels concernés, le conseil économique et social néerlandais (SER) estime que l'introduction de cette VME pose des problèmes techniques et économiques trop importants aux entreprises (écarts dans les méthodes de mesure, difficultés quant à la possibilité de respecter une telle norme dans la pratique). Il propose d'instaurer une valeur limite plus réaliste de 200 UE/m³ tout en gardant l'objectif de diminuer les expositions afin d'abaisser ultérieurement la limite légale à 50 UE/m³, si possible 2 ans après la mise en place de la limite de 200 UE/m³.

La réglementation est modifiée le 27 novembre 2000 ; la valeur limite de 200 UE/m³ entre en vigueur à compter du 1^{er} juillet 2001.

Cette échéance ne pouvant pas être respectée, l'entrée en vigueur est une première fois repoussée au 1^{er} janvier 2003.

2002 : En novembre 2002, le SER considère que l'adoption de la valeur limite de 200 UE/m³ doit être suspendue.

2003 : Le 15 juillet 2003, cette valeur limite est supprimée de la réglementation néerlandaise sous certaines conditions :

- les entreprises doivent établir un plan de réduction de l'exposition aux endotoxines, dont l'exécution pourra prendre de 2 à 4 ans selon les secteurs d'activités ;
- la future norme EN 14031 devra être mise en place ;
- les laboratoires d'analyses devront répondre à des exigences précises.

Le SER prévoit un délai de 2 à 4 ans avant la mise en place d'une nouvelle valeur limite légale.

2010 : Le DECOS considère qu'une exposition à une VME à 90 UE/m³ est sans effet notable sur la santé. En juillet 2010, les Pays-Bas fixe la VME endotoxines à 90 UE/m³ pour une durée d'exposition de 8 heures, les endotoxines étant mesurées selon la norme EN 14031 modifiée selon Spaan et al. [73].

utilisent une version modifiée de la norme NF EN 14031 [73]. Ceci incite à la prudence quant à la transposition de cette VLEP à toute situation de travail ailleurs qu'aux Pays-Bas.

Ailleurs, il n'existe pas de valeur limite réglementairement définies. L'ACGIH (*American Conference of Industrial Hygienists*) a publié en 1999 un rapport faisant le point des connaissances sur les bioaérosols [74]. Pour les endotoxines, il était proposé de retenir les valeurs seuils suivantes : en l'absence de plainte spontanée des travailleurs, concentration mesurée au plus égale à 30 fois la concentration de base ; en cas de contrôle après plaintes de travailleurs, concentration mesurée au plus égale à 10 fois celle de base. Ceci suppose qu'un site de référence (air de l'environnement extérieur, local réputé sans pollution spécifique...) ait été choisi pour un prélèvement dont le résultat sera considéré comme la concentration témoin à laquelle seront comparés les résultats des au-

tres mesurages. Mais depuis au moins 2009, l'ACGIH ne veut plus se prononcer sur des valeurs limites pour les endotoxines, ni pour les autres éléments des bioaérosols [75].

L'IRSST (Institut Robert Sauvé de recherche et de sécurité en santé au travail) au Québec retient toujours ces anciennes valeurs ACGIH comme des valeurs-guides dont le dépassement nécessite l'engagement d'actions correctrices [76].

Certaines valeurs seuils sont souvent avancées dans des articles ou rapports comme étant ceux de la Commission internationale de santé au travail (CIST). En fait, dans les années 90, elles ont été publiées sous la signature, entre autres, de Rylander [77] alors responsable du Comité Poussières organiques de la CIST. Ces valeurs seuils ne concernent que les effets aigus des endotoxines sur les voies respiratoires et ne présentent rien d'éventuelles conséquences à long terme d'une exposition chronique (*tableau I*).

