
**Nanotechnologies — Essai de détection
d'endotoxines sur des échantillons
de nanomatériaux pour des systèmes
in vitro — Essai au lysat d'améboocytes
de *Limule* (LAL)**

*Nanotechnologies — Endotoxin test on nanomaterial samples for
in vitro systems — Limulus amoebocyte lysate (LAL) test*
(standards.iteh.ai)

[ISO 29701:2010](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/85734c9b-bb7a-4c33-b4f1-a5ace9e59209/iso-29701-2010)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/85734c9b-bb7a-4c33-b4f1-
a5ace9e59209/iso-29701-2010](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/85734c9b-bb7a-4c33-b4f1-a5ace9e59209/iso-29701-2010)



iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 29701:2010

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/85734c9b-bb7a-4c33-b4fl-a5ace9e59209/iso-29701-2010>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2010

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Version française parue en 2011

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
Introduction.....	v
1 Domaine d'application	1
2 Termes et définitions	1
3 Termes abrégés	2
4 Considérations préalables à l'essai.....	3
4.1 Conservation des nanomatériaux.....	3
4.2 Récipients.....	3
4.3 Manipulation des nanomatériaux	3
5 Échantillon à soumettre à essai.....	3
5.1 Dispersion aqueuse	3
5.2 Extrait aqueux.....	3
6 Préparation de l'échantillon à soumettre à essai.....	3
6.1 Méthode de dispersion	3
6.2 Méthode d'extraction.....	4
6.3 Concentration	4
6.4 Conservation de l'échantillon à soumettre à essai.....	4
6.5 Environnement du laboratoire	4
7 Méthodes d'essai.....	5
7.1 Principe.....	5
7.2 Autres méthodes d'essai	5
7.3 Sélection et validation de la méthode d'essai	6
7.4 Modes opératoires de l'essai	7
8 Évaluation des résultats	7
8.1 Généralités	7
8.2 Recommandations concernant l'application de l'essai.....	7
9 Rapport d'essai.....	7
Annexe A (informative) Exemples d'interférences potentielles dans l'essai LAL.....	9
Annexe B (informative) Méthode dite de coagulation	10
Annexe C (informative) Méthode photométrique.....	14
Annexe D (informative) Méthode cinétique	17
Bibliographie.....	20

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO 29701 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 229, *Nanotechnologies*.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 29701:2010](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/85734c9b-bb7a-4c33-b4fl-a5ace9e59209/iso-29701-2010)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/85734c9b-bb7a-4c33-b4fl-a5ace9e59209/iso-29701-2010>

Introduction

Les endotoxines (lipopolysaccharides LPS) sont l'un des constituants de la membrane externe de la paroi cellulaire de bactéries Gram-négatif telles que *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Neisseria* et *Haemophilus*. Chez les mammifères, entre autres les humains, elles peuvent être la cause de nombreuses réactions systémiques, telles que la fièvre, le syndrome de coagulation intravasculaire disséminée, l'hypotension, l'état de choc et le décès: les réponses sont déclenchées par la production de diverses sortes de cytokines, l'activation rapide du complément, l'activation rapide de la coagulation, etc. Les endotoxines sont présentes naturellement dans l'environnement. La plupart des échantillons de nanomatériaux destinés à des systèmes d'essai in vitro et in vivo nécessitant divers modes opératoires de préparation, des endotoxines peuvent contaminer ces nanomatériaux si les échantillons sont préparés sans y porter une attention particulière.

De nombreux systèmes d'essais sur cultures cellulaires in vitro et modèles animaux in vivo ont été développés et utilisés en vue d'effectuer des dépistages de toxicité ou de tester la biocompatibilité des nanomatériaux, ou d'effectuer des études de mécanisme de la toxicité éventuelle induite par des nanomatériaux. Dans le cadre de systèmes d'essai in vitro, des macrophages et autres cellules spécifiques de mammifères sont fréquemment utilisées en tant que cellules d'essai, notamment pour les nanomatériaux car elles représentent les principales cellules de protection de l'organisme. Toutefois, ces cellules sont éminemment réactives aux endotoxines, il est donc difficile de distinguer leur réponse aux endotoxines de celle aux nanomatériaux. En conséquence, une contamination par des endotoxines fausserait le résultat d'essais in vitro.

