



HAL
open science

Les endotoxines en hémodialyse. Obtention de bains stériles apyrogènes. Rétention des lipopolysaccharides par les membranes de dialyse modifiées

François Lantreibecq

► To cite this version:

François Lantreibecq. Les endotoxines en hémodialyse. Obtention de bains stériles apyrogènes. Rétention des lipopolysaccharides par les membranes de dialyse modifiées. Hématologie. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 1990. Français. NNT : . tel-01068738

HAL Id: tel-01068738

<https://theses.hal.science/tel-01068738v1>

Submitted on 26 Sep 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre:

Année 1990

THÈSE

présentée devant
L'UNIVERSITÉ DE SAINT-ÉTIENNE

pour l'obtention
du **DIPLÔME DE DOCTORAT**

par
François LANTREIBECQ

**LES ENDOTOXINES EN HÉMODIALYSE :
OBTENTION DE BAINS STÉRILES APYROGÈNES -
RÉTENTION DES LIPOPOLYSACCHARIDES PAR DES
MEMBRANES DE DIALYSE MODIFIÉES.**

Soutenue le 26 mars 1990

JURY

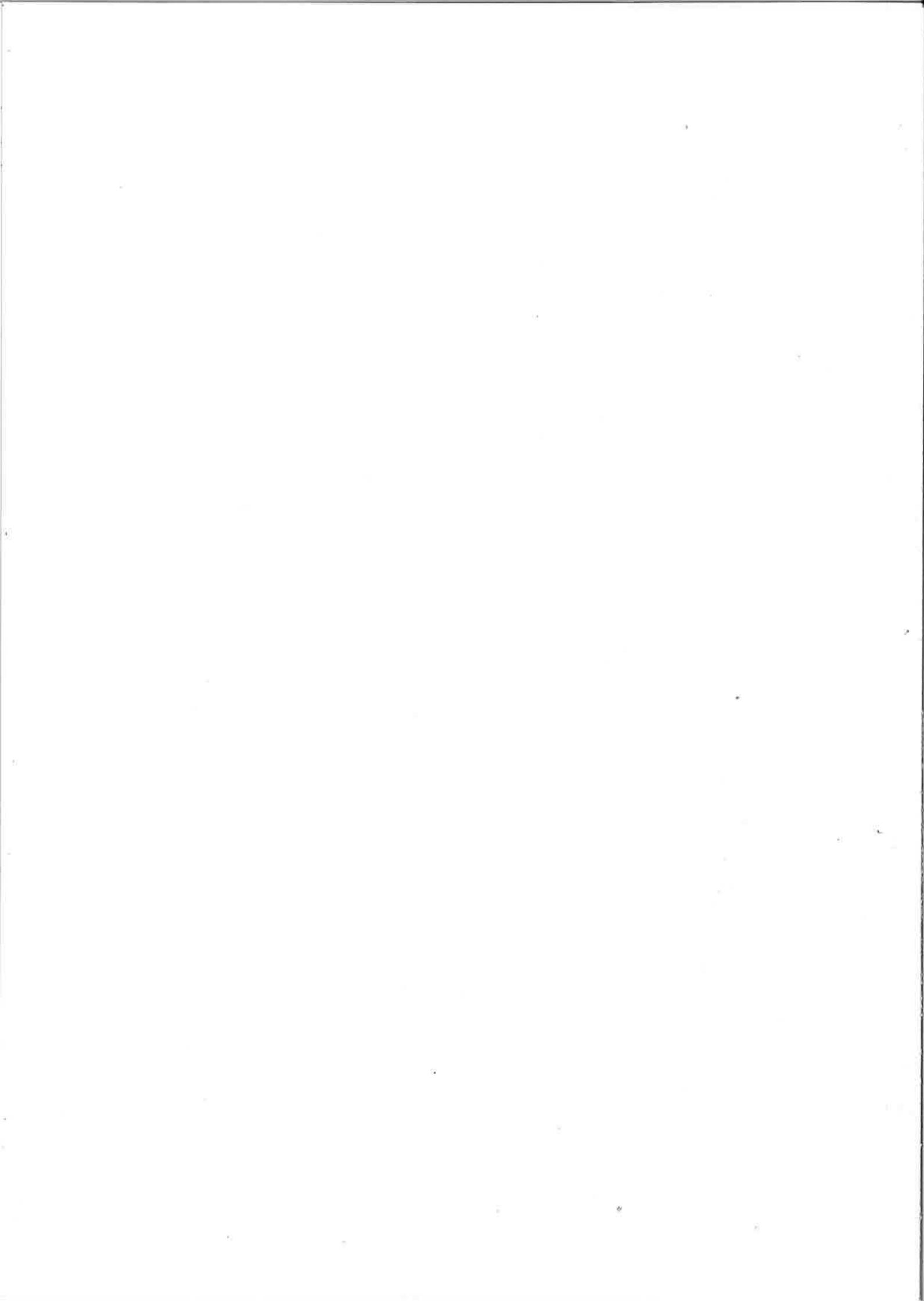
Monsieur J.C. Healy

Monsieur F. Berthoux

Monsieur E.H. Stitt

Mademoiselle M.J. Transy

Monsieur C. Tran-Minh



THÈSE

présentée devant
L'UNIVERSITÉ DE SAINT-ÉTIENNE

pour l'obtention
du DIPLÔME DE DOCTORAT

par
François LANTREIBECQ

LES ENDOTOXINES EN HÉMODIALYSE :
OBTENTION DE BAINS STÉRILES APYROGÈNES -
RÉTENTION DES LIPOPOLYSACCHARIDES PAR DES
MEMBRANES DE DIALYSE MODIFIÉES.

Soutenue le 26 mars 1990

JURY

Monsieur J.C. Healy
Monsieur F. Berthoux
Monsieur E.H. Stitt
Mademoiselle M.J. Transy
Monsieur C. Tran-Minh

Et ça, j'en fais quoi?

Alors tu mets une
self et une capa en
série et t'envoies le
signal !!

Merci pour le café, les
coups de main (et de pied),
... et les braves injures.

Et n'oublie pas que
tout va, tout va, tout va
BIEN

Atchao MCB

FL

à Claire et Julien

à mes parents

Ce travail a été financé, dans le cadre d'une convention Cifre, par la société HOSPAL, et je tiens à remercier Monsieur FRITSCH, directeur technique d'HOSPAL, pour la confiance qu'il m'a accordée.

Ce travail a été réalisé conjointement dans le laboratoire de Biotechnologie de l'École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne sous la direction Monsieur TRAN-MINH et dans le centre de recherche de la société HOSPAL dirigé par Monsieur VANTARD. Je les remercie de m' avoir accueilli et de m'avoir fourni tous les moyens nécessaires à la réalisation de cette thèse.

Mes remerciements vont également à Mademoiselle TRANSY et Monsieur PUSINERI, responsables du service Recherche et Développement Biologie d'HOSPAL, dont les conseils m'ont été précieux pour mener à bien cette étude.

Je remercie Monsieur le Professeur HEALY, de la Faculté de Médecine de Saint Etienne qui a accepté de présider le jury de cette thèse.

J'exprime toute ma gratitude au Professeur BERTHOUX de l'Hôpital Nord de Saint Etienne et à Monsieur STITT de l'université de Bradford qui ont accepté d'évaluer ce travail en qualité de rapporteurs et de membres du jury.

Mes remerciements vont également à Mademoiselle TRANSY et à Monsieur TRAN-MINH pour avoir accepté de participer à mon jury.

J'exprime toute ma reconnaissance à M. LAUDE-SHARP de l'Hôpital Broussais (Paris) qui a grandement contribué à la réalisation de ce travail en effectuant les dosages de l'activité IL-1.

Je tiens à remercier tout le personnel d'HOSPAL-COT et tout particulièrement M-N. RODANGE et T. CROST qui ont enduré avec moi les joies du test LAL.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à l'ensemble des membres du laboratoire de Biotechnologie de l'École des Mines qui m'ont aidé à mener à bien ce travail, et tout particulièrement à M-C. BARTHOLIN pour son aide permanente et ses conseils avertis, à D. CHAVANNE, H. BESSET et H. VAILLANT pour leurs coups de main.

Je remercie également Pascal et Laurent qui m'ont précédé dans ce laboratoire et y ont fait pénétrer la microbiologie.

Enfin, je souhaite bon courage et mes sincères vœux de réussite à Bernadette, Florence, Françoise, Isabelle, Denis, Helmut, Jean-Marie, Jean-Pascal, Pierre, Rémi, Satish et Stéphane.

RÉSUMÉ

Les réactions de type hypersensibilité parfois observées au début de séances d'hémodialyse ont été corrélées à la présence, dans les bains de dialyse, d'endotoxines (Lipopolysaccharides, LPS) provenant de bactéries de type Gram négatif.

Nous nous sommes tout d'abord attachés au développement d'un système de production de bains de dialyse stériles et apyrogènes qui soit intégrable au matériel existant. Notre étude nous a permis de rejeter les dispositifs d'ultrafiltration utilisant des membranes organiques planes ou des membranes minérales tubulaires. L'emploi d'un hémofiltre à fibres creuses en polyamide s'avère un bon compromis puisque, dans des conditions de contamination normales, le bain produit est stérile et apyrogène et la faible perte de charge générée par le filtre permet son intégration aux générateurs de bains existants.

Nous avons ensuite estimé la masse moléculaire des LPS par électrophorèse et par filtrations successives sur des membranes de seuils de coupure décroissants. Nous avons ainsi pu mettre en évidence des LPS après filtration sur des membranes de 5 kDa. Ce résultat a été confirmé en électrophorèse où nous avons pu estimer une masse moléculaire inférieure à 5 kDa pour les LPS de type R.

Dans une dernière étape, nous avons cherché à modifier la membrane de dialyse pour augmenter sa réjection des LPS. Un revêtement de la face dialysat de la membrane par un polymère organique polycationique nous a permis d'obtenir des adsorptions notables de LPS.

La conjonction des deux méthodes que nous avons proposées, ultrafiltration des bains et modification de la membrane, limite d'ores et déjà considérablement les possibilités de transfert des LPS vers le compartiment sanguin. Des essais cliniques nous permettront de valider ce procédé.

ABSTRACT

The occurrence of febrile reactions at the beginning of hemodialysis session has been well correlated with the presence of endotoxins (Lipopolysaccharides, LPS) in the dialysate.

We have developed a system for the production of sterile pyrogen-free dialysate using a hemofilter containing polyamide hollow fibers.

We have also estimated the molecular weight of LPS by electrophoresis and successive ultrafiltrations using membranes of decreasing pore size. A molecular weight below 5 kDa was determined.

The dialysis membranes were then modified in order to increase their rejection of LPS. Membranes coated with a polycationic organic polymer exhibit high adsorption capacity for LPS.

The methods we propose, namely, ultrafiltration of dialysate and coating of dialysis membranes, significantly lower the risks of pyrogenic reactions. However, these results need to be confirmed by clinical experiments.

INTRODUCTION.....	1
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES - PROBLÉMATIQUE.....	5
1. L'HÉMODIALYSE.....	5
1.1. Insuffisance rénale et fonctions de l'hémodialyse.....	5
1.2. Différents modes de suppléance rénale.....	7
1.2.1. Hémodialyse périodique.....	7
1.2.2. Hémofiltration.....	7
1.2.3. Hémodiafiltration.....	9
1.2.4. Dialyse péritonéale.....	9
1.2.5. Transplantation rénale.....	9
1.3. Hémodialyseurs et membranes.....	13
1.3.1. Différents types d'hémodialyseurs.....	13
1.3.2. Membranes de dialyse.....	13
1.3.3. Performances des hémodialyseurs.....	13
1.3.4. Biocompatibilité des membranes d'hémodialyse.....	15
1.4. Transferts de matière en hémodialyse.....	15
1.5. Bains de dialyse.....	17
1.6. Générateurs de bains.....	19
2. LES RÉACTIONS ANAPHYLACTOÏDES EN HÉMODIALYSE.....	21
2.1. Existence.....	21
2.2. Origine des réactions.....	21
2.2.1. Résidus de fabrication des hémodialyseurs.....	23
2.2.2. Agents stérilisants.....	23
2.2.3. Biocompatibilité des membranes.....	25
2.2.4. Contamination bactérienne.....	25
2.3. Mécanismes des réactions; l'hypothèse IL-1.....	25
2.4. Conclusion.....	27
3. CONTAMINATION BACTÉRIENNE ET ENDOTOXINES.....	27
3.1. Microbiologie des bains de dialyse.....	27
3.2. Les Lipopolysaccharides (LPS).....	29
3.2.1. Structure des LPS.....	31
3.2.2. Taille - conformation.....	31
3.2.2.1. Masse moléculaire.....	31
3.2.2.2. Conformation des LPS natifs.....	33
3.2.3. Activités biologiques des LPS.....	35

4. MÉTHODES DE DÉTECTION DES LPS.....	35
4.1. Remarque à propos du test sur lapin	35
4.2. Le test L.A.L. (Lysat d'Amœbocytes de Limule).....	35
4.3. Capacité d'induction de la synthèse d'Interleukine-1 (IL-1)	39
4.3.1. Présentation de l'Interleukine-1 humaine.....	39
4.3.2. Induction de la synthèse d'Interleukine-1	39
4.3.2. Mécanisme d'induction de la synthèse d'Interleukine-1	41
5. ORIENTATION DES TRAVAUX.....	43
ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE LA PRODUCTION DE BAINS STÉRILES APYROGÈNES	45
1. INTRODUCTION.....	45
1.1. Choix du site de purification	45
1.2. Procédés de dépyrogénéation	47
1.2.1. Adsorption	47
1.2.2. Osmose inverse.....	47
1.2.3. Ultrafiltration.....	47
1.2.4. Microfiltration.....	49
1.3. Cahier des charges	49
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES	51
2.1. Présentation des membranes	51
2.1.1. Membranes planes.....	51
2.1.2. Hémofiltre FH88.....	51
2.1.3. Membranes céramiques.....	53
2.2. Méthodologie: Types de validation.....	53
2.3. Bancs d'essai	55
2.3.1. Essais <i>in vitro</i>	55
2.3.2. Simulation de dialyse	55
2.3.3. Banc d'essai pour membranes céramiques.....	57
3. RÉSULTATS	57
3.1. Membranes planes.....	57
3.1.1. Perte de charge.....	57
3.1.2. Performances biologiques.....	59
3.1.2.1. Rétention bactérienne	59
3.1.2.2. Rétention endotoxinique.....	59
3.1.3. Remarque sur les membranes planes.....	61
3.1.4. Conclusion	61

3.2. Hémofiltre FH 88	61
3.2.1. Perte de charge.....	65
3.2.2. Validation biologique	67
3.2.2.1. Rétention bactérienne	67
3.2.2.2. Rétention endotoxinique	67
3.2.2.3. Induction d'IL-1	67
3.2.3. Effet des désinfections.....	69
3.2.4. Conclusion.....	71
3.3. Membranes céramiques.....	71
3.3.1. Rétention endotoxinique.....	71
3.3.2. Perméabilité	73
3.3.3. Conclusion.....	73
4. CONCLUSION GÉNÉRALE.....	73

APPROCHE DE LA MASSE MOLÉCULAIRE DES INDUCTEURS D'IL-1 PRÉSENTS DANS LES BAINS DE DIALYSE..... 77

1. INTRODUCTION.....	77
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	77
2.1. Electrophorèse des LPS	77
2.1.1. Conditions d'électrophorèse	77
2.1.2. Préparation des échantillons.....	79
2.1.2.1. LPS extraits.....	79
2.1.2.2. Lysats de bactéries entières.....	79
2.1.3. Coloration au nitrate d'argent [TSAI et coll., 1982]	81
2.1.3.1. Fixation.....	81
2.1.3.2. Oxydation	81
2.1.3.3. Coloration par le nitrate d'argent	83
2.1.3.4. Révélation.....	83
2.2. Filtration en cascade.....	83
2.2.1. Préparation de surnageant de culture.....	83
2.2.2. Matériel.....	85
2.2.3. Protocole de filtration des LPS purifiés de <i>Pseudomonas</i>	85
2.2.4. Protocole de filtration des bains contaminés	87

3. RÉSULTATS	87
3.1. Electrophorèse	87
3.2. Résultats des filtrations en cascade de bains surcontaminés.....	89
3.2.1. Protéines.....	91
3.2.2. Activité LAL	91
3.2.3. Interleukine-1	91
3.3. Filtration en cascade de LPS purifiés	95
4. CONCLUSION	97
RÉTENTION DES LPS PAR DES MEMBRANES DE DIALYSE MODIFIÉES	99
1. INTRODUCTION.....	99
1.1. Passage transmembranaire de LPS.....	99
1.2. Présentation des travaux.....	101
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES	103
2.1. Préparation des hémodialyseurs	103
2.1.1. Présentation.....	103
2.1.2. Rinçage.....	105
2.1.3. Traitement.....	105
2.2. Préparation des bains surcontaminés.....	105
2.3. Banc d'essai.....	105
3. RÉSULTATS - DISCUSSION.....	107
3.1. Remarques préliminaires	107
3.2. Effet du traitement par l'albumine	107
3.2.1. Perméabilité vis-à-vis de LPS purifiés.....	109
3.2.2. Perméabilité vis à vis de bains contaminés.....	111
3.2.3. Conclusion.....	111
3.3. Evaluation des performances de polymères organiques	113
3.3.1. Essais d'adsorption	113
3.3.2. Dialyses simulées.....	113
3.3.2.1. Résultats LAL.....	115
3.3.2.2. Résultats d'IL-1	115
4. CONCLUSION	117
CONCLUSION	121
BIBLIOGRAPHIE.....	125

LISTE DES ABRÉVIATIONS

DOC	Désoxycholate de sodium
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ETO	Oxyde d'éthylène
IFN γ	Interféron gamma
IL-1	Interleukine-1
KDO	Acide 2-céto-3-désoxy-D-manno-octonique
LAL	Lysat d'Amœbocytes de Limule
LPS	Lipopolysaccharide
LRV	Log Retention Value
<i>N. meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PAGE	Electrophorèse en gel de polyacrylamide
PEI	PolyEthylèneImine
PGE ₂	Prostaglandine E2
pNa	Para-nitroaniline
ppi	pour préparation injectable
PVP	PolyVinylPyrrolidone
SDS	Sodium DodecylSulfate
Temed	N,N,N',N' tétraméthyléthylènediamine
TNF	Tumor necrosis factor
Tris	Tris (hydroxyméthyl)-amino méthane
UE	Unité d'Endotoxine
UFC	Unité Formant une Colonie

INTRODUCTION

L'insuffisance ou la perte des fonctions rénales nécessite la mise en place de traitements de substitution. Parmi ceux-ci, la transplantation d'organe est la meilleure méthode mais elle est limitée par la disponibilité restreinte des greffons. Le recours aux autres traitements est donc nécessaire. Le principal d'entre eux, l'hémodialyse consiste en un échange diffusif, à travers une membrane semi-perméable, entre le sang et une solution saline qui permet un rééquilibrage de l'état humoral du patient. Actuellement près de 300 000 insuffisants rénaux sont traités par hémodialyse.

Il survient parfois en début de séance de dialyse des réactions violentes, semblables à des chocs anaphylactiques, qui peuvent mettre en danger la vie des patients. De nombreuses hypothèses ont été faites pour expliquer ces phénomènes, mais il est maintenant établi que l'apparition de ces réactions est corrélée avec une contamination microbienne des bains de dialyse, principalement par des bactéries de type Gram négatif. La présence de ces bactéries, appartenant principalement au genre *Pseudomonas*, dans les bains, entraîne le relargage de divers dérivés bactériens et en particulier de Lipopolysaccharides (LPS) ou endotoxines. Ces molécules, qui font partie de la paroi bactérienne, possèdent un grand nombre d'activités biologiques. Elles sont capables de traverser la membrane de dialyse par diffusion ou par convection et, ainsi, de provoquer les chocs anaphylactoïdes.

L'obtention de bains stériles et dépourvus de ces dérivés bactériens est donc un objectif primordial pour améliorer la qualité de la dialyse et assurer la santé des insuffisants rénaux.

L'ultrafiltration est une méthode simple, peu coûteuse et très répandue pour la purification en ligne de fluides. Le développement de cette technique est, d'autre part, facilement envisageable dans l'environnement des générateurs de dialysat. Dans un premier temps, en nous basant sur la littérature, nous avons donc étudié divers systèmes d'ultrafiltration susceptibles de produire des bains stériles et apyrogènes. La qualité du dialysat a été évaluée par deux activités biologiques, qui permettent, seules, la détection des très faibles quantités de LPS présents dans les bains : le test LAL et un test d'induction de la synthèse d'Interleukine-1 sur des monocytes humains *in vitro*.

Les LPS sont des molécules très hétérogènes qui ont tendance à s'agréger, ce qui facilite leur séparation par ultrafiltration. Les critères de qualité fixés n'étant cependant pas entièrement assurés par les systèmes que nous avons testés, nous avons ensuite approché la masse moléculaire des LPS de *Pseudomonas* afin de déterminer le seuil de coupure

nécessaire à leur élimination des bains de dialyse. Nous avons employé l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de détergent qui donne des renseignements sur la masse moléculaire des LPS isolés. Afin d'étudier les comportements des LPS naturellement produits par les bactéries, nous avons réalisé des filtrations successives de surnageants de cultures bactériennes, sur des membranes de seuils de coupure décroissants.

Cette étude nous a montré que l'ultrafiltration seule n'est concevable pour atteindre la qualité optimale des bains qu'au prix de contraintes importantes. Afin de parfaire la pureté des bains produits par ultrafiltration, il est nécessaire de la compléter par une autre technique telle que l'adsorption par interaction hydrophobe ou ionique. Nous avons donc évalué la capacité de rétention des LPS de membranes de dialyse commerciales après modification par adsorption de protéines mais aussi de polymères organiques.

**RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES
PROBLÉMATIQUE**

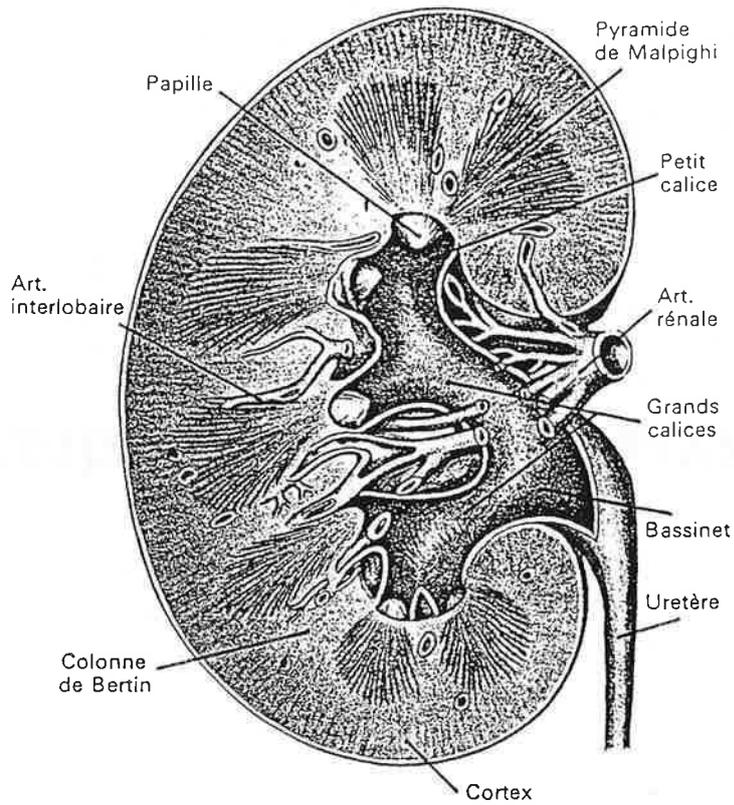


Figure I.1.a : Coupe sagittale du rein.
(d'après SAMSON WRIGHT, 1973)

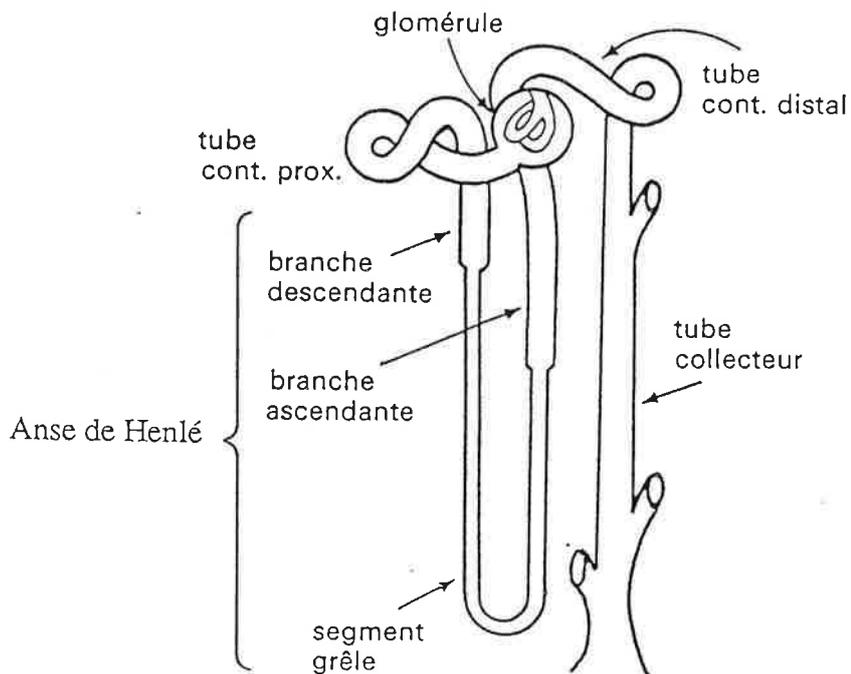


Figure I.1.b : Schéma d'un néphron.
(d'après SAMSON WRIGHT, 1973)

1. L'HÉMODIALYSE

1.1. INSUFFISANCE RÉNALE ET FONCTIONS DE L'HÉMODIALYSE

Les reins normaux possèdent trois fonctions principales qui sont :

- une fonction d'excrétion des déchets du métabolisme azoté
- une fonction de régulation du bilan hydroélectrolytique corporel
- une fonction endocrine.

Nous ne détaillerons pas la structure du rein (Figure I.1.a). Il faut simplement rappeler que l'unité fonctionnelle est le néphron (Figure I.1.b) : un rein en comprend environ un million. L'épuration sanguine effectuée par le rein consiste tout d'abord en une filtration glomérulaire : 1700 l de sang sont ainsi filtrés quotidiennement et conduisent à la formation de 170 l de filtrat. La deuxième étape est une réabsorption de l'eau et des solutés au niveau des tubes contournés distal et proximal et de l'anse de Henlé. Ce double mécanisme confère au rein une remarquable sélectivité qui lui permet, par exemple, d'éviter toute perte urinaire de glucose. Le Tableau I.I montre les principaux éléments dont la concentration sanguine est régulée par le rein.

La totalité des métabolites provenant du catabolisme azoté : urée, créatinine et acide urique est éliminée normalement par le rein. La diminution des fonctions rénales entraîne l'accumulation de ces dérivés azotés dans le plasma et les tissus, et, par conséquence, la toxicité urémique.

Jusqu'à un degré très avancé d'insuffisance rénale, le rein conserve des facultés d'adaptation qui lui permettent d'assurer l'élimination de l'eau et de ses solutés ioniques. Au stade final, aucune adaptation n'est plus possible et la diurèse diminuant, voire s'annulant, l'homéostasie de l'eau et des électrolytes n'est plus maintenue. C'est l'insuffisance rénale terminale; elle se traduit par une filtration glomérulaire résiduelle inférieure à $5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ (contre $120 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ pour des reins normaux) ce qui correspond à moins de 5 % de néphrons fonctionnels.

Les principales conséquences de l'insuffisance rénale terminale sont :

- la non-élimination des dérivés azotés,
- l'acidose,
- l'hyperkaliémie,
- la déshydratation cellulaire liée à une hypernatrémie.

Constituant	Concentration plasmatique g/l	Quantité dans 170 l de filtrat glomérulaire	Quantité excrétée par l'urine en 24 heures	Quantité réabsorbée dans les tubules
Eau		170 l	1,5 l	168,5 l
Glucose.....	1,00	170 g	0	170 g
HCO ₃ ⁻	1,50	255 g	0,1 g	254,9 g
Na ⁺	3,30	560 g	5 g	555 g
Cl ⁻	3,65	620 g	9 g	611 g
K ⁺	0,17	29 g	2,2 g	26,8 g
Phosphate (en P)	0,03	5,1 g	1,2 g	3,9 g
Ca ⁺⁺	0,06	10,2 g	0,2 g	10 g
Urée.....	0,3	51 g	30 g	21 g
HSO ₄ ⁻ (en S)....	0,02	3,4 g	2,7 g	0,7 g

Tableau II: Evolution de la composition du filtrat glomérulaire et de l'urine au cours de la filtration rénale.
(D'après SAMSON WRIGHT, 1973).

A ce stade et en l'absence d'épuration sanguine de remplacement, la toxicité urémique entraîne la mort du patient en quelques jours.

Les traitements de substitution permettent d'assurer les fonctions d'excrétion et de régulation de la balance hydroélectrolytique mais, évidemment, ne restaurent pas les fonctions endocrines.

1.2. DIFFÉRENTS MODES DE SUPPLÉANCE RÉNALE

A l'heure actuelle, le nombre de patients traités dans le monde est de l'ordre de 300000. Ils se situent principalement en Amérique du Nord, au Japon, en Europe et sur le pourtour méditerranéen. Ceci représente un marché de 1,4 milliards de dollars, mais il est potentiellement beaucoup plus important puisque l'hémodialyse est très peu répandue dans les pays en voie de développement.

1.2.1. Hémodialyse périodique

L'hémodialyse (Figures I.2.a et I.2.b) consiste en un échange diffusif à travers une membrane semi-perméable entre le sang du patient et une solution de composition électrolytique voisine de celle du plasma normal : le bain de dialyse. L'élément clé est donc la membrane de dialyse contenue dans un hémodialyseur qui sépare le sang du patient et le bain circulant à contre-courant. Outre la simple diffusion sous l'action de gradient de concentration des différents solutés, l'établissement d'une pression transmembranaire permet, par ultrafiltration, l'élimination de l'eau accumulée entre 2 séances de dialyses ainsi qu'un transfert convectif de solutés.

Le principe de la dialyse est connu depuis longtemps mais le développement de l'hémodialyse n'a été possible qu'après la mise au point d'abords vasculaires permanents. Scribner conçut en 1960 un shunt artério-veineux qui permit le véritable essor de cette technique [JUNGERS et coll, 1984]. L'hémodialyse est le mode de suppléance le plus utilisé aujourd'hui.

1.2.2. Hémofiltration

Ce procédé est fondé sur l'ultrafiltration tangentielle du sang (Figures I.3.a et I.3.b). Le volume de plasma ultrafiltré contenant les toxines azotées est compensé par un liquide de substitution stérile et apyrogène. A la différence de l'hémodialyse, le transport de solutés se fait uniquement de manière convective : les solutés de faible masse

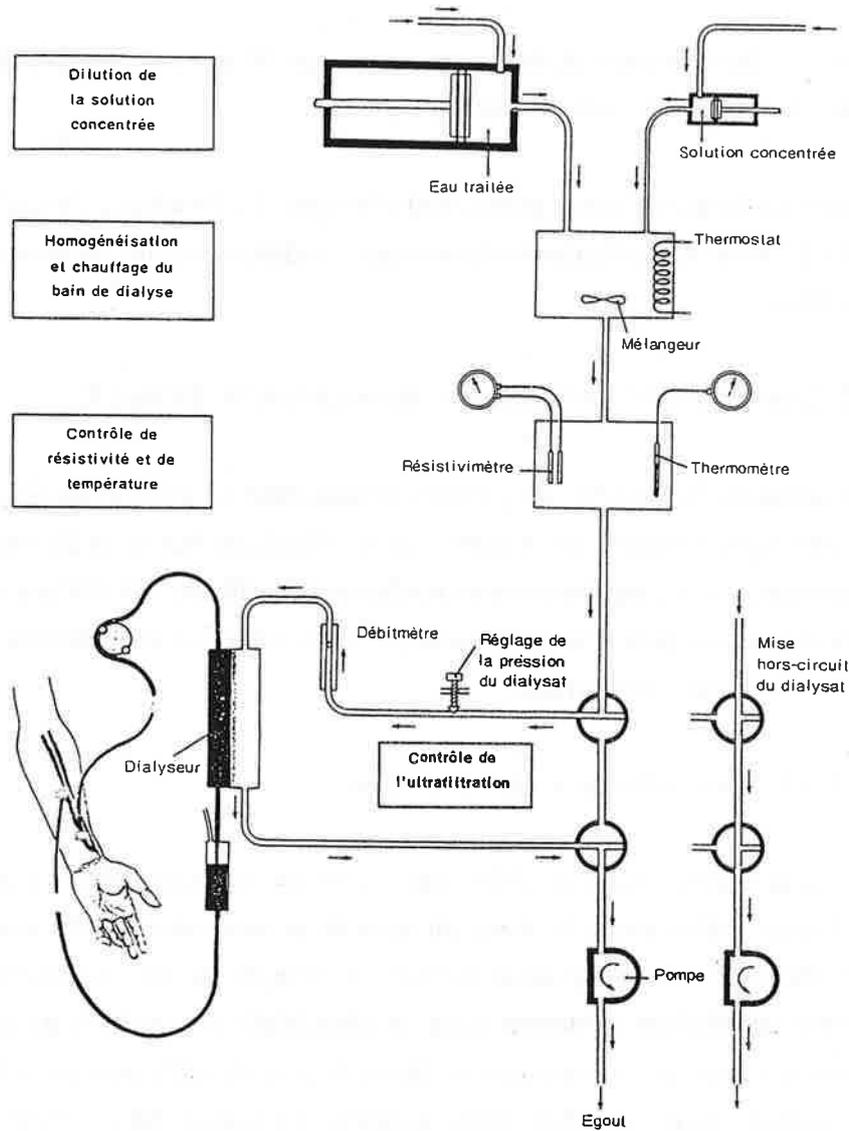


Figure I.2.a : Dispositif pour hémodialyse, Circulation extracorporelle et générateur de bain de dialyse (d'après Jungers et coll, 1984).

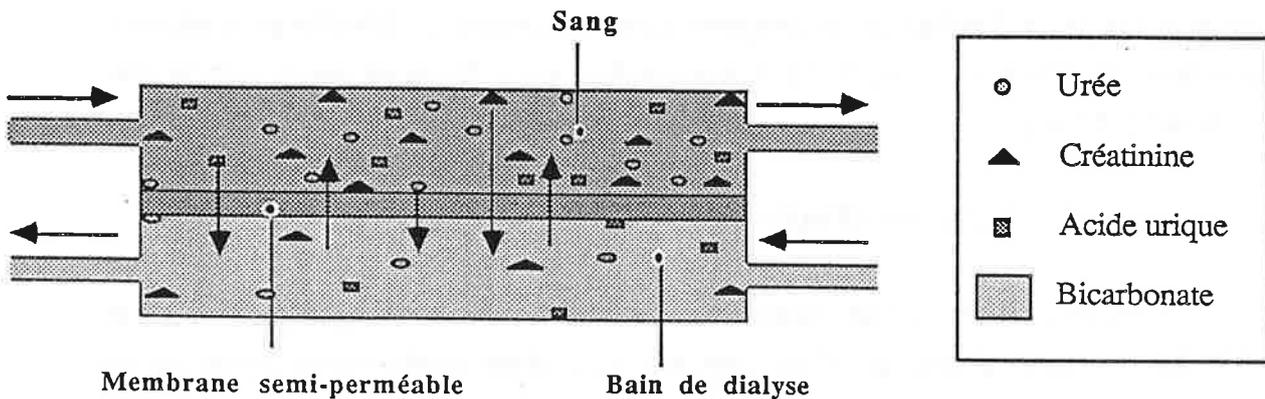


Figure I.2.b : Schéma d'un hémodialyseur et des transferts par diffusion sous l'action du gradient de concentration des divers solutés.

moléculaire sont entraînés par le flux à travers la membrane, tandis que les solutés de plus haute masse moléculaire qui ne peuvent pénétrer les pores de la membrane sont retenus.

Cette technique qui reproduit le fonctionnement du rein humain permettrait une meilleure épuration des moyennes molécules (de masse moléculaire comprise entre 1 et 10 kDa); elle reste cependant moins répandue que l'hémodialyse. Il est important de noter que le liquide de substitution nécessaire à maintenir la volémie doit être réinjectable c'est à dire stérile et apyrogène contrairement aux bains de dialyse qui ne requièrent pas cette spécificité. Le développement de l'hémofiltration est en fait freiné par les problèmes de production en ligne de ces solutés.

1.2.3. Hémodiafiltration

Il s'agit d'une technique récente qui combine l'hémodialyse et l'hémofiltration.

1.2.4. Dialyse péritonéale

Dans le cas de la dialyse péritonéale, c'est le péritoine qui joue le rôle de la membrane de dialyse et qui régule les échanges de solutés entre le sang et le bain contenu dans la cavité péritonéale.

Le principal danger de cette technique est lié aux risques de contaminations bactériennes du bain ou de l'abord péritonéal qui peuvent provoquer des péritonites. L'utilisation de cette technique est aussi limitée à long terme par la diminution de la perméabilité du péritoine.

La dialyse péritonéale est une méthode que l'on peut qualifier de plus douce que les précédentes puisque l'épuration sanguine est continue. De plus, il n'y a pas de contact avec des matériaux synthétiques ce qui limite les problèmes de biocompatibilité.

Le matériel nécessaire est réduit comparativement aux méthodes précédentes qui requièrent une circulation sanguine extracorporelle.

1.2.5. Transplantation rénale

Le niveau d'épuration obtenu par les différentes méthodes reste malheureusement éloigné de celui des reins sains. Seule la transplantation d'organe peut rétablir un état humoral normal. La greffe n'est cependant pas toujours possible en raison soit de l'âge élevé du patient, soit de son état général qui interdit toute intervention chirurgicale, soit des problèmes de compatibilité entre le donneur et le patient.