Valeurs seuils pour les effets aigus des endotoxines [77].

	ng/m ³	UE/m ³	Effet clinique
■	10	100	Irritation des voies respiratoires
■	100	1 000	Effets systémiques (fièvre, courbatures...)
■	200	2 000	ODTS (syndrome toxique des poussières organiques)

TABLEAU I



Quelle que soit leur origine, les valeurs seuils proposées dans la littérature ont l'inconvénient de ne pas être spécifiques d'une activité donnée et peuvent donc prêter à discussion quant à leur utilisation comme valeur de référence, d'où l'utilité des résultats des mesures comparatives conseillées ci-dessus. La répétition des mesurages après des travaux d'amélioration portant sur la ventilation des locaux, le captage des poussières... permet également de suivre la diminution de l'exposition. L'idéal serait de pouvoir disposer d'une échelle des valeurs rencontrées dans des situations semblables. Dans l'attente d'une valeur limite d'exposition réglementaire, ceci permettrait de situer les résultats de prélèvements faits pour une entreprise par rapport à ce qui s'observe ailleurs dans le même secteur professionnel et de pointer les résultats aberrants. Tout résultat largement supérieur aux moyennes enregistrées ailleurs devrait alors entraîner la mise en œuvre rapide de moyens de correction et de mesures de prévention. Un résultat situé dans la moyenne des résultats de la profession ne serait pas synonyme d'absence de risque mais donnerait plus de temps pour réfléchir aux moyens à mettre en œuvre pour diminuer l'exposition aux endotoxines et tendre vers les résultats les plus bas enregistrés pour ce type d'activité.

Compte tenu de la complexité du mesurage des endotoxines et des difficultés d'interprétation des résultats, il va de soi qu'un contrôle de la teneur en endotoxines

n'a de sens que dans des ambiances de travail où les VLEP poussières totales et poussières alvéolaires sont déjà respectées.

Conclusion

Les endotoxines sont des éléments constitutifs de la paroi des bactéries Gram négatif présentes partout dans l'environnement, y compris dans certaines atmosphères de travail.

Lors de leur lyse ou de leur multiplication, les bactéries Gram négatif libèrent des endotoxines qui peuvent alors agir sur l'organisme avec, notamment en santé au travail, un effet pyrogène et des symptômes respiratoires (toux, dyspnée). Pour le contrôle des atmosphères de travail, différentes pratiques existent tant pour l'échantillonnage que pour l'analyse des endotoxines. Bien qu'il ne soit pas d'une pratique courante, le mesurage des endotoxines se développe peu à peu.

Ce premier article fait une synthèse des connaissances sur l'origine et les propriétés toxiques et bénéfiques des endotoxines. Un second article fera le point sur les expositions et les risques en milieu professionnel. Un point rapide sera également fait sur la théorie hygiéniste.

Points à retenir

Les endotoxines sont des composants de la paroi des bactéries Gram négatif. Elles associent un fragment de la paroi et un lipopolysaccharide spécifique de l'espèce bactérienne.

Les endotoxines ont parfois des effets toxiques redoutables mais elles ont aussi des effets positifs sur la santé.

Les bactéries Gram négatif étant ubiquitaires, les endotoxines sont elles-mêmes présentes partout dans l'environnement.

De nombreux secteurs professionnels sont concernés : monde agricole, transformation des fibres végétales et de la laine, travail dans les égouts, traitement des déchets et des eaux usées...

La métrologie des endotoxines dans les bioaérosols n'est pas une pratique courante mais elle se développe peu à peu.