La contamination des échantillons d'essai par des endotoxines peut être réduite si des précautions adéquates sont mises en œuvre lors de la préparation de ces échantillons. Ainsi, la détection préalable d'endotoxines est nécessaire en vue d'en minimiser la contamination ou pour confirmer des niveaux non significatifs d'endotoxines dans l'échantillon d'essai. Il est également important de les quantifier en vue d'une interprétation adéquate des données obtenues dans les systèmes d'essai biologique in vitro.

Les endotoxines étant susceptibles de contaminer des instruments médicaux et des médicaments destinés à une administration parentérale, des méthodes d'essai quantitative et semi-quantitative in vivo et in vitro ont été développées pour tester la présence des endotoxines et sont utilisées à des fins réglementaires et en tant que procédures opératoires de laboratoire standardisées concernant les nanomatériaux (voir Référence [6]). Un essai portant sur les endotoxines bactériennes utilisant le réactif LAL (lysat d'améboocytes de Limule) a été développé sous la forme d'une méthode d'essai in vitro destinée à tester la présence d'une contamination par des endotoxines afin d'offrir une alternative à l'essai de pyrogénicité sur des lapins. Ces méthodes sont décrites dans les pharmacopées de nombreux pays.

La présente Norme internationale fournit des considérations concernant l'application de l'essai LAL aux échantillons de nanomatériaux destinés aux essais biologiques in vitro.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 29701:2010

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/85734c9b-bb7a-4c33-b4f1-a5ace9e59209/iso-29701-2010>

Nanotechnologies — Essai de détection d'endotoxines sur des échantillons de nanomatériaux pour des systèmes *in vitro* — Essai au lysat d'améboocytes de *Limule* (LAL)

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale décrit l'application d'un essai utilisant le réactif LAL (lysate d'améboocytes de limule) en vue d'évaluer des nanomatériaux destinés à des systèmes d'essai biologique sur cultures cellulaires *in vitro*. L'essai est approprié à une utilisation avec des échantillons de nanomatériaux dispersés dans un milieu aqueux, par exemple de l'eau, du sérum physiologique ou un milieu de réaction, ainsi qu'à des milieux incubés avec des nanomatériaux pendant un temps donné à 37 °C.

La présente Norme internationale est conçue pour des échantillons destinés à des systèmes *in vitro*, toutefois, les méthodes peuvent également être adaptées à des nanomatériaux étant administrés à des animaux par voies parentérales.

iTeh STANDARD PREVIEW

2 Termes et définitions (standards.iteh.ai)

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

2.1 coagulogène

protéine coagulable du LAL, connue pour jouer un rôle central dans la coagulation du lysate par les endotoxines

NOTE Un coagulogène dérivé de la Limule (Japanese horseshoe crab: *Tachypleus tridentatus*) se compose d'un total de 175 acides aminés pour un poids moléculaire de 19 723 (voir Référence [7]).

2.2 coaguline

fragments résultant du coagulogène après protéolyse limitée de l'enzyme de coagulation du LAL

NOTE Une coaguline dérivée de la Limule (Japanese Horseshoe Crab: *Tachypleus tridentatus*) se compose de fragments peptidiques N-terminaux (Ala1 – Arg18) et de fragments peptidiques C-terminaux (Gly47 – Phe175) (voir Référence [7]).

2.3 endotoxine

partie de la membrane externe d'une enveloppe cellulaire de bactérie à Gram-négatif

NOTE Les principaux principes actifs sont les lipopolysaccharides (LPS).

2.4 unité d'endotoxine UE

unité normalisée de l'activité d'endotoxine

NOTE 1 L'unité d'endotoxine a été définie par le Comité d'Experts de la Standardisation Biologique (CESB) de l'OMS en 1996 relative à l'activité de 0,1 ng de l'endotoxine de référence d'*Escherichia coli* 0113:HK10:K(-) ou 10 UE/ng (voir Référence [8]).

NOTE 2 UE équivaut à l'unité internationale (UI) de l'endotoxine.