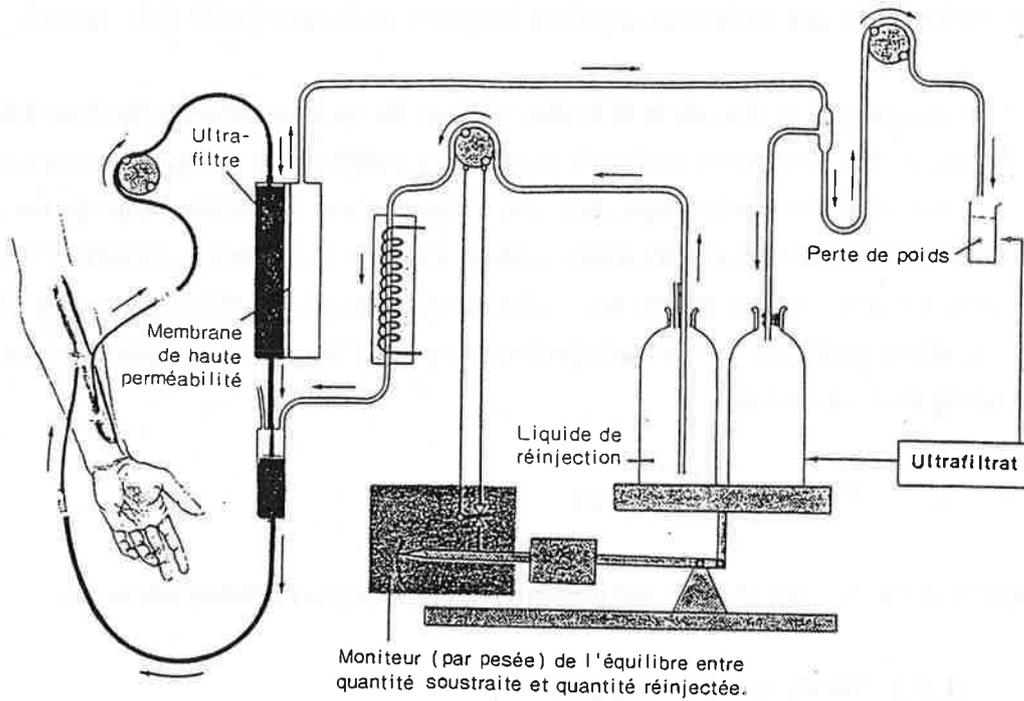


Figure I.3.a : Schéma d'un dispositif d'hémofiltration (d'après Jungers et coll, 1984).

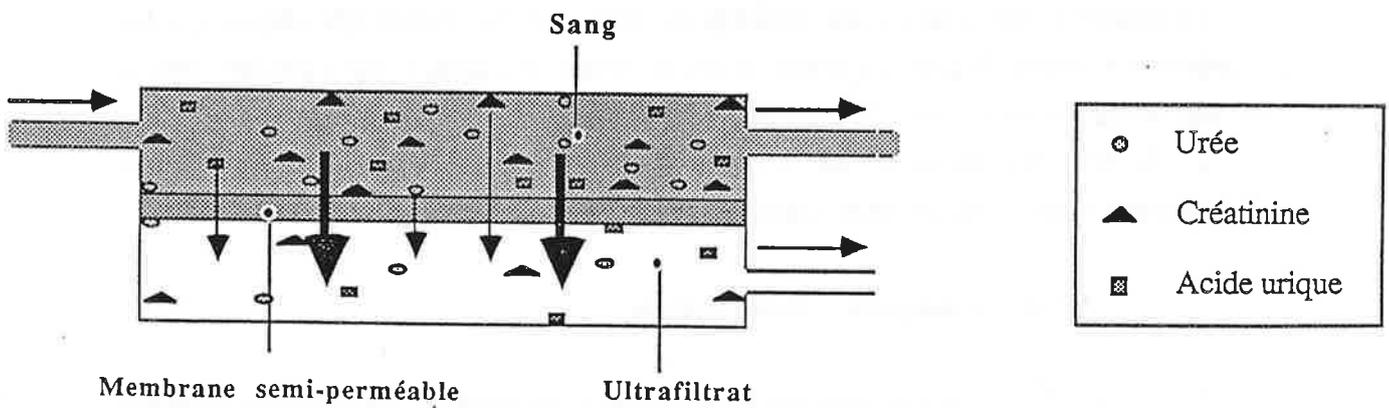


Figure I.3.b : Schéma d'un hémofiltre et des transferts par convection sous l'action d'une surpression.

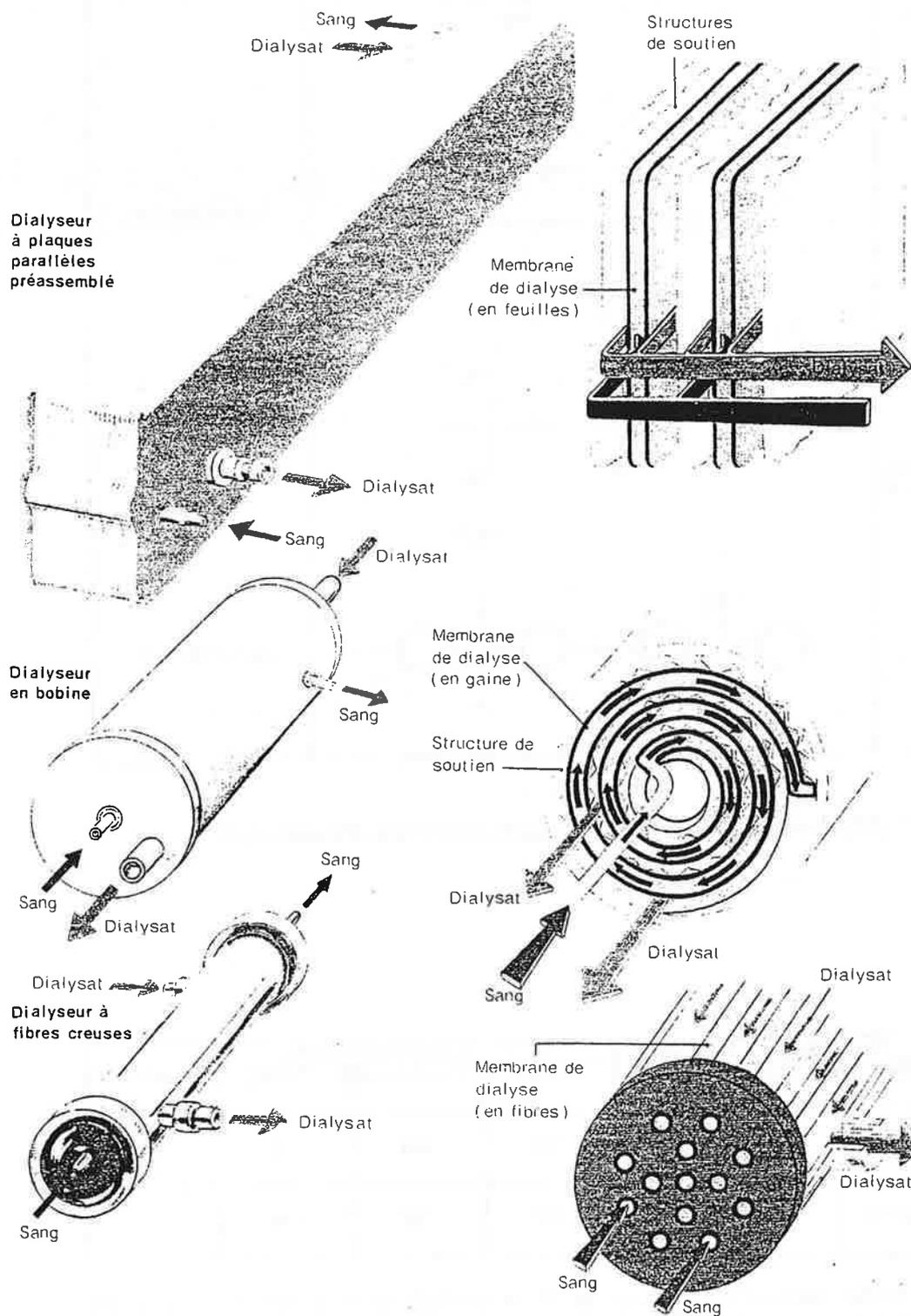


Figure I.4 : Différents types d'hémodialyseurs (d'après Jungers et coll, 1984)

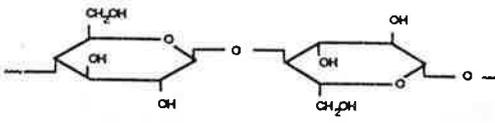
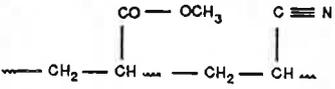
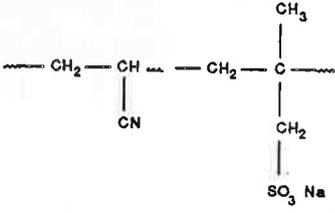
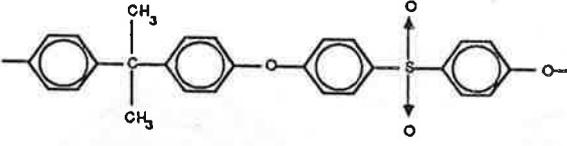
MEMBRANE	STRUCTURE CHIMIQUE	MORPHOLOGIE
CUPROPHAN® (ENKA) Cellulose régénérée		DENSE-SYMETRIQUE
PAN (ASAHI)		ASYMETRIQUE
AN 69® (HOSPAL) Copolymère d'acrylonitrile et de metallylsulfonate de sodium		DENSE-SYMETRIQUE
POLYSULFONE (FRESENIUS)		ASYMETRIQUE

Tableau I.II : Structure et morphologie de quelques membranes d'hémodialyse

	Membrane		Perméabilité hydraulique (ml/h.mmHg)	Clearances (ml/min)			
	Nature	Epaisseur (µm)		Urée	Créatinine	Acide Urique	Vitamine B12
Disscap E 160	Cuprophan	9,5	6,25	189	166	153	56
Filtral 12	AN 69	50	45	174	158	130	87

Tableau I.III : Performances comparées de 2 hémodialyseurs à fibres creuses en Cuprophan et AN 69
(d'après documentation HOSPAL: les clearances sont mesurées avec un débit Sang de 200 ml.min⁻¹, un débit Bain de 200 ml.min⁻¹ et une ultrafiltration de 10 ml.min⁻¹).

Le problème principal reste la disponibilité des organes. En 1986, le délai moyen d'attente en Europe variait de 6 mois en Finlande à 8 ans au Portugal [TUFVESON et coll, 1989].

Même si on peut s'attendre à une augmentation des greffes d'organes, les autres formes de substitution rénale resteront nécessaires, pendant la période transitoire d'attente de la transplantation.

1.3. HÉMODIALYSEURS ET MEMBRANES

1.3.1. Différents types d'hémodialyseurs

Suivant la présentation de la membrane on distingue les hémodialyseurs à membrane plane, modules spirales et hémodialyseurs à plaque, des modules à fibres creuses (Figure I.4). Apparues plus récemment les fibres creuses sont maintenant les plus largement utilisées. Elles permettent de disposer d'une surface membranaire très importante dans un encombrement réduit; elles sont par ailleurs plus faciles à mettre en œuvre : au niveau du rinçage, par exemple, il n'y a pas les problèmes d'adhérence qui peuvent se produire avec les membranes planes.

1.3.2. Membranes de dialyse

Les membranes de dialyse sont constituées de différents polymères ; le Tableau I.II donne les compositions de différentes membranes. Les premières membranes commercialisées, à base de cellulose : Acétate de cellulose, Esters de cellulose, Cuprophan[®], Hemophan[®] sont maintenant supplantées par des membranes synthétiques de conception plus récente : AN 69[®] (copolymère d'acrylonitrile et de métallylsulfonate de sodium) et polysulfone. Les échanges étant plus rapides avec ces membranes dites à haute perméabilité, la durée des séances de dialyse peut ainsi être réduite.

1.3.3. Performances des hémodialyseurs

En dehors de la perméabilité hydraulique, les performances d'un dialyseur peuvent se mesurer par ses clearances de divers solutés. La clearance se définit comme le rapport entre la quantité de solutés extraite du sang et sa concentration sanguine à l'entrée de l'hémodialyseur.

Le Tableau I.III montre que les membranes à haute perméabilité et les membranes Cuprophan de faible épaisseur ont des clearances équivalentes pour les composés de faible masse moléculaire. En revanche, dès que celle-ci augmente (1355 Da pour la

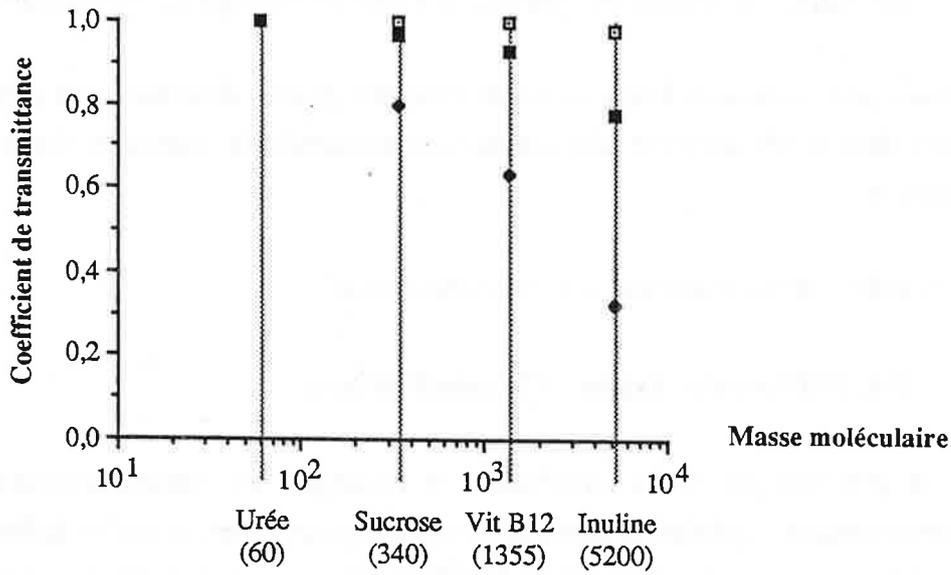


Figure I.5 : Comparaison des coefficients de transmittance des membranes Cuprophan (♦), AN69 (■) et de la membrane basale glomérulaire (○). (d'après Jungers et coll, 1984)

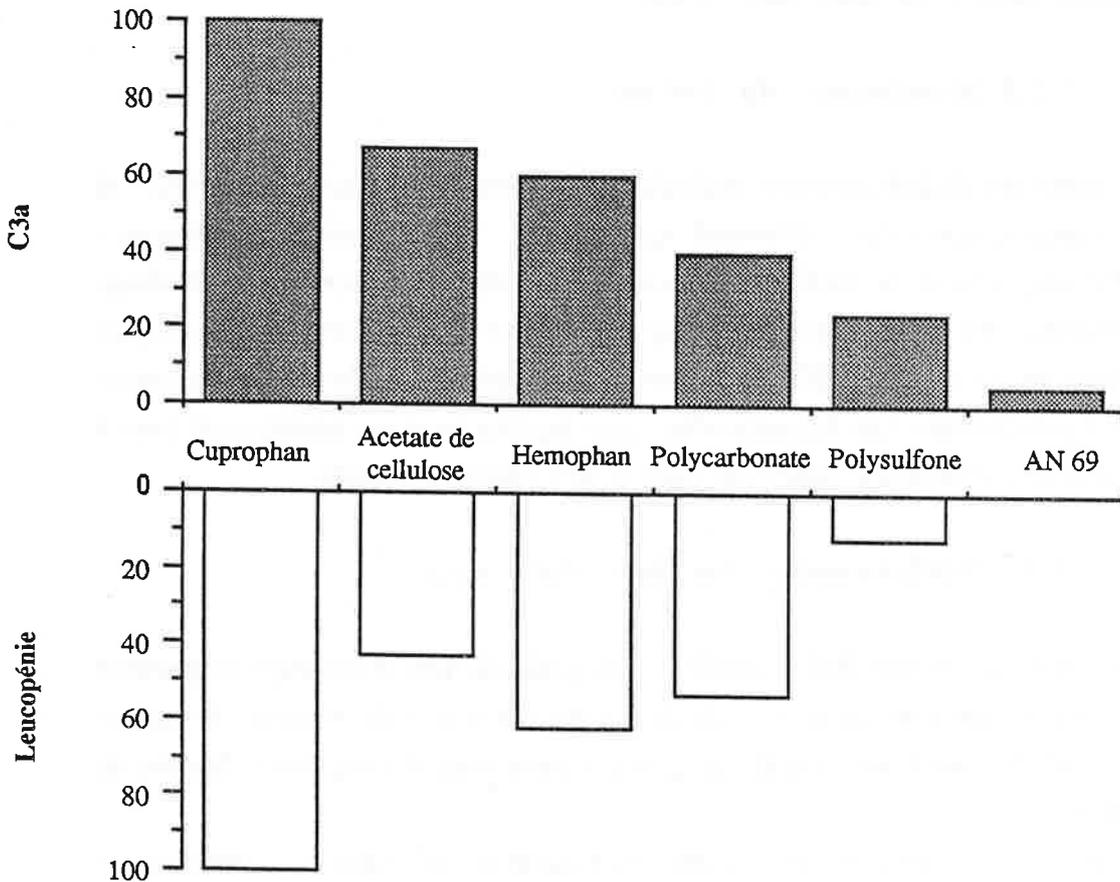


Figure I.6: Biocompatibilité des membranes d'hémodialyse. Comparaison de la leucopénie et du taux d'anaphylatoxine C3a induites par différentes membranes (d'après HENDERSON et coll, 1987)

vitamine B 12) la clearance des membranes à haute perméabilité devient nettement supérieure. L'intérêt de ces membranes pour l'épuration des moyennes molécules de masse moléculaire comprise entre 1 et 10 kDa est donc évident, d'autant plus que leur transmittance en ultrafiltration (fraction de soluté non rejeté) est supérieure (Figure I.5).

1.3.4. Biocompatibilité des membranes d'hémodialyse

Un aspect très important de l'hémodialyse est la biocompatibilité des matériaux qui entrent dans la composition de la circulation extracorporelle. La biocompatibilité du polymère composant la membrane est primordiale compte tenu de la grande surface de contact, 1 m² et plus, entre le sang et la membrane. La biocompatibilité se définit comme la capacité d'un matériau à être toléré par l'organisme. Plusieurs critères permettent d'évaluer la biocompatibilité des membranes :

- L'absence de coagulation est un des facteurs permettant de juger la biocompatibilité des membranes. Aucune différence notable entre les membranes n'a pu être mise en évidence, d'autant plus que la coagulation peut être influencée par des facteurs hémodynamiques liés par exemple aux configurations des têtes de dialyseurs.

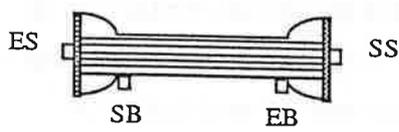
- L'activation du complément, par la voie classique ou la voie alterne, est un deuxième critère de bioincompatibilité. Les travaux d'HENDERSON [HENDERSON et coll, 1987] permettent de différencier les membranes activatrices dérivées de la cellulose des membranes peu (polysulfone) ou non activatrices (AN 69®) (Figure I.6). L'activation du complément a pu être reliée à la présence de groupements hydroxyles qui sont présents en grand nombre pour les membranes cellulosiques.

La Figure I.6 montre que les membranes synthétiques et en particulier l'AN 69® apparaissent comme des membranes biocompatibles.

1.4. TRANSFERTS DE MATIÈRE EN HÉMODIALYSE

Nous avons vu que l'hémodialyseur doit assurer :

- l'excrétion des composés azotés
- le rééquilibre de la balance électrolytique ainsi que le rétablissement de la volémie plasmatique.



ES = Entrée Sang
 SS = Sortie Sang
 EB = Entrée Bain
 SB = Sortie Bain

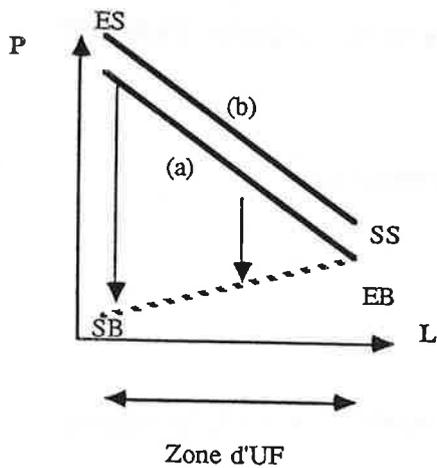
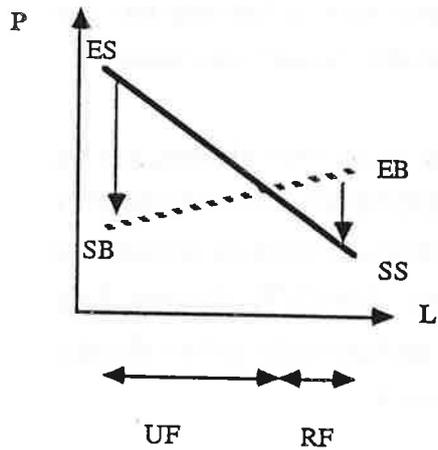
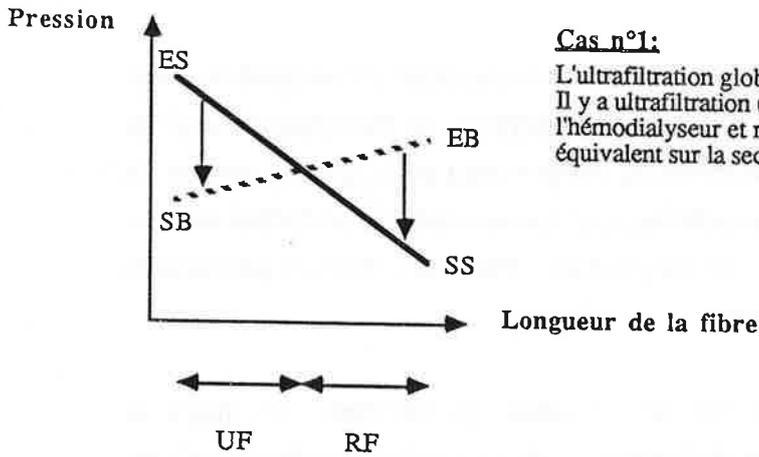


Figure I.7 : Transferts de masse dans un hémodialyseur; Ultrafiltration et Rétrofiltration en fonction des pressions dans les compartiments Sang et Bain.

Les deux rôles sont remplis par 2 phénomènes différents qui sont :

- la diffusion ou dialyse : le transfert de matière se fait sous l'action d'un gradient de concentration,
- la convection ou ultrafiltration : les solutés sont entraînés par le flux de solvant (l'eau) provoqué par un gradient de pression hydrostatique.

Dans un hémodialyseur, du fait de la circulation à contre-courant du bain et du sang, il peut y avoir à la fois ultrafiltration (passage de solvant et transport convectif du sang vers le bain) et rétrofiltration (du bain vers le sang) (Figure I.7). Considérons un hémodialyseur pour lequel l'ultrafiltration globale apparente est nulle (cas n°1), et les pertes de charge dans les 2 compartiments : à l'entrée sang et sur la première moitié du dialyseur, la pression sanguine est supérieure à la pression du bain et il y a donc ultrafiltration. Sur la deuxième partie du dialyseur, la pression sanguine est par contre inférieure à celle du bain et il y a une rétrofiltration d'un volume égal à l'ultrafiltration observée à l'entrée, ce qui nous donne une ultrafiltration nette nulle.

Les conditions d'ultrafiltration globale nulle n'existent en principe pas en hémodialyse du fait de la surpression sanguine qui est imposée pour permettre la perte de poids du patient. Dans les conditions d'ultrafiltration normales ($0,6 \text{ l.h}^{-1}$), la rétrofiltration n'existe pas pour les dialyseurs à membranes de faible perméabilité (cas n°3b) tandis qu'elle subsiste pour les dialyseurs à membrane polysulfone (cas n°2) [BAURMEISTER et coll, 1988]. Pour la membrane AN 69[®], ce débit correspond au débit critique permettant d'annuler la rétrofiltration (cas n°3a).

En pratique, il est possible, notamment au remplissage de l'hémodialyseur, que les conditions d'ultrafiltration ne soient pas suffisantes pour éviter toute rétrofiltration.

1.5. BAINS DE DIALYSE

Le bain de dialyse est une solution isotonique non stérile de composition électrolytique voisine de celle du liquide extracellulaire. Préparé à partir de concentrés salins, il est bien évidemment dépourvu des dérivés azotés dont l'élimination est souhaitée. Il existe actuellement 2 systèmes de bains : bain acétate et bain bicarbonate. La composition de ces bains est reportée sur le Tableau I.IV ; ce sont des bains standard et il peut y avoir des modifications notamment pour les concentrations en sodium, potassium et calcium selon les fabricants et les prescriptions des cliniciens.

Composition :

de la solution concentrée d'acétate:

- Chlorure de sodium	204,75 g
- Chlorure de calcium, 6H ₂ O	13,37 g
- Chlorure de magnésium, 6H ₂ O	5,32 g
- Chlorure de potassium	3,92 g
- Acétate de sodium, 3H ₂ O	166,6 g
- Eau désionisée	qsp 1 litre

de la solution diluée au 1 / 35ème :

- Na ⁺	135,0 meq/l
- Ca ²⁺	3,5 meq/l
- Mg ²⁺	1,5 meq/l
- K ⁺	1,5 meq/l
- Cl ⁻	106,5 meq/l
- ClH ₃ COO ⁻	35,0 meq/l

Composition :

de la solution concentrée de bicarbonate:

- Chlorure de sodium	23,53 g
- Bicarbonate de sodium	65,95 g
- Eau désionisée	qsp 1 litre

de la solution diluée au 1 / 20,13ème :

- Na ⁺	59 meq/l
- Cl ⁻	25,0 meq/l
- HCO ₃ ⁻	34,0 meq/l

de la solution concentrée acide :

- Chlorure de sodium	172,19 g
- Chlorure de calcium, 6H ₂ O	14,11 g
- Chlorure de magnésium, 6H ₂ O	3,74 g
- Chlorure de potassium	5,49 g
- Acide acétique	8,85 g
- Eau désionisée	qsp 1 litre

de la solution diluée au 1 / 36,83ème :

- H ⁺	4,0 meq/l
- Na ⁺	80,0 meq/l
- Ca ²⁺	3,5 meq/l
- Mg ²⁺	1,0 meq/l
- K ⁺	2,0 meq/l
- Cl ⁻	86,5 meq/l
- ClH ₃ COO ⁻	4,0 meq/l

Le bain de dialyse dilué au bicarbonate est constitué du mélange de la solution de bicarbonate et de la solution acide. Les concentrations finales étant la somme des concentrations indiquées pour chaque solution diluée.

Tableau I.IV : Composition des bains et des concentrés à base de Bicarbonate et d'Acétate

Le bain acétate a été très largement utilisé depuis le début de l'hémodialyse du fait de sa facilité de préparation qui est réduite à une simple dilution. Le concentré est autostérile, du fait de son acidité, ce qui évite tout problème de contamination microbienne. L'utilisation de l'acétate est très controversée à l'heure actuelle, en particulier avec les membranes à haut flux. En effet, l'acétate est métabolisé par le foie en bicarbonate qui joue un rôle essentiel dans le maintien du pH plasmatique. Avec des membranes à haut flux ainsi que chez les patients souffrant d'insuffisance hépatocellulaire, le transfert d'acétate peut excéder la clearance métabolique du foie et entraîner une acidose plasmatique et des troubles cardiovasculaires.

Le bain bicarbonate est plus difficile à mettre en oeuvre : sa préparation se fait à partir de 2 concentrés ; le premier contient le bicarbonate de sodium, et le second, le calcium, le magnésium et l'acide acétique pour éviter la formation de précipités de carbonates de calcium et magnésium insolubles. Cette considération, d'ordre technique, a poussé à l'emploi massif de l'acétate, mais elle ne constitue plus aujourd'hui une limite à l'utilisation du bicarbonate. Le bain bicarbonate est le bain physiologique et il est mieux accepté par les patients [MION et coll, 1989]. L'évolution des générateurs de dialysat doit permettre la généralisation du bain bicarbonate.

1.6. GÉNÉRATEURS DE BAINS

Le générateur est une machine qui doit maintenir les conditions appropriées à une séance de dialyse.

Outre la dilution correcte du (ou des) concentré(s), le générateur doit assurer le chauffage à 37°C du bain et son dégazage. La température et la concentration sont régulées respectivement par des sondes de température, de pH et de conductivité.

Le générateur a également en charge le contrôle de l'ultrafiltration qui doit être très précis, surtout si on emploie des membranes à haute perméabilité.

On distingue les générateurs à circuit fermé des générateurs à circuit ouvert. Ces derniers procurent un bain toujours propre, exempt de dérivés azotés provenant du patient.

HOSPAL a développé un générateur pour l'utilisation de la membrane AN 69® à haute perméabilité : le MONITRAL®. Son circuit hydraulique complexe de type semi-ouvert permet un contrôle très précis de l'ultrafiltration (Figure I.8). L'adjonction du MBM (Monitral Bicarbonate Module) étend ses possibilités à la dialyse au bicarbonate, mais complique encore son circuit hydraulique.

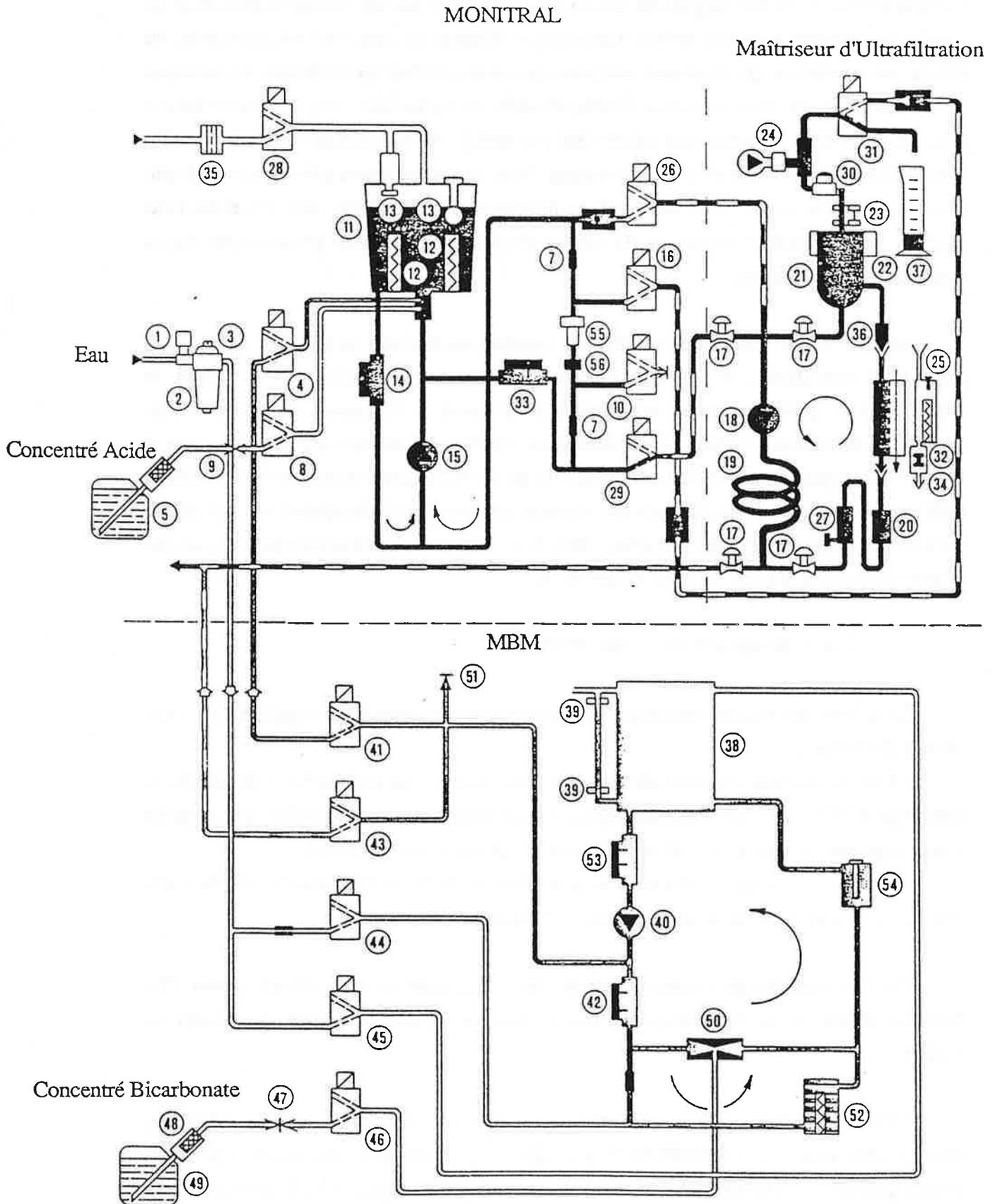


Figure I.8 : Schéma du circuit hydraulique du Monitral® et de son module pour dialyse au bicarbonate (MBM®).

2. LES RÉACTIONS ANAPHYLACTOÏDES EN HÉMODIALYSE

Il survient parfois en début de séance de dialyse des réactions ou chocs de type allergique qualifiés aussi d'anaphylactoïdes, d'hypersensibilité ou d'hypotension. La terminologie est assez vague même si les symptômes sont nettement définis. Il est difficile dans la littérature de faire la part entre les réactions précoces aiguës et des réactions différées et plus modérées qui sont à relier à un état allergique chronique des hémodialysés.

2.1. EXISTENCE

L'existence de réactions fébriles apparaissant au début des séances de dialyse a été rapportée dès le début des années 70 [ROBINSON et coll, 1971; RAIJ et coll, 1973]. Les praticiens ont été mis en garde par une lettre de FDA [HAFFNER et coll, 1983] qui décrit les principaux symptômes de ces réactions anaphylactoïdes : nausées, malaises, faiblesse générale, sensation de chaleur et de brûlure, transpiration intense, détresse respiratoire. L'état du patient s'aggravant, il est parfois nécessaire d'interrompre la dialyse et de procéder à de la réanimation. Dans certains cas extrêmes, une hypotension et un arrêt cardiopulmonaire peuvent entraîner la mort [NICHOLS et coll, 1982].

Bien que ces réactions aiguës soient relativement limitées en importance 3,5 / 100.000 dialyseurs vendus aux Etats Unis en 1982 [VILLAROEL, 1984], 6,3 / 100.000 en 1978 et 26,7 / 100.000 en 1983 en France [FORET et coll, 1985], elles ne peuvent être négligées par les fabricants d'hémodialyseurs. NOSÉ rapporte également des réactions allergiques mineures pour 1 % des hémodialysés ainsi qu'un dérèglement des fonctions cardiopulmonaires chez plus de 10 % d'entre eux [NOSÉ, 1984]. En 1985, FORET rapporte une forte majorité de chocs consécutifs à l'utilisation de membranes Cuprophan® [FORET et coll, 1985]. Plus récemment, certains auteurs ont également observé des chocs liés à l'utilisation de membranes à haute perméabilité et notamment avec l'AN 69 [MONTAGNAC et coll, 1988 ; MAN et coll, 1988].

2.2. ORIGINE DES RÉACTIONS

L'origine des chocs est controversée et plusieurs hypothèses ont été proposées.

2.2.1. Résidus de fabrication des hémodialyseurs

INAGAKI invoque la présence dans le compartiment sanguin de particules de matériaux entrant dans la fabrication de l'hémodialyseur. En cas de mauvais rinçage, ces résidus peuvent être remis en suspension dans le sang du patient. Cet auteur constate cependant qu'un rinçage avec un litre de sérum physiologique suffit pour éliminer la quasi-totalité de ces particules [INAGAKI et coll, 1987]. Il faut remarquer que ces conditions de rinçage sont réalisées par les procédures désormais préconisées par les fabricants; la contamination particulaire ne peut donc expliquer les réactions d'hypersensibilité qu'en cas de non-respect de ces procédures. FORET dans sa revue sur les chocs en France entre 1977 et 1984 note que 75 % des chocs sont liés à un mauvais rinçage, avec un volume de liquide inférieur à un litre [FORET et coll, 1985].

2.2.2. Agents stérilisants

L'oxyde d'éthylène (ETO) est un gaz très largement utilisé pour la stérilisation des hémodialyseurs et des lignes de circulation extracorporelle ainsi que pour d'autres matériels d'usage pharmaceutique et médical. L'ETO a la propriété de se fixer sur les polymères organiques utilisés dans la fabrication de ces matériels. Il est ensuite désorbé progressivement de ces matériaux. HENNE démontre qu'après 60 jours de désorption des hémodialyseurs à fibres creuses contiennent encore 0,3 mg d'ETO, dont 90 % sont retenus par le polyuréthane utilisé pour l'emportage. Cette quantité est inférieure aux normes américaine et allemande mais peut expliquer certains chocs du fait des propriétés allergisantes de l'ETO [HENNE et coll, 1984]. Cet auteur note également que l'ETO résiduel n'est pas complètement éliminé même après 6 heures de rinçage. Les contacts répétés avec l'ETO entraînent certainement la sensibilisation des patients. DOLOVICH dénote de son côté la présence d'IgE spécifiques de l'ETO chez 22/27 patients ayant déjà subi un choc au branchement [DOLOVICH et coll, 1984]. FORET cependant en retrouve en proportion beaucoup plus faible (4/22) et donc peu significative [FORET et coll, 1985]. L'hypothèse de l'ETO permettrait d'expliquer l'augmentation des réactions anaphylactoïdes avec le développement des dialyseurs à fibres creuses comportant un emportage polyuréthane. KESSLER passe en revue les différents arguments plaidant pour mais aussi contre cette hypothèse [KESSLER et coll, 1988]. Sa conclusion est assez mitigée en particulier du fait qu'il n'existe pas de bonne corrélation entre la présence d'IgE et les chocs.

2.2.3. Biocompatibilité des membranes

L'activation de la voie alterne du complément par les membranes celluloses (CUPROPHAN® par exemple) peut aussi expliquer en partie les réactions précoces. [HENDERSON et coll, 1987]. Cet argument n'est cependant pas valable avec les membranes biocompatibles en particulier l'AN 69 qui n'induit pas le complément (voir Figure I.6).

2.2.4. Contamination bactérienne

De nombreux auteurs ont relié les réactions de type allergique à une contamination des baigns de dialyse par des bactéries de type Gram négatif et leurs dérivés à forte activité biologique : les endotoxines [JENKINS et coll, 1987; MAN et coll, 1988; MION et coll, 1989; MONTAGNAC et coll, 1988; PORT et coll, 1987; RAIJ et coll, 1973; WAMBERGUE et coll, 1984].