Bibliographie

- [1] Euzéby J.P. Dictionnaire de bactériologie clinique, 2000.
- [2] RAMAZZINI B - Des maladies au travail. Traduit de : *de morbis artificum diatriba*. 1700. Éditions Alexitère ; 1990 : 343 p.
- [3] RIETSCHEL ET, BRADE H - Bacterial endotoxins. *Sci Am*. 1992 ; 267 (2) : 54-61.
- [4] BOIVAN A, MESROBEANU L - Contribution à l'étude de la composition chimique des bactéries. Les substances phosphorées au cours de l'analyse bactérienne *C R Soc Biol*. 1933 ; 112 : 76-79.
- [5] WESTPHAL O, LUEDERITZ O, STAUB AM - Bacterial endotoxins. *J Med Pharm Chem*. 1961 ; 4 : 497-504.
- [6] SCHNEITER R, NEAL PA, CAMINITA BH - Etiology of Acute Illness Among Workers Using Low-grade Stained Cotton. *Am J Public Health Nations Health*. 1942 ; 32 (12) : 1345-59.
- [7] PERNIS B, VIGLIANI EC, CAVAGNA C, FINULLI M - The role of bacterial endotoxins in occupational diseases caused by inhaling vegetable dusts. *Br J Ind Med*. 1961 ; 18 : 120-29.
- [8] CAVAGNA G, FOA V, VIGLIANI EC - Effects in man and rabbits of inhalation of cotton dusts or extracts and purified endotoxins. *Br J Ind Med*. 1969 ; 26 (4) : 314-21.
- [9] RYLANDER R, MOREY P - Airborne endotoxin in industries processing vegetable fibers. *Am Ind Hyg Assoc J*. 1982 ; 43 (11) : 811-12.
- [10] RYLANDER R - The role of endotoxin for reactions after exposure to cotton dust. *Am J Ind Med*. 1987 ; 12 (6) : 687-97.
- [11] RYLANDER R - The role of endotoxin in humidifier disease. In: Molina C (Ed) - Maladies des climatiseurs et des humidificateurs. Colloque INSERM. Clermont-Ferrand, 5-6 septembre 1985. Paris : INSERM ; 1986 : 179-92, 377 p.
- [12] MATTSBY I, RYLANDER R - Clinical and immunological findings in workers exposed to sewage dust. *J Occup Med*. 1978 ; 20 (10) : 690-92.
- [13] HOLST O, ULMER AJ, BRADE H, FLAD HD ET AL - Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. *FEBS Immunol Med Microbiol*. 1996 ; 16 (2) : 83-104.
- [14] SONESSON A, JANTZEN E, TANGEN T, ZÄHRINGER U - Chemical characterization of lipopolysaccharides from *Legionella feeleii*, *Legionella hackeliae* and *Legionella jordanis*. *Microbiology*. 1994 ; 140 (Pt 10) : 2663-71.
- [15] RIETSCHEL ET, SEYDEL U, ZÄHRINGER U, SCHAUDE UF ET AL - Bacterial endotoxin: molecular relationships between structure and activity. *Infect Dis Clin North Am*. 1991 ; 5 (4) : 753-79.
- [16] RAETZ CR, ULEVITCH RJ, WRIGHT SD, SIBLEY CH ET AL - Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *FASEB J*. 1991 ; 5 (12) : 2652-60.
- [17] GALANOS C, LEHMANN V, LÜDERITZ O, RIETSCHEL ET ET AL - Endotoxic properties of chemically synthesized lipid A part structures. Comparison of synthetic lipid A precursor and synthetic analogues with biosynthetic lipid A precursor and free lipid A. *Eur J Biochem*. 1984 ; 140 (2) : 221-27.
- [18] KITCHENS RL, THOMPSON PA, VIRIYAKOSOL S, O'KEEFE GE ET AL - Plasma CD14 decreases monocyte responses to LPS by transferring cell-bound LPS to plasma lipoproteins. *J Clin Invest*. 2001 ; 108 (3) : 485-93.
- [19] WURFEL MM, HAILMAN E, WRIGHT SD - Soluble CD14 acts as a shuttle in the neutralization of lipopolysaccharide (LPS) by LPS-binding protein and reconstituted high density lipoprotein. *J Exp Med*. 1995 ; 181 : 1743-54.
- [20] BILLIAR TR, CURRAN RD, FERRARI FK, WILLIAMS DL ET AL - Kupffer cell: hepatocyte cocultures release nitric oxide in response to bacterial endotoxin. *J Surg Res*. 1990 ; 48 (4) : 349-53.
- [21] MIRA JP, CARIOU A, GRALL F, DELCLAUX C ET AL - Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA*. 1999 ; 282 (6) : 561-68.
