

## Élimination des endotoxines, RNases, DNases et bactéries grâce au PURELAB Option-Q équipé d'un Biofiltre

### Performances du Biofiltre ELGA monté sur un PURELAB Option-Q

#### Spécifications

- Endotoxines <0,001 EU/ml
- RNase <0,002 ng/ml
- DNase <20 pg/ml (<0,02 pg/μl)
- Bactéries <10 CFU/100ml (<0,1 UFC/ml)

Le modèle Option-Q produit de l'eau ultrapure directement à partir d'une alimentation en eau potable. Équipé d'un Biofiltre ELGA LabWater, il fournit une eau effectivement exempte d'impuretés biologiquement actives.

Ceci constitue la garantie d'une eau utilisable dans les applications biochimiques telles que la culture cellulaire.

### Endotoxines

Les endotoxines sont des lipopolysaccharides (LPS) issus de la membrane externe des bactéries gram-négatives viables. Elles se libèrent lorsque la cellule bactérienne meurt.

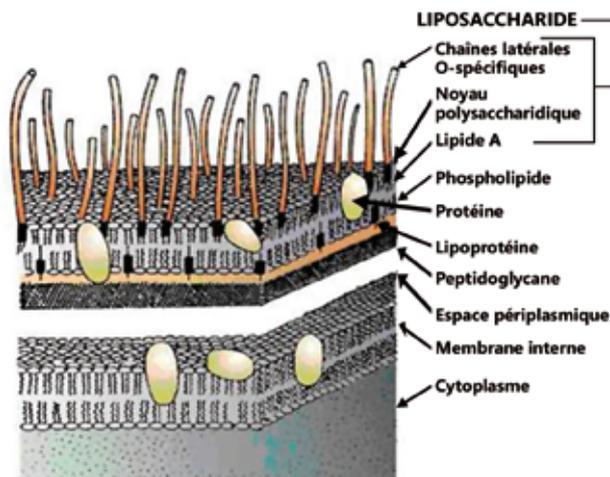


Schéma de la membrane d'une cellule gram-négative

Les endotoxines présentent des charges négatives à pH >2 et peuvent être efficacement retenues par des filtres chargés positivement tels que le Biofiltre ELGA LabWater. Les filtres chargés créent un obstacle minime à l'écoulement de l'eau et sont à retenir de préférence pour les applications au point d'utilisation où on les utilise comme stade final de toute une série de techniques de purification.



Les endotoxines interagissent avec les cellules en provoquant un large éventail d'effets nuisibles (réf. 1. Dawson et réf. 2. Nagano). D'autres applications telles que la fécondation in vitro (réf. 3. Dumoulin) et les cultures cellulaires (réf. 4. Stacey) y sont très vulnérables.

Les expériences impliquant la division cellulaire, l'électrophorèse et autres procédés biochimiques gagnent en fiabilité à l'élimination des endotoxines.

## Mise à l'épreuve aux endotoxines

Le Biofiltre a été mis à l'épreuve par un apport continu de teneurs élevées d'endotoxines dans l'eau envoyée au filtre chargé positivement. La concentration en endotoxines a ensuite été mesurée dans l'eau produite à l'aide du test sur lysat d'amibocytes de limule (analyse cinétique turbidimétrique).

La plupart des doses d'épreuve d'endotoxines dépendent de LPS purifiés. L'équipe de recherche d'ELGA LabWater produit ses propres LPS à partir des bactéries déjà présentes dans l'eau purifiée. Ceci a été mis au point pour imiter un environnement de mise à l'épreuve réaliste.

Au départ, les bactéries présentes dans l'eau purifiée sont isolées. Les microorganismes sont inoculés dans une eau peptonée puis étuvés à 27 °C. Le produit est autoclavé à plusieurs reprises et filtré à l'aide d'une membrane filtrante de 0,45µm, ce qui permet d'obtenir un concentré d'endotoxines.

Chaque épreuve, d'une durée de 5 minutes, a permis d'obtenir les valeurs d'épreuve totale ci-dessous. Même à plus de 90 UE/ml et avec une charge totale de près de 800 000 UE, aucune endotoxine (<0,001 UE/ml) n'a pu être détectée dans l'eau produite.