Cette hypothèse est désormais la plus vraisemblable : en effet, à l'heure actuelle, les dialyseurs sont généralement correctement rincés, ce qui permet de réduire les taux d'ETO et les contaminations particulières; l'emploi de membranes biocompatibles limite les activations du complément.

2.3. MÉCANISMES DES RÉACTIONS; L'HYPOTHÈSE IL-1

HAMILTON décrit les différents mécanismes des réactions allergiques : la médiation par des IgE, les activations du complément par voie classique ou alterne sont les principales voies conduisant à la libération d'histamine [HAMILTON et coll, 1984].

De nombreux auteurs ont récemment mis en évidence une activation de la synthèse d'IL-1 chez les hémodialysés [HENDERSON et coll, 1983, SHALDON et coll, 1985]. Cette activation peut être due aux membranes celluloses [LUGER et coll, 1987 ; LONNEMANN et coll, 1988a] ou au dialysat acétate [PORT et coll, 1987] d'autant plus qu'il contient des endotoxines [KOCH et coll, 1985]. L'IL-1 est connue comme pyrogène endogène et la tentation de l'impliquer dans les réactions précoces est forte. Cependant, le délai d'apparition des symptômes traduisant la production d'IL-1 est de l'ordre de 1 à 4 heures après la stimulation des monocytes [SHALDON et coll, 1985]. L'hypothèse IL-1 rend compte uniquement des réactions apparaissant à partir du milieu de la séance de dialyse et qui se caractérisent principalement par une hypotension, une hyperthermie et une augmentation du catabolisme protéique.

BACTERIES DE TYPE GRAM NÉGATIF :		
genre <i>Pseudomonas</i> :	119	87,5 %
Autres genres :	12	8,8 %
Total des bactéries Gram négatif	<hr/> 131	<hr/> 96,3%
BACTÉRIES DE TYPE GRAM POSITIF :		
<i>Staphylococcus</i>	3	2,2%
Total des bactéries	<hr/> 134	<hr/> 98,5%
CHAMPIGNONS :		
<i>Candida</i>	2	1,5%
Total des micro-organismes	<hr/> 136	<hr/> 100%

Tableau I.V.a : Identification des micro-organismes isolés des liquides de dialyse (d'après SIMARD, 1989).

Concentré Bicarbonate :	<i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Pseudomonas testosteroni</i>
Dialysat :	<i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Pseudomonas testosteroni</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas paucimobilis</i> <i>Pseudomonas acidovorans</i> <i>Pseudomonas maltophilia</i> <i>Pseudomonas putida</i>
Eau :	<i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Pseudomonas testosteroni</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas acidovorans</i> <i>Pseudomonas maltophilia</i>

Tableau I.V.b : Localisation des espèces de *Pseudomonas* isolées selon l'origine des prélèvements (d'après SIMARD, 1989).

L'IL-1 n'est pas responsable des réactions précoces violentes, mais l'augmentation de son taux pendant les dialyses sur Cuprophan ou sa concentration chronique importante chez les dialysés sur membrane à haute perméabilité [HAEFFNER-CAVAILLON, 1989a] rendent compte d'un état d'inflammation chronique chez les hémodialysés.

2.4. CONCLUSION

Les réactions anaphylactoïdes précoces observées en hémodialyse sont probablement en partie dues à la contamination des bains de dialyse. Cette hypothèse est cohérente avec les chocs observés lors de l'emploi de membranes biocompatibles associées au bain bicarbonate, mais le mécanisme même des réactions reste inconnu.

3. CONTAMINATION BACTÉRIENNE ET ENDOTOXINES

3.1. MICROBIOLOGIE DES BAINS DE DIALYSE

Plusieurs équipes ayant montré l'existence de contamination microbienne des bains, nous avons entrepris l'identification des principaux germes présents dans les bains, les concentrés et l'eau pour l'hémodialyse. La méthodologie et l'ensemble des résultats sont détaillés dans la thèse de L. SIMARD [SIMARD, 1989] mais nous rappellerons ici les points marquants :

- Prépondérance des bactéries de type Gram négatif (96,3 %) par rapport aux bactéries à Gram positif représentées uniquement par le genre *Staphylococcus* (2,2 %) et aux levures genre *Candida* (1,5 %) (Tableau I.V.a).

- Présence majoritaire du genre *Pseudomonas* (87,5 %), ce qui est en accord avec la littérature [BAURMEISTER et coll, 1988; JANS et coll, 1978; JENKINS et coll, 1987; MAN et coll, 1988; MONTAGNAC et coll, 1988; RAIJ et coll, 1973] et de deux espèces en particulier *P. cepacia* et *P. testosteroni* qui, de plus, sont ubiquitaires (Tableau I.V.b).

Les pharmacopées française et européenne ne donnent pas de règles mais uniquement des recommandations concernant les contaminations des bains de dialyse, seule la pharmacopée américaine a édicté des normes: 200 et 2000 UFC.ml⁻¹ respectivement dans l'eau traitée et les bains.

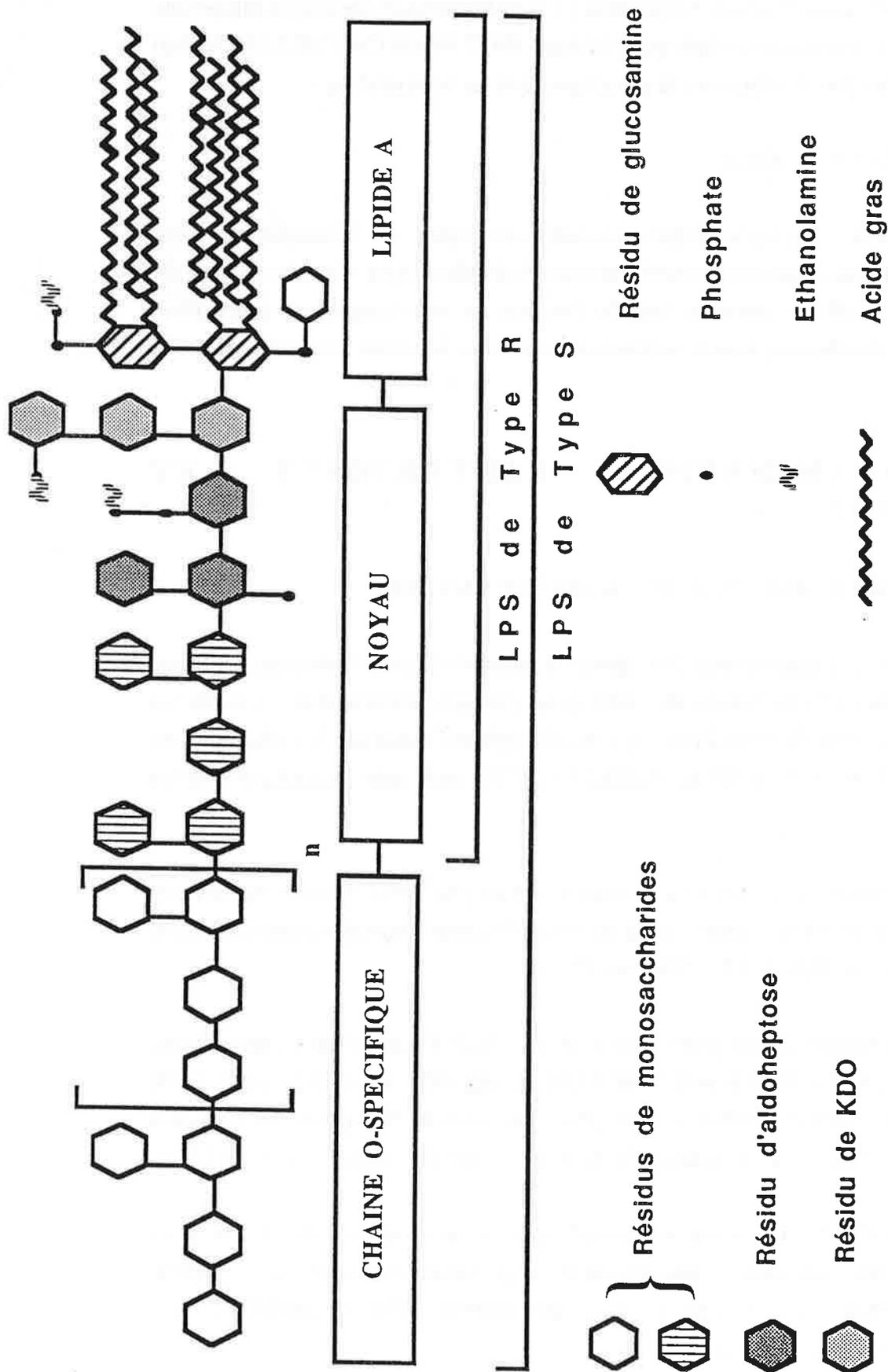


Figure 1.9 : SCHEMA DE LA STRUCTURE DES LIPOPOLYSACCHARIDES DES SALMONELLES

(D'après : Rietschel et coll,1988)

Les bactéries entières ne peuvent traverser la membrane de dialyse sauf en cas de rupture : cela peut conduire à l'obtention d'hémocultures positives [JENKINS et coll, 1981]. Pour la plupart des réactions observées, les hémocultures négatives semblent indiquer qu'il n'y a aucun passage de bactéries et que l'intégrité de la membrane est conservée. Les réactions pyrogéniques doivent donc être expliquées par le passage d'un dérivé bactérien à travers la membrane de dialyse.

3.2. LES LIPOPOLYSACCHARIDES (LPS)

Parmi les substances pyrogéniques bactériennes, on trouve principalement les exotoxines chez les bactéries à Gram positif et les endotoxines ou Lipopolysaccharides chez les bactéries à Gram négatif.

3.2.1. Structure des LPS

Les exotoxines protéiques des bactéries à Gram positif ont une toxicité nettement plus élevée que les endotoxines, mais ces toxines sont nettement moins stables que les LPS et sont souvent produites dans des conditions de croissance optimales ce qui n'est pas le cas dans les bains. Du fait de la prépondérance des bactéries de type Gram négatif, de la stabilité des LPS et de leurs multiples activités biologiques, ceux-ci constituent la meilleure hypothèse pour expliquer les réactions observées.

Les LPS sont des molécules thermostables et amphiphiles composées de trois régions principales (Figure I.9) :

- le Lipide A,
- le noyau polysaccharidique ou "core",
- la chaîne latérale O-spécifique.

- Le Lipide A

L'architecture générale du Lipide A, composé de deux molécules de glucosamine substituées par des acides gras, est commune à l'ensemble des bactéries à Gram négatif.

Les Lipides A diffèrent suivant les genres bactériens par la nature de ces acides gras ainsi que par le degré de phosphorylation des glucosamines.

Le Lipide A constitue le pôle hydrophobe de la molécule.

- Le noyau polysaccharidique

Ce noyau est constant pour toutes les souches d'une même espèce. Sa structure est pratiquement commune aux bactéries du même genre. Il est composé d'un enchaînement de monosaccharides et en particulier de molécules d'heptose et d'acide 2-céto-3-désoxy-D-manno-octonique (ou KDO) qui est caractéristique des LPS. Ce noyau peut également contenir des groupements phosphates qui confèrent avec ceux du lipide A une charge négative à la molécule de LPS.

- La chaîne latérale O-spécifique

La chaîne latérale O-spécifique est constituée de sous-unités répétitives d'oligosaccharides qui composent l'Antigène O. Ces sous-unités sont généralement constituées de 3 à 6 hexoses ou pentoses de nature très variable, neutres ou chargés (aminés) et pouvant être substitués. Sa composition est propre à chaque souche.

Au sein d'une même souche la longueur de la chaîne est variable et permet de distinguer les LPS de forme R dénués de chaîne O-spécifique, les formes SR possédant en plus une sous-unité polysaccharidique unique et les formes S dont la chaîne latérale comprend plusieurs sous-unités répétitives. Ces formes S et R correspondent également à un aspect macroscopique des colonies bactériennes. On distingue ainsi les colonies lisses (Smooth) où les LPS sont majoritairement de forme S et les colonies rugueuses (Rough) avec des LPS de forme R.

La chaîne latérale et le noyau constituent le pôle hydrophile du LPS.

3.2.2. Taille - conformation

3.2.2.1. Masse moléculaire

Pour une même souche bactérienne la longueur de la chaîne polysaccharidique peut être extrêmement variable. Le nombre d'unités répétitives peut être facilement observé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. TSAI et FRASCH montrent ainsi pour *Escherichia coli* 0111:B4 la présence d'une population de LPS ayant jusqu'à 40 sous-unités répétitives O-spécifiques [TSAI et coll, 1982] et donc de masse moléculaire très variable. HITCHCOCK note cependant l'importance des formes R et SR de petite taille: elles représentent 40 à 50 % des LPS chez les *Enterobacteriaceae*. Chez les non Enterobactéries dont les *Pseudomonas* font partie, la chaîne polysaccharidique est courte et donc les formes R et SR sont aussi prédominantes [HITCHCOCK et coll, 1986].

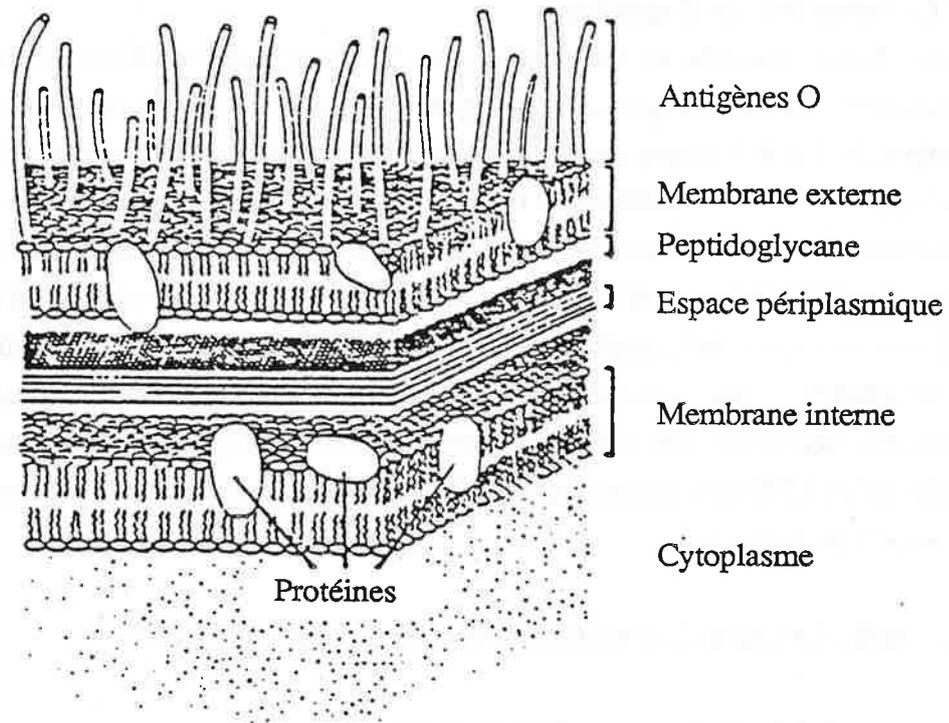


Figure I.10 : Schéma de la paroi des bactéries à Gram négatif.

En se basant sur la structure chimique des LPS de mutants de *Salmonella typhimurium*, la masse moléculaire calculée est de [TSAI et coll, 1982]:

- 2800 Da chez un mutant Re : LPS comprenant le lipide A + 1 molécule de KDO
- 4700 Da chez un mutant Ra : Lipide A et noyau complet
- 5340 Da pour une souche SR : 1 unité répétitive.

Les structures du Lipide A et du core étant relativement constantes parmi les genres bactériens, on peut estimer que l'ordre de grandeur de 5000 Da est vraisemblable pour un LPS de forme R de *Pseudomonas*.

Une telle masse moléculaire ne permet théoriquement pas l'exclusion des molécules de LPS les plus petites par les membranes de dialyse à haute perméabilité puisqu'on peut estimer leur seuil de coupure entre 10 et 30 kDa (3kDa pour les membranes Cuprophan). Cette considération n'est valable que si le LPS est sous une forme isolée.

3.2.2.2. Conformation des LPS natifs

Les LPS font partie intégrante du feuillet externe de la membrane externe dans lequel ils sont associés à des phospholipides et à des protéines (Figure I.10).

Du fait de leur partie hydrophobe, les LPS, une fois mis en solution, ont tendance à s'organiser en bicouches, analogues à celle des phospholipides et à s'aggréger pour former des vésicules qui peuvent atteindre 0,1 μm en présence de cations divalents Ca^{2+} , Mg^{2+} . En l'absence de ces cations, ils forment des micelles de masse moléculaire comprise entre $3 \cdot 10^5$ et 10^6 Da qui peuvent être dispersées par des détergents ou des sels biliaires [SWEADNER et coll, 1977].

Aussi l'existence naturelle de LPS sous une forme isolée capable de franchir la membrane est très douteuse, en particulier dans les bains de dialyse qui contiennent des cations divalents (voir Tableau I.IV).

Il faut également noter que les LPS à l'état natif restent associés à des protéines membranaires ce qui augmente encore leur taille mais peut modifier leur solubilité.

3.2.3. Activités biologiques des LPS

Les activités biologiques des LPS sont reportées dans le Tableau I.VI. Il faut noter que ces activités, exprimées par le LPS entier, le sont aussi par le Lipide A isolé. Le Lipide A est donc la partie biologiquement active des LPS. Certaines de ces activités :

Pyrogénicité	Induction de la résistance non spécifique à l'infection
Toxicité létale chez la souris	Induction de la tolérance à l'endotoxine
Leucopénie	Induction d'un état réfractaire aux changements de température
Leucocytose	Activité adjuvante
Réaction locale de Shwartzman	Rôle mitogène sur les cellules
Nécrose de la moelle osseuse	Rôle nécrogène sur les tumeurs
Résorption du squelette embryonnaire	Activations des macrophages (Synthèse d'Interleukine 1).
Activation du complément	Induction du facteur de croissance bactérien
Diminution de la tension artérielle	Induction de la synthèse d'IgG chez les souris nouveaux-nés
Aggrégation des plaquettes	Induction de la synthèse de prostaglandines
Activation du facteur d'Hageman	Induction de la production d'interféron
Induction de l'activateur du plasminogène	Induction du facteur de nécrose des tumeurs
Géification d'un lysat d'amœbocytes de Limule	Induction de la pyruvate kinase du foie de souris
Toxicité augmentée par le BCG	Sécrétion de RNA viral de type C par les cellules spléniques de souris
Toxicité augmentée par l'adrénalectomie	Action positive sur la formation dans la rate de souris d'un foyer viral de Friend
Augmentation de la réactivité dermique à l'épinéphrine	Inhibition de la phosphoenolpyruvate carboxykinase
	Hypothermie des souris

Tableau I.VI: Principales activités biologiques des lipopolysaccharides ou du Lipide A

réaction fébrile, hypotension, activation du complément pourraient expliquer les réactions observées, mais il faut rappeler que les LPS n'ont pas été identifiés comme allergènes.

Dans ce large spectre d'activités, il faut noter également l'induction de la synthèse d'IL-1. De nombreuses activités comme la pyrogénicité des LPS découlent en fait de leur capacité à induire la synthèse d'IL-1 ainsi que d'autres médiateurs cellulaires (TNF, IFN γ , PGE2).

Ces activités nous donnent 2 marqueurs de la présence de LPS dans les dialysats et de leur transfert transmembranaire.

4. MÉTHODES DE DÉTECTION DES LPS

4.1. REMARQUE À PROPOS DU TEST SUR LAPIN

Le "test sur lapin" est le test officiel de la Pharmacopée Française (X^{ème} édition) pour la recherche de substances pyrogènes dans les solutés injectables, dans les dérivés du sang ainsi que dans tout médicament contenant cette clause dans leur Autorisation de Mise sur le Marché (AMM), ce qui n'est pas le cas pour les bains de dialyse.

Ce test demande une infrastructure importante et des conditions de réalisation très strictes. Il est basé sur l'élévation de la température corporelle du lapin après injection des échantillons dans la veine marginale de l'oreille.

Pour des raisons pratiques, nous n'avons pas utilisé ce test au cours de notre étude. Il s'agit de plus d'un test qualitatif et non quantitatif qui fait appel à la réactivité du lapin et donc ne représente pas un très bon modèle.

4.2. LE TEST L.A.L. (LYSAT D'AMŒBOCYTES DE LIMULE)

L'utilisation du Lysat d'Amœbocytes de Limule (LAL) pour la détection des endotoxines est due à BANG [BANG, 1956]. Il observa que l'infection du crabe primitif : *Limulus polyphemus* (crabe en fer à cheval) par des bactéries de type Gram négatif provoquait une coagulation intra-vasculaire de son hémolymphe qui entraînait la mort de l'animal.

LEVIN et BANG montrèrent que ce phénomène provenait de la réaction entre les endotoxines (d'*Escherichia coli* et de *Vibrio cholerae*) et un lysat d'amœbocytes représentant les seuls éléments figurés présents dans l'hémolymphe de la Limule [LEVIN et coll., 1964a; LEVIN et coll., 1964b]. Ils développèrent une méthode sensible de

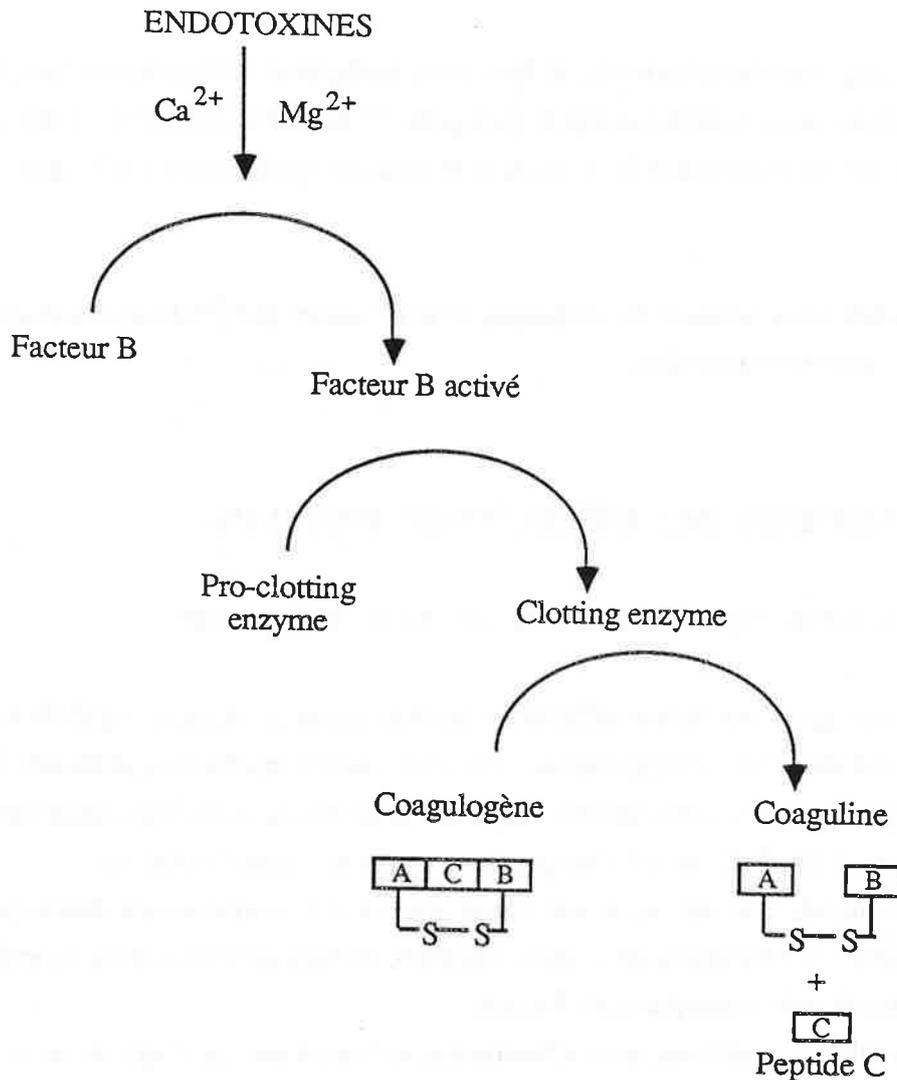


Figure I.11 : Représentation schématique du système de coagulation du LAL. Le facteur B est activé par la présence d'endotoxine, il active à son tour la "pro-clotting enzyme" qui libère le peptide C du coagulogène en donnant la coaguline qui compose le gel.

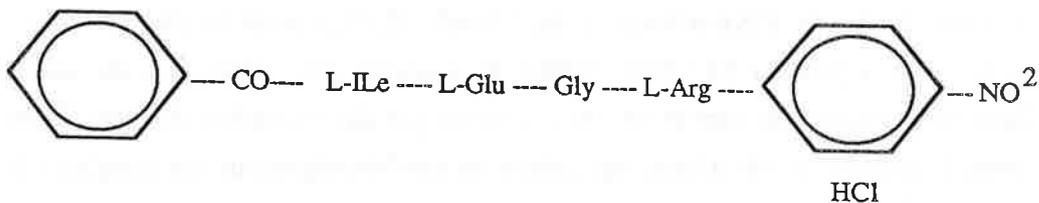


Figure I.12 : Substrat synthétique utilisé dans le test LAL chromogénique. La clotting enzyme formée catalyse l'hydrolyse du groupement p-Nitroaniline (pNa). La quantité de pNa ainsi libéré est mesurée au spectrophotomètre à 405 nm.

détection des endotoxines basée sur la coagulation de ce lysat cellulaire [LEVIN et coll., 1968] .

SOLUM [SOLUM, 1970; SOLUM, 1973] et YOUNG [YOUNG et coll., 1972] ont purifié et caractérisé la protéine coagulante du LAL. TAI a montré que la réaction du LAL avec les endotoxines était de type enzymatique et qu'elle était dépendante d'ions magnésium (Mg^{2+}) et calcium (Ca^{2+}) [TAI et coll., 1977].

De nombreux travaux ont permis d'élucider la séquence des réactions enzymatiques impliquées dans la formation du gel (Figure I.11). La coupure de la molécule de coagulogène par l'enzyme activée conduit à la libération de coaguline qui compose le gel. Cette technique est utilisée actuellement pour la détermination semi-quantitative des endotoxines. En effet, un dosage précis n'est pas envisageable car la prise du caillot n'est pas toujours facile à estimer à l'œil nu. Il existe néanmoins des méthodologies turbidimétriques, basées sur la cinétique de la réaction de gélification, qui sont très précises, mais très délicates à maîtriser.

Il a été démontré que, après activation, l'enzyme terminale pouvait hydrolyser d'autres molécules et notamment des substrats chromogènes synthétiques. Cette réaction conduit à la libération d'un produit coloré : le para-nitroaniline (pNa) permettant une mesure spectrophotométrique à 405 nm (Figure I.12).

De nouveaux tests permettant de passer de la méthode de détection de l'activation enzymatique par formation de caillot à celle utilisant la libération de pNa, ont été élaborés [IWANAGA et coll, 1978; FRIBERGER, 1982]. La coloration développée étant proportionnelle à la quantité d'endotoxine présente, ces tests autorisent une évaluation quantitative de l'activité LAL des échantillons à doser; c'est un test de cette nature que nous avons utilisé.

Le test LAL est, en principe, spécifique des LPS qui réagissent par l'intermédiaire du Lipide A. La structure nécessaire à l'activité consiste en un mono ou disaccharide phosphorylé [TAKAYAMA et coll, 1984]. Des auteurs rapportent cependant des réactions positives dues à des nucléotides, des protéines [ELIN et coll, 1973], ainsi qu'avec de simples polysaccharides: β -glucanes ou dextrans [MIKAMI et coll, 1982]. Il faut en particulier noter la réactivité au LAL des dérivés cellulosiques qui peuvent donner des réactions positives à des eaux de rinçage de membranes à base de cellulose [CARSON et coll, 1982; PEARSON et coll, 1982; PEARSON et coll, 1984]. En revanche, la glycérine employée pour la conservation des membranes semi-sèches comme l'AN 69 peut inhiber la cascade enzymatique et fausser le dosage.

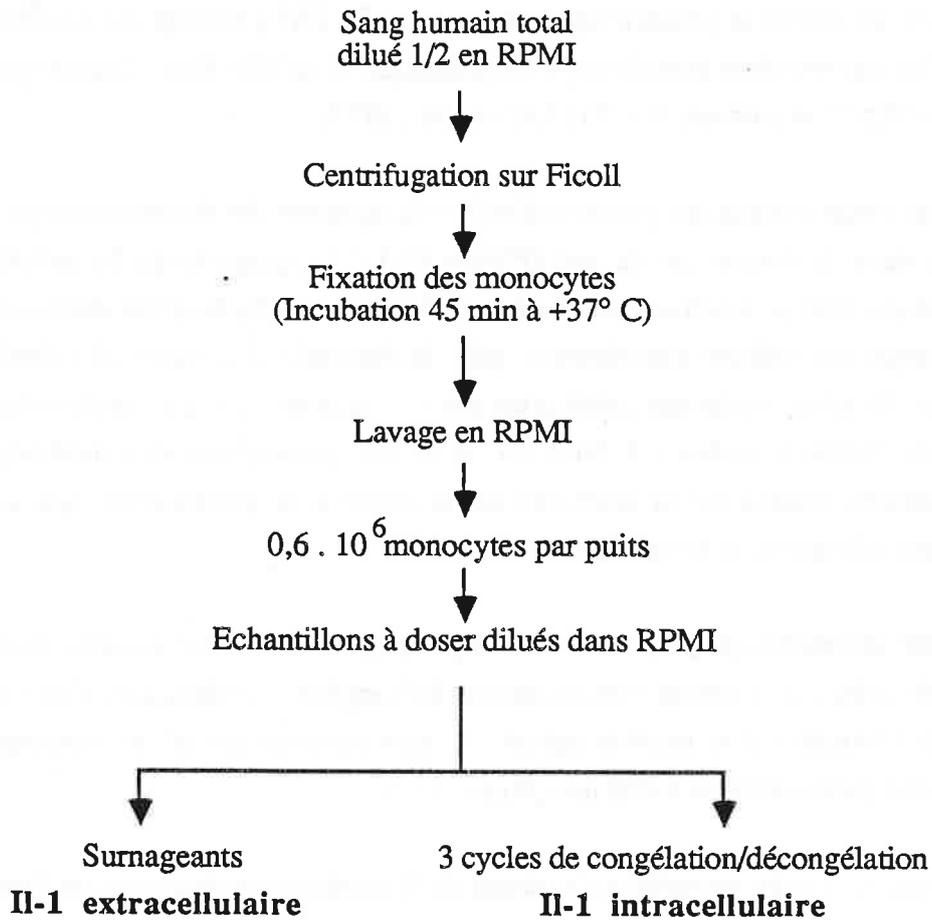
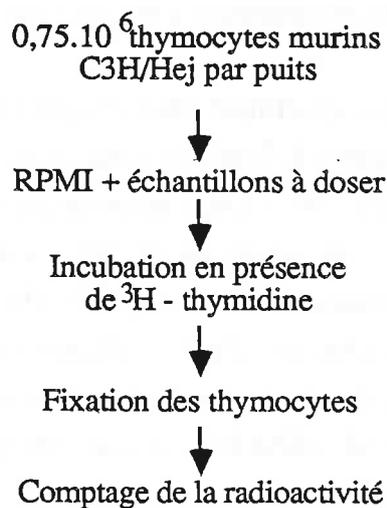
Etape 1 : Induction d'IL-1**Etape 2 : Dosage de l'IL-1**

Figure I.13 : Test d'induction de la synthèse d'Interleukine-1 par des monocytes humains *in vitro*.

La réactivité LAL et la toxicité étant dissociées, puisque nécessitant des structures moléculaires différentes [TAKAYAMA et coll, 1984], le dosage LAL ne reflète pas une activité biologique potentielle. Il est cependant un bon marqueur de la contamination bactérienne effective et/ou passée du dialysat.

Le seuil de détection est de l'ordre de 10 pg.ml^{-1} de LPS de *E. coli* O111:B4 de référence ce qui correspond à $0,1 \text{ Unité Endotoxine (UE).ml}^{-1}$. La réactivité des LPS vis-à-vis de ce test varie avec les genres, les espèces, les souches et même le type d'extraction. Les études menées dans notre laboratoire démontrent par exemple des réactivités variant de 1 à 44 UE.ng^{-1} pour des LPS de *Pseudomonas* [SIMARD, 1989]. Il est donc difficile et hasardeux de convertir le résultat d'un dosage en une quantité pondérale d'endotoxine si on ne connaît pas la nature exacte de l'échantillon.

4.3. CAPACITÉ D'INDUCTION DE LA SYNTHÈSE D'INTERLEUKINE-1 (IL-1)

Parmi les nombreuses activités biologiques attribuées aux LPS, nous avons également retenu leur capacité à induire la synthèse et la sécrétion d'Interleukine-1 (IL-1) par des monocytes humains *in vitro* [NEWTON, 1986].

4.3.1. Présentation de l'Interleukine-1 humaine

L'Interleukine-1 humaine est une protéine de masse moléculaire 17,5 Kda. On distingue l'IL-1 α de l'IL-1 β sur la base de leur composition en amino-acides et de leurs points isoélectriques, qui sont respectivement de 5,0 et de 7,0.

Cette molécule est biologiquement active à de très faibles concentrations (inférieures à 10^{-12} M) et possède un spectre d'activités très large [DINARELLO, 1988]. Elle joue un rôle primordial dans l'inflammation: elle était précédemment appelée pyrogène endogène.

4.3.2. Induction de la synthèse d'Interleukine-1

De nombreux stimuli peuvent être à l'origine de la production d'Interleukine-1. Le LPS est l'un des meilleurs [LACHMAN, 1983]. POOLE propose donc l'induction de la synthèse d'IL-1 comme test pour la détection des pyrogènes et il montre une sensibilité de 2 à 10 pg.ml^{-1} [POOLE et coll, 1988].

AREND [AREND et coll., 1986] et NEWTON [NEWTON, 1986] ont développé un test qui permet d'évaluer la synthèse et la sécrétion d'IL-1 par des monocytes humains, en réponse à une stimulation par les LPS. L'activation des monocytes par les LPS peut se

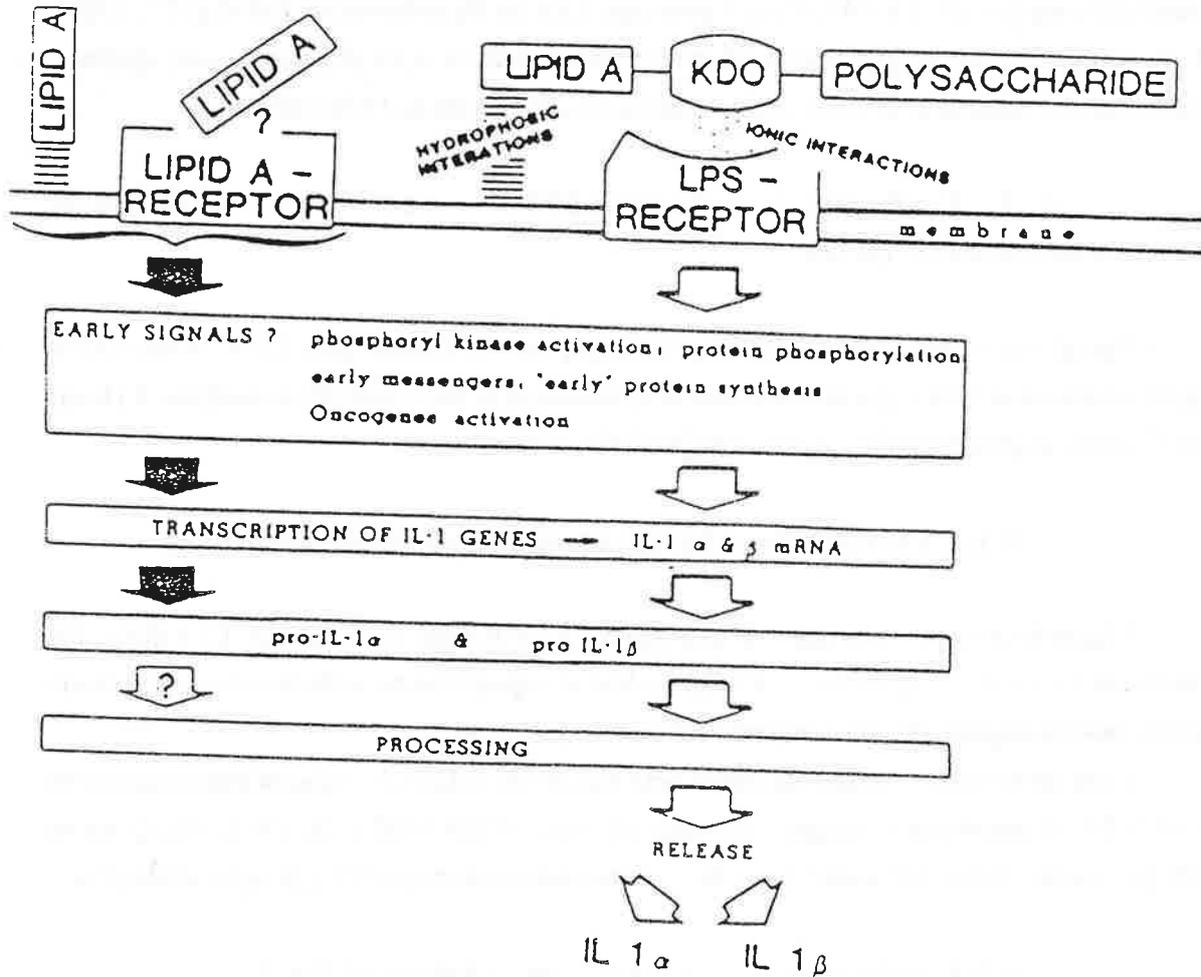


Figure I.14 : Modèle hypothétique de l'induction de la production d'Interleukine-1 (IL-1) par les Lipopolysaccharides, ou le Lipide A, après interaction avec la membrane du macrophage. (D'après HAEFFNER-CAVAILLON et coll., 1986).

traduire à deux niveaux: les LPS induisent la synthèse et l'accumulation intracellulaire d'IL-1, ce qui se traduit dans le test par l'IL-1 intracellulaire, puis dans un deuxième temps ils peuvent en provoquer l'excrétion, ce qui nous donne l'IL-1 extracellulaire.