Comment in: *JAMA*. 1999 ; 282 (6) : 579-81.
- [22] LORENZ E, MIRA JP, FREES KL, SCHWARTZ DA - Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med*. 2002 ; 162 (9) : 1028-32.
Comment in: *Arch Intern Med*. 2002 ; 162 (21) : 2496; author reply 2496.
- [23] CHARPIN D - Maladies allergiques, maladies environnementales. *Rev Prat*. 2007 ; 57 (12) : 1297-303.
- [24] PRIDMORE AC, WYLLIE DH, ABDILLAH F, STEEGHS L ET AL - A lipopolysaccharide-deficient mutant of *Neisseria meningitidis* elicits attenuated cytokine release by human macrophages and signals via toll-like receptor (TLR) 2 but not via TLR4/MD2. *J Infect Dis*. 2001 ; 183 (1) : 89-96.
Erratum in: *J Infect Dis*. 2001 ; 183 (1) : 177.
- [25] AMOUREUX MC - Rôle pathophysiologique des endotoxines, un dénominateur commun dans différentes maladies. *Pathol Biol*. 2004 ; 52 (7) : 415-22.
- [26] MIYASHIMA T, HAYASHI K, AWAI M - Initiation and recovery processes of endotoxin induced disseminated intravascular coagulation (DIC): scanning and transmission electron microscopic observations of rat renal tissues. *Acta Med Okayama*. 1989 ; 43 (2) : 115-26.
- [27] VAN DER POLL T, DE JONGE E, LEVI M - Regulatory role of cytokines in disseminated intravascular coagulation. *Semin Thromb Hemost*. 2001 ; 27 (6) : 639-651.
- [28] VAN DER POLL T - Coagulation and inflammation. *J Endotoxin Res*. 2001 ; 7 (4) : 301-04.
- [29] TEN CATE JW, VAN DER POLL T, LEVI M, TEN CATE H ET AL - Cytokines: triggers of clinical thrombotic disease. *Thromb Haemost*. 1997 ; 78 (1) : 415-19.
- [30] OPAL SM, SCANNON PJ, VINCENT JL, WHITE M ET AL - Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis*. 1999 ; 180 (5) : 1584-89.
- [31] OPAL SM - The clinical relevance of endotoxin in human sepsis: a critical analysis. *J Endotoxin Res*. 2002 ; 8 (6) : 473-76.
- [32] BRANDTZAEG P, KIERULF P, GAUSTAD P, SKULBERG A ET AL - Plasma endotoxin as a predictor of multiple organ failure and death in systemic meningococcal disease. *J Infect Dis*. 1989 ; 159 (2) : 195-204.
- [33] HURLEY JC - Concordance of endotoxemia with gram-negative bacteremia. A meta-analysis using receiver operating characteristic curves. *Arch Pathol Lab Med*. 2000 ; 124 (8) : 1157-64.
- [34] SCHULZE C, OESSER S, HEIN H, SEIFERT J - Risk of endotoxemia during the initial phase of gut decontamination with antimicrobial agents. *Res Exp Med (Berl)*. 2001 ; 200 (3) : 169-174.
- [35] LEPPER PM, HELD TK, SCHNEIDER EM, BÖLKE E ET AL - Clinical implications of antibiotic-induced endotoxin release in septic shock. *Intensive Care Med*. 2002 ; 28 (7) : 824-33.
- [36] REED CE, MILTON DK - Endotoxin-stimulated innate immunity: A contributing factor for asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 ; 108 (2) : 157-66.
- [37] HYERS TM, TRICOMI SM, DETTENMEIER PA, FOWLER AA - Tumor necrosis factor levels in serum and bronchoalveolar lavage fluid of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*. 1991 ; 144 (2) : 268-71.
- [38] SANAI L, HAYNES WVG, MACKENZIE A, GRANT IS ET AL - Endothelin production in sepsis and the adult respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med*. 1996 ; 22 (1) : 52-56.
- [39] FAGAN KA, McMURTRY IF, RODMAN DM - Role of endothelin-1 in lung disease. *Respir Res*. 2001 ; 2 (2) : 90-101.
- [40] FUJII Y, MAGDER S, CERNACEK P, GOLDBERG P ET AL - Endothelin receptor blockade attenuates lipopolysaccharide-induced pulmonary nitric oxide production. *Am J*