2.5

lambda

λ

marque de sensibilité du LAL pour la méthode de coagulation ou pour la plus basse concentration en endotoxines sur la courbe de référence des méthodes chromogéniques ou turbidimétriques, exprimée en UE/ml

2.6

lysats d'améboocytes de Limule

LAL

extraits aqueux de globules sanguins provenant de la Limule, *Limulus polyphemus* ou *Tachypleus tridentatus*

2.7

lysats d'améboocytes de Limule

essai LAL

essai destiné au mesurage des endotoxines bactériennes au moyen d'un réactif de lysat d'améboocytes de Limule

NOTE L'essai LAL est désigné par «Essai de détection des endotoxines bactériennes (BET)» dans la pharmacopée.

2.8

densité optique

DO

absorbance optique d'un élément optique pour une longueur d'onde donnée par unité de distance

2.9

échantillon à soumettre à essai

dispersion aqueuse ou extrait aqueux de nanomatériaux à soumettre à essai

3 Termes abrégés

BET essai de détection des endotoxines bactériennes

CESB comité d'experts de la standardisation biologique

CSE étalon d'endotoxine de contrôle lyophilisé

DO densité optique

EF exempt d'endotoxines

I/EC contrôle de l'inhibition/exacerbation

LAL lysat d'améboocytes de Limule

LPS lipopolysaccharide

OMS Organisation Mondiale de la Santé

RSE étalon d'endotoxine de référence

UE unité d'endotoxine

4 Considérations préalables à l'essai

4.1 Conservation des nanomatériaux

En raison de leur importante surface, les nanomatériaux peuvent collecter de nombreux contaminants dont les endotoxines de l'environnement. Par conséquent, entre le moment de leur réception et de leur utilisation, les nanomatériaux doivent être collectés et conservés dans des récipients hermétiques exempts d'endotoxines (par exemple des récipients en verre). Des échantillons témoins, tels que des poudres d'oxyde de métal exemptes d'endotoxines comme le dioxyde de titane, le dioxyde de silicium, etc., doivent être utilisés pour vérifier l'absence de contamination par les endotoxines.

NOTE 1 Il est préférable d'éviter les plastiques tels que le polypropylène pour la conservation de nanomatériaux en raison de l'éventuelle interférence avec l'essai LAL, comme indiqué dans l'Annexe A.

NOTE 2 Les poudres d'oxyde de métal exemptes d'endotoxines peuvent être obtenues par traitement thermique (voir 4.2).

4.2 Récipients

Il convient de soumettre à essai la verrerie et les autres récipients thermostables utilisés pour la conservation des nanomatériaux et des échantillons à une température supérieure à 250 °C pendant au moins 30 min ou à toute autre combinaison de température et de temps validée (par exemple durant au moins 3 h à 180 °C et durant 1 min à 650 °C) afin d'éliminer les endotoxines. Il est possible d'utiliser des récipients stériles en polystyrène exempts d'endotoxine disponibles dans le commerce.

4.3 Manipulation des nanomatériaux

La poussière présente dans l'environnement intérieur contient habituellement des quantités significatives d'endotoxines. Le contact entre la poussière et les nanomatériaux au cours de l'échantillonnage et de la manipulation doit être évité avec soin. L'air du laboratoire doit être propre (recommandation de 6.5).

5 Échantillon à soumettre à essai

5.1 Dispersion aqueuse

Les nanomatériaux dispersés dans un liquide aqueux peuvent être soumis directement à un essai LAL ou après dilution dans une eau exempte d'endotoxines.

5.2 Extrait aqueux

Un milieu de réaction exempt d'endotoxines, une solution saline physiologique ou d'autres milieux d'extraction incubés avec des nanomatériaux peuvent servir d'échantillon à soumettre à essai pour un essai LAL.

6 Préparation de l'échantillon à soumettre à essai

6.1 Méthode de dispersion

Les dispersions à soumettre à essai peuvent être préparées par

- broyage manuel,
- fraisage mécanique, et/ou
- ultrasonication.

Le milieu de dispersion dépendra de l'objectif et de l'essai in vitro particulier.