Le test que nous avons utilisé, effectué par LAUDE-SHARP de l'Hôpital Broussais, en est dérivé (Figure I.13). Du sang humain provenant d'un donneur sain est centrifugé sur gradient de Ficoll pour en recueillir les leucocytes. Ceux-ci sont répartis et incubés pendant 45 min à + 37°C dans des plaques de culture en absence de sérum pour permettre l'adhérence des monocytes. Parmi les cellules adhérentes au plastique, le pourcentage de monocytes est estimé par une coloration histochimique permettant la recherche d'une activité estérase non spécifique [TUCKER et coll. 1977]. L'induction est alors réalisée en incubant ces monocytes dans du milieu RPMI en présence des échantillons. Après 20 h de culture les surnageants sont récoltés et centrifugés et on obtient l'IL-1 extracellulaire. Les cellules adhérentes sont lysées par 3 cycles de congélation-décongélation dans du RPMI pour en extraire l'IL-1 intracellulaire. La mesure de la teneur en IL-1 des échantillons provenant de la première étape est réalisée par prolifération de thymocytes murins en présence de concanavaleine A et de thymidine tritiée. La quantité d'IL-1 est ainsi directement reliée à l'incorporation de la thymidine tritiée que l'on mesure par comptage de la radioactivité. Les valeurs obtenues pour les échantillons sont comparées aux témoins "RPMI" qui correspondent à l'IL-1 naturellement produite et excrétée en l'absence d'inducteur.

4.3.3. Mécanisme d'induction de la synthèse d'Interleukine-1

Les doses de LPS, l'origine de ceux-ci, la nature des cellules ainsi que leur réponse individuelle sont autant de paramètres qui influencent l'amplitude de la production d'IL-1 [NEWTON, 1986]. Il est donc difficile de donner un seuil de sensibilité exact à ce test. AREND note que l'activité IL-1 est reliée à la présence du Lipide A et du KDO et est plus importante en présence de Lipide A diphosphorylé. Si le Lipide A joue un rôle important dans la stimulation des monocytes, LEBBAR a montré que la sécrétion d'IL-1 par des monocytes humains nécessite une interaction entre le LPS via sa portion polysaccharidique et la membrane du monocyte. Il semble que ce soit plus précisément la partie "core" contenant des sucres particuliers comme le KDO et les heptoses qui interviennent de manière spécifique dans cette interaction [LEBBAR et coll, 1986].

L'ensemble de ces remarques a conduit HAEFFNER-CAVAILLON à proposer le schéma hypothétique présenté Figure I.14 afin d'expliquer l'induction par le LPS de la synthèse et de la libération d'IL-1 par les monocytes [HAEFFNER-CAVAILLON et coll, 1986]. Plus récemment HAEFFNER-CAVAILLON a réaffirmé l'importance du KDO dans l'induction de la synthèse d'IL-1 [HAEFFNER-CAVAILLON et coll, 1989b] mais

TABLEAU I.VII :

Les inducteurs d'Interleukine-1

Inducteurs de la phagocytose

Lipopolysaccharides (LPS)
 Listeria
 Muramyl dipeptide (MDP)
 Peptidoglycane
 Exotoxines staphylococciques (TSST)
 Pseudomonas aeruginosa
 Mycobactérium tuberculosis (PPD)
 (Exopolysaccharide)
 (Antigène 5 cytoplasmique)
 Candida albicans
 (Extrait antigénique)
 (Polysaccharide)
 Spirochètes
 Le virus Epstein Barr
 Le virus influenza
 gp120 de HIV

Billes de latex
 Zymosan
 Phorbol Myristic Acetate
 Silice

Les antigènes associés aux
 antigènes de classe II du
 C.M.H., à la surface des
 macrophages et
 présentés aux cellules T.

Des conditions physiologiques

Exercice physique
 Cycle menstruel
 Exposition aux ultra-violet
 Régime enrichi en vitamine A

Lymphokines et médiateurs

Colony stimulating factor (CSF)
 Interféron
 Tumor Necrosis Factor (TNF α et TNF β)
 Interleukine-1
 Interleukine-2
 PDGF
 L'hydroxide d'aluminium

Médicaments et produits chimiques

Polymyxine B
 1-3 β glucan
 Acide hyaluronique
 L'hydroxide d'aluminium
 Le pyrophosphate de calcium
 Phénytoin
 L'ouabaine
 15-deoxyspergualin

Produits biologiques

Des stéroïdes
 Fragment Fc des IgG
 Cristaux d'urée monosodique
 Epinéphrine et hydrocortisone
 IgG agrégées

Neuromédiateurs

Substance P
 Neurokine; Arginine
 Vassopressine

Et également:

La réaction mixte
 lymphocytaire
 Des cellules tumorales
 Les anticorps anti-HLA DR
 La vitamine D3

les travaux de notre laboratoire montrent que des LPS pauvres en KDO peuvent être plus inducteurs que des LPS plus riches [SIMARD, 1989].

Le test IL-1 est donc relativement difficile à interpréter. Il est plus sensible que le test LAL [HAEFFNER-CAVAILLON, communication personnelle] mais il est sans doute moins spécifique que celui-ci: des polysaccharides d'origine microbienne ou le Muramyl DiPeptide (MDP) sont des activateurs d'IL-1 [DINARELLO et coll, 1986] (Tableau I.VII). Le test IL-1 doit donc être considéré ainsi que le test LAL comme un marqueur de contamination globale du dialysat.

5. ORIENTATION DES TRAVAUX

Les performances accrues des membranes à haute perméabilité plaident en faveur de leur emploi en association avec du bain bicarbonate. L'utilisation du bicarbonate, à base de concentrés non stériles semble augmenter les risques de réactions anaphylactoïdes au début des séances de dialyse. La contamination du dialysat et de l'appareillage par des bactéries de type Gram négatif explique au moins en partie ces réactions puisque les LPS issus de ces bactéries sont susceptibles de traverser les membranes de dialyse.

La production de dialysat propre, c'est-à-dire stérile et non-inducteur dans les tests LAL et IL-1, marqueurs de contamination par des LPS, est donc un objectif primordial. Il devrait principalement permettre de réduire les réactions précoces mais aussi les inductions chroniques du système inflammatoire chez les hémodialysés.

Cet objectif rejoint, par ailleurs, une préoccupation de l'hémofiltration qui est la production en ligne de liquide pour réinjection, puisque les contraintes que nous imposons au bain de dialyse sont similaires à celles des liquides réinjectables.

Dans un premier temps, nous nous attacherons à la sélection et à la validation d'un système de production de tels bains. Nous étudierons ensuite les LPS et les autres inducteurs d'IL-1 éventuellement présents dans les bains. Dans une dernière étape, nous verrons comment limiter les transferts de LPS à travers les membranes de dialyse.

**ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE LA
PRODUCTION DE BAINS STÉRILES
APYROGÈNES**

1. INTRODUCTION

1.1. CHOIX DU SITE DE PURIFICATION

La contamination bactérienne du dialysat a 3 sources :

- l'eau [BOMMER et coll, 1987a ; DU MOULIN et coll, 1987]
- le concentré bicarbonate
- le générateur

qui ont une importance variable dans la contamination finale.

La production d'eau chimiquement propre pour l'hémodialyse nécessite une série de traitements qui sont autant de sources de contamination.

Classiquement l'eau est traitée par un adoucisseur ou des résines échangeuses d'ions, un préfiltre, une cartouche de charbon actif pour l'élimination du chlore libre et de la matière organique et par osmose inverse. Les premiers éléments sont des terrains propices de contamination : les média employés permettent la fixation des bactéries qui trouvent dans l'alimentation en eau une source continue de matières organiques nécessaires à leur prolifération. L'osmose inverse permet en revanche d'obtenir une eau propre tant du point de vue chimique (réjection ionique) que bactériologique (réjection des bactéries et de leurs dérivés). Cependant, il est pratiquement impossible d'éviter la recontamination de cette eau et, par contamination rétrograde, de l'ensemble de l'installation en aval de l'osmoseur. MION [MION et coll, 1989] donnent les principales recommandations pour la conception d'une unité de production d'eau par hémodialyse : boucle de recirculation, conditions de stockage, limitation des volumes morts,...

Les contaminations observées dans les concentrés au bicarbonate peuvent être très importantes. MONTAGNAC rapporte des niveaux de 10^7 UFC.l⁻¹ et EBBEN de 10^5 UFC.ml⁻¹ soit 10^8 UFC.l⁻¹ [MONTAGNAC et coll, 1988 ; EBBEN et coll, 1987]. En dehors de l'existence d'une norme pour les concentrés, quelques actions sont envisageables. Outre la sensibilisation des fabricants de concentrés pour qu'ils en améliorent la qualité, on peut penser les microfiltrer ou les ultrafiltrer avant leur entrée dans le générateur.

Récemment, GAMBRO a développé le Bicart. Cette cartouche permet la production extemporanée de bicarbonate concentré à partir d'eau traitée et de bicarbonate solide naturellement peu contaminé. L'emploi de ce système doit permettre une réduction notable de la contamination.

	Hollow- fiber UF	Distillation	Thermo- compression Distillation	Reverse Osmosis	Charged Filters
Applicable					
For Water	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
For Product	Yes	No	No	No	Yes
Sanitary Design	Good	Good	Good	Fair	Good
Removal Efficiency	$>10^5$	$>10^5$	$>10^5$	$>10^5$	10^2-10^3
Approximate Operating Cost per 1000 liter	\$0.50-0.80	\$10-15	\$1-2	\$1-2	\$2.50-10
Approximate Capital Cost of 800 l/hr System	\$8,000	\$60,000	\$140,000	\$20,000	\$5,000

Tableau II.I: Comparaison de différentes méthodes de dépyrogénéation
(d'après TUTUNJIAN, 1985)

Les générateurs, du fait de leur circuit hydraulique complexe (tuyauteries sans circulation, espaces morts, connections, surfaces rugueuses, écoulements laminaires), offrent de nombreux sites favorables de stagnation et la température élevée favorise la prolifération des micro-organismes. De plus, dans les générateurs à circuit fermé ou semi ouvert, des nutriments sont amenés par le dialysat usé.

En conclusion, il est extrêmement difficile d'assurer la stérilité des fluides entrant dans les générateurs et, quand bien même ces conditions seraient remplies, la recontamination des générateurs est inévitable. Nous avons donc opté pour la purification du bain après sa préparation.

1.2. PROCÉDÉS DE DÉPYROGÉNATION

La dépyrogénéation, c'est-à-dire l'élimination des pyrogènes (LPS principalement) peut être assurée par diverses techniques (Tableau II.I). Nous n'envisagerons que celles dont le développement est possible dans l'environnement d'un générateur individuel de bains de dialyse.

1.2.1. Adsorption

L'adsorption sur charbon actif est une méthode que nous devons rejeter d'emblée. Comment évaluer la saturation de la cartouche? Quels sont les risques de relargage? Comme tout système à cartouche, c'est un site très favorable de prolifération bactérienne et donc de production de LPS.

1.2.2. Osmose inverse

La rejection ionique des membranes d'osmose inverse ne permet pas d'envisager cette technique.

1.2.3. Ultrafiltration

La production de liquide réinjectable, stérile et apyrogène par ultrafiltration, a été démontrée depuis longtemps par HENDERSON [HENDERSON et coll, 1978]. Le choix de cette technique s'imposait donc *a priori*. Le seuil de coupure des membranes retenu par différents auteurs [BELFORT et coll, 1980 ; TUTUNJIAN, 1982] est de 10 kDa. Un tel seuil de coupure permet sans aucun doute d'exclure les LPS agrégés sous forme de

micelles. En revanche, on ne peut prétendre interdire tout passage de LPS de petite taille (forme R) sous leur forme libre. Cette hypothèse est néanmoins peu vraisemblable puisque les bains contiennent des cations divalents qui favorisent la formation de micelles et même de vésicules.

1.2.4. Microfiltration

La microfiltration n'est pas suffisante pour éliminer les endotoxines, ROBINSON a cependant reporté l'utilisation d'une membrane microporeuse (0,1 μm) en polypropylène pour la filtration des endotoxines. Cette membrane permet de réduire la concentration d'un facteur 10^3 - 10^4 . Le mécanisme de rétention invoqué est l'interaction hydrophobe entre le polypropylène et le Lipide A [ROBINSON et coll, 1985].

L'adsorption sur des microfiltres chargés positivement a également été envisagée. GERBA montre une rétention de plus de 99 % de LPS purifiés avec des filtres en profondeur ou des filtres membranes [GERBA et coll, 1985]. Cependant, des essais effectués par HOSPAL avec des membranes N66TM PosidyneTM (PALL) se sont révélés peu probants.

Le problème principal est de connaître la limite de saturation de ces filtres, puisqu'une fois ce seuil atteint la rétention est pratiquement nulle. Il est hasardeux d'utiliser de tels filtres pour notre application puisque nous n'avons aucun moyen d'évaluer en ligne la qualité du dialysat produit. Dans le cadre de notre étude, nous avons donc rejeté cette méthode pour la purification des bains.

1.3. CAHIER DES CHARGES

Le système de purification de bains par ultrafiltration devra :

- produire un bain stérile, non réactif au LAL, non inducteur de la synthèse d'IL-1
- être intégrable aux générateurs déjà existants et pour cela il devra remplir les conditions suivantes :

- perte de charge 0,5 bar pour un débit de 0,5 l.min⁻¹
- résistance aux agents désinfectants utilisés en routine (en particulier eau de Javel 3000 ppm)
- encombrement minimum.

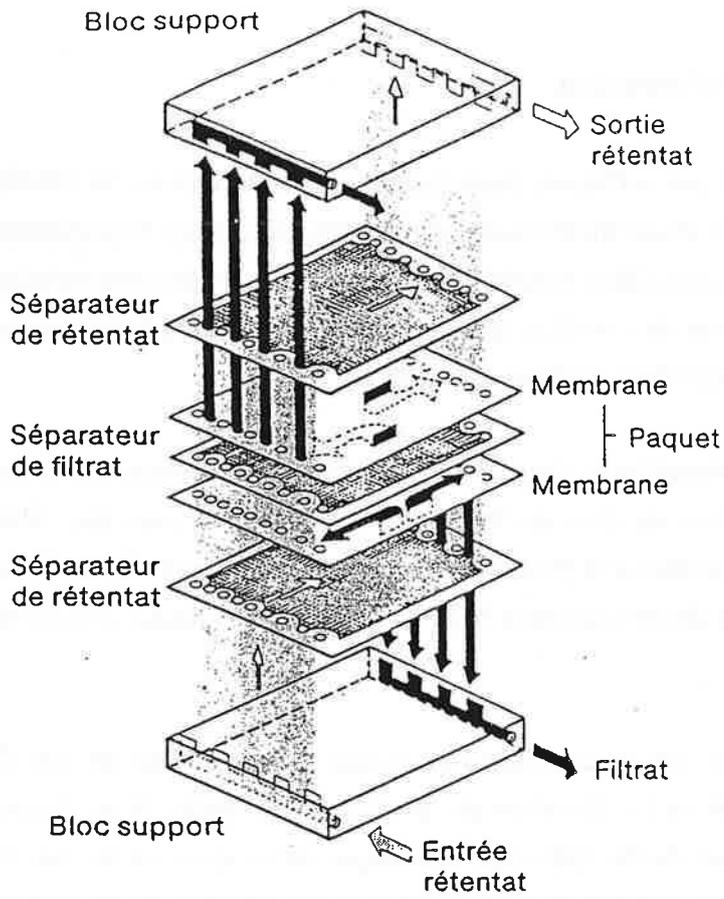


Figure II.1 : Présentation des membranes planes
Constitution des cassettes.

Nous avons donc testé différentes membranes planes en polysulfone, un hémofiltre à fibres creuses en polyamide ainsi qu'un système d'ultrafiltration à membranes minérales.

Le coût du système sera aussi un élément de choix déterminant.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. PRÉSENTATION DES MEMBRANES

2.1.1. Membranes planes

Les membranes testées sont en polysulfone et possèdent un seuil de coupure de 10 kDa. Nous avons évalué les performances des membranes suivantes :

- | | |
|--|-------------------------------|
| - Millipore (type PTGC) | Surface: 0,232 m ² |
| - Filtron (série Nova) | Surface: 0,465 m ² |
| - Rhône-Poulenc (membrane expérimentale) | Surface: 0,465 m ² |

Les membranes sont préconditionnées en cassettes qui sont des empilements de séparateur de rétentat, de membrane et de séparateur de filtrat (Figure II.1). L'étanchéité de l'ensemble est assurée par collage. Ces cassettes sont maintenues dans une contention (FILTRON). L'encombrement de l'ensemble contention-cassette est d'environ 30x20x10 cm.

Ces membranes représentent un investissement important de 6 à 7000 F.

2.1.2. Hémofiltre FH88

Le FH88 (GAMBRO) est un hémofiltre de 2 m² de surface. Sa membrane est sous forme de fibre creuse de 215 µm de diamètre interne et de 60 µm d'épaisseur. C'est une membrane asymétrique en polyamide à haute perméabilité.

L'hémofiltre a une longueur de 30 cm pour un diamètre de 8 cm.

Le prix de cet hémofiltre est de l'ordre de 250 F.

Cet hémofiltre est conçu pour un usage unique mais nous avons envisagé sa réutilisation en validant sa désinfection avec le formol, l'eau de Javel et l'acide peracétique.

2.1.3. Membranes céramiques

Les membranes céramiques ont été développées en France sur la base des barrières de diffusion gazeuse mises au point par le CEA pour l'enrichissement d'Uranium. Ces membranes sont maintenant largement utilisées en industrie laitière et pharmaceutique. Les essais que nous présentons ont été effectués avec des membranes CARBOSEP fournies par le CEA.

Les membranes CARBOSEP sont tubulaires : le support mécanique est un tube de graphite de diamètre interne 6 mm, diamètre externe 10 mm et de longueur 1,2 m ; la paroi interne de ce tube est recouverte d'une couche d'oxyde de zirconium qui constitue la membrane d'ultrafiltration. Le seuil de coupure de la membrane utilisée est de 10 kDa.

Ces membranes résistent à une pression de 15 bars, une température de 150°C. Elles sont stérilisables et dépyrogénables à la vapeur ce qui constitue un avantage très appréciable par rapport aux membranes organiques.

2.2. MÉTHODOLOGIE: TYPES DE VALIDATION

Pour apprécier les performances des ultrafiltres, nous avons eu recours à 2 types de validation :

- Des validations bactériennes sont effectuées par alimentation des bancs d'essai par une suspension bactérienne. L'espèce utilisée *Pseudomonas aeruginosa* n'est pas la plus représentative, la plus ubiquitaire, mais elle a un taux de croissance élevé qui permet un dénombrement rapide.

- Des validations endotoxiniques sont réalisées en alimentant le banc avec des LPS purifiés en solution. Lors de validations bactériennes, les taux de contamination endotoxinique ne sont en effet pas assez importants pour permettre une évaluation correcte des capacités de rétention des ultrafiltres. Le LPS contaminant est en général du LPS d'*E. coli* O111:B4 (SIGMA). Les membranes sont ainsi caractérisées par leur LRV (Log Retention Value) qui est le logarithme du rapport entre la concentration en amont et la concentration en aval de la membrane.

Les dénombrements bactériens sont effectués par étalement sur boîte de Pétri (Gélose Trypcase-Soja Biomérieux) après dilution et les dosages d'endotoxines par la méthode LAL (voir Annexe 1).

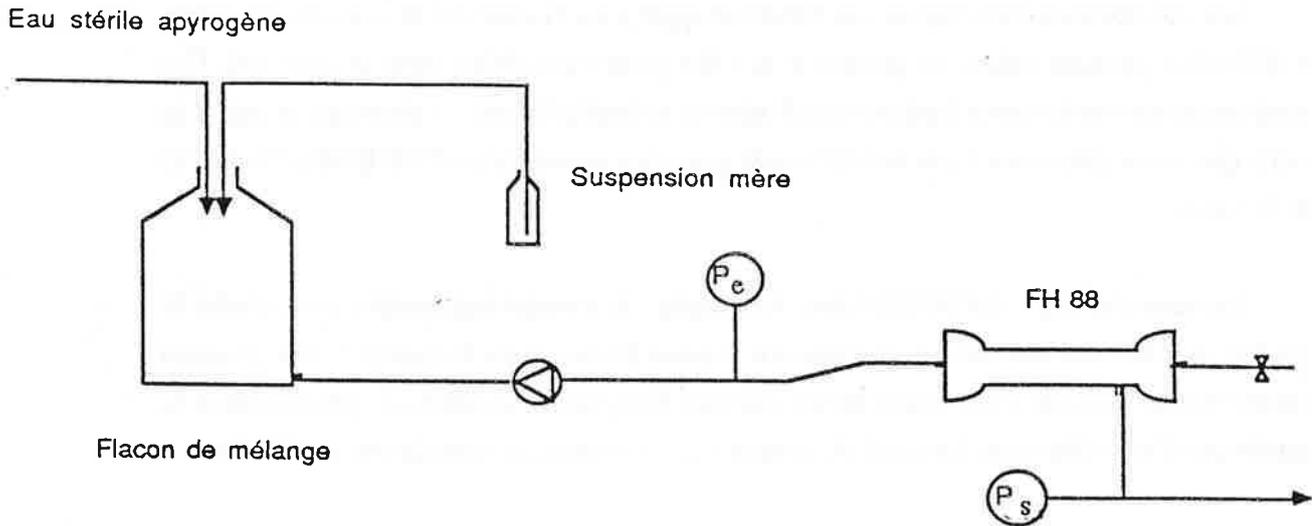


Figure II.2 : Banc d'essai pour validation *in vitro* des membranes planes et de l'hémofiltre FH88

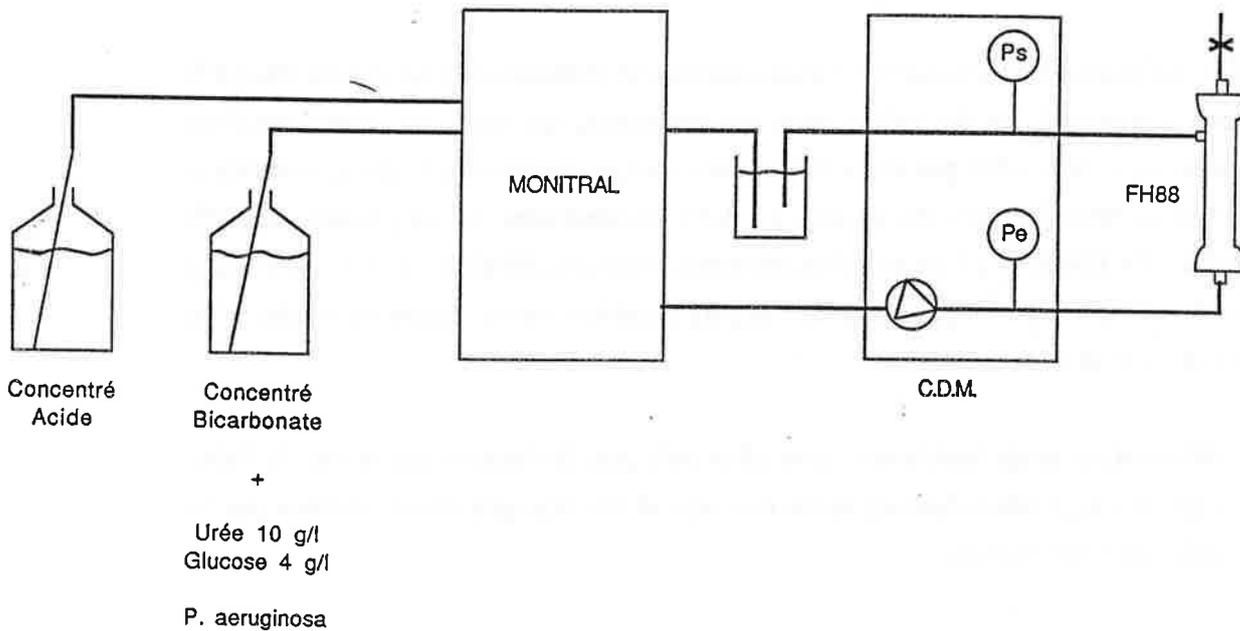


Figure II.3 : Montage pour les dialyses simulées.
Insertion du CDM sur sur la boucle de recirculation du Monitral.

La perte de charge que nous considérons est la différence de pression hydrostatique mesurée en régime permanent.

2.3. BANCS D'ESSAI

2.3.1. Essais *in vitro*

Le banc d'essai utilisé est schématisé dans la Figure II.2.

Le système d'ultrafiltration est alimenté par une dilution dans de l'eau stérile apyrogène (fournie par un MilliQ-UF Millipore) de la suspension "mère". Celle-ci est obtenue soit par suspension dans de l'eau stérile apyrogène de *P. aeruginosa* cultivé sur milieu Tryp-case-Soja (Biomérieux), soit par dilution de LPS purifiés. Les suspensions bactériennes finales sont ainsi de l'ordre de 10^5 à 10^6 UFC.ml⁻¹.

Le débit est de 1 l.min⁻¹ pour les membranes Filtron et Rhône Poulenc et de 0,5 l.min⁻¹ pour les membranes Millipore et l'hémofiltre Gambro FH88.

La filtration est totale avec une chasse tangentielle toutes les 30 minutes. L'ensemble du circuit est stérilisé par autoclavage excepté l'élément de filtration qui est désinfecté à l'eau de Javel pour les membranes planes, au formol ou l'eau de Javel pour le FH 88.

2.3.2. Simulation de dialyse

Des dialyses simulées ont été effectuées en insérant l'hémofiltre sur le circuit de distribution du dialysat d'un générateur (Monitral, HOSPAL) (Figure II.3). Ceci a nécessité la mise au point d'un prototype d'ultrafiltration (ou CDM) constitué d'une pompe, de 2 capteurs de pression et d'une alarme. Le CDM, asservi au moniteur, permet d'assurer un débit de 500 ml.min⁻¹ dans une large gamme de perte de charge, ce qui n'aurait pu être effectué avec la pompe de recirculation du Monitral.

Le Monitral est alimenté en eau permutée, en concentré bicarbonate et concentré acide.

Le concentré bicarbonate est surcontaminé par une suspension de *P. aeruginosa*. Les taux de contamination minima ainsi obtenus sont les suivants :

- Bactéries 20000 UFC/ml
- Endotoxines 2000 UE/ml

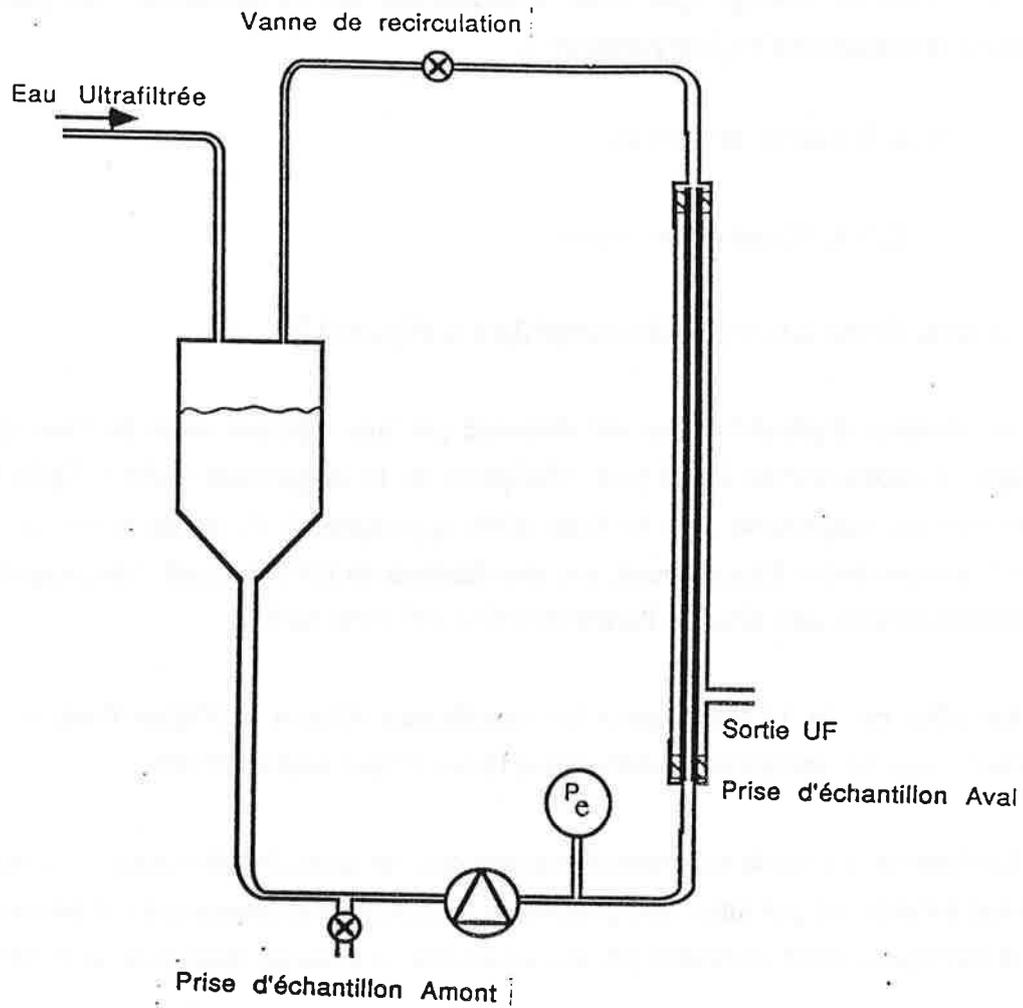


Figure II.4 : Schéma du pilote d'ultrafiltration à membrane céramique.

Le concentré est par ailleurs supplémenté par 10 g/l d'urée et 4 g/l de glucose pour assurer survie et croissance de la souche.

L'ensemble du circuit hydraulique est désinfecté après la simulation au formol, à l'eau de Javel ou à l'acide peracétique suivant le cycle de désinfection du générateur.

2.3.3. Banc d'essai pour membranes céramiques

Le banc d'essai utilisé, schématisé Figure II.4, nous a été prêté par le CEA. L'unité de filtration est monotube, ce qui représente une surface de filtration très faible par rapport aux autres systèmes utilisés ($22,6 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2$).

Avec ce système, seules ont été caractérisées la perte de charge et la rétention endotoxinique.

Il n'est en effet pas possible de stériliser correctement ce pilote. Dans ces conditions une validation bactérienne ne serait pas interprétable. Les échantillons destinés au dosage LAL sont donc microfiltrés sur Millex GV (Millipore) immédiatement après prélèvement.

3. RÉSULTATS

3.1. MEMBRANES PLANES

Nous n'avons effectué qu'un faible nombre d'essais avec les membranes planes. Ils nous ont permis d'effectuer un choix fondé sur les perméabilités des membranes. Pour la plus perméable, nous avons ensuite évalué la rétention des LPS .

3.1.1. Perte de charge

C'est la cassette Filtron qui donne la plus faible perte de charge : 385 mmHg contre 560 et 1600 pour les cassettes Rhône-Poulenc et Millipore respectivement. La cassette Millipore génère une perte de charge bien supérieure à la limite imposée par notre cahier des charges.

Ces pertes de charge augmentent lors des validations bactériennes de l'ordre de 30 à 60 mmHg pour la cassette Filtron, jusqu'à 80 mmHg pour la cassette Rhône-Poulenc.

Tableau II. II : Evolution des pertes de charge et des contaminations bactériennes et endotoxiques lors des dialyses simulées

Caractéristiques des dialyses	Temps	ΔP (mm Hg)	Bactéries (UFC/ml)		Titre LAL (UE/ml)	
			Amont	Aval	Amont	Aval
ESSAI 1 :	0	115	300	<10	5,8	0,2
Concentré enrichi	1 min		4000	<10	49,7	<0,03
en urée, glucose,	5 min		2000	<10	24,4	<0,03
et bouillon,	15 min		1300	<10	27	<0,03
contaminé par	30 min		1000	<10	27	<0,03
<i>P. aeruginosa</i>	1 h	120	600	<10	63	<0,03
60.000 UFC/ml	2 h	160	300	<10	66	<0,03
1900 UE/ml	3 h	210	<100	<10	67	<0,03
	4 h	255	<100	<10	53	<0,03
ESSAI 2 :	0	110	2900	<10	20	<0,03
2 dialyses avec	1 min		1250	<10	4,5	<0,03
même concentré	15 min		200	<10	1,9	<0,03
100.000 UFC/ml	30 min		8900	<10	86	<0,03
5000 UE/ml	1 h	340	9000	<10	240	<0,03
Changement de	0	100	<100	<10	1,2	<0,03
filtre entre les	1 min		<100	<10	62	<0,03
deux dialyses	15 min		<100	<10	20	<0,03
	30 min		<100	<10	80	<0,03
	1 h		<100	<10	58	<0,03
	2 h		50	<10	138	<0,03
	3 h	145	50	<10	200	<0,03
	4 h	155	50	<10	154	<0,03
	5 h		<100	<10	200	<0,03
	5 h 30	190	<100	<10	1 ?	<0,03

Les chasses tangentielles toutes les demi-heures n'ont aucun effet sur la perte de charge. Le colmatage observé serait donc surtout dû à une adsorption sur la membrane plutôt qu'à la création d'une couche de polarisation.

Les désinfections par l'eau de Javel (3000ppm) permettent en revanche de restaurer la perméabilité initiale des cassettes Rhône-Poulenc et Millipore. Pour la cassette Filtron, on perd un peu de perméabilité après la première désinfection puis la perte de charge se stabilise à 430 mmHg.

3.1.2. Performances biologiques

3.1.2.1. Rétention bactérienne

La rétention bactérienne des cassettes est excellente. Pour des contaminations supérieures à 10^6 UFC/ml la rétention est totale. C'est d'ailleurs un facteur d'évaluation de l'intégrité de la membrane qui nous a permis de démontrer une détérioration (détachement des membranes) de la cassette Rhône-Poulenc après un stockage prolongé d'un mois dans du formol à 1 %.

3.1.2.2. Rétention des endotoxines

Lors des validations bactériennes de 4 heures la rétention est totale : tous les dosages sont négatifs (inférieur à $0,03$ UE.ml⁻¹). Il faut cependant constater que les niveaux moyens mesurés en amont des ultrafiltres sont inférieurs à 20 UE/ml ce qui est assez faible.

Compte-tenu de la perte de charge importante de la membrane Millipore et de la détérioration de la cassette Rhône-Poulenc, nous n'avons déterminé le LRV que pour la cassette Filtron.

Les deux déterminations nous donnent des LRV de 3,4 et 4,2 correspondant à une réduction du niveau de LPS de 10 µg.ml⁻¹ à moins de $0,05$ pg.ml⁻¹.

Ces LRV ne sont pas excellents. TUTUNJIAN rapporte en effet un LRV supérieur à 5,3 avec une membrane fibre creuse en polyamide (Amicon) [TUTUNJIAN, 1982].

Si on considère que les taux de contamination dans les dialysats sont au maximum de l'ordre 100 à 200 UE.ml⁻¹, les bains produits par ultrafiltration auront un titre LAL théorique d'environ $0,01$ UE.ml⁻¹ qui est en fait non-détectable.

Tableau II.II (suite)

Caractéristiques des dialyses	Temps	ΔP (mmHg)	Bactéries (UFC/ml)		Titre LAL (UE/ml)	
			Amont	Aval	Amont	Aval
ESSAI 3 : 2 dialyses avec le même filtre même concentré 21.000 UFC/ml 10.000 UE/ml	0	100	400	<10	40	<0,03
	1 min		460	<10	137	<0,03
	15 min	90	200	<10	158	<0,03
	30 min		100	<10	155	<0,03
	1 h	100	130	<10	153	<0,03
	2 h	125	160	<10	345	<0,03
	3 h	150	300	<10	270	<0,03
	4 h	175	100	<10	220	<0,03
	0	210	230	<10	3,4	<0,03
	1 min		330	<10	240	<0,03
	15 min		160	<10	390	42 ?
	30 min		300	<10	210	0,1
	1 h	230	330	<10	230	<0,03
	2 h	260	530	<10	200	<0,03
	3 h	280	260	<10	210	<0,03
	4 h	290	400	<10	370	<0,03
ESSAI 4 : 2 dialyses avec le même filtre même concentré 200.000 UFC/ml 2.500 UE/ml Léger débit de fuite (10 ml/min)	0	85	900	<10	1,8	<0,03
	1 min		7200	<10	25	<0,03
	15 min	80	7900	<10	122	<0,03
	30 min		62000	<10	240	<0,03
	1 h	85	56000	<10	200	<0,03
	2 h	105	9000	<10	130	<0,03
	3 h	110	45000	<10	107	<0,03
	0	120	42000	<10	105	<0,03
	1 min		52000	<10	180	<0,03
	15 min		75000	<10	220	<0,03
	30 min		38000	<10	310	<0,03
	1 h	140	41000	<10	235	<0,03
	2 h	150	77000	<10	450	<0,03
3 h	170	170000	<10	430	<0,03	

3.1.3. Remarques sur les membranes planes

Les quelques essais réalisés ont permis de dégager certains points négatifs des systèmes à membrane plane.

Le premier point est lié aux contentions : elles ont des volumes morts importants qui sont difficiles à dégazer, à désinfecter et dans lesquels les vitesses d'écoulement sont très faibles et entraînent une stagnation.

L'alignement des cassettes sur ces contentions est difficile et nous avons enregistré des essais désastreux dus à un mauvais montage de la cassette.

Les membranes d'ultrafiltration sont fragiles. Après utilisation, elles doivent rester humides pour garder leur intégrité, leurs performances. Il n'est pas évident que ceci soit réalisé dans un générateur même pour un arrêt de courte durée. Le point capital reste la tenue à longue échéance aux désinfectants. Pour une utilisation annuelle, la membrane et la colle assurant l'intégrité des deux compartiments devraient supporter plus de 600 désinfections. Or Millipore préconise une eau de Javel à 10 ppm maximum pour la désinfection de ses membranes. Des taux de 200 ppm oxydent les membranes et altèrent leurs performances, alors que les taux d'hypochlorite utilisés par les machines sont de 2 à 3000 ppm.

L'incident observé avec la membrane Rhône-Poulenc conservée dans le formol nous montre aussi les limites d'utilisation d'un des désinfectants les plus courants.