Respir Crit Care Med. 2000 ; 161 (3 Pt 1) : 982-89.

[41] **KHADAROO RG, MARSHALL JC** - ARDS and the multiple organ dysfunction syndrome. Common mechanisms of a common systemic process. *Crit Care Clin.* 2002 ; 18 (1) : 127-41.

[42] **MATHISON JC, ULEVITCH RJ** - The clearance, tissue distribution, and cellular localization of intravenously injected lipopolysaccharide in rabbits. *J Immunol.* 1979 ; 123 (5) : 2133-43.

[43] **RUITER DJ, VAN DER MEULEN J, BROUWER A, HUMMEL MJ ET AL.** - Uptake by liver cells of endotoxin following its intravenous injection. *Lab Invest.* 1981 ; 45 (1) : 38-45.

[44] **NOLAN JP** - The role of endotoxin in liver injury. *Gastroenterology.* 1975 ; 69 (6) : 1346-56.

[45] **LIEHR H, GRÜN M, BRUNSWIG D, SAUTTER T** - Letter: Endotoxaemia in liver cirrhosis: treatment with polymyxin B. *Lancet.* 1975 ; 1 (7910) : 810-11.

[46] **PRYTZ H, HOLST-CHRISTENSEN J, KORNER B, LIEHR H** - Portal venous and systemic endotoxaemia in patients without liver disease and systemic endotoxaemia in patients with cirrhosis. *Scand J Gastroenterol.* 1976 ; 11 (8) : 857-63.

[47] **CHAN CC, HWANG SJ, LEE FY, WANG SS ET AL.** - Prognostic value of plasma endotoxin levels in patients with cirrhosis. *Scand J Gastroenterol.* 1997 ; 32 (9) : 942-46.

[48] **ENOMOTO N, IKEJIMA K, BRADFORD B, RIVERA C ET AL.** - Alcohol causes both tolerance and sensitization of rat Kupffer cells via mechanisms dependent on endotoxin. *Gastroenterology.* 1998 ; 115 (2) : 443-51.

[49] **ADACHI Y, MOORE LE, BRADFORD BU, GAO W ET AL.** - Antibiotics prevent liver injury in rats following long-term exposure to ethanol. *Gastroenterology.* 1995 ; 108 (1) : 218-24.

[50] **NANJJI AA, KHETTRY U, SADRZADEH SM** - *Lactobacillus* feeding reduces endotoxemia and severity of experimental alcoholic liver (disease). *Proc Soc Exp Biol Med.* 1994 ; 205 (3) : 243-247.

[51] **VODOVOTZ Y, LIU S, McCLOSKEY C, SHAPIRO R ET AL.** - The hepatocyte as a microbial product-responsive cell. *J Endotoxin Res.* 2001 ; 7 (5) : 365-73.

[52] **BAUTISTA AP, SPITZER JJ** - Superoxide anion generation by in situ perfused rat liver:

effect of in vivo endotoxin. *Am J Physiol.* 1990 ; 259 (6 Pt 1) : G907-12.

[53] **SOZINOV AS** - Systemic endotoxemia during chronic viral hepatitis. *Bull Exp Biol Med.* 2002 ; 133 (2) : 153-55.

[54] **CARADONNA L, MASTRONARDI ML, MAGRONE T, COZZOLONGO R ET AL.** - Biological and clinical significance of endotoxemia in the course of hepatitis C virus infection. *Curr Pharm Des.* 2002 ; 8 (11) : 995-1005.

[55] **BURRELL R, YE SH** - Toxic risks from inhalation of bacterial endotoxin. *Br J Ind Med.* 1990 ; 47 (10) : 688-91.

[56] **JACOBS RR** - Airborne endotoxins: an association with occupational lung disease. *Appl Ind Hyg.* 1989 ; 4 (2) : 50-56.

[57] **FUCHS HJ, DEBS R, PATTON JS, LIGGITT HD** - The pattern of lung injury induced after pulmonary exposure to tumor necrosis factor-alpha depends on the route of administration. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1990 ; 13 (5) : 397-404.

[58] **WHEELER AP, JESMOK G, BRIGHAM KL** - Tumor necrosis factor's effects on lung mechanics, gas exchange, and airway reactivity in sheep. *J Appl Physiol.* 1990 ; 68 (6) : 2542-49.