NOTE Les nanomatériaux peuvent présenter une surface importante, une porosité ou une hydrophobie ainsi que d'autres propriétés susceptibles de rendre cette étape difficile. Il peut être, en conséquence, nécessaire de développer d'autres méthodes.

6.2 Méthode d'extraction

Les conditions d'extraction, telles que le milieu d'extraction, le temps d'incubation, la température d'incubation et la concentration de l'échantillon à soumettre à essai peuvent simuler les conditions d'incubation de l'essai in vitro concerné. Un milieu de réaction sans indicateur de pH (par exemple du rouge de phénol) ou une solution physiologique tamponnée sont préférés en tant que milieu d'extraction afin d'éviter toute interférence de couleur. Il convient que le milieu d'extraction soit certifié exempt d'endotoxines ou reconstitué à partir de réactifs exempts d'endotoxines. L'ajout d'antibiotiques et d'antimycosiques au milieu d'extraction peut être efficace pour empêcher respectivement la croissance bactérienne et fongique. Il convient que les effets d'interférence dus aux agents antibiotiques ajoutés à l'essai LAL soient validés (voir 7.3.3). Une fois l'extraction effectuée, le mélange d'extraction doit être centrifugé et il convient de récupérer le surnageant, servant d'échantillon pour l'essai LAL, dans des tubes ou des récipients à l'aide d'embouts de pipette, le tout étant exempt d'endotoxine. Les conditions d'extraction, notamment de centrifugation, doivent être justifiées et consignées. Les conditions de centrifugation doivent notamment être déterminées en fonction des nanomatériaux concernés.

NOTE 1 Le polysorbate 20 à 0,05 % est suggéré en tant que vecteur d'extraction pour une endotoxine dans l'air à partir de filtres en fibre de verre (voir Référence [9]).

NOTE 2 Un tensioactif à base de vitamine E à 0,1 % (vitamine E d- α -tocophéryl polyéthylène glycol-1000 succinate) s'est avéré améliorer l'extraction des endotoxines à partir de nano-objets en carbone (voir Référence [10]).

NOTE 3 Pour de plus amples informations concernant les méthodes d'extraction, voir l'ISO 10993-12:2007.

[ISO 29701:2010](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/85734c9b-bb7a-4c33-b4f1-a5ace9e59209/iso-29701-2010)

6.3 Concentration <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/85734c9b-bb7a-4c33-b4f1-a5ace9e59209/iso-29701-2010>

L'échantillon à soumettre à essai doit être préparé à la plus haute concentration possible dans une eau exempte d'endotoxines pour l'essai sur culture cellulaire in vitro concerné, le cas échéant.

6.4 Conservation de l'échantillon à soumettre à essai

Si possible, l'échantillon doit être soumis à essai dès que possible une fois la préparation effectuée afin d'éviter une dégradation des endotoxines ou une croissance bactérienne pouvant survenir lors de la conservation. L'échantillon doit être conservé dans un récipient hermétique et exempt d'endotoxines (voir 4.2) à une température comprise entre 2 °C et 8 °C. Si un échantillon à soumettre à essai est conservé plus de 24 h, la stabilité et l'homogénéité de l'échantillon à soumettre à essai dans les conditions de conservation doivent être vérifiées.

6.5 Environnement du laboratoire

6.5.1 Eau du robinet et propreté de l'air

L'eau du robinet et la poussière présente dans l'environnement intérieur contiennent habituellement des quantités significatives d'endotoxines. Les nanomatériaux doivent être manipulés dans un milieu et dans de la verrerie de laboratoire exempts d'endotoxines afin de garantir une préparation aseptisée de l'échantillon. Sauf justification contraire, une salle blanche, une hotte à air propre ou un dispositif équivalent de purification de l'air de classe ISO 5 (voir l'ISO 14644-1) doivent être utilisés en laboratoire si une contamination par des endotoxines dans l'air est avérée. Pour des recommandations concernant le dispositif de purification de l'air, voir l'ISO 14644-1, l'ISO 14644-2 et l'ISO 14644-7.