3.1.4. Conclusion

Le système utilisant la membrane plane FILTRON permet de produire un liquide stérile et non-réactif au LAL en respectant les consignes du cahier des charges. Les essais limités que nous avons effectués ne plaident cependant pas pour l'utilisation de ces membranes qui sont de mise en oeuvre et de maintenance délicates. Il ne semble pas aisé d'intégrer un tel système dans un générateur individuel.

3.2. HÉMOFILTRE FH 88

Un nombre d'essais important a été effectué sur FH88 qui se répartissent en une série de validations *in vitro*, une série de dialyses simulées (Tableau II.II) et deux séries de dialyses simulées pour évaluer les compatibilités avec les désinfectants usuels : Javel, formol (Tableau II.III) et acide peracétique (Tableau II.IV).

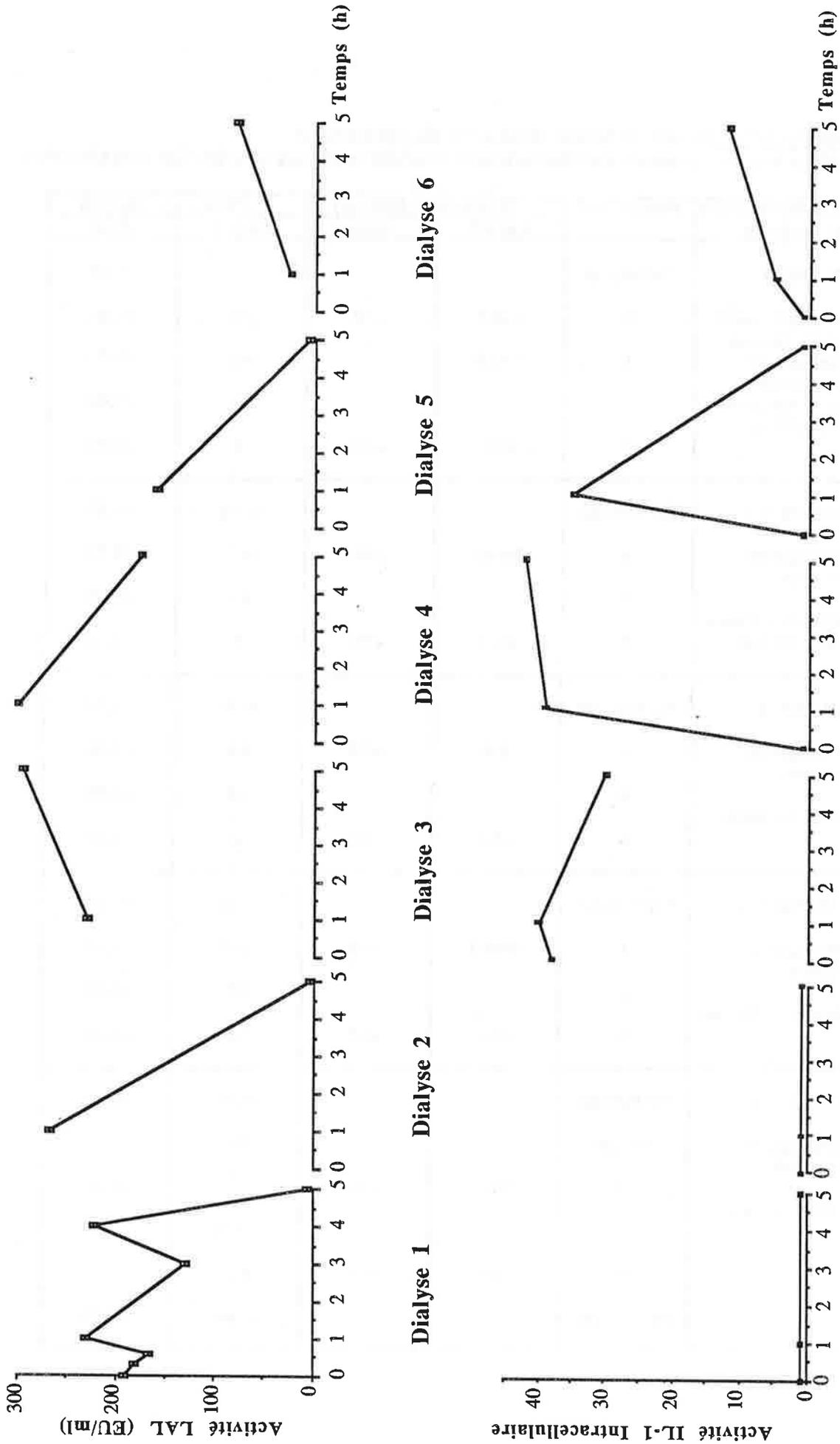
Tableau II.III: Essais de désinfection à l'eau de Javel et au formol
Evolution des contaminations bactériennes et endotoxiques lors des dialyses simulées

Caractéristiques des dialyses	Temps (h)	Bactéries (UFC/ml)		Titre LAL (UE/ml)	
		Amont	Aval	Amont	Aval
DIALYSE 1 : Concentré enrichi en urée, glucose, contaminé par <i>P. aeruginosa</i> 2700 UFC/ml 6500 UE/ml Désinfection Javel	Fin Rinçage			<0,03	<0,03
	0	<10	<10	190	<0,03
	0,3			180	<0,03
	0,6	10	<10	165	<0,03
	1			230	<0,03
	2			0,1	45,3 ?
	3	<10	<10	130	<0,03
4			220	<0,03	
5	<10	<10	5,2	<0,03	
DIALYSE 2 : Concentré de même type que pour la dialyse 1 Désinfection Formo	Fin Rinçage			0,15	<0,03
	1	6300	<10	266	<0,03
	5	<10	<10	3,4	<0,03
DIALYSE 3 : Concentré de même type que pour la dialyse 1 Désinfection Javel	Fin Rinçage			280	<0,03
	1	370	<10	230	<0,03
	5	170	<10	295	<0,03
DIALYSE 4 : Concentré de même type que pour la dialyse 1 Désinfection Formo	Fin Rinçage			2	<0,03
	1	2585	<10	296	<0,03
	5	165	<10	175	<0,03
DIALYSE 5 : Concentré de même type que pour la dialyse 1 Désinfection Javel	Fin Rinçage			0,4	<0,03
	1	3090	<10	160	<0,03
	5	25	<10	6	<0,03
DIALYSE 6 : Même concentré que dialyse 1 Désinfection Javel	Fin Rinçage			0,6	<0,03
	1	106	<10	25	<0,03
	5	30	<10	80	<0,03

Tableau II.IV : Essais de désinfection à l'acide peracétique
Evolution des contaminations bactériennes et endotoxiques lors des dialyses simulées

Caractéristiques des dialyses	Temps (h)	Bactéries (UFC/ml)		Titre LAL (UE/ml)	
		Amont	Aval	Amont	Aval
DIALYSE 1 : Concentré enrichi en urée, glucose, contaminé par <i>P. aeruginosa</i> : 28000 UFC/ml 1400 UE/ml	Fin Rinçage				0,05
	0	1350	<10	73	<0,03
	1	1730		42	<0,03
	3			36	<0,03
	5	550	<10	3	<0,03
DIALYSE 2 : Même type de concentré 1200000 UFC/ml 10500 UE/ml	Fin Rinçage			0,08	<0,03
	1	2500	<10	37	<0,03
	3			64	<0,03
	5	200	<10	4	<0,03
DIALYSE 3 : Même type de concentré 80000 UFC/ml	Fin Rinçage			0,8	<0,03
	1	60	<10	68	<0,03
	3			23	<0,03
	5	350	<10	2	<0,03
DIALYSE 4 : Même type de concentré 1900000 UFC/ml	Fin Rinçage			2,2	<0,03
	1	5200	<10	111	<0,03
	3			35	<0,03
	5	630	<10	49	<0,03
DIALYSE 5 : Même type de concentré 410000 UFC/ml	Fin Rinçage			0,5	<0,03
	20 min			28	
	1	290	<10	141	<0,03
	3			168	<0,03
	5	30	<10	138	<0,03
	Fin Rinçage			0,06	<0,03

Figure II.5: Comparaison des activités LAL et IL-1 Intracellulaire en Amont de l'hémofiltre FH 88 lors des essais de désinfection Javel et Formol.



3.2.1. Perte de charge

Les pertes de charges initiales de l'hémofiltre se situent aux alentours de 90 mmHg avec cependant des variations lorsque l'on se situe sur banc d'essai *in vitro* (70 à 90 mmHg) ou sur Monitral + CDM (85 à 115 mmHg). Les écarts entre ces deux bancs d'essai peuvent s'expliquer par des différences de viscosité des solutions utilisées. En dialyse simulée on utilise en effet un bain supplémenté en urée, glucose et même bouillon nutritif pour les deux premiers essais.

Ces pertes de charge sont nettement moindres que celles des systèmes à membrane plane. Pourtant, si on tient compte de la surface, la perméabilité de la polysulfone FILTRON est double.

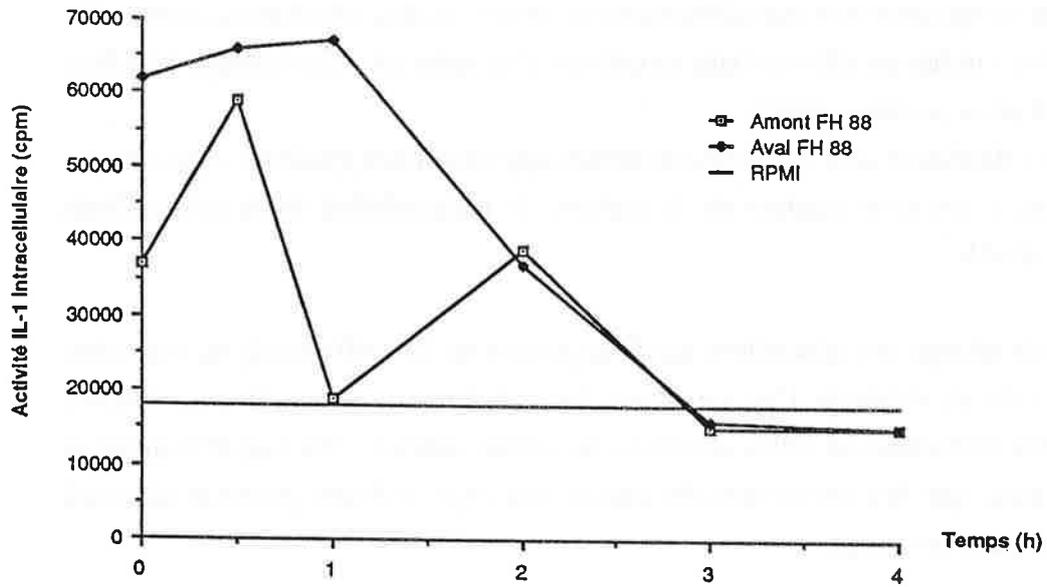
La perte de charge des hémofiltres neufs augmente de 20 à 40 mmHg au cours des validations *in vitro* de 4 heures. Ces variations, qui sont importantes vu la perméabilité initiale, sont bien moindres que celles observées en dialyse simulée : les suppléments du concentré ainsi que les différences de qualité des eaux utilisées peuvent ici aussi expliquer un tel comportement.

Ce phénomène peut aussi être expliqué par une contamination endotoxinique plus importante lors des simulations de dialyse. Cette contamination semble avoir une forte influence sur la perte de charge. Lors de la validation endotoxinique *in vitro*, la perte de charge augmente nettement dans les premières minutes, ce que l'on peut relier à une adsorption massive des LPS sur l'hémofiltre.

L'imposition d'un débit de fuite permet de limiter l'augmentation de perte de charges. Du fait de l'implantation de l'hémofiltre dans la boucle du maîtreur d'ultrafiltration, il faudrait relier la fuite au retour du bain pour pouvoir contrôler efficacement l'ultrafiltration. Il n'est donc pas évident de réaliser ce débit de fuite. D'autre part, il ne faut pas penser augmenter fortement ce débit pour ne pas déséquilibrer les cycles du Monitral.

Il est certain que les contaminations que nous avons imposées sont très importantes par rapport à des contaminations réelles. Nous pouvons donc penser que le colmatage dans des conditions normales de dialyse ne sera pas aussi important. Il serait alors possible d'insérer directement l'hémofiltre dans le circuit du dialysat sans avoir recours au module CDM. Ceci renforce l'intérêt de ce filtre puisque nous pourrions l'utiliser sans investissement supplémentaire.

Figure II.6 : Induction de synthèse d' IL-1 par les LPS de *P. cepacia*



3.2.2. Validation biologique

3221 Rétention bactérienne

La rétention bactérienne est excellente puisque des taux supérieurs à 10^6 UFC.ml⁻¹ sont retenus totalement par l'hémofiltre. De tels taux de contamination n'ont pu être atteints que dans les essais *in vitro*. En dialyse simulée, il y a mort et sans doute lyse rapide des bactéries dans le concentré que l'on peut attribuer à un choc osmotique. Cette lyse bactérienne peut aussi expliquer le plus fort colmatage observé. Ces contaminations sont plus représentatives de cas réels que les surcontaminations obtenues *in vitro*.

3222 Rétention endotoxinique

Les essais *in vitro* montrent des LRV supérieurs à 5 et même 5,7 puisque le filtre retient totalement des concentrations de 3000 et même 14000 UE.ml⁻¹ obtenues avec des LPS d'*E. coli*. En dialyse simulée, les taux d'endotoxine sont plus faibles, de 20 à 400 EU.ml⁻¹, mais sont aussi plus représentatifs des conditions normales de dialyse. La rétention se révèle totale compte tenu de la sensibilité du dosage LAL.

Ces excellentes performances, supérieures à celles des membranes planes polysulfone, doivent sans doute être imputées à la charge positive de la membrane polyamide. ROBINSON montre que, pour des membranes microporeuses, la rétention des LPS est plus importante avec une membrane polyamide qu'avec des membranes hydrophobes ou chargées négativement (ROBINSON et coll, 1985).

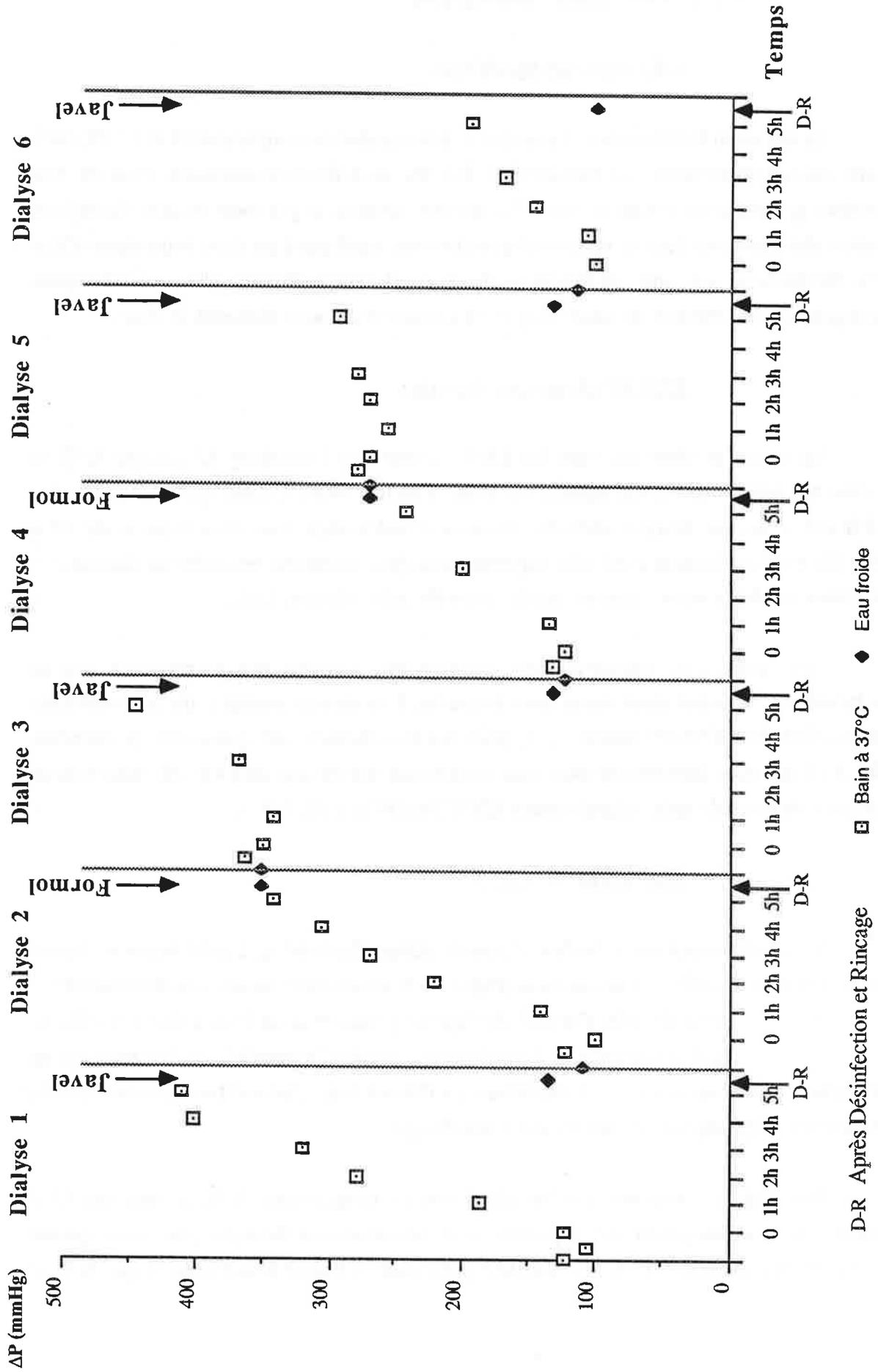
3223 Induction d'IL-1

Lors de la deuxième série de dialyses simulées, l'activité IL-1 a été testée en amont et en aval de l'hémofiltre. Les résultats (Figure II.5) appellent 2 remarques essentielles :

- il est difficile d'obtenir de façon reproductible un bain inducteur d'IL-1,
- les inducteurs d'IL-1 produits de manière "naturelle" par les bactéries ne sont pas capables de traverser la membrane de l'hémofiltre. L'hémofiltre répond ainsi à la contrainte prépondérante de notre cahier des charges.

Des dialyses simulées ont été effectuées en contaminant le bain avec des LPS purifiés de *N. meningitidis* et *P. cepacia* et les échantillons ont été testés pour leur capacité à induire la synthèse d'IL-1. Les résultats portés sur la Figure II.6 montrent que le bain

Figure II.7 : Désinfection de l'hémofiltre FH 88 au Formol et à l'eau de Javel
Evolution de la perte de charge



ultrafiltré a une activité inductrice d'IL-1 intracellulaire. Aucun échantillon amont ou aval n'est inducteur de la sécrétion d'IL-1. Nous montrons ainsi qu'un bain non réactif en LAL peut induire la synthèse d'IL-1. La réponse du test IL-1 n'étant pas quantitative, on ne peut apprécier l'effet de la filtration sur l'activité inductrice des bains : il n'est pas possible de connaître la proportion d'inducteurs retenus par 2 filtres. Etant donné la nature du contaminant, il y a peu de doute quant à l'origine de l'induction. L'inducteur est certainement le LPS entier ou un fragment de LPS.

3.2.3. Effet des désinfections

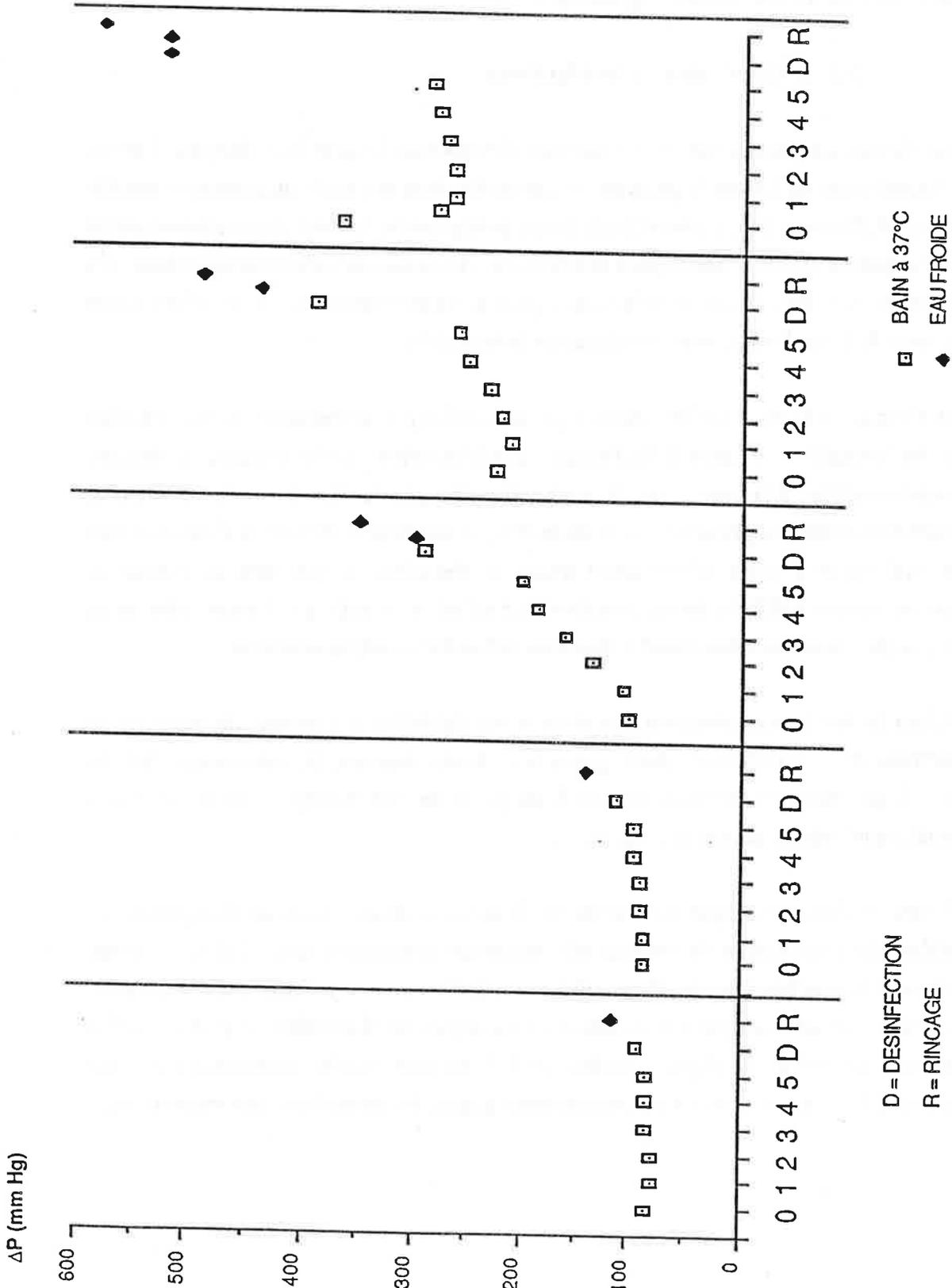
Le formol ne permet pas de décolmater l'hémofiltre (Figure II.7 dialyses 2 et 4). Après désinfection au formol la perte de charge ne diminue pas mais, au contraire, semble augmenter légèrement ce qui peut être dû à une précipitation de dérivés protéiques par le formol. Le formol est déconseillé pour la désinfection des membranes d'ultrafiltration; les ultrafiltres doivent être rincés abondamment pour éliminer toute trace de protéines avant contact avec le formol sous peine de colmatage irréversible.

A l'instar du formol, l'acide peracétique ne permet pas de restaurer la perméabilité initiale des hémofiltres (Figure II.8). Pendant la désinfection puis le rinçage, on observe une augmentation drastique de la perte de charge. Celle-ci diminue ensuite progressivement dans la première heure de la dialyse suivante. Elle atteint finalement un niveau équivalent à celle qu'elle avait avant la désinfection. On peut expliquer ce phénomène par une précipitation de protéines due à l'acide peracétique. Le précipité serait ensuite progressivement resolubilisé à chaud au début de la dialyse suivante.

L'eau de Javel, contrairement aux deux autres désinfectants permet de retrouver la perméabilité des hémofiltres quels que soient leurs niveaux de colmatage. Sur la Figure II.7, par exemple, après la dialyse 3, on passe de 430 mmHg en fin de dialyse à 110 mmHg après désinfection et rinçage.

L'eau de Javel provoque cependant un jaunissement au niveau de l'empotage de l'hémofiltre. Le changement de couleur, très nettement perceptible après 2 désinfections, s'accroît avec le nombre d'essais. Ce jaunissement traduit une oxydation du polyuréthane d'empotage et fait craindre pour le maintien de l'intégrité de l'hémofiltre à plus ou moins long terme. L'emploi de l'hypochlorite, sauf à de très faibles concentrations, est généralement à proscrire avec les polymères entrant dans la composition des membranes.

Figure II.8 : Désinfections du FH88 à l'acide peracétique.
Evolution de la perte de charge.



D'une manière générale, les désinfectants n'altèrent pas les capacités de rétention tant bactérienne qu'endotoxinique dans les conditions "normales" d'utilisation. Un des essais *in vitro* de détermination de LRV endotoxinique a d'ailleurs été effectué après 2 désinfections au formol et nous donne un LRV de 5,7.

3.2.4. Conclusion

L'ultrafiltration par l'hémofiltre FH88 d'un bain de dialyse contaminé permet d'obtenir un bain stérile, non réactif au LAL et non inducteur d'IL-1 dans des conditions normales de contamination. La mise en oeuvre de l'hémofiltre est simple et la maintenance est susceptible d'être effectuée par le personnel hospitalier habitué à la manipulation des dialyseurs et hémofiltres. Sa faible perte de charge, due à sa grande surface développée, et sa compacité rendent possible son intégration dans les systèmes déjà existants sans modification ni investissement supplémentaire.

Ces performances, qui semblent supérieures à celles des systèmes à membrane plane, sont probablement dues à la nature de sa membrane polyamide à charge positive qui permettrait une adsorption des LPS par interaction ionique. La désinfection à l'eau de Javel s'avère un bon moyen de décolmatage du filtre et rend possible la réutilisation pendant une période limitée; il subsiste néanmoins une incertitude quant à l'emploi à long terme de ce désinfectant.

L'utilisation de ce filtre ne permet cependant pas d'éliminer totalement les inducteurs de synthèse d'IL-1, mais elle est quand même envisageable pour limiter les risques cliniques.

3.3. MEMBRANES CÉRAMIQUES

3.3.1. Rétention endotoxinique

La rétention endotoxinique est bonne puisque la concentration en aval de l'ultrafiltre ne dépasse pas 2 UE.ml^{-1} (Figure II.9) pour une contamination en amont moyenne de $0,8.10^5 \text{ UE.ml}^{-1}$. On obtient ainsi un LRV de 4,6 ce qui est comparable aux meilleurs résultats des membranes organiques. Ce LRV est en fait sous-estimé puisque le compartiment aval n'est pas apyrogène au début des validations (plus de 2 UE/ml). Les valeurs observées après quelques minutes d'ultrafiltration sont certainement plus représentatives et nous donnent un LRV supérieur à 5 pour la deuxième validation.

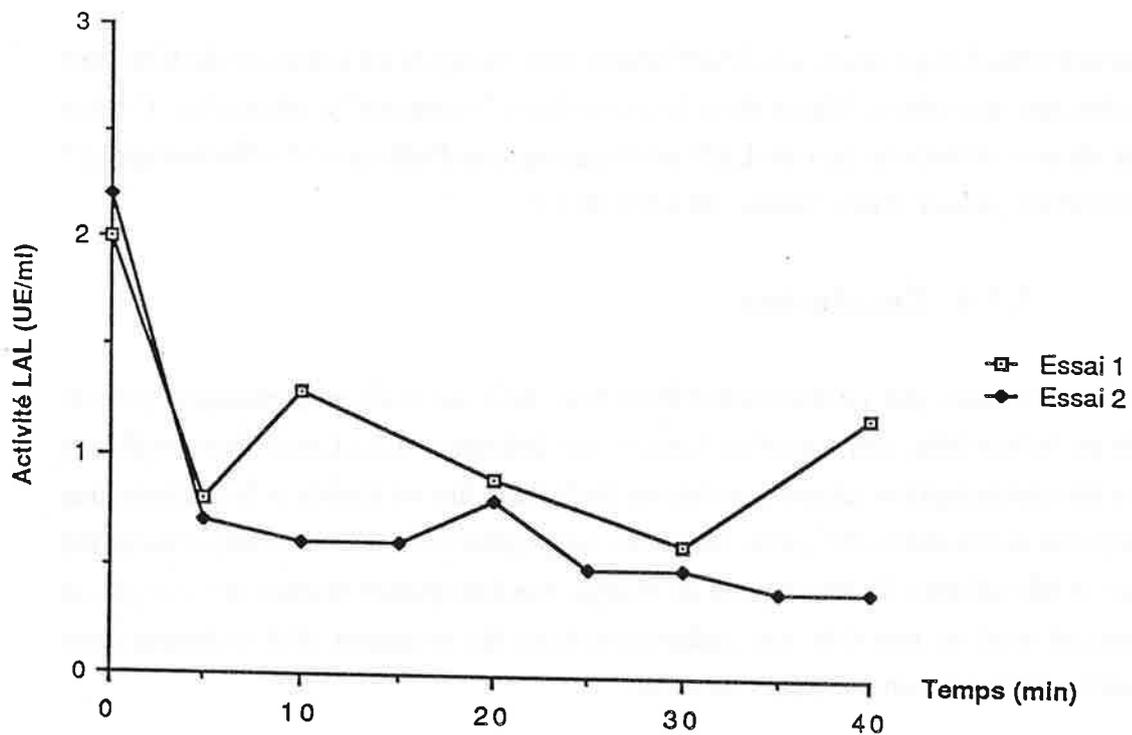


Figure II.9 : Détermination des LRV endotoxiniques des membranes céramiques
Evolution de la contamination en aval de la membrane

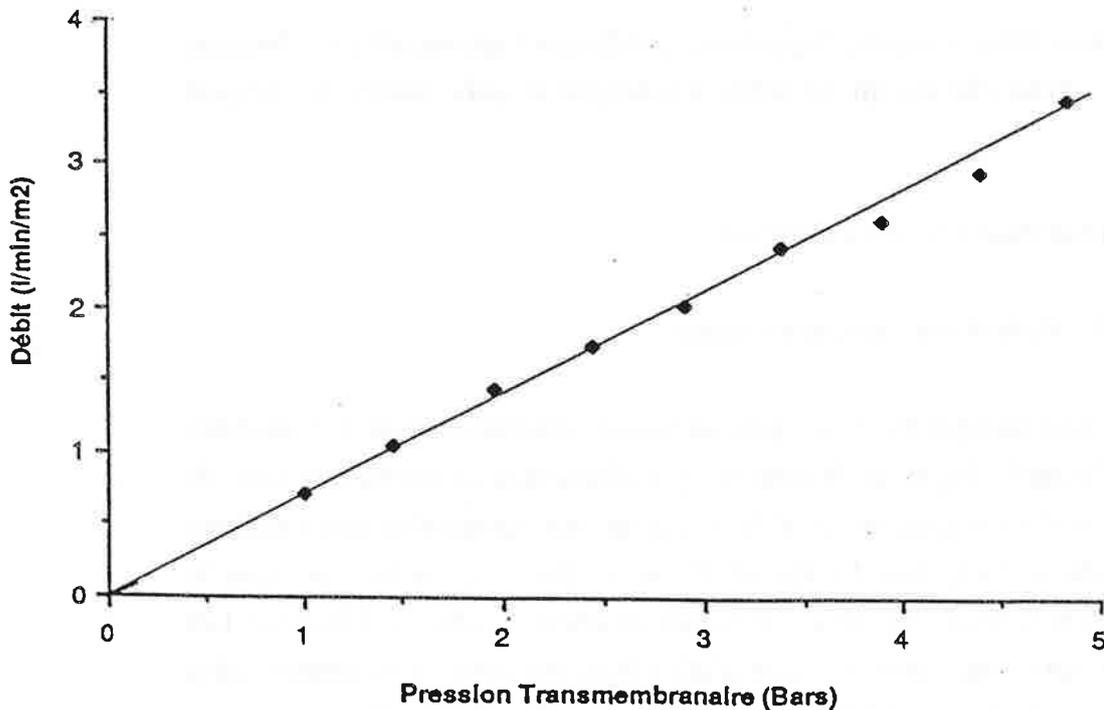


Figure II.10 : Perméabilité des membranes céramiques.
Détermination de la pente à l'eau.

3.3.2. Perméabilité

La pente à l'eau de la membrane est de 0,7 l/m²/bar à 37°C (Figure II.10). Cette performance est nettement inférieure à celle donnée par le fabricant (1,25 l/m²/bar à 40°C).

La perméabilité décroît rapidement lors des validations endotoxiques puisqu'on perd près d'1/3 de la perméabilité initiale en 40 minutes. Pour expliquer ce colmatage, il faut prendre en considération les forts niveaux de contamination imposés (1µg/ml).

Compte tenu de la perte de charge, l'objectif de débit de 1 l.min⁻¹ sous 1 bar de pression ne peut être atteint qu'avec 1,4 m² de surface membranaire ou 0,8 m² si on considère les performances données par le constructeur. Ces surfaces représentent des modules de 62 et 37 tubes soit des éléments de 1,2 m de longueur et de 10 à 20 centimètres de diamètre. De tels encombrements sont peu concevables dans l'environnement d'un générateur individuel.

3.3.3. Conclusion

L'utilisation des membranes céramiques n'est envisageable que si l'on reconsidère le cahier des charges. Pour diminuer la surface membranaire, et donc l'encombrement, il faut accepter de surdimensionner les pompes.

D'autre part, l'avantage de ces membranes est leur résistance à la chaleur. Pour en tirer le meilleur parti il faut concevoir un générateur entièrement nouveau, avec un circuit hydraulique et une instrumentation capables de supporter une stérilisation à la vapeur.

Ces objectifs sont peu réalistes pour un générateur individuel. La destination de ces membranes se situe plutôt au niveau industriel. Leur utilisation semble plus envisageable pour la production d'une eau de bonne qualité à l'échelle d'un centre de dialyse.

4. CONCLUSION GÉNÉRALE

A l'issu de ces essais sur différents systèmes de filtration, nous prouvons qu'il est possible de produire une eau stérile dont le titre LAL est réduit d'un facteur 10⁴-10⁵. Ces objectifs sont réalisés soit avec une membrane céramique de seuil de coupure 10 kDa, soit avec une membrane polysulfone de seuil de coupure 10 kDa soit avec un hémofiltre polyamide de seuil de coupure environ 30 kDa.

L'encombrement important des membranes céramiques nous amène à rejeter *a priori* cette solution. Les performances de l'hémofiltre FH88 se révèlent supérieures à celles des membranes planes en polysulfone. C'est l'hémofiltre qui convient le mieux à notre cahier des charges, d'autant plus que sa mise en oeuvre est nettement plus simple que celle des membranes planes.

Il subsiste 2 points négatifs :

- le dialysat produit reste inducteur de la synthèse d'IL-1 en cas de fortes contaminations initiales obtenues *in vitro* avec des LPS extraits, mais dans des conditions "normales" de contamination le bain produit n'est pas inducteur.

- la compatibilité de l'hémofiltre avec les procédures de désinfection est douteuse à long terme.

Pour limiter les risques cliniques et compte tenu de l'expérience acquise sur la désinfection nous pouvons cependant proposer l'utilisation de l'hémofiltre FH88 pour une durée hebdomadaire avec une désinfection journalière.

Avant tout emploi clinique de l'hémofiltre, il serait nécessaire de développer les contrôles de fiabilité du système. La perte de charge est d'ores et déjà mesurée par le CDM et une alarme se déclenche en cas de dépassement de la valeur de consigne. Le contrôle de l'intégrité de la membrane est plus délicat à réaliser. Il n'existe pas de capteurs permettant de mesurer de faibles quantités de bactéries. Il faut donc envisager des méthodes indirectes comme la recirculation d'un colorant de haute masse moléculaire en amont de la membrane : en cas de rupture de celle-ci le colorant serait détecté en aval.

**APPROCHE DE LA MASSE MOLÉCULAIRE
DES INDUCTEURS D'IL-1 PRÉSENTS DANS
LES BAINS DE DIALYSE**

1. INTRODUCTION

Les essais d'ultrafiltration nous ont montré qu'il est impossible d'obtenir un dialysat non-réactif au LAL avec des membranes de seuil de coupure de 10 kDa dans des conditions extrêmes de contamination.

L'étude bibliographique (I.3.1.) nous indique par ailleurs que les LPS de forme R dont la masse est de l'ordre de 5 kDa, sont susceptibles de traverser de telles membranes

Cependant, la présence de ces LPS sous forme isolée est douteuse dans les bains qui contiennent des cations divalents, favorisant l'agrégation des LPS en micelles ou vésicules de haute masse moléculaire. Nous avons, d'autre part, peu de données sur les LPS de *Pseudomonas* et nous n'avons fait qu'une estimation théorique de leur masse. Il serait également intéressant de connaître les proportions des différentes formes de LPS.

Pour apprécier la taille des LPS et éventuellement d'autres dérivés réactifs dans le test LAL et inducteurs d'IL-1 nous avons eu recours à 2 méthodes :

- l'électrophorèse des LPS de *Pseudomonas* en présence d'agents dissociants qui nous renseigne sur leur masse moléculaire et sur l'importance relative des différentes formes.

- l'ultrafiltration sur des membranes de seuil de coupure décroissant de LPS purifiés et de surnageants de culture qui nous permet d'évaluer plus précisément la capacité des LPS à traverser ces membranes quand ils sont naturellement agglomérés et associés ou non à d'autres dérivés bactériens.

Ces expériences doivent nous permettre d'établir une relation entre la taille des LPS et leurs activités biologiques.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. ELECTROPHORÈSE DES LPS

2.1.1. Conditions d'électrophorèse

Les LPS sont analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'un détergent, le désoxycholate de sodium (DOC), et d'urée, selon la technique décrite par BASU [BASU et coll, 1986] et adaptée dans notre laboratoire. L'emploi d'un gel de concentration n'améliore pas la résolution et nous n'en avons donc pas utilisé.