[59] **MICHEL O, DUCHATEAU J, SERGYSLS R** - Effect of inhaled endotoxin on bronchial reactivity in asthmatic and normal subjects. *J Appl Physiol.* 1989 ; 66 (3) : 1059-64.

[60] **MICHEL O, NAGY AM, SCHROEVEN M, DUCHATEAU J ET AL.** - Dose-response relationship to inhaled endotoxin in normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 ; 156 (4 Pt 1) : 1157-64.

[61] **NORN S, CLEMENTSEN P, FOMSGAARD A, KILIAN M** - *Haemophilus influenzae* potentiates basophil histamine release possibly by its endotoxins. *Agents Actions.* 1990 ; 30 (1-2) : 57-60.

[62] **RYLANDER R** - Environmental exposures with decreased risks for lung cancer? *Int J Epidemiol.* 1990 ; 19 (Suppl 1) : S67-72.

[63] **GREFF MIRGUET G** - Échantillonnage et analyse des endotoxines dans l'air: Étude bibliographique. Note documentaire ND 2170. *Cah Notes Doc.* 2002 ; 187 : 73-87.

[64] Endotoxines. Fiche Métropol 089. In : Métropol. INRS ; 2010 (www.inrs.fr/metropol).

[65] **LAITINEN S, NEVALAINEN A, KOTIMAA M, LIESVUORI J ET AL.** - Relationship between bacterial counts and endotoxin concentrations in

the air of wastewater treatment plants. *Appl Environ Microbiol.* 1992 ; 58 (11) : 3774-76.

[66] **WEISS PJ** - Pyrogen testing. *J Parenter Drug Assoc.* 1978 ; 32 (5) : 236-41.

[67] **SONESSON A, LARSSON L, SCHÜTZ A, HAGMAR L ET AL.** - Comparison of the *limulus* amoebocyte lysate test and gas chromatography-mass spectrometry for measuring lipopolysaccharides (endotoxins) in airborne dust from poultry-processing industries. *Appl Environ Microbiol.* 1990 ; 56 (5) : 1271-78.

[68] **MARCHAND G** - Les endotoxines en milieu de travail. Bilans de connaissances. Rapport B-049. Montréal : IRSST ; 1996 : 37 p.

[69] **CAMPBELL NA** - Biology. Menlo Park : Benjamin Cummings Publishing Corporation ; 1987.

[70] **BERZOFKY RN, McCULLOUGH KZ** - Applications of LAL in pharmaceutical and medical devices. In: Gupta AP (Ed) - Immunology of insects and other arthropods. Boca Raton : CRC Press ; 1991 : 430-44, 508 p.

[71] **KIRSCHNER D, QUE HEE SS, CLARK CS** - Method for detecting the 3-hydroxymyristic acid component of the endotoxins of gram-negative bacteria in compost samples. *Am Ind Hyg Assoc J.* 1985 ; 46 (12) : 741-46.

[72] Atmosphères des lieux de travail. Détermination des endotoxines en suspension dans l'air. Norme française homologuée NF EN 14031. Mai 2003. Indice de classement X 43-240. Saint-Denis La Plaine : AFNOR ; 2003 : 15 p.

[73] Endotoxins. Health-based recommended occupational exposure limit. The Hague : Health Council of the Netherlands ; 2010 : 100 p.

[74] **MACHER J, AMMANN HA, BURGE H, MILTON DK (Eds) ET AL.** - Bioaerosols: assessment and control. Cincinnati ACGIH ; 1999 : 322 p.

[75] TLVs and BEIs ACGIH Cincinnati Ohio USA septembre 2001, 54 pages

[76] **GOYER N, LAVOIE J, LAZURE L, MARCHAND G ET AL.** - Les bioaérosols en milieu de travail : guide d'évaluation, de contrôle et de prévention. Études et recherches. Guide technique T-23. Montréal : IRSST ; 2001 : 88 p.

[77] **RYLANDER R** - Evaluation of the risks of endotoxin exposures. *Int J Occup Environ Health.* 1997 ; 3 (Suppl 1) : S32-S36.