6.5.2 Matériel et verrerie de laboratoire

Il convient de soumettre à essai le matériel et la verrerie destinés à la préparation d'échantillons à une température supérieure à 250 °C pendant au moins 30 min ou à une autre combinaison de température et de temps validée (par exemple durant au moins 3 h à 180 °C et durant 1 min à 650 °C) afin d'éliminer les endotoxines. Les matériaux thermolabiles ou autres ne pouvant pas être soumis à un traitement thermique doivent être traités au moyen d'autres mesures visant à éliminer les endotoxines. Une méthode adéquate d'élimination des endotoxines consiste à rincer les matériaux au moyen d'eau exempte d'endotoxines après trempage dans une solution oxydante ou fortement alcaline. En cas d'utilisation d'une solution fortement alcaline ou oxydante, la méthode doit être validée afin de garantir qu'elle réduit la présence d'endotoxines et qu'aucun résidu restant au terme du traitement n'interfère avec l'essai. En ce qui concerne les verreries thermolabiles, telles que des récipients, des tubes, des embouts de micropipettes, des produits en matière plastique exempts d'endotoxines sont disponibles dans le commerce.

NOTE Il est préférable d'utiliser des produits en polystyrène en cas d'utilisation de produits en matière plastique.

6.5.3 Eau de rinçage

L'eau est l'une des sources d'endotoxines avérées dans le matériel et la verrerie de laboratoire. L'eau distillée peut être utilisée pour rincer le matériel et la verrerie après des traitements d'élimination des endotoxines. Toutefois, l'eau distillée préparée dans le laboratoire peut être contaminée par des endotoxines en raison d'un matériel inadapté ou d'une manipulation inappropriée, bien que la distillation se soit avérée efficace dans l'élimination des endotoxines provenant d'une eau contaminée (voir Référence [11]). Le niveau d'endotoxines dans l'eau distillée préparée dans le laboratoire doit être mesuré périodiquement afin de valider qu'il n'est pas significatif. Si la contamination par des endotoxines de l'eau distillée est inévitable, il convient d'utiliser de l'eau exempte d'endotoxines disponible dans le commerce.

(standards.iteh.ai)

7 Méthodes d'essai

ISO 29701:2010

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/85734c9b-bb7a-4c33-b4f1-a5ace9e59209/iso-29701-2010>

7.1 Principe

Les endotoxines activent un facteur du LAL, déclenchant des effets protéolytiques rapides (voir Référence [12]). L'enzyme de coagulation, qui est libérée de l'enzyme de pré-coagulation par l'un des facteurs activés, catalyse la protéolyse du coagulogène du LAL et les fragments obtenus, les coagulines, se lient spontanément les unes aux autres par une liaison disulfure entraînant la turbidité du LAL puis, finalement, entraîne la coagulation du lysat. La formation de ce gel de coagulation du lysat est principalement déterminée par une inspection visuelle par retournement des tubes à essai. Cette méthode n'implique aucun lecteur optique et les modes opératoires sont simples à réaliser. La méthode de coagulation présentant la plus grande sensibilité reposant sur l'utilisation de réactifs disponibles dans le commerce permet un mesurage de 0,015 UE/ml.

NOTE Un des modes opératoires pratiques pour la méthode de coagulation du lysat est décrit dans l'Annexe B.

7.2 Autres méthodes d'essai

7.2.1 Méthodes photométriques

La densité optique (DO) du mélange de réaction est mesurée après un certain temps de réaction. Deux techniques photométriques sont disponibles: la technique turbidimétrique consistant à mesurer la turbidité du mélange réactif et la technique chromogénique consistant à mesurer la p-nitroaniline (p-NA) libérée à partir d'un substrat synthétique tel que Boc-Leu-Gly-Arg-p-NA ou Boc-Thr-Gly-Arg-p-NA pour l'enzyme de coagulation. En raison de la faible sensibilité et de la difficulté technique à arrêter la progression de la turbidité à un temps précis, la méthode turbidimétrique simple est remplacée par la méthode turbidimétrique cinétique décrite en 7.2.2. Il existe au moins deux modes opératoires permettant de mesurer la p-NA dans le mélange de réaction:

— l'une mesure la DO de la p-NA directement à une longueur d'ondes de 405 nm;