L'électrophorèse est réalisée dans un gel de séparation de dimension : $L = 10 \text{ cm} \times l = 8 \text{ cm} \times e = 0,075 \text{ cm}$ et de composition suivante :

- Acryl-Bisacrylamide (42 : 0,8 %) 10 ml
- Urée 10M 12 ml
- Tris-HCl 1,5 M pH = 8,4, DOC 0,25 % 7,5 ml
- Persulfate d'ammonium 10 % 200 μ l
- Temed 20 μ l

Tampon d'électrophorèse utilisé pour la migration:

- Tris-HCl pH = 6,8 25 mM
- Glycine 200 mM
- SDS 0,1 %
- H₂O distillée qsp 1 l

La migration est effectuée à courant constant (25 mA / gel) durant 2 heures environ jusqu'à ce que l'indicateur coloré ait atteint le bas du gel.

2.1.2. Préparation des échantillons

2.1.2.1. LPS extraits

Les LPS extraits lyophilisés sont dilués dans le tampon d'échantillon (ou dénaturant) de composition suivante

- Tris - HCl pH = 6,8 100 mM
- SDS 2 %
- Saccharose 20 %
- Bleu de Bromophénol 0,1 %

Les solutions de LPS sont diluées dans ce même tampon concentré deux fois.

2.1.2.2. Lysats de bactéries entières

Cette méthode de préparation décrite par HITCHCOCK permet la caractérisation rapide des LPS par électrophorèse sans extraction ni purification préalables [HITCHCOCK et coll, 1983].

A partir de colonies prélevées sur boîte de Pétri, on réalise une suspension bactérienne dont la densité optique à 540 nm est ajustée à environ $DO=1$. Un volume de

1,5 ml de cette suspension est centrifugé. Après centrifugation, les culots sont repris par 50 μ l de tampon de lyse de composition suivante:

- Tris - HCl pH = 6,8	1 M
- 2-Mercaptoéthanol	4 %
- SDS	2 %
- Saccharose	20 %
- Bleu de Bromophénol	0,1 %

Le mélange est porté à 100°C pendant 10 minutes puis on ajoute 25 μ g de protéinase K (10 μ l à 2,5 mg.ml⁻¹). On fait agir la protéinase K pendant 1 h à 60°C. Les échantillons sont alors déposés sur le gel.

2.1.3. Coloration au nitrate d'argent [TSAI ET COLL., 1982]

Après migration les gels sont fixés et colorés selon la technique décrite par TSAI et FRASCH. Les gels sont déposés dans des boîtes de coloration nettoyées au préalable à l'acide nitrique pur et rincées à l'eau distillée. Toutes les étapes de la coloration se font sous agitation.

2.1.3.1. Fixation

- Ethanol	400 ml
- Acide acétique	50 ml
- H ₂ O qsp.....	1 l

Les gels sont fixés pendant une nuit sous agitation.

2.1.3.2. Oxydation

- Acide periodique	3,5 g
- H ₂ O qsp.....	1 l

Le fixateur est remplacé par le mélange oxydant, préparé extemporanément, et les gels sont maintenus 5 minutes précisément sous agitation. L'oxydation est suivie de cinq rinçages de 15 minutes en eau distillée .

2.1.3.3. Coloration par le nitrate d'argent

- Ammoniaque concentrée 2 ml
- NaOH 0,1N..... 28 ml
- AgNO₃ à 20 % dans H₂O 5 ml
- H₂O distillée 115 ml

Ce réactif est lui aussi préparé extemporanément; les gels y sont maintenus durant précisément 10 minutes sous agitation constante.

Cette étape est suivie de cinq rinçages de 15 minutes en eau distillée.

2.1.3.4. Révélation

- Acide citrique 50 mg
- Formaldéhyde 37 % 0,5 ml
- H₂O distillée qsp 1 l

Durée : 2 minutes précisément puis le révélateur est remplacé par de l'eau distillée et on laisse la révélation se développer pendant 1 heure.

2.2. FILTRATION EN CASCADE

2.2.1. Préparation de surnageant de culture

Il est difficile de reproduire les contaminations réelles des bains de dialyse. Il est pratiquement impossible d'obtenir une croissance de bactéries, même à partir d'une souche isolée de bain, dans un bain propre et, *a fortiori*, un concentré. En revanche, il est facile d'obtenir une croissance dans des bains usés collectés à la vidange d'un générateur. C'est cette démarche que nous avons adoptée.

Du dialysat usé, et donc contenant des dérivés azotés et des nutriments, a été prélevé au centre de dialyse de Bourg en Bresse. Ce bain a été immédiatement stérilisé par filtration, réparti en aliquotes et congelé.

Des aliquotes ont été ensemencées avec respectivement des souches de *Pseudomonas aeruginosa*, *P. cepacia*, *P. maltophilia*, *P. testosteroni* isolées de bains ou de concentrés. Après développement, les bains sont de nouveau microfiltrés puis congelés.

2.2.2. Matériel

Les filtrations ont été effectuées avec le système NOVACELL® (Filtron) de 10 ml de volume utile. Ce module d'ultrafiltration est constitué d'une tête de cellule supportant un barreau aimanté et d'une cuve à usage unique, stérile et apyrogène, qui conditionne la membrane.

La membrane, en polysulfone, est disponible avec des seuils de coupure de 10, 8, 5, 3, et 1 kDa.

La tête de cellule est théoriquement autoclavable, mais ce mode de stérilisation entraîne sa détérioration. Pour éviter cet inconvénient et effectuer les cascades en un minimum de temps, la tête de cellule est stérilisée à l'alcool entre chaque cascade, puis abondamment rincée à l'eau ppi (Aguettant).

Avant chaque filtration, la cellule et la membrane sont rincées en ultrafiltrant 20 ml de sérum physiologique injectable (Aguettant) pour éliminer la glycérine de la membrane. Les ultrafiltrats récoltés à la fin de ce rinçage ne sont inducteurs d'activité ni dans le test LAL ni dans le test IL-1.

Les filtrations sont effectuées sous 2 bars de pression, excepté pour les membranes 1 kDa pour lesquelles la pression est augmentée à 3 bars pour accélérer la filtration.

2.2.3. Protocole de filtration des LPS purifiés de *Pseudomonas*

Les LPS ont été extraits par la méthode du Phénol à chaud décrite par WESTPHAL [WESTPHAL et coll, 1952].

5 ml d'une suspension de LPS à 1 mg.ml⁻¹ dans de l'eau ppi sont homogénéisés par agitation vigoureuse et sonication à l'aide d'une microsonde reliée à un générateur BRANSON (500 watts) réglé à la puissance 4, durant 20 secondes, en mode pulsé afin de favoriser la dispersion des LPS. Après ultrafiltration à sec, sur membrane 10 kDa, le rétentat est repris par 2 ml d'eau ppi et l'ultrafiltration est poursuivie jusqu'à ce que le volume du rétentat soit de 1 ml. Le volume de l'éluat est alors de 6 ml. Après homogénéisation 1 ml est prélevé pour effectuer les différents dosages. Le volume de

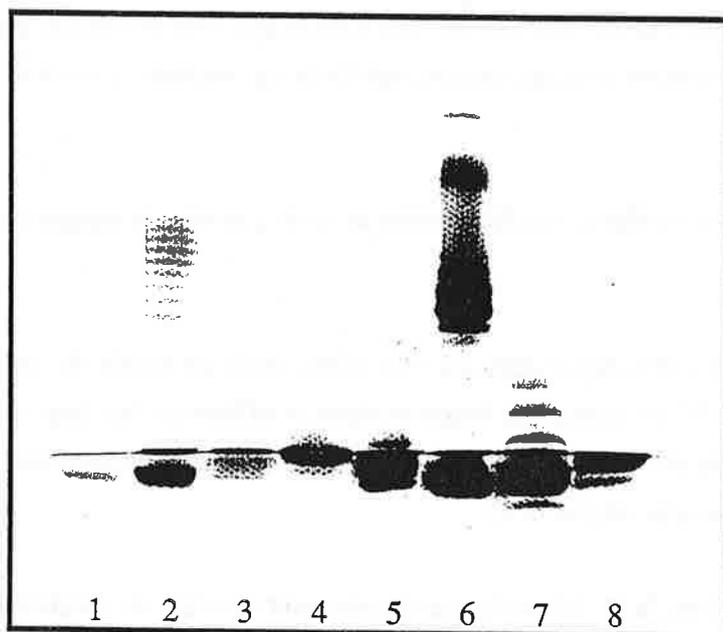


Figure III.1 : Electrophorèse des LPS

- Piste 1 : *Yersinia pestis* EV 40
- Piste 2 : *Escherichia coli* O111:B4
- Piste 3 : *Pseudomonas aeruginosa*
- Piste 4 : *Pseudomonas fluorescens*
- Piste 5 : *Pseudomonas cepacia* CIP 8024
- Piste 6 : *Pseudomonas cepacia* 871101
- Piste 7 : *Pseudomonas testosteroni* 871204
- Piste 8 : *Neisseria meningitidis*

l'échantillon est donc de 5 ml et on poursuit ainsi la cascade d'ultrafiltration jusqu'à la membrane 1 kDa.

Les différents échantillons sont testés pour leurs activités biologiques vis-à-vis du test LAL et du test IL-1. Nous prélevons également 200 µl qui sont lyophilisés en vue d'effectuer une électrophorèse (DOC-PAGE).

2.2.4. Protocole de filtration des bains contaminés

40 ml de bain contaminé sont ultrafiltrés sur membrane 10 kDa. La cellule est rincée en ultrafiltrant 10 ml de NaCl 9‰ ppi. On arrête ce rinçage lorsque le volume de rétentat est d'environ 3 ml. On obtient donc 47 ml de filtrat dont 40 ml sont ultrafiltrés sur membrane 8 kDa. La cascade est ainsi poursuivie jusqu'à la membrane 1 kDa.

Les échantillons sont dosés par les tests LAL et IL-1. La teneur en protéines des échantillons est par ailleurs dosée par la méthode BCA (PIERCE).

Des témoins sont effectués en ultrafiltrant, dans les mêmes conditions, le bain utilisé ayant servi à la croissance bactérienne et une solution de LPS purifiés de *Neisseria meningitidis* à 500 ng.ml⁻¹.

3. RÉSULTATS

3.1. ELECTROPHORÈSE

En électrophorèse en présence de désoxycholate de sodium, les LPS ne migrent pratiquement qu'en fonction de leur masse moléculaire. Les formes R de petite masse moléculaire migrent très rapidement, presque aussi vite que le front de migration matérialisé par le bleu de bromophénol. Les formes S de masse et de taille plus élevées sont retardées dans la matrice du gel et migrent moins loin.

Pour les souches possédant les différentes formes de LPS, on observe des profils électrophorétiques en échelle. Le "barreau" inférieur de l'échelle correspond à la forme R et chaque "barreau" supérieur à une forme S qui comporte à chaque fois une sous-unité répétitive supplémentaire.

Les profils électrophorétiques obtenus, soit à partir de LPS extraits, soit à partir de suspensions bactériennes sont identiques. Les bandes sont néanmoins plus nettes avec

Tableau III.I : Filtrations en cascade - Teneurs en protéines des différentes fractions.

	Bain usé (Témoïn)	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. cepacia</i>	<i>P. maltophilia</i>	<i>P. testosteroni</i>
DEPART	870	75	79	66	284
RETENTAT 10 kD	4,3	5,7	3,85	1,4	15,6
PERMEAT 10 kD	840	70	74,4	68	302
RETENTAT 8 kD	3,6	1,1	0,7	3,9	3,6
PERMEAT 8 kD	833	67	74	59,5	280
RETENTAT 5 kD	9,1	1,3	1,6	1,5	10,1
PERMEAT 5 kD	806	68	70,8	59	259
RETENTAT 3 kD	6,2	2,5	1,9	0,65	8
PERMEAT 3 kD	567	65,5	69,2	60	257
RETENTAT 1 kD	17,8	15,5	ND	ND	X
PERMEAT 1 kD	930 ?	60	ND	ND	X

* VALEURS CORRIGÉES PAR LE FACTEUR DE CONCENTRATION (µg/ml)

ND: DOSAGE NON EFFECTUE

X: FILTRATION NON EFFECTUEE

des LPS extraits. La Figure III.1 représente une électrophorèse de LPS purifiés de *Pseudomonas*, ainsi que de souches de *N.meningitidis*, *E. coli* et *Yersinia pestis*.

Sur cette figure, on voit que les LPS de *Pseudomonas* sont de petite taille : excepté pour *P. cepacia* 871101, on n'observe pas de bande de grande masse moléculaire comme pour les LPS d'*E. coli*. Les LPS de *Pseudomonas* ne comprendraient au maximum que 5 à 6 sous-unités répétitives. Le profil électrophorétique de *P. cepacia* 871101 est très particulier et unique parmi les souches que nous avons pu tester. Il a déjà été observé chez des *Aeromonas* et serait lié à la présence de protéines cristallines à la surface de la paroi bactérienne [DOOLEY et coll, 1985].

Le point le plus remarquable de ces électrophorèses est que la forme R, pour chaque souche de *Pseudomonas*, apparaît majoritaire. La bande correspondante très intense, prédominante se situe au même niveau que les bandes inférieures des LPS de *N.meningitidis* et *Yersinia pestis*. Pour *Yersinia pestis*, la forme R a une masse estimée d'environ 3000 Da [BRUNETEAU, communication personnelle]. La masse du LPS de *N.meningitidis* a été estimée à 4300 Da [TSAI et coll, 1982].

Nous établissons ainsi l'existence majoritaire de LPS de petite masse moléculaire chez les *Pseudomonas*.

3.2. RÉSULTATS DES FILTRATIONS EN CASCADE DE BAINS SURCONTAMINÉS

Les teneurs en protéines et les résultats des dosages d'activité LAL et IL-1 sont donnés sur les Tableaux III.I, III.II et III.III respectivement. Les résultats LAL et protéines ont été corrigés en tenant compte de la concentration des rétentats et de la dilution des perméats par rapport au bain initial.

Certains résultats aberrants, voire contradictoires sont liés à la contamination des rétentats par la tête de cellule non stérilisée entre chaque expérience. Il est en fait impossible avec de tels systèmes d'éviter les pollutions des compartiments Amont des membranes par les rétentats précédents. Les filtrats ne subissent cependant aucune contamination croisée et les résultats obtenus en aval des membranes sont donc interprétables.

Ces essais sont également biaisés par la méthodologie employée. Le bain utilisé pour la croissance bactérienne est, dès le départ, inducteur dans les deux tests. Il faut mettre en cause une contamination antérieure à la récolte et à la filtration stérilisante. L'activité LAL n'est cependant pas très importante comparativement aux bains surcontaminés et les résultats restent donc interprétables.

Tableau III.II : Filtrations en cascade - Teneurs en endotoxines des différentes fractions*.

	LPS N. meningitidis	Bain usé (Témoins)	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. cepacia</i>	<i>P. maltophilia</i>	<i>P. testosteronei</i>
DEPART	6700	136	2240	1375	9100	6215
RETENTAT 10 kD	4060	62	5700	1680	8780	4480
PERMEAT 10 kD	41	1,2	150	16	10,3	182
RETENTAT 8 kD	8,85	1,5	31	3	0,4	134
PERMEAT 8 kD	0,07	-	-	-	0,5	-
RETENTAT 5 kD	0,09	0,4	0,2	0,02	0,03	-
PERMEAT 5 kD	-	-	-	-	-	-
RETENTAT 3 kD	0,11	0,4	0,2	0,01	0,01	-
PERMEAT 3 kD	-	-	-	-	-	-
RETENTAT 1 kD	x	0,75	0,15	ND	ND	X
PERMEAT 1 kD	x	-	-	ND	ND	X

* VALEURS CORRIGÉES PAR LE FACTEUR DE CONCENTRATION (µg/ml)

- : non réactif au LAL

ND : DOSAGE NON EFFECTUE

X : FILTRATION NON EFFECTUEE

3.2.1. Protéines

Le LPS purifié de *N. meningitidis* ne contient pas de protéines et n'est pas mentionné sur le Tableau III.I. La majorité des protéines présentes dans les bains avant filtration est retrouvée dans les perméats 1 kDa. Les "protéines" détectées seraient plutôt des petits peptides issus de la dégradation de protéines provenant du patient. Il faut noter la teneur nettement plus élevée dans le bain initial que dans les bains surcontaminés, ce qui traduit une assimilation des dérivés azotés lors de la croissance bactérienne.

3.2.2. Activité LAL

Pour l'ensemble des cascades, l'activité LAL (Tableau III.II) est pratiquement nulle après la filtration sur membrane 10 kDa. Ce résultat est cohérent avec ceux reportés par la littérature et ceux présentés précédemment dans ce travail. Le LRV de la membrane est cependant nettement inférieur à ceux déjà obtenus. Il n'est que de 1,17 pour la filtration de *P. aeruginosa* contre 3,4 et plus pour des suspensions de la même espèce. La filtration sur membrane 8 kDa est suffisante pour arrêter toute activité avec *P. aeruginosa*, *P. cepacia*, *P. testosteroni*.

En revanche, il est nécessaire d'utiliser une membrane de 5 kDa pour éliminer tout activateur de LAL pour *P. maltophilia* et les LPS de *N. meningitidis*.

Les différences entre les *Pseudomonas* dans les filtrations en cascade peuvent s'expliquer par un degré d'agglutination variable des LPS, des protéines associées, puisque nous avons des LPS bruts, ou une adsorption.

3.2.3. Interleukine-1

Les résultats d'induction d'IL-1 sont plus surprenants (Tableau III.III) : on retrouve une activité dans les perméats 5 kDa pour *P. aeruginosa* et les LPS de *N. meningitidis*. Pour *P. cepacia* et *P. maltophilia*, l'activation d'IL-1 disparaît après filtration sur la membrane de 8 kDa tandis que les filtrats de membrane 3 kDa sont encore inducteurs pour *P. testosteroni*. Les fractions après filtration sur membrane 10 kDa n'induisent pas la sécrétion de l'IL-1 mais uniquement son accumulation intracellulaire.

Ces résultats permettent également de faire des suppositions quant au mécanisme de réjection des inducteurs : on constate un effet à plusieurs reprises une "disparition" de

Tableau III.III : Filtrations en cascade - Activités inductrices d'IL-1 intracellulaire des différentes fractions.

	LPS N. meningitidis	Bain usé (Témoin)	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. cepacia</i>	<i>P. maltophilia</i>	<i>P. testosteronei</i>
DEPART	+++	+++	+++	+++	+++	+++
RETENTAT 10 KD	+++	+++	+++	+++	+	+++
PERMEAT 10 KD	++	++	+++	++	+++	+
RETENTAT 8 KD	+++	+++	++	-	±	-
PERMEAT 8 KD	++	±	++	±	±	+++
RETENTAT 5 KD	+	++	+	-	-	+
PERMEAT 5 KD	+	-	++	-	+	++
RETENTAT 3 KD	-	++	-	-	-	++
PERMEAT 3 KD	-	-	-	-	±	±
RETENTAT 1 KD	X	+	-	-	-	X
PERMEAT 1 KD	X	-	-	-	-	X

X: FILTRATION NON EFFECTUEE

l'effet inducteur. Le filtrat 10 kDa de la cascade *P. cepacia* est inducteur alors que ni le rétentat ni le filtrat 8 kDa ne le sont. C'est aussi vrai pour *P. aeruginosa* (3 kDa), et les LPS de *N. meningitidis* (3 kDa). Il y aurait donc adsorption des inducteurs sur la membrane.

Certains filtrats sont plus inducteurs que les rétentats correspondants : ceci peut s'expliquer par la rétention d'inhibiteurs par le filtre.

Nous trouvons une grande hétérogénéité de comportement : pour *P. cepacia*, ainsi que pour le témoin bain, les activités dans les deux tests sont bien corrélées tandis que pour les autres souches il y a découplage des activités.

Plusieurs hypothèses peuvent être faites pour l'expliquer :

La première explication serait la plus grande sensibilité du test IL-1 aux LPS. Cependant les LPS de *Pseudomonas* semblent des inducteurs assez faibles [POOLE et coll, 1988] et les niveaux de sensibilité des deux tests apparaissent équivalents. Cette hypothèse est valable pour le LPS *N. meningitidis*.

Une deuxième explication tiendrait au mécanisme même des réactions; les sites réactionnels dans les deux tests sont cependant mal connus. En fait, nous savons que le lipide A est nécessaire dans les deux cas mais on connaît mal l'influence de la partie polysaccharidique et de l'état d'agrégation des LPS.

Nos résultats tendent à montrer que seuls les LPS de masse supérieure à 8 - 10 kDa ou des LPS agglomérés sont réactifs au LAL tandis que les formes isolées sont détectables par le test IL-1. Il est pourtant difficile de dire que les LPS de petite taille sont peu réactifs au LAL. SIMARD a montré, pour des LPS de *P. testosteroni* et *P. cepacia* que les extractions au P.C.P [GALANOS et coll, 1969] qui sont sensées extraire préférentiellement les formes R sont plus réactives que les extractions au phénol à chaud [WESTPHAL et coll, 1952] plus spécifiques des formes S [SIMARD, 1989].

Une autre hypothèse serait d'impliquer dans l'activité IL-1 des protéines d'origine bactérienne non détectables au LAL mais ceci n'explique pas le découplage d'activité obtenu pour le LPS *N. meningitidis*. Il faut donc écarter cette supposition.

Quoiqu'il en soit, ces essais montrent que des dérivés inducteurs d'IL-1 sont capables de traverser une membrane de seuil de coupure 5 kDa. Si, avec les bains usés, nous ne sommes pas entièrement certains que ces inducteurs soient des LPS, la filtration

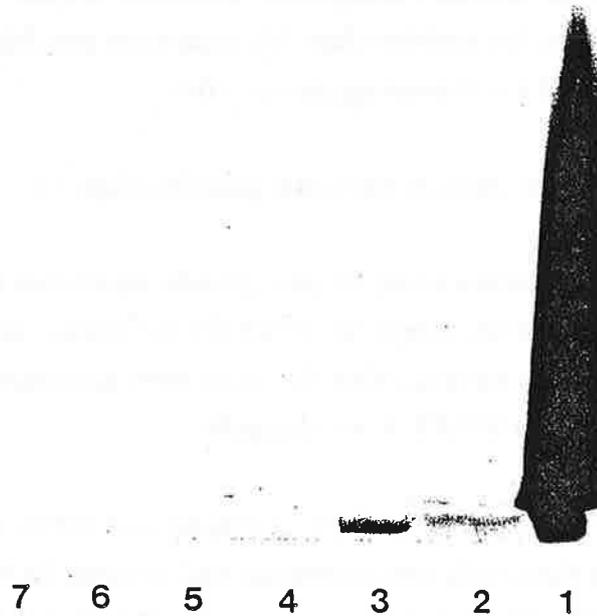


Figure III.2 : Analyse par électrophorèse (DOC-PAGE) des fractions éluées après ultrafiltration en cascade des LPS de *P. testosteroni* 871204

<u>Piste 1 :</u>	Rétentat 10 Kda
<u>Piste 2 :</u>	Eluat 10 Kda
<u>Piste 3 :</u>	Rétentat 8 Kda
<u>Piste 4 :</u>	Eluat 8 Kda
<u>Piste 5 :</u>	Eluat 5 Kda
<u>Piste 6 :</u>	Eluat 3 Kda
<u>Piste 7 :</u>	Eluat 1 Kda

des LPS de *N. meningitidis* prouve que ce sont bien des LPS de petite taille qui peuvent traverser ces membranes

3.3. FILTRATION EN CASCADE DE LPS PURIFIÉS

Pour les filtrations en cascade des LPS purifiés de *P. testosteroni* 871204 et *P. cepacia* 871101 les quantités initiales sont beaucoup plus importantes (5 mg) pour permettre une analyse par électrophorèse des différentes fractions. Les résultats présentés sur le Tableau III.IV montrent qu'une rétention presque totale est assurée après les deux premières filtrations.

On observe cependant une nette différence de comportement entre les deux LPS. Le filtrat 10 kDa de *P. cepacia* est nettement moins inducteur : 156 UE.ml^{-1} contre $1,08.10^4$ pour *P. testosteroni*. Il est vrai que le LPS de *P. testosteroni* est plus réactif en LAL et la charge initiale correspond à 10^8 UE contre 5.10^6 . Si on calcule les LRV, on constate que la différence est moins nette : il est de 4,5 pour *P. cepacia* et 4 pour *P. testosteroni*. Cette différence peut s'expliquer par la grande taille de certains LPS de *P. cepacia* 871101 tandis que pour *P. testosteroni* 871204 les LPS restent de petite taille. Les LRV sont meilleurs que pour les bains, ce qui semble normal ; les LPS sont ici très concentrés et l'agrégation est sans doute forte malgré la sonication effectuée avant filtration. Il y a aussi une forte adsorption sur les membranes. En effet, les valeurs LAL des rétentats 10 kDa sont inférieures aux taux de contaminations initiales alors qu'il y a eu concentration d'un facteur 5.

Les profils électrophorétiques confirment les dosages LAL. L'analyse des différentes fractions obtenues pour *P. testosteroni* est représentée Figure III.2. Dans l'éluat 10 kDa on ne retrouve que la bande correspondant à la plus petite masse moléculaire. Cette bande disparaît dans le filtrat 8 kDa, ce qui va de pair avec une très faible activité LAL. Pour *P. cepacia*, seul le rétentat 10 kDa est observable après coloration.

L'électrophorèse est beaucoup moins sensible que les dosages biologiques que nous employons, mais elle nous apporte des renseignements précieux sur les masses moléculaires des LPS. Les études faites dans notre laboratoire montrent que la sensibilité de la coloration pour les LPS de *Pseudomonas* est de l'ordre de 50 ng. Une telle quantité, compte tenu du volume d'échantillon déposable sur les gels de polyacrylamide, correspond à une concentration de $2,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Nous n'avons pu visualiser le filtrat 10 kDa qu'après lyophilisation. Pour visualiser les LPS qui traversent la membrane

Membrane	LPS <i>P. cepacia</i> 871101		LPS <i>P. testosteroni</i> 871204	
	Rétentats	Perméats	Rétentats	Perméats
10 Kda	$2,8 \cdot 10^6$	156	$8,54 \cdot 10^6$	$1,08 \cdot 10^4$
8 Kda	10^3	<1	10^4	1,1
5 Kda	10^2	2,4	13	1,6
3 Kda	10^2	<1	13	0,1
1 Kda	>1	<0,03	>1	<0,03

Les résultats sont exprimés en UE.ml⁻¹

Tableau III.IV: Activité LAL des fractions obtenues après filtration en cascade des LPS de *P. cepacia* 871101 et de *P. testosteroni* 871204.

8 kDa, il faudrait lyophiliser des quantités importantes d'éluat ou ultrafiltrer des solutions extrêmement concentrées.

On peut ainsi se demander pourquoi les LPS de petite taille dont la masse estimée est inférieure à 5 kDa ne traversent que difficilement les membranes 8 kDa. Sans oublier les phénomènes d'adsorption, il faut se rappeler que les seuils de coupure sont estimés d'après des calibrations par des standards protéiques et que la conformation des LPS est sans doute différente. On ne peut transposer les calibrations protéiques des membranes aux LPS.

4. CONCLUSION

L'électrophorèse des LPS de *Pseudomonas* a confirmé l'estimation théorique que nous avons faite pour leurs masses. Elle nous a permis également de démontrer que les LPS de forme R sont les plus importants en quantité.

Les filtrations en cascade nous prouvent que des inducteurs de synthèse d'IL-1 de nature lipopolysaccharidique sont capables de traverser, de manière limitée, des membranes possédant un seuil de coupure de 8 et même 5 kDa.

La perméabilité de telles membranes étant nettement plus faible que celle des membranes 10 kDa, leur utilisation pour la préparation des dialysats entraînerait de nouvelles contraintes pour le système de pompage ce qui n'est pas économiquement concevable

Une simple ultrafiltration n'apparaît pas toujours suffisante pour obtenir des bains stériles, apyrogènes et non-inducteurs d'IL-1. Nous sommes ainsi amenés à reconsidérer notre choix initial de purification des bains de dialyse.

Pour limiter les risques de réactions anaphylactoïdes, il est également envisageable d'éviter le transfert des LPS à travers la membrane de dialyse. Dans le chapitre suivant nous étudions des modifications de la membrane de dialyse dans le but d'empêcher tout passage de LPS du dialysat vers le sang.

**RÉTENTION DES LPS PAR DES
MEMBRANES DE DIALYSE MODIFIÉES**

1. INTRODUCTION

1.1. PASSAGE TRANSMEMBRANAIRE DE LPS

Dans les rappels bibliographiques, nous avons avancé l'hypothèse d'un transfert transmembranaire de LPS pour expliquer les réactions anaphylactoïdes au branchement. Cette hypothèse était surtout fondée sur les corrélations entre ces réactions et la contamination bactérienne du dialysat.

Certains éléments apportés dans les chapitres précédents viennent étayer notre supposition initiale:

- des membranes de seuils de coupure inférieurs à ceux des membranes de dialyse ne rejettent pas totalement les LPS,
- une activité inductrice d'IL-1 est retrouvée en aval d'une membrane d'hémofiltration de caractéristiques proches des membranes de dialyse,
- il faut ultrafiltrer des bains contaminés sur des membranes dont les seuils de coupure vont de 8 à 3 kDa pour voir disparaître toute activité biologique.

Dès 1973, RAIJ met en évidence, grâce au test LAL, un transfert *in vitro* de LPS purifiés d'*Escherichia coli*. Il détecte aussi la présence d'endotoxines dans le sang de patients ayant subi des réactions fébriles au début des séances de dialyse. Cependant la technologie des membranes à l'époque peut expliquer ces observations : le passage se ferait par des défauts de la membrane.

Une étude ultérieure [BERNICK et coll, 1979] ne montre en revanche aucune réactivité LAL dans le compartiment sanguin au cours de 26 simulations de dialyse. Ces expériences sont menées avec des surnageants de culture de bactéries dans du dialysat usé, les bactéries étant isolées des circuits d'eau pour hémodialyse. L'imposition d'un flux convectif du dialysat vers le sang ne favorise pas le passage de LPS à travers la membrane en Cuprophan.

Des données sur la membrane Polysulfone sont apportées par KLINKMANN [KLINKMANN et coll, 1985] et BOMMER [BOMMER et coll, 1987b]. KLINKMANN rapporte un passage transmembranaire de LPS purifiés d'*E. coli* correspondant à 1 à 2 ‰ de la contamination initiale quand la membrane est testée en ultrafiltration tangentielle. Le même essai avec une membrane en cellulose régénérée possédant une perméabilité hydraulique nettement inférieure ne montre au contraire aucun passage. Cependant, dans des conditions proches de l'hémodialyse, avec un débit d'ultrafiltration plus faible, aucun transfert de LPS n'est détectable par le test LAL.

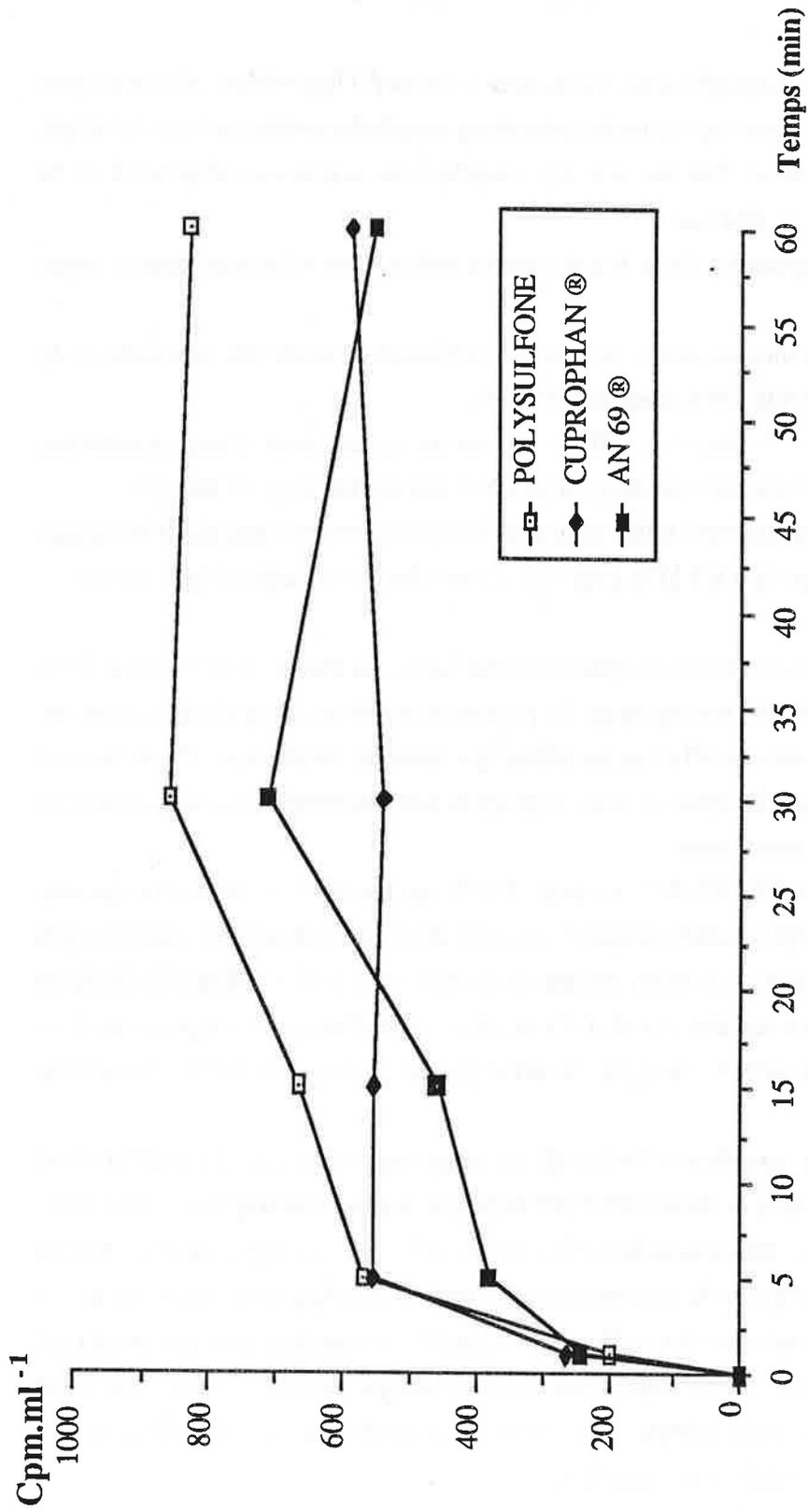


Figure IV.1.: Tests de perméabilité des membranes de dialyse aux ^3H -LPS de *P. testosteroni* 871204

BOMMER confirme cette dernière observation. Dans des conditions d'ultrafiltration nette nulle, qui favorisent les transferts convectifs par rétrofiltration, il n'y a aucun passage de LPS purifiés ni même de Lipide A de taille nettement inférieure.

A l'aide de ces quelques exemples, on constate que le test LAL est insuffisant pour démontrer une quelconque perméabilité des membranes aux LPS. BINGEL a donc mesuré l'IL-1 produite lors d'une dialyse simulée. Il effectue une dialyse avec une membrane en cellulose régénérée où du sang humain est en présence de tampon contaminé par des LPS purifiés; après 4 heures de recirculation les monocytes sont récoltés, incubés et l'IL-1 est dosée. Une nette activation des monocytes est ainsi démontrée qui est directement impliquable aux LPS ou à des fragments de LPS [BINGEL et coll, 1986].

Cette expérience est confirmée par LONNEMANN [LONNEMANN et coll, 1988b] qui obtient des résultats similaires en utilisant soit des endotoxines purifiées soit des filtrats de culture. Il note cependant qu'aucune activité ne peut être obtenue si le sang est remplacé par du sérum physiologique. Cette constatation peut donc nous faire penser à des mécanismes différents d'activation des monocytes dans lesquels les LPS ne sont pas impliqués. La membrane Cuprophane utilisée par LONNEMANN est connue pour son activation du complément et les anaphylatoxines qui en résultent induisent la production d'IL-1. Les témoins sans LPS n'activant pas de synthèse d'IL-1, cette production n'est pas uniquement d'origine membranaire, mais on peut penser qu'il y a une synergie entre les effets membranaires et les LPS. La réponse monocyttaire aux LPS serait ainsi amplifiée au contact de la membrane.

Une expérience récente de notre laboratoire en collaboration avec LAUDE-SHARP et HAEFFNER-CAVAILLON met clairement en évidence le transfert transmembranaire des LPS. En utilisant le banc d'essai décrit Figure IV.2a et des LPS radiomarqués, il est nettement montré un transfert rapide de LPS du bain vers le compartiment sanguin, que la membrane soit en Cuprophane, Polysulfone ou AN 69. Sur la Figure IV.1, on voit, dès la première minute, une augmentation nette de la radioactivité dans le "Sang" (remplacé par du sérum physiologique) ce qui traduit un passage des LPS radiomarqués. Le taux de réjection de la membrane est important puisque seulement 2% de la radioactivité initiale est retrouvée dans le compartiment sang.

1.2. PRÉSENTATION DES TRAVAUX

Compte tenu de ces enseignements, notre démarche nous a conduits à étudier un système d'adsorption des endotoxines. La solution proposée est le revêtement de la face

dialysat de l'AN 69 par un adsorbant. Nous avons donc étudié les effets d'un revêtement par :

- l'Albumine humaine
- la PolyEthylèneImine (PEI)
- la PolyVinylPyrrolidone (PVP)

L'albumine est connue pour adsorber les LPS: ceux-ci en constituent un contaminant majeur qui est difficile à éliminer au cours de la purification de cette protéine.

La membrane AN 69 est naturellement chargée négativement du fait de sa structure moléculaire. Avec la PEI, polymère polycationique, nous cherchons à donner une charge positive à la membrane AN 69 pour adsorber les LPS qui sont chargés négativement. Les essais précédemment décrits avec la membrane polyamide nous ont en effet montré qu'une membrane chargée positivement possède une meilleure rétention qu'une membrane neutre ou hydrophobe.

Les essais avec la PVP sont essentiellement motivés par l'étude de la membrane Polysulfone commercialisée par FRESSENIUS. Cette membrane qui possède de bonnes capacités d'adsorption des LPS [BOMMER et coll, 1987b] est en effet plastifiée par une quantité importante de PVP.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. PRÉPARATION DES HÉMODIALYSEURS

2.1.1. Présentation

L'essentiel de nos travaux portant sur la membrane AN69, nous avons utilisé des hémodialyseurs de type FILTRAL 12. Ces hémodialyseurs renferment la membrane AN 69 conditionnée sous forme de fibres creuses de 240 μm de diamètre. L'épaisseur de la membrane est de 50 μm . La surface développée est de 1,3 m^2 . Ces hémodialyseurs sont les plus vendus actuellement par HOSPAL.

Pour permettre des comparaisons entre les différents types de membranes, nous avons également utilisé des dialyseurs F60 de FRESSENIUS à membrane Polysulfone et des DISSCAP 10 (HOSPAL) à membrane Cuprophan. La surface de ces dialyseurs est équivalente à celle des FILTRAL 12.

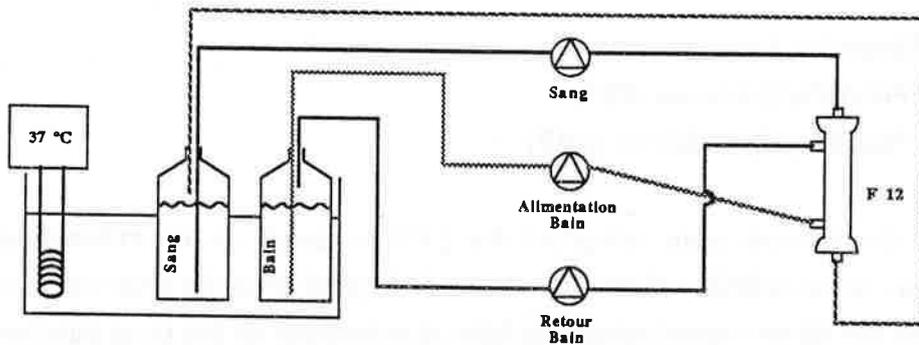


Figure IV.2.a : Montage pour la dialyse sans ultrafiltration.

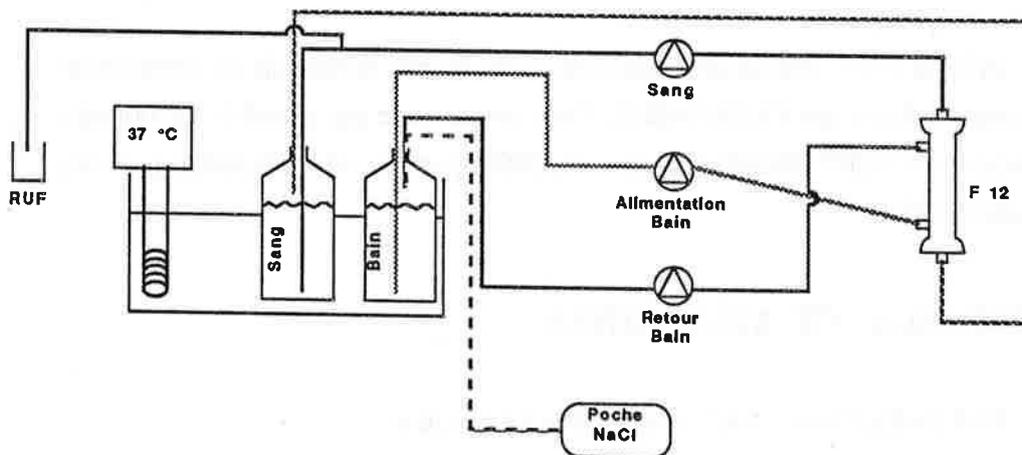


Figure IV.2.b : Montage pour la dialyse avec rétrofiltration.

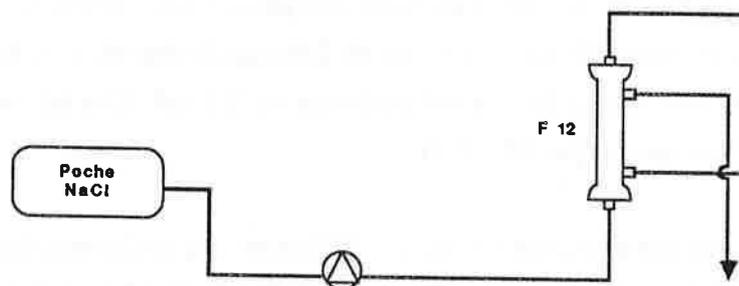


Figure IV.2.c : Montage pour le rinçage des deux compartiments par du sérum physiologique stérile.

2.1.2. Rinçage

Les hémodialyseurs sont d'abord rincés de façon aseptique par 2 l de sérum physiologique stérile apyrogène à un débit de 200 ml.min⁻¹ (Figure IV.2c). Ils sont ensuite vidés afin de ne pas fausser les volumes des solutions utilisées dans la suite de l'expérience.

2.1.3. Traitement

Les FILTRAL rincés sont traités par recirculation côté Bain pendant 1 h, à un débit de 500 ml.min⁻¹, par une des solutions suivantes:

- 1% PEI (MM 50-60.000, JANSSEN),
- 1% PVP (MM 360.000, JANSSEN),
- 1% Albumine (Centre de Transfusion Sanguine).

Les compartiments dialysats sont ensuite rincés par 1 l de sérum physiologique puis vidés.

2.2. PRÉPARATION DES BAINS SURCONTAMINÉS

Les bains surcontaminés sont obtenus par croissance de souches de *Pseudomonas* isolées de fluides de dialyse dans des bains de dialyse stériles.

6 fois 2 litres de bain bicarbonate stérile supplémenté par :

- 5 ‰ L-Méthionine
- 5 ‰ Gluconate de Potassium
- 5 ‰ Glucose

sontensemencés respectivement par des suspensions de *P. aeruginosa*, *P. cepacia*, *P. fluorescens*, *P. maltophilia* et *P. testosteroni* (2 fois). Après 21 jours de stagnation à 30°C, les différents bains sont microfiltrés par filtration tangentielle (0,22 µm) puis réunis. Ils sont ensuite répartis en aliquotes de 500 ml et congelés à -18°C.

L'utilisation de ces bains supplémentés nous permet d'obtenir des croissances correctes sans recourir à des bains usés qui rendent difficile l'interprétation des résultats.

2.3. BANC D'ESSAI

Le banc d'essai utilisé est présenté sur les Figures IV.2a et IV.2b. Il est composé de 2 circuits distincts dans lesquels circulent le "Bain" et le "Sang" à des débits respectifs de 500 et 200 ml.min⁻¹. L'ensemble est thermostaté à 37°C. Ce banc permet de simuler une dialyse avec une ultrafiltration globale nulle (Figure IV.2a) ou de provoquer une

rétrofiltration d'un débit connu (Figure IV.2b), d'environ 15 ml.min⁻¹, pour favoriser les transferts convectifs. L'ensemble du circuit est constitué de lignes à sang pour hémodialyse à usage unique (HOSPAL). Les flacons de recirculation en verre sont stérilisés et dépyrogénés au four Pasteur à 200°C pendant 4 h.

Le "Bain" est, suivant les essais, soit du bain bicarbonate contaminé, soit du sérum physiologique stérile et apyrogène (Aguettant) contenant des LPS purifiés.

Le "Sang" est constitué par du sérum physiologique stérile et apyrogène.

Des prélèvements sont effectués à intervalles réguliers, principalement dans le "Sang", pour dosage d'activité LAL et d'induction d'IL-1. Dans le "Bain", il s'agit surtout de vérifier la constance de la contamination.

La principale différence entre ce montage et les conditions d'hémodialyse normales réside dans le remplacement du sang par du sérum physiologique. Cette démarche que nous avons adoptée tout d'abord pour des raisons pratiques (approvisionnement en sang humain) nous permet par ailleurs d'éviter les problèmes d'interaction sanguine avec la membrane. Les activités décelées sont donc directement imputables à un transfert de LPS ou éventuellement d'autres dérivés bactériens.

3. RÉSULTATS - DISCUSSION

3.1. REMARQUES PRÉLIMINAIRES

Le recours à des bains contaminés se justifie pleinement. Ces bains sont en effet plus représentatifs des conditions réelles d'hémodialyse. D'autre part des essais préliminaires nous ont montré un transfert d'inducteurs d'IL-1 avec du bain contenant des LPS *N. meningitidis*, à 1 µg.ml⁻¹. Des concentrations similaires de LPS de *P.testosteroni* ou *P.cepacia* n'ont pas induit d'activité dans le "Sang". Pour *P.cepacia*, 10 µg.ml⁻¹ de LPS n'ont pas provoqué d'induction.

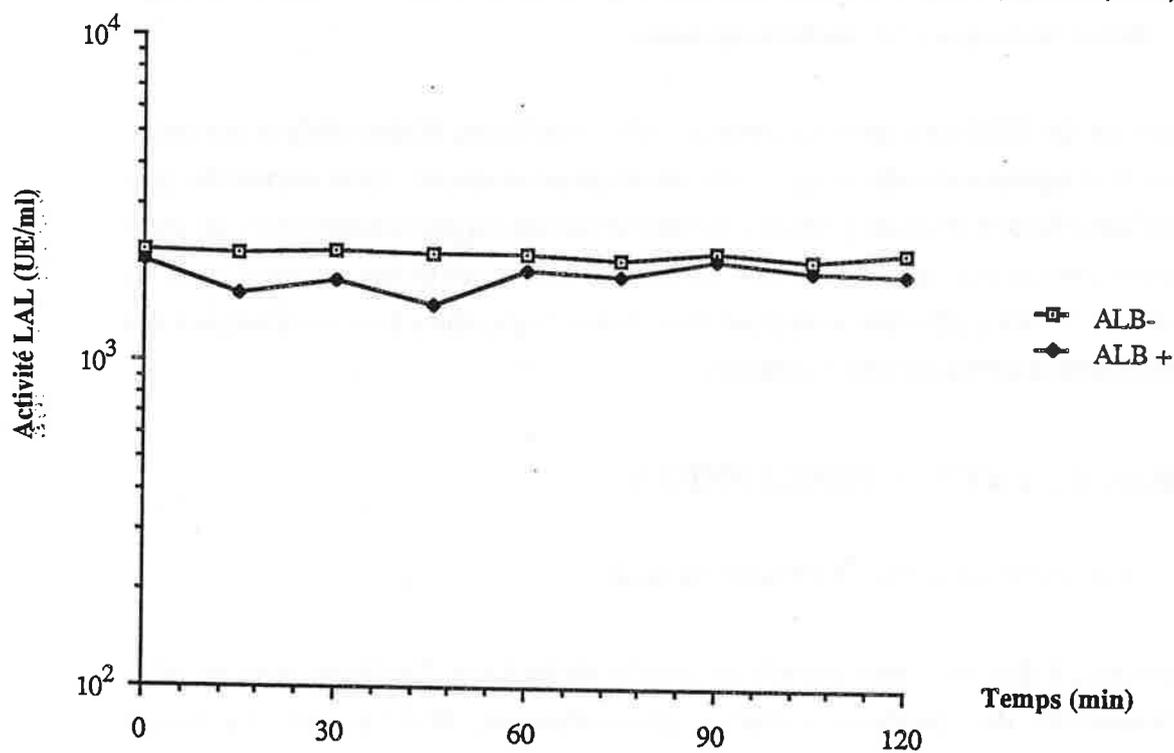
Les LPS de *Pseudomonas*, faibles inducteurs d'IL-1 ne sont donc pas adaptés pour ces essais. Quant à ceux de *N.meningitidis*, ils offrent un intérêt expérimental puisqu'ils permettent par leur fort pouvoir d'induction de détecter des transferts très faibles, mais ils nous éloignent des conditions rencontrées en cliniques.

3.2. EFFET DU TRAITEMENT PAR L'ALBUMINE

Pour évaluer l'effet du traitement par l'albumine, nous avons eu recours à 2 séries d'essais: la première a été réalisée en contaminant le bain avec des LPS *N.meningitidis* et la seconde avec des bains surcontaminés.

Figure IV.3 : Evolution de l'activité LAL dans les bains

Essais contaminés avec la membrane traitée (ALB+) ou non (ALB-)



3.2.1. Perméabilité vis-à-vis de LPS purifiés.

La dialyse est simulée pendant une heure à ultrafiltration nette nulle. Pendant la deuxième heure un débit de rétrofiltration de 15 ml.min^{-1} est instauré.

4 essais consécutifs sont effectués:

- 1 témoin membrane non traitée et bain non contaminé
- 1 témoin membrane traitée par la solution d'albumine et bain non contaminé
- 1 essai membrane non traitée et bain contaminé par des LPS *N.meningitidis* (environ $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$)
- 1 essai membrane traitée par la solution d'albumine et bain contaminé par des LPS *N.meningitidis* (environ $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$).

Les échantillons prélevés côté Sang sont tous négatifs au LAL.

Les taux de contamination des Bains (Figure IV.3) restent stables, de l'ordre de 2000 UE.ml^{-1} et sont sensiblement équivalents que la membrane soit ou non traitée. Ces taux restent évidemment nuls pour les témoins non contaminés.

Le test IL-1 permet, par contre, de détecter une activité dans le compartiment Sang pour les essais contaminés. L'absence d'induction pour les témoins démontre que l'activité observée n'est ni due à un éventuel relargage membranaire ni au revêtement par l'albumine. Les dosages de protéines négatifs dans le Bain montrent par ailleurs qu'il n'y a aucune désorption d'albumine.

L'activité IL-1 côté Sang (Figure IV.4) n'est cependant pas constante, ce qui traduit peut-être une adsorption dans le circuit de dialyse. Sans traitement, on observe 2 pics majeurs: le premier 15 minutes après le début de dialyse et le second 30 minutes après l'instauration de la rétrofiltration (un pic mineur peut être considéré à 65 minutes, soit au tout début de la rétrofiltration). Avec l'hémodialyseur traité, on n'observe qu'un pic majeur à 30 minutes qui est cependant atténué par rapport à l'essai précédent (et aussi un pic mineur à 65 minutes plus faible encore qu'en l'absence de traitement). Ces résultats montrent que l'albumine ne permet pas d'inhiber complètement le transfert des LPS. On constate néanmoins que l'induction d'IL-1 est moins importante et décalée dans le temps.

Ce décalage est intéressant puisqu'il permet *in vivo* l'adsorption de l'albumine du patient sur l'intérieur des fibres créant de ce fait une couche adsorbante. La présence de cette couche d'albumine sur la face sanguine est invoquée pour expliquer qu'aucune réaction ne se produit après la première demi-heure de dialyse.

Dans la procédure standard de rinçage, l'hémodialyseur est rincé côté Sang par du sérum physiologique et côté Bain par le dialysat produit par le générateur; le branchement

Figure IV.4 : Evaluation de l'effet de l'albumine sur les transferts de LPS
Evolution de l'activité inductrice d'IL-1 dans les compartiments Sang

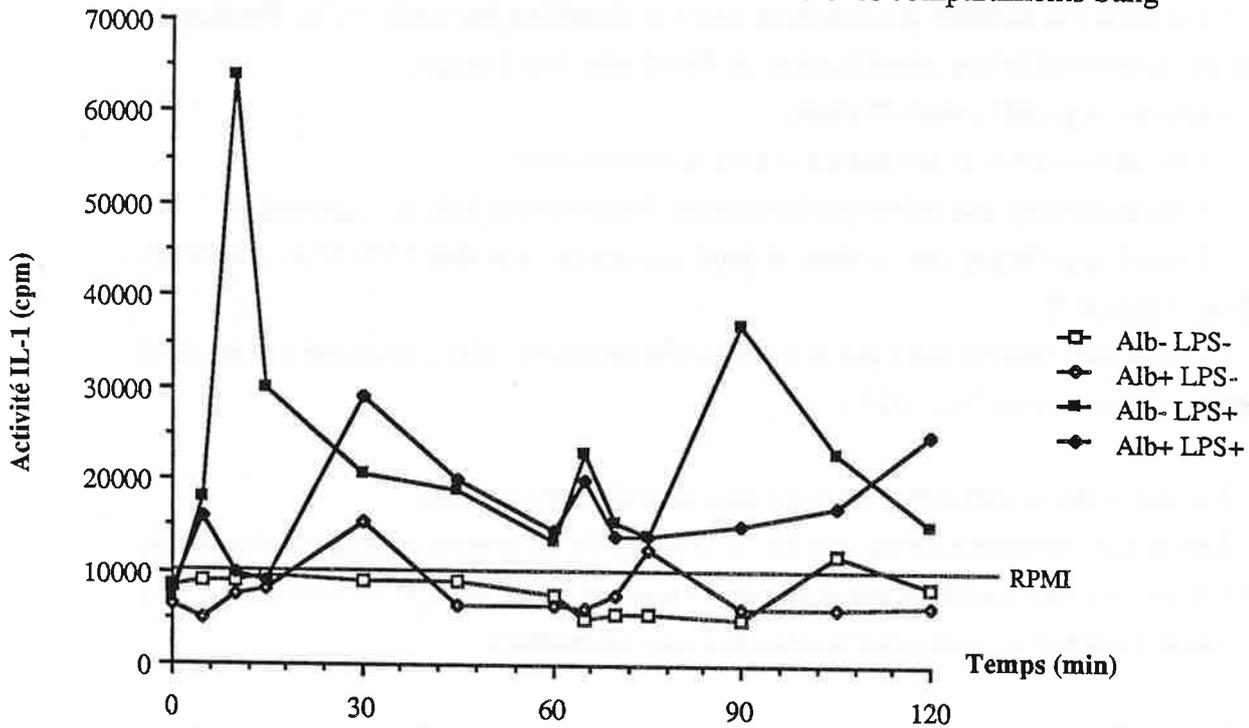
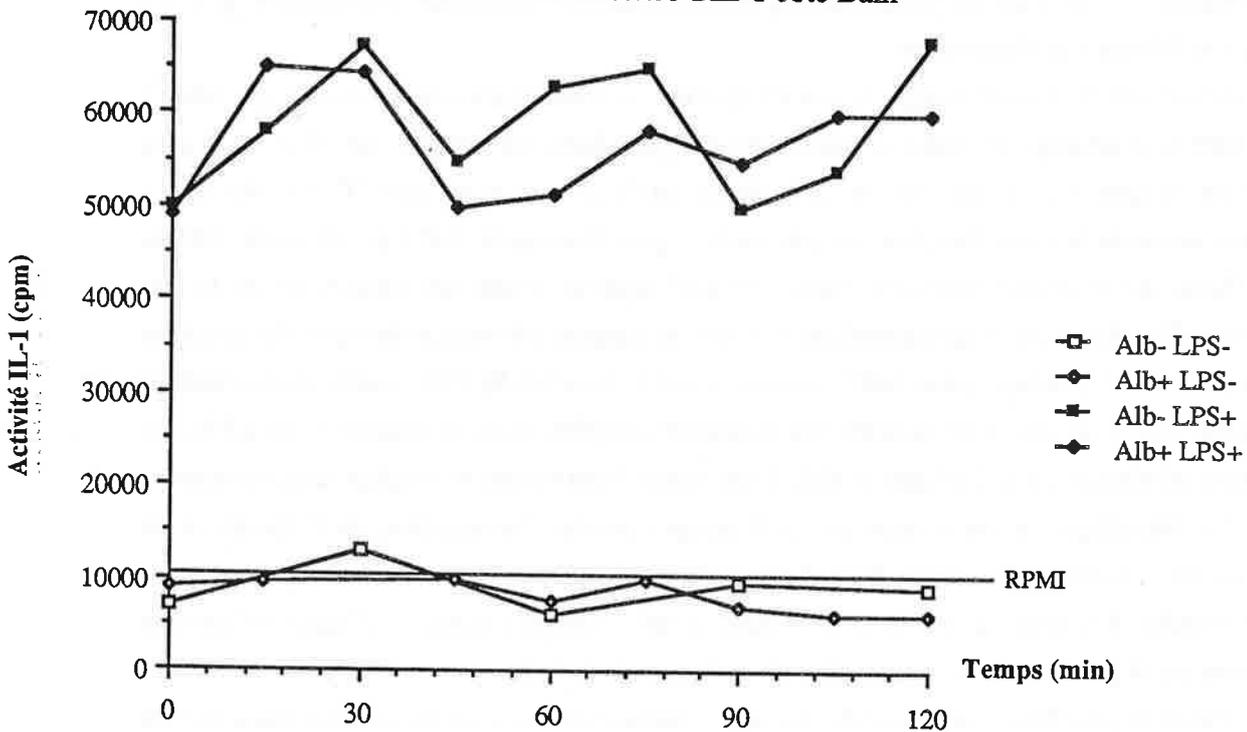


Figure IV.5 : Evaluation de l'effet de l'albumine sur les transferts de LPS
Evolution de l'activité inductrice d'IL-1 côté Bain



du patient est ensuite effectué et le sang pénètre dans l'hémodialyseur où il est mis en "contact" avec un dialysat contaminé. HOSPAL a mis au point un nouveau protocole de rinçage dans lequel les 2 compartiments sont rincés par le sérum physiologique stérile (Figure IV.2c) : une fois le branchement effectué et avant le raccordement au générateur de dialysat, on laisse le sang circuler pendant quelques minutes, ce qui permet un dépôt d'albumine sur la membrane. Avec ce système, le sang n'est donc jamais directement face à du bain contaminé. Les résultats cliniques de cette méthode de rinçage sont intéressants [BIGAZZI et coll, 1989] et confirment nos observations ainsi que l'hypothèse de l'adsorption des LPS par l'albumine.

Il faut cependant remarquer que cette adsorption est faible dans nos essais. On ne voit aucune baisse de l'activité IL-1 dans le bain, ce qui est normal compte tenu de la nature du test qui est semi-quantitatif. Grâce au dosage LAL, on peut voir que le taux moyen est légèrement plus faible en présence d'albumine mais il n'y a pas de décroissance notable de l'activité.

Ce dernier résultat est confirmé par la deuxième série d'essais : sur la Figure IV.7 on ne voit pas de décroissance de la contamination dans le bain en présence d'albumine.

3.2.2. Perméabilité vis à vis de bains contaminés.

Dans ces expériences communes avec les évaluations des revêtements par les polymères, nous ne constatons cette fois aucune adsorption de LPS due à l'albumine (Figure IV.5). Les teneurs LAL des bains sont nettement plus élevées et le test ne peut détecter une faible variation de la contamination.

Aucune activité LAL n'est encore détectée dans le Sang et les résultats d'IL-1 contradictoires ne permettent pas de tirer de nouveaux enseignements sur l'effet de l'albumine.

3.2.3. Conclusion

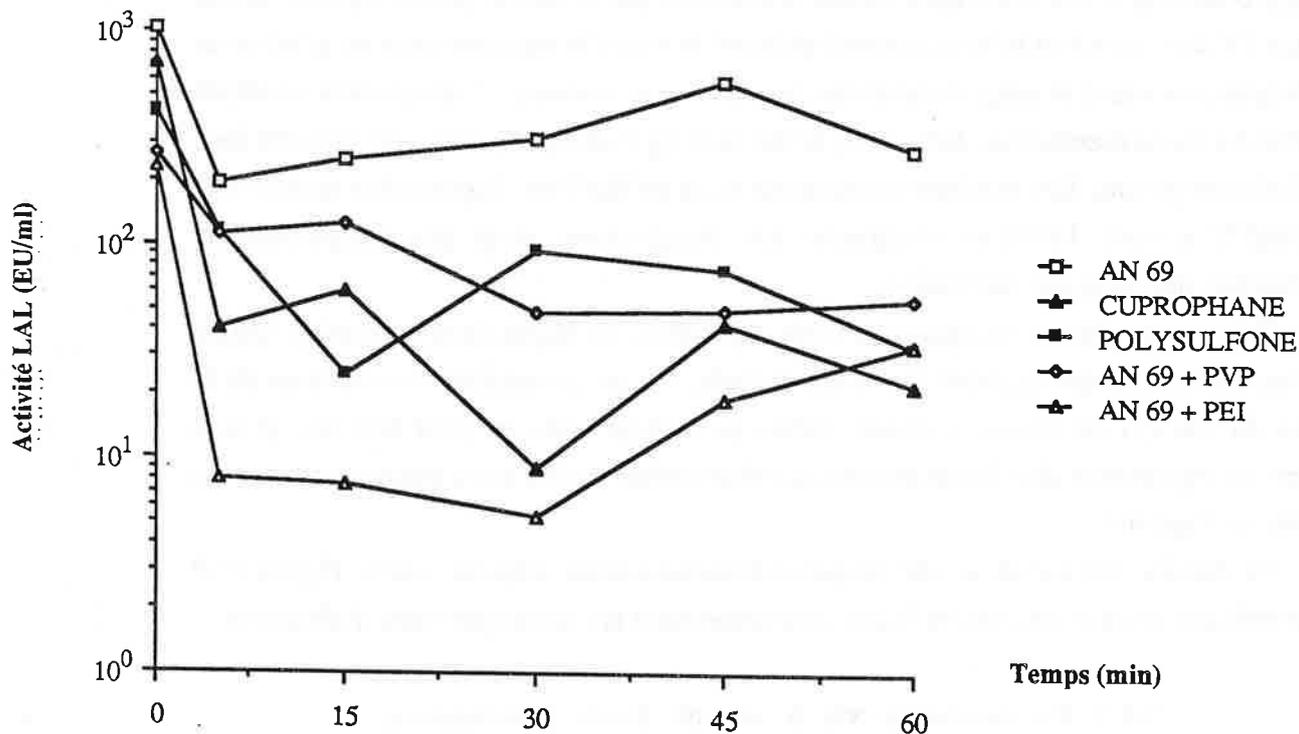
Le traitement de la membrane par l'albumine représente un intérêt certain pour limiter les transferts de LPS.

Les expériences que nous avons décrites peuvent servir à justifier la nouvelle méthode de mise en oeuvre des hémodialyseurs proposée par HOSPAL. Cette méthode nécessite cependant l'emploi de lignes supplémentaires (Bioprime Kit) ce qui peut gêner son développement en centre de dialyse.

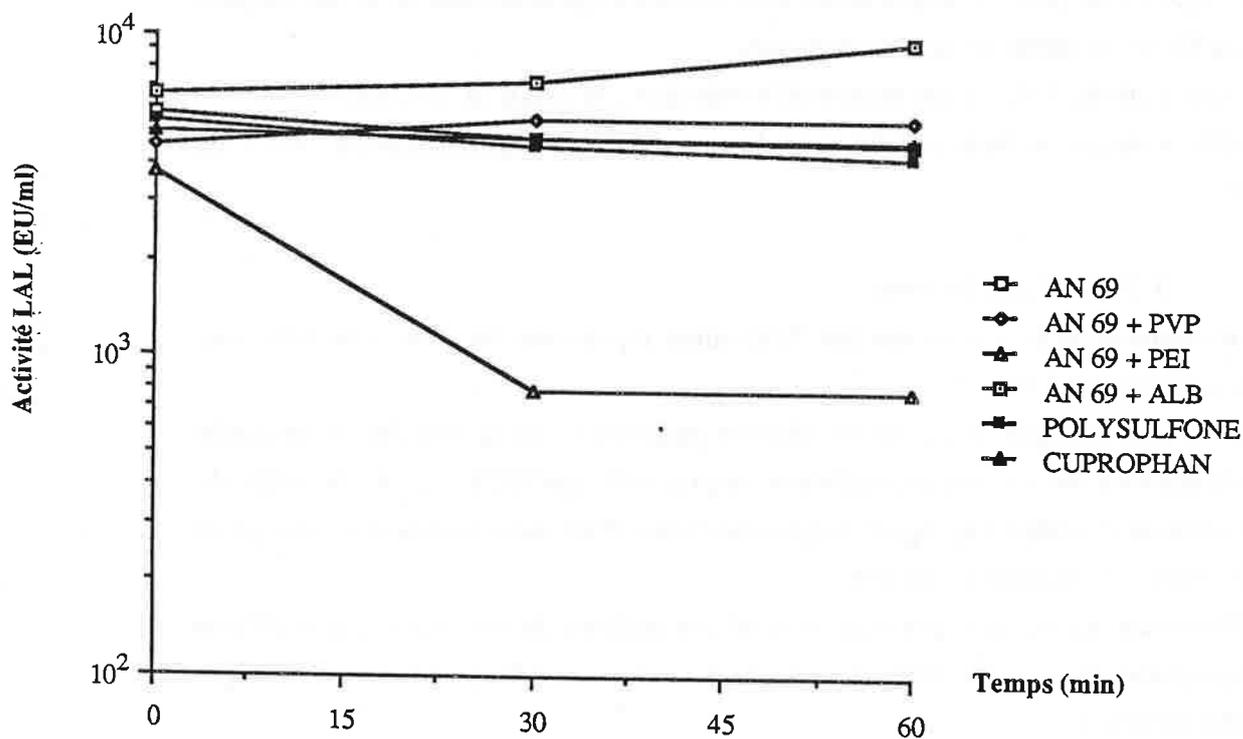
L'adsorption ne semble pas être le seul mécanisme de rétention des LPS par l'albumine. L'inhibition du transfert est sans doute aussi liée à l'encombrement stérique de la couche protéique.

Figure IV.6: Capacités d'adsorption de LPS des différentes membranes

Evolution de l'activité LAL dans les Bains

**Figure IV.7:** Adsorption des inducteurs de LAL par les membranes

Evolution de la contamination des Bains



Il est également évident que le traitement de l'AN 69 par l'albumine est inapplicable industriellement, ne serait-ce que pour des raisons économiques. L'emploi de polymères organiques est la seule solution envisageable.

3.3. EVALUATION DES PERFORMANCES DE POLYMERES ORGANIQUES

3.3.1. Essais d'adsorption

Dans un premier temps, pour valider notre hypothèse initiale, nous avons effectué des essais d'adsorption de LPS purifiés de *P.testosteroni* sur la membrane AN 69, traitée ou non, ainsi que sur Cuprophane et Polysulfone. Nous avons utilisé le banc d'essai schématisé sur la Figure IV.2.a en faisant une simple recirculation de bain contaminé par $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de LPS *P.testosteroni*.

Les résultats (Figure IV.6) sont assez spectaculaires puisqu'avec la PEI nous obtenons une baisse importante de l'activité LAL dans le compartiment Bain. Avec ce traitement, le niveau LAL après 5 minutes de recirculation est inférieur à 10 UE.ml^{-1} pour une contamination initiale supérieure à 200 UE.ml^{-1} .

L'adsorption de ces LPS par l'AN 69 est loin d'être négligeable mais celles des membranes Cuprophane et Polysulfone sont nettement plus importantes. Le revêtement par la PVP permet à l'AN 69 d'égaliser les performances de ces dernières, tandis que l'ajout de PEI confère à l'AN 69 une capacité d'adsorption bien supérieure.

Ces premiers essais exploratoires nous permettent de démontrer l'intérêt des polymères et d'établir une différence de comportement entre l'AN 69 et les 2 autres membranes largement utilisées en hémodialyse. Cette différence peut expliquer les observations des cliniciens qui constatent sensiblement plus de réactions d'hypersensibilité avec l'AN 69 qu'avec la membrane Polysulfone.

3.3.2. Dialyses simulées

Ces dialyses simulées ont pour but d'évaluer les perméabilités des membranes aux dérivés inducteurs présents dans des filtrats de culture de *Pseudomonas*.

Pour chaque traitement et la membrane Cuprophane, on réalise 3 essais avec du bain contaminé et un témoin. Pour l'AN 69 non traitée et la Polysulfone, il n'y a que 2 essais.

Figure IV.8.a : Evolution de l'activité IL-1 Extracellulaire dans les compartiments Sang pour l'AN 69 non traitée

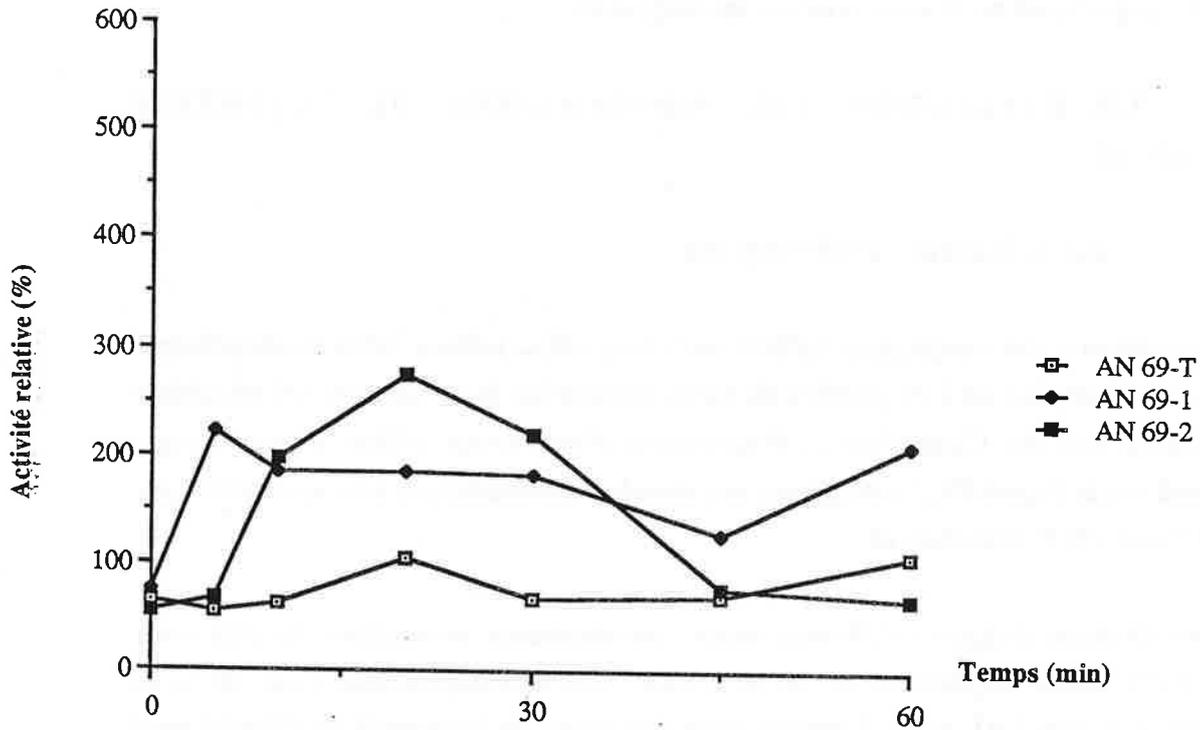
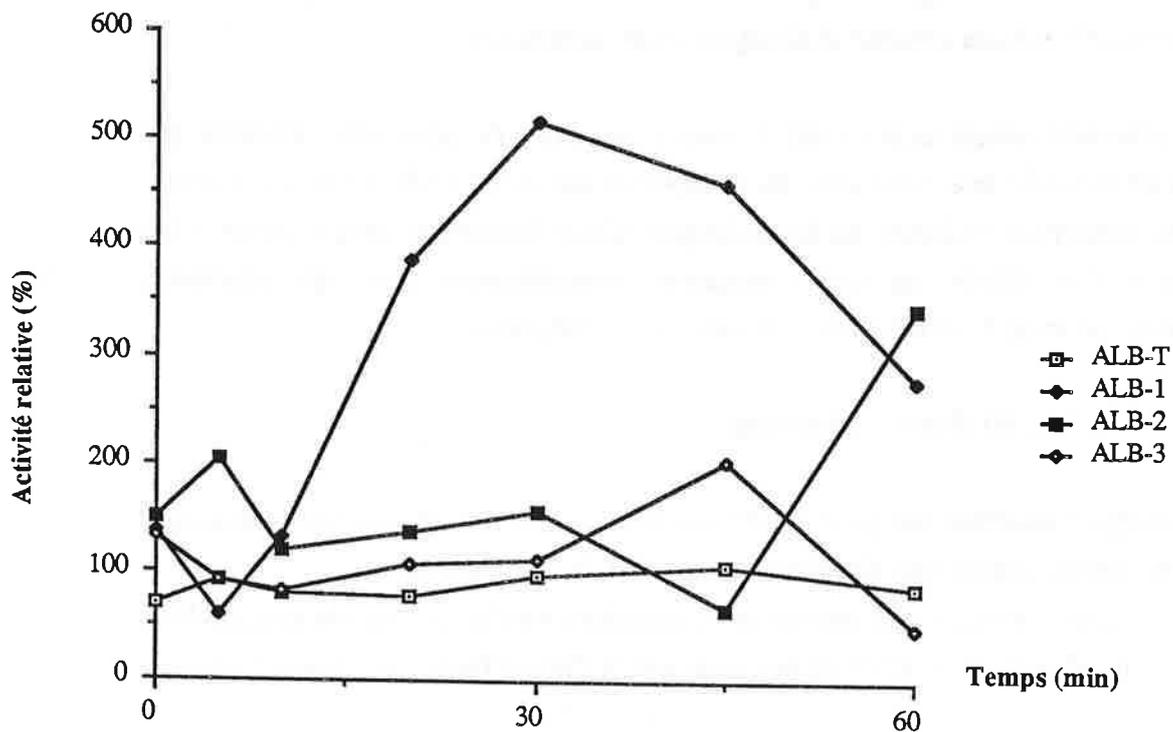


Figure IV.8.b : Evolution de l'activité IL-1 Extracellulaire dans les compartiments Sang après traitement à l' Albumine



3.3.2.1. Résultats LAL

Pour les échantillons prélevés côté Sang, le test LAL ne permet de détecter une activité qu'avec la membrane Cuprophan et pour une seule dialyse avec l'AN 69 non traitée. Les taux sont de l'ordre de $0,1 \text{ UE.ml}^{-1}$ et il serait hâtif d'en déduire un transfert de LPS. Pour la Cuprophan, l'induction LAL est certainement due à des oligomères de cellulose puisqu'on constate aussi une activation pour le témoin. Nous confirmons les observations de la littérature qui montrent que le test LAL est insuffisant pour mettre en évidence un passage de LPS.

En revanche les résultats des tests LAL dans le bain (Figure IV.7) permettent de tirer plus d'enseignements. Seule la PEI permet d'abaisser sensiblement l'activité inductrice des bains. Celle-ci passe d'environ 5000 à 500-1000 UE.ml^{-1} . Excepté pour l'AN 69 traitée par la PEI, les capacités d'adsorption des membranes sont moins évidentes que précédemment. On ne voit pas de différence entre AN 69, Polysulfone et Cuprophan. De même l'intérêt de la PVP est discutable. Il faut remarquer que la contamination est ici environ 10 fois plus importante que pour les essais préliminaires d'adsorption. Les sites d'adsorption des membranes sont peut-être plus rapidement saturés sans que cela soit détectable avec le test LAL. De plus, comme nous utilisons des bains contaminés, il peut également se produire des adsorptions d'autres dérivés bactériens qui ont plus d'affinité pour les membranes que les LPS.

3.3.2.2. Résultats d'IL-1

Compte tenu du nombre important d'échantillons, les dosages ont été faits en recourant aux monocytes de 2 patients. Avec le premier lot de monocytes les échantillons correspondant aux différents traitements (AN 69, PEI, PVP, Albumine) ont été dosés, tandis que le deuxième a servi à comparer les différentes membranes (AN 69, Polysulfone et Cuprophan).

Les résultats donnés en annexe sont globalement incohérents et on ne peut en tirer que d'hypothétiques conclusions

Effet des divers traitements :

Les monocytes du premier donneur relarguent très facilement leur IL-1 et il est préférable de considérer les valeurs d'IL-1 Extracellulaire. Ces valeurs ont été reportées dans les Figures IV.8a-IV.8d où l'activité relative représente le rapport entre l'activité de l'échantillon et celle du témoin RPMI (ce rapport a été effectué de manière à prendre en compte les variations des témoins RPMI).

Figure IV.8.c : Evolution de l'activité IL-1 Extracellulaire dans les compartiments Sang après traitement par la PEI

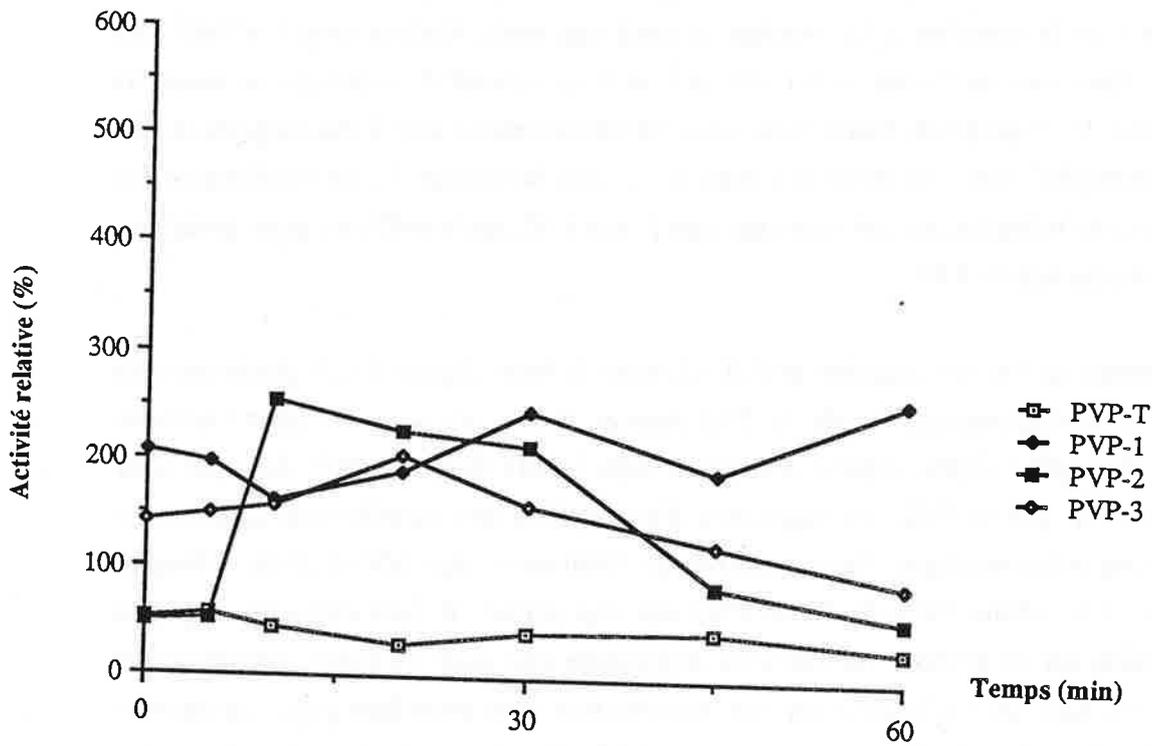
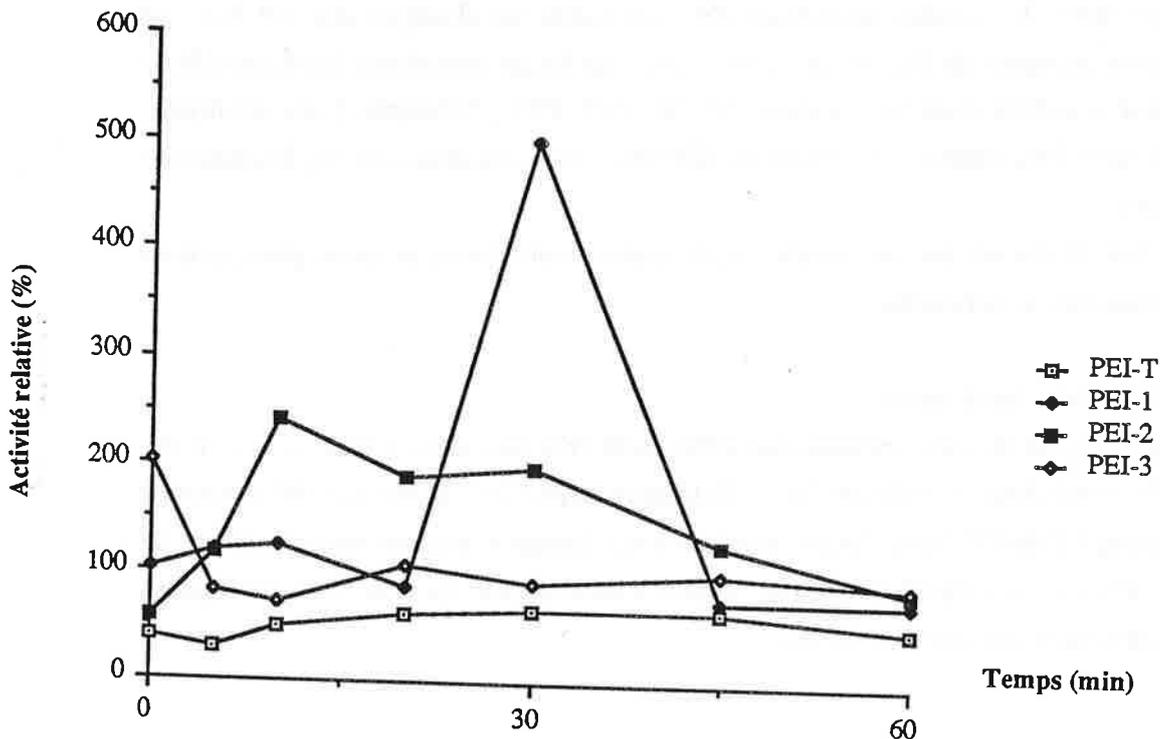


Figure IV.8.d : Evolution de l'activité IL-1 Extracellulaire dans les compartiments Sang après traitement par la PEI



Côté Bain, on obtient des résultats assez surprenants puisque des bains contaminés ne provoquent aucune induction (AN 69-2, PVP-2). Ceci peut s'expliquer par une dégénérescence ou une lyse cellulaire due au bain bicarbonate, mais ce comportement devrait être général puisque les bains sont identiques pour toutes les expériences. On peut néanmoins observer une certaine baisse de l'activité IL-1 pour les essais avec la PEI mais le nombre de points est insuffisant pour différencier ces essais de ceux avec la PVP.

Une légère induction d'IL-1 extracellulaire est mise en évidence pour l'AN 69 et l'AN 69 + PVP, principalement entre 10 et 30 minutes. Ces résultats sont cependant en contradiction avec ceux obtenus en intracellulaire où seul le témoin AN 69 induit légèrement (AN 69-T) et un seul essai avec PVP induit fortement (PVP-1). Pour la PEI, un essai induit les 2 formes d'IL-1 tandis que les 2 autres sont négatifs.

A la vue de ces résultats, on ne peut tirer aucune conclusion quant aux transferts de LPS ou leur inhibition par les polymères.

Comparaison des membranes :

Les monocytes du deuxième donneur sont fortement induits au contact des plaques de culture : les témoins RPMI ont des niveaux très importants d'IL-1 intracellulaire. Les résultats obtenus avec ce donneur ne sont donc pas exploitables et il est impossible de donner des éléments de comparaison des différentes membranes.

4. CONCLUSION

Les essais que nous avons présentés ne sont pas totalement satisfaisants : si nous avons pu mettre en évidence une certaine inhibition des transferts de LPS grâce à l'albumine, on ne peut que suspecter un même effet avec la PEI. L'ensemble des résultats nous fait penser que ce traitement en établissant une couche d'adsorption des LPS permet de limiter leur transfert.

Nous nous heurtons en fait à un problème de méthodologie. Le dosage LAL est insuffisant pour détecter des LPS dans le compartiment sanguin et nous permet uniquement de suivre l'évolution de la contamination des bains. Le test d'induction d'IL-1 est apparu aléatoire. Les contradictions que nous avons observées dans les derniers essais nous font réfléchir quant à la validité des conclusions que nous avons pu en tirer précédemment.

Le test IL-1 tel qu'il est pratiqué offre plusieurs sources de variations. Les monocytes prélevés chez des donneurs que l'on ne contrôle pas, peuvent être activés avant récolte et leurs comportements varient énormément. Il serait certainement préférable de travailler avec des lignées cellulaires, par exemple des lignées humaines

prémonocytaires de type U937 ou HL60, avec lesquelles on peut penser obtenir une bonne reproductibilité. La deuxième étape qui repose sur la prolifération de thymocytes d'une lignée murine pose moins de problèmes de répétabilité. On pourrait néanmoins s'affranchir de la variabilité de ce test cellulaire en le remplaçant par un dosage radioimmunologique.

Nous pouvons également envisager d'autres méthodes qui nous permettraient de statuer définitivement sur les rétentions des LPS par les membranes modifiées. Nous pourrions par exemple employer des LPS radiomarqués puisqu'avec ce matériel, il a déjà été clairement prouvé un passage transmembranaire de LPS. La présence de LPS dans le compartiment sanguin pourrait également être mise en évidence grâce à des anticorps anti-LPS avec une amplification par ELISA. La production d'anticorps anti-LPS de *Pseudomonas* est en cours en collaboration avec le laboratoire de M^{me} Gaudin à l'hôpital Nord de St Etienne.

CONCLUSION

Des réactions de type hypersensibilité sont parfois observées au début de séances d'hémodialyse. L'étude bibliographique nous a montré que la contamination des bains de dialyse par des bactéries de type Gram négatif est bien corrélée avec ces réactions. Celles-ci sont imputables aux endotoxines ou LPS, composants de la paroi de ces bactéries. La dialyse avec des bains stériles et dépourvus de ces endotoxines doit donc permettre de limiter les risques de réactions.

Dans une première étape, nous nous sommes attachés au développement d'un système de purification en ligne de tels bains de dialyse qui soit intégrable au matériel existant. Notre étude nous a permis de rejeter les dispositifs d'ultrafiltration utilisant des membranes organiques planes, de mise en œuvre délicate, ou des membranes minérales tubulaires, dont l'encombrement est trop important. Nous avons proposé l'emploi de l'hémofiltre FH 88 à fibres creuses qui s'avère un bon compromis :

- dans des conditions de contamination normales, le bain produit est stérile et non inducteur dans les deux tests d'activité biologique que nous avons employés.

- la perte de charge générée par le filtre le rend intégrable aux générateurs de bains déjà commercialisés sans modification.

- la présentation de cet ultrafiltre est familière au personnel hospitalier. Sa mise en œuvre et sa maintenance sont donc possibles sans problème particulier.

Il subsiste malgré tout deux points négatifs :

- la compatibilité à long terme aux désinfectants est douteuse.

- le bain ultrafiltré reste inducteur de la synthèse d'IL-1 en cas de fortes contaminations par des LPS.

Les résultats que nous avons obtenus ont montré que l'ultrafiltration sur des membranes de seuil de coupure de 10 à 30 kDa est insuffisante pour rejeter totalement les LPS. Nous avons donc déterminé plus précisément la masse moléculaire de ces composés par électrophorèse et par filtrations successives sur des membranes de seuils de coupure décroissants. Nous avons ainsi pu mettre en évidence des LPS, par leur activité inductrice d'IL-1, après filtration sur des membranes de 5 kDa. Ce résultat a été confirmé en électrophorèse grâce à laquelle nous avons pu estimer une masse moléculaire inférieure à 5 kDa pour les LPS de type R.

Compte tenu de ces résultats, l'ultrafiltration seule n'est pas apparue économiquement possible pour atteindre notre objectif. Nous avons cherché à modifier la membrane de dialyse pour augmenter sa réjection des LPS. Un revêtement de la face

dialysat de la membrane par un polymère organique, la PEI, nous a permis d'obtenir des adsorptions notables de LPS. Cependant, les tests biologiques disponibles sont encore insuffisants pour mettre clairement en évidence une inhibition du transfert de LPS par la membrane modifiée. L'emploi de LPS radiomarqués peut permettre de statuer sur ce dernier point.

La conjonction des deux méthodes que nous avons proposées, ultrafiltration des bains et modification de la membrane, limite d'ores et déjà considérablement les possibilités de transfert des LPS vers le compartiment sanguin. Seuls des essais cliniques nous permettront de vérifier son efficacité et de valider ce procédé.

La démarche originale de modification des membranes que nous avons adoptée peut être également employée pour améliorer les performances de tout système de filtration ou d'ultrafiltration. Nous pouvons en effet moduler les caractéristiques de surface des membranes pour leur conférer une sélectivité supplémentaire : les séparations ne reposent alors plus uniquement sur la taille des particules ou molécules en solution. En réalité, les membranes ne sont pas neutres et les interactions avec les solutés ne sont pas négligeables. Il est donc essentiel qu'avant toute séparation, un choix raisonné de membrane accompagné d'une modification éventuelle soit fait en adéquation avec les composés à séparer.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AREND, W.P., MASSONI, R.J., **1986**
Characteristics of bacterial lipopolysaccharide induction of interleukin 1 synthesis and secretion by human monocytes.
Clin. Exp. Immunol., 64, 656-664
- BANG, F.B., **1956**
A bacterial disease of *Limulus polyphemus*
Bull. Johns Hopkins Hosp., 98, 325
- BASU, S., RADZIEJEWSKA-LEBREJ, J., MAYER, H., **1986**
Lipopolysaccharide of providencia rettgeri. chemical studies and taxonomical implications.
Arch. Microbiol. , 144, 213-218
- BAURMEISTER, U. VIENKEN, J., HARDING, G., KLEIN, E., **1988**
Dialysate quality and backfiltration: Key issue in the use of Low and High flux membranes.
International Course on Therapeutic, Advances in Nephrology, Mexico December 14-18
- BELFORT, G., BALTUTIS, T.F., BLATT, W.F., **1980**
Automated hollow fiber ultrafiltration : pyrogen removal and phage recovery from water.
Polym. Sci. Technol. , 13, 439-474
- BERNICK, J.J., PORT, F.K., FAVERO, M.S., BROWN, D.G., **1979**.
Bacterial and endotoxin permeability of hemodialysis membranes.
Kidney Int., 16, 491-496
- BINGEL, M., LONNEMANN, G., SHALDON, S., KOCH, K.M., DINARELLO, C.A., **1986**
Human interleukin-1 production during hemodialysis
Nephron, 43, 161-163
- BINGEL, M., LONNEMANN, G., KOCH, K.M., DINARELLO, C.A., SHALDON, S., **1988**.
Plasma interleukin-1 activity during hemodialysis: the influence of dialysis membranes.
Nephron , 50, 273-276
- BOMMER, J., RITZ, E., **1987a**.
Water quality : a neglected problem in hemodialysis.
Nephron , 46, 1-6
- BOMMER, J., BECKER, P., URBASCHEK, R., RITZ, E., URBASCHEK, B., **1987b**.
No evidence for endotoxin transfer across high flux polysulfone membranes.
Clin. Nephrol., 27(6), 278-282
- CARSON, L.A., PETERSEN, N.J., **1982**
LAL reactive material associated with hemodialysis membranes
Prog. Clin. Biol. Res., 93, 217-230
- DINARELLO, C.A., **1988**
Interleukin-1
Digest. Dis. Sci. , 33(3), 25s-35s
- DOLOVICH, J., MARSHALL, C.P., SMITH, E.K.M., SHIMIZU, A., PEARSON, F.C., SUGONA, M.A., LEE, W., **1984**
Allergy to ethylene oxide in chronic hemodialysis patients
Artif. Organs, 8(3), 334-337

- DOOLEY, J.S.G., LALLIER, R., SHAW, D.H., TRUST, T.J., **1985**
Electrophoretic and immunochemical analysis of the lipopolysaccharides from various strains of *Aeromonas hydrophila*
J. Bacteriol., 164(1), 263-269
- DU MOULIN, G.C., COLEMAN, E.C., HEDLEY-WHYTE, J., **1987**
Bacterial colonization and endotoxin content of a new renal dialysis water system composed of abs
Appl. Environ. Microbiol. , 53(6), 1322-1326
- EBBEN, J.P., HIRSCH, D.N., LUEHMANN, D.A., COLLINS, A.J., KESHAVIAH, P.R., **1987**
Microbiologic contamination of liquid bicarbonate concentrate for hemodialysis
Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs , 33, 269-273
- ELIN, R.J., WOLFF, S.M., **1973**
Nonspecificity of the limulus amoebocytes lysate test: positive reactions with polynucleotides and proteins.
J. Infect. Dis. , 128(3), 349-352
- FORET, M., KUENTZ, F., HACHACHE, T., CHRISTOLLET, M., MILONGO, R., MEFTAH, H., DECHELETTE, E., CORDONNIER, D.J., **1985**
Hypersensitivity reactions during hemodialysis in France
Proc. Edta-era , 22, 181-186
- FRIBERGER, P., **1982**
A quantitative endotoxin assay utilizing LAL and a chromogenic substrate.
In Endotoxins and their detection with the *Limulus* Amebocyte Lysate test
Progr. Clin. Biol. Res., 93, 195-206
- GALANOS, C., LUDERITZ, O., WESTPHAL, O., **1969**
A new method for the extraction of R lipopolysaccharides
Eur. J. Biochem. , 9, 245-249
- GERBA, C.P., HOU, K., **1985**
Endotoxin removal by charge-modified filters
Appl. Environ. Microbiol., 50(6), 1375-1377
- HAEFFNER-CAVAILLON, N., CAVAILLON, J-M., **1986**
Involvement of the LPS receptor in the induction of interleukin-1 in human monocytes stimulated with endotoxins
An. Inst. Pasteur Immunol. , 7, 473-477
- HAEFFNER-CAVAILLON, N., CAVAILLON, J-M., CIANCIONI, C., BACLE, F., DELONS, S., KAZATCHKINE, M.D., **1989a**
In vivo induction of interleukin-1 during hemodialysis.
Kidney Int. , 35, 1212-1218
- HAEFFNER-CAVAILLON, N., CAROFF, M., CAVAILLON, J-M., **1989b**
Interleukin-1 induction by lipopolysaccharides: structural requirements of 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (KDO)
Molec. Immunol. , 26(5), 485-494
- HAEFFNER, M.E., VILLAROEL, F., **1983**
Lettre Fda 30/11/83

- HAMILTON, R.G., ADKINSON Jr, N.F., 1984
Mechanisms of acute allergic reactions
Artif. Organs, 8(3), 311-317
- HENDERSON, L.W, CHENOWETH, 1987
Biocompatibility of artificial organs : an overview
Blood Purif. 5, 100-111
- HENDERSON, L.W., KOCH, K.M., DINARELLO, C.A., SHALDON, S., 1983
Hemodialysis hypotension : the interleukin hypothesis.
Blood Purif. , 1, 3-8
- HENDERSON, L.W., BEANS, E., 1978
Successful production of sterile pyrogen-free electrolyte solution by ultrafiltration.
Kidney Int. , 14, 522-525
- HENNE, W., DIETRICH, W., PELGER, M., VON SENGBUSCH, G., 1984
Residual ethylene oxide in hollow-fiber dialysers.
Artif. Organs, 8(3), 306-309
- HITCHCOCK, P.J., BROWN, T.M., 1983
Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels.
J. Bacteriol. , 154(1), 269-277
- HITCHCOCK, P.J., LEIVE, L., MAKELA, P.H., RIETSCHER, E.T., STRITTMATTER, W., MORRISON, D.C., 1986
Lipopolysaccharide nomenclature - past, present and future
J. Bacteriol., 166(3), 699-705
- INAGAKI, H., HAMAZAKI, T., KURODA, H., YANO, S., 1987
Foreign particles contaminating hemodialyzers and method of removing them by rinsing.
Nephron , 46, 343-346
- IWANAGA, S., MORITA, T., HARADA, T., NAKAMURA, S., NIWA, M., TAKADA, K., KIMURA, T., SAKAKIBARA, S., 1978
Chromogenic substrates for horseshoe crab clotting enzyme
Haemostasis, 7, 183-188
- JANS, H., BRET LAU, P., NIELSEN, B., 1978
Bacterial contamination of dialysers: clinical, bacteriological and scanning electron-microscopic evaluation of different dialysate mixing systems
Nephron , 20, 10-17
- JENKINS, S.R., LIN, F.Y.C., LIN, R.S., ISRAEL, E., PETERSEN, N.J., 1987
Pyrogenic reactions and *Pseudomonas* bacteremias in a hemodialysis center
Dialys. Transplant. , 16(4), 192-197
- JUNGERS, P., ZINGRAFF, J., MAN, N.K., DRÜEKE, T., TARDIEU, B., 1984
L'essentiel sur l'hémodialyse
Ed. Masson, 2^{ème} édition.
- KESSLER, M., CAO HUU, T., MARIOT, A., CHANLIAU, J., 1988
Associated complications due to sterilizing agents ethylene oxide and formaldehyde.
Contrib. Nephrol., 62, 13-23

- KLINKMAN, H., FALKENHAGEN, D., SMOLLICH, B.P., 1985
Investigation of the permeability of highly permeable polysulfone membranes for pyrogens
Contr. Nephrol. , 46, 174-183
- KOCH, K.M., SHALDON, S., BALDAMUS, C.A., LYSAGHT, M.J., LONNEMANN, G., BINGEL, M., DINARELLO, C.A., 1985
Convective mass transport in dialysis.
Proc. Edta , 22, 155-161
- LACHMAN, L.B., 1983
Interleukin-1 release from LPS-stimulated mononuclear phagocytes.
In Beneficial effects of endotoxin (Ed by A. Nowotny) Plenum Press New-York USA
- LEBBAR, S., CAVAILLON, J-M, CAROFF, M., LEDUR, A., BRADE, H., SARFATI, R., HAEFFNER-CAVAILLON, N., 1986
Molecular requirement for interleukin-1 induction by lipopolysaccharide-stimulated monocytes : involvement for the heptosyl-2-keto-3-deoxyoctulosonate region
Eur. J. Immun., 16, 87-91
- LEVIN, J., BANG, F.B., 1964a
The role of endotoxin in extracellular coagulation of *Limulus* blood
Bull. Johns Hopkins Hosp., 115, 265
- LEVIN, J., BANG, F.B., 1964b
A description of cellular coagulation in the *Limulus*
Bull. Johns Hopkins Hosp., 115, 337
- LEVIN, J., BANG, F.B., 1968
Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin
Thromb. Diath. Haemorrh., 19, 186
- LONNEMANN, G., BINGEL, M., KOCH, K.M., SHALDON, S., DINARELLO, C.A., 1987
Plasma interleukin-1 activity in humans undergoing hemodialysis with regenerated cellulosic membranes
Lymphokine Res. , 6(2), 63-70
- LONNEMANN, G., BINGEL, M., FLOEGE, J., KOCH, K.M., SHALDON, S., DINARELLO, C.A., 1988a
Detection of endotoxin-like interleukin-1 activity during *in vitro* dialysis
Kidney Int. , 33, 29-35
- LONNEMANN, G., KOCH, K.M., SHALDON, S., DINARELLO, C.A., 1988b
Studies on the ability of hemodialysis membranes to induce, bind, and clear human interleukin-1.
J. Lab. Clin. Med. , 112(1), 76-86
- LUGER, A., KOVARIK, J., STUMVOLL, H-K., URBANSKA, A., LUGER, T.A., 1987
Blood- membrane interaction in hemodialysis leads to increased cytokine production
Kidney Int., 32, 84-88
- MAN, N.K., CIANCIONI, C., FAIVRE, J.M., DIAB, N., LONDON, G., MARET, J., WAMBERGUE, F.P., 1988
Dialysis-associated adverse reactions with high-flux membranes and microbial contamination of liquid bicarbonate concentrate
Contr. Nephrol. , 62, 24-34

- MIKAMI, T., NAGASE, T., MATSUMOTO, T., SUZUKI, S., SUZUKI, M., **1982**
Gelation of limulus amoebocyte lysate by simple polysaccharides.
Microbiol. Immunol. , 26(5), 403-409
- MION, C., CANAUD, B., STEC, F., NGUYEN, Q.V., **1989**
Dialysat au bicarbonate sterile et sans pyrogene: un progres en hemodialyse applicable des
aujourd'hui, *Actualites Nephrologiques* , Ed. Flammarion Medecine Sciences, 289-326
- MONTAGNAC, R., SCHILLINGER, F., MILCENT, T., CROIX, J.C., **1988**
Réactions d'hypersensibilité en cours d'hémodialyse. Rôles de la haute perméabilité, de la
rétrofiltration et de la contamination bactérienne du dialysat
Néphrologie, 9, 29-32
- NEWTON, R.C., **1986**
Human monocyte production of interleukin-1 : parameters of the induction of interleukin-
1 secretion by lipopolysaccharides
J. Leuk. Biol. , 39, 299-311
- NOSÉ, Y., **1984**
Hypersensitivity in Hemodialysis : only the Tip of the Iceberg
Artif. Organs, 8(3), 268-269
- PEARSON, F.C., WEARY, M., BOHON, J., **1982**
Detection of Limulus Amoebocyte Lysate reactive material in capillary flow hemodialysers
Prog. Clin. Biol. Res., 93, 247-260
- PEARSON, F.C., BOHON, J., LEE, W., BRUSZER, G., SAGONA, M., DAWE, R.,
JABUKOWSKI, G., MORRISON, D., DINARELLO, C., **1984**
Comparison of chemical analysis of hollow fiber dialyser extracts.
Artif. Organs, 8(3), 291-298
- POOLE, S., THORPE, R., MEAGER, A., HUBBARD, A.R., GEARING, A.J.H.,
1988
Detection of pyrogen by cytokine release.
Lancet , 8577, 130
- PORT, F.K., VANDEKERKHOVE, K.M., KUNKEL, S.L., KLUGER, M.J., **1987**
The role of dialysate in the stimulation of interleukin-1 production during clinical
hemodialysis.
Am. J. Kidney Dis., 10(2), 118-122
- RAIJ, L., SHAPIRO, F.L., MICHAEL, A.F., **1973**
Endotoxemia in febrile reactions during hemodialysis
Kidney Int., 4, 57-60
- ROBINSON, P.J., ROSEN, S.M., **1971**
Pyrexial reactions during hemodialysis
Br. Med. J. 1, 528-530
- ROBINSON, J.R., O'DELL, M.C., TAKACS, J., BARNES, T., GENESIVI, C.,
1985
Depyrogenation by microporous membrane filters.
In Depyrogenation, PDA technical report n°7, Parenteral Drug Association Inc.
- RONALD, L.W., KLEIN, E., **1984**
Hypersensitivity in Hemodialysis
Artif. Organs, 8(3), 270-272

SHALDON, S., DESCHODT, G., BRANGER, B., GRANOLLERAS, C.,
BALDAMUS, C.A., KOCH, K.M., LYSAGHT, M.J., DINARELLO, C.A., 1985
Haemodialysis hypotension : the interleukin hypothesis restated.
Proc. Edta , 22, 229-243

SAMSON WRIGHT, 1973
Physiologie appliquée à la médecine
Ed Flammarion Médecine-Sciences, 12^{ème} édition.

SIMARD, L., 1989
Caractérisation biochimique et biologique des lipopolysaccharides des bactéries présentes
dans les bains de dialyse: *Pseudomonas cepacia* et *Pseudomonas testosteroni*. Etude de
leur transfert à travers la membrane de dialyse
Thèse n°201.89, Université Claude Bernard - Lyon 1

SOLUM, N.O., 1970
Some characteristics of the clottable protein of *Limulus polyphemus* blood cells
Thromb. Diath. Haemorrh., 23, 170

SOLUM, N.O., 1973
The coagulogen of *Limulus polyphemus* hemocytes. A comparison of the clotted and
non clotted forms of the molecule
Thomb. Res., 2, 55

SWEADNER, K.J., FORTE, M., NELSEN, L.L., 1977
Filtration removal of endotoxin in solution in different states of aggregation.
Appl. Environ. Microbiol. , 34(4), 382-385

TAI, J.Y., LIU, T.Y., 1977
Studies on *Limulus* lysate. Isolation of pro-clotting enzyme
J. Biol. Chem., 252, 2178

TAKAYAMA, K., QURESHI, N., RAETZ, C.R.H., RIBI, E., PETERSON, J.,
CANTRELL, J.L., PEARSON, F.C., WIGGINS, J., JOHNSON, A.G., 1984
Influence of fine structure of lipid a on limulus amoebocyte lysate clotting and toxic
activities.
Infect. Immun. , 45(2), 350-355

TSAI, C-M, FRASCH, C.E, 1982
A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels.
Anal. Biochem. , 119, 115-119

TUCKER, S.B., PIERRE, R.V., JORDON, R.E., 1977
Rapid indentification of monocytes in a mixed mononuclear preparation
J. Immun. Meth., 14, 267-269

TUFVESON, G., GEELINGS, W., BROYER, M., BRUNNER, F.P., BRYNGER, H.,
DYKES, S.R., EHRICH, J.H.H., FASSBINDER, W., RIZZONI, G., SELWOOD,
N.H., WING, A.J., 1989
EDTA registry centre survey, 1986
Nephrol. Dial. Transplant. 4, 161-171

TUTUNJIAN, R.S., 1982
Pyrogen removal by ultrafiltration.
Prog. Clin. Biol. Res. , 93, 319-327

VILLAROEL, F., 1984
Incidence of hypersensitivity in hemodialysis
Artif. Organs, 8(3), 278-280

WAMBERGUE, F., BENE, B., BENCHETRIT, C., CABRERA, N., 1984
Manifestations allergiques precoces liées a la contamination bactérienne du dialysat
Abstract Symposium on Biocompatibility, Grenoble

WESTPHAL, O., LÜDERITZ, O., BISTER, F., 1952
Über die extraktion von bakterien mit phenol/wasser
Z. Naturforschg. , 7b, 148-155

YOUNG, N.S., LEVIN, J., PRENDERGAST, R.A., 1972
An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: evidence for enzymatic
mediation
J. Clin. Invest. , 51, 1790-1797

ANNEXES

ANNEXE 1: DOSAGE DE L'ACTIVITÉ LAL

L'estimation de l'activité de nos échantillons vis-à-vis du Lysat d'Amœbocytes de *Limule* a été réalisée avec des kits de dosage LAL chromogénique. Nous avons utilisé, soit le kit "Coatest Endotoxin" (Kabi-Vitrum AB Stockholm, Suède), soit le kit "QCL-1000" (Witthaker Bioproducts Inc. Walkersville, Maryland).

50 µl de dilutions logarithmiques d'échantillons sont incubés à + 37°C avec 50 µl de Lysat d'Amœbocyte dans une plaque de microtitration à fond plat (Nunc). Après 11 ou 12 minutes, selon les lots de LAL, on ajoute 100 µl de substrat chromogénique et on laisse la réaction se développer durant 3 minutes pour le kit "Coatest Endotoxin" et 6 minutes pour le kit "QCL-1000". La réaction est stoppée par addition de 100 µl d'acide acétique à 50 %.

La densité optique de chaque cupule est lue à l'aide d'un spectrophotomètre pour microplaque "Titertek Multiscan" à 405 nm. L'activité spécifique est déterminée vis-à-vis d'une endotoxine de référence de *Escherichia coli* O111:B4 calibrée sur le standard E.C.5 de la F.D.A..

L'activité est exprimée en unité d'endotoxine (EU). Une unité d'endotoxine étant définie comme la réponse colorimétrique obtenue avec 0,1 ng de LPS de *E. coli* O111:B4.

**ANNEXE 2 : ETUDE DES CAPACITÉS DE RETENTION DES LPS
PAR LES MEMBRANES MODIFIÉES : RÉSULTATS D'IL-1**

ACTIVITE IL-1 INTRACELLULAIRE (DONNEUR 1)

Temps	SANG										BAIN			RPMI
	0	5	10	20	30	45	60	60	0	30	60			
AN 69	TEMPOIN	4488	3309	2654	3415	3870	3745	5428	4354	3646	2111	2486		
	POOL1	1852	1760	1397	3110	1524	1588	2230	1402	2209	4436	2234		
	POOL2	9710	12205	10306	6928	8542	8454	8358	6462	3785	8125	9844		
AN 69 + PVP	TEMPOIN	1833	1503	1983	2960	2849	2100	945	1729	2025	2174	2486		
	POOL1	2513	4502	3692	6109	10050	12062	10110	11623	12463	11829	2234		
	POOL2	10598	6005	5998	3736	6566	9379	5004	7925	5536	4801	9844		
AN 69 + PEI	POOL3	7436	5996	8662	10257	8966	11090	9704	17479	13234	13173	8576		
	TEMPOIN	1711	2711	1067	1517	1928	1395	1875	2160	1906	2219	2486		
	POOL1	7019	6103	8007	5868	13385	9608	7490	4202	3623	5421	8453		
AN 69 + ALBUMINE	POOL2	4285	4164	8567	11343	13369	9469	13894	13738	13349	13265	5836		
	POOL3	7037	9180	4243	10982	9531	9108	3960	8000	7005	8043	8576		
	TEMPOIN	2713	2614	1692	3285	2742	2899	1663	1937	2483	2492	1332		
AN 69 + ALBUMINE	POOL1	8848	3283	6542	9534	7946	7729	7796	8552	5855	3237	8453		
	POOL2	8121	8492	9864	7602	5661	9100	14806	19563	19156	10085	5836		
	POOL3	5711	5006	7606	8058	8175	11000	8000	9185	11407	10775	8576		

ACTIVITE IL-1 EXTRACELLULAIRE (DONNEUR 1)

Temps	SANG										BAIN			RPMI
	0	5	10	20	30	45	60	60	0	30	60			
AN 69	TEMPOIN	1463	1231	1371	2371	1532	1581	2411	1268	709	1146	2263		
	POOL1	807	2399	1981	2010	1966	1362	2258	7719	6720	10811	1085		
	POOL2	1139	1376	4092	5672	4533	1576	1393	1993	1232	1584	2072		
AN 69 + PVP	TEMPOIN	1172	1287	1050	646	975	1013	679	739	834	934	2263		
	POOL1	2241	2139	1754	2055	2675	2084	2821	8475	4868	5165	1085		
	POOL2	1047	1107	5253	4683	4445	1802	1175	1157	1381	1265	2072		
AN 69 + PEI	POOL3	2170	2301	2405	3112	2440	1899	1365	7646	7156	10542	1530		
	TEMPOIN	937	712	1109	1372	1487	1506	1183	997	903	1191	2263		
	POOL1	1528	1774	1833	1301	7420	1154	1119	9541	8052	6749	1478		
AN 69 + ALBUMINE	POOL2	777	1562	3226	2522	2632	1712	1167	10021	6939	7350	1331		
	POOL3	3077	1241	1116	1625	1426	1557	1412	10365	1643	4806	1530		
	TEMPOIN	1005	1332	1139	1123	1404	1519	1241	1210	987	997	1431		
AN 69 + ALBUMINE	POOL1	2021	880	1962	5750	7656	6817	4109	3244	2818	2151	1478		
	POOL2	1978	2716	1592	1828	2097	902	4599	7804	7520	6291	1331		
	POOL3	2029	1421	1262	1653	1733	3102	772	5358	7925	7012	1530		

ACTIVITE IL-1 INTRACELLULAIRE (DONNEUR 2)

	Temps	SANG							BAIN			RPMI
		0	5	10	20	30	45	60	0	30	60	
AN 69	TEMPOIN	21115	16185	21411	25066	21085	15628	12891	22571	18966	17604	26366
	ESSAI1	9667	15847	12008	22416	16648	15822	19454	25725	13880	17489	26366
	ESSAI2	15658	20328	19391	23136	15509	22806	19328	16916	14760	19458	10370
POLYSULFONE	TEMPOIN	16536	13306	17119	18680	17056	11498	11531	11885	12074	15002	10721
	ESSAI1	15171	15281	13560	10476	7466	8498	11803	16418	16871	14625	10721
	ESSAI2	9988	13744	10077	16403	19120	20697	15816	14982	12513	16239	12734
CUPROPHANE	TEMPOIN	16473	9442	13789	19346	15034	19708	13440	14389	9733	12274	12734
	ESSAI1	15194	14281	16296	13287	12506	10186	12907	13855	15002	14160	16988
	ESSAI2	14301	11597	12761	10200	13350	17954	15119	13113	12145	12470	16988
ESSAI3	11308	12325	3211	3278	7742	3260	6967	9690	3603	1830	16988	

ACTIVITE IL-1 EXTRACELLULAIRE (DONNEUR 2)

	Temps	SANG							BAIN			RPMI
		0	5	10	20	30	45	60	0	30	60	
AN 69	TEMPOIN	7072	6706	5846	5635	5224	5607	4411	6652	6051	4859	7939
	ESSAI1	4054	3921	2027	6929	4850	7375	8036	7594	9350	8974	7939
	ESSAI2	4827	4488	4888	6310	2344	5898	4600	6000	6486	6933	3600
POLYSULFONE	TEMPOIN	6216	8160	7058	7075	7407	4860	7345	5652	7150	5644	4427
	ESSAI1	6236	7730	8296	6580	5186	5876	7051	5015	8772	10055	4427
	ESSAI2	2634	3960	5163	5974	5756	6066	6353	7319	6273	6618	4636
CUPROPHANE	TEMPOIN	4985	7300	5221	4681	4396	4750	4741	4584	4884	3778	4636
	ESSAI1	3471	3408	5216	4368	3629	1740	3881	4410	4957	5320	3944
	ESSAI2	3541	4520	2696	1793	4234	3967	3119	2854	3620	7895	3944
ESSAI3	3706	2914	6413	5018	3748	3251	4086	5665	6265	6695	3944	