Dose d'épreuve (UE/ml)	0,02	2,83	14,00	48,40	90,70
Total de l'épreuve (UE)	100	14250	84250	326250	779750
Après le Biofiltre (UE/ml)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Réduction logarithmique	>1,3	>3,5	>4,1	>4,7	>5,0

En pratique, la teneur en endotoxines de l'eau d'alimentation du filtre sera très faible (<0,1 UE/ml). Pour imiter plus étroitement ces conditions, le filtre a ensuite été testé sur une période prolongée avec une alimentation nominale à 1 UE/ml. Aucune endotoxine (<0,001 UE/ml) n'a pu être détectée après le passage de 800 litres d'eau contenant 1 UE/ml.

## DNase et RNase

La présence possible d'autres espèces biologiquement actives, telles que les RNases et DNases, dans l'eau purifiée pose également des soucis.

La présence de ces espèces dans l'eau purifiée pourrait provoquer de sérieuses interférences. Cependant, un milieu d'échange ionique et l'exposition à la lumière UV oxydante permettent de les éliminer et on ne les retrouve pas dans l'eau provenant de systèmes bien conçus qui bénéficient d'une désinfection et d'un entretien adéquats.

Les versions « maison » améliorées des procédures de test Ambion® Alert, reposant sur l'utilisation de substrats à RNase ou DNase clivables à marquage fluorescent, ont été utilisées pour la détection. Les résultats des tests montrent des niveaux de détection de la RNase très faibles, <0,002 ng/ml, et des niveaux de DNase <20 pg/ml. Même avec ces niveaux élevés de sensibilité, l'eau produite par l'Option-Q équipé d'un Biofiltre s'est avérée effectivement sans RNase ni DNase (RNase <0,002 ng/ml, DNase <0,02 ng/ml). À ces niveaux, l'eau purifiée sortant de l'Option-Q équipé d'un Biofiltre peut être utilisée à la place de l'eau traitée au diéthylpyrocarbonate



(DEPC) (sous réserve d'une désinfection régulière et d'un entretien conforme aux recommandations d'ELGA LabWater).

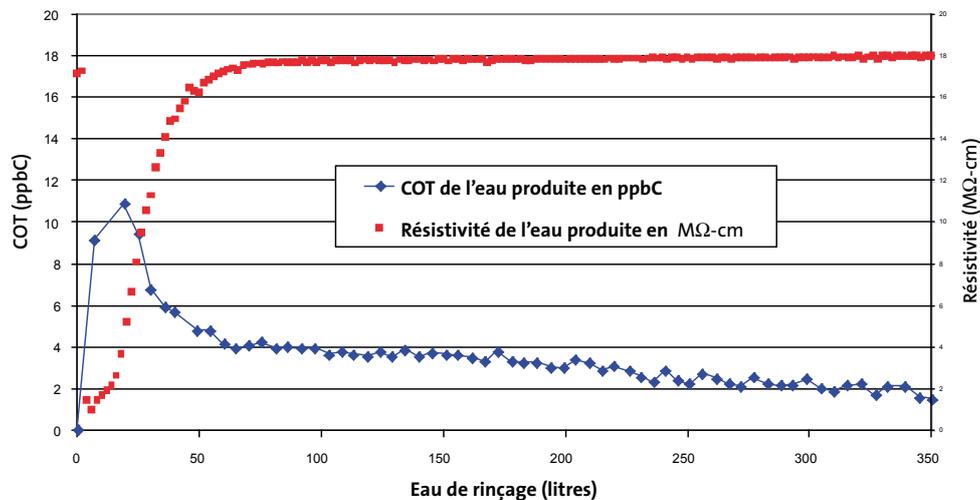
Pour pousser plus loin l'essai du système, le réservoir de stockage de l'Option-Q a été rempli d'une dose d'épreuve de 1 mg/l de RNase A et de DNase, c'est à dire un facteur de 500 000 voire plus au-dessus de la limite de détection. L'eau produite s'est avérée effectivement exempte de RNase et de DNase (RNase <0,002 ng/ml, DNase <0,02 ng/ml).

## Rinçage du COT et de la résistivité

Tout en éliminant les éventuelles endotoxines dans l'eau produite par l'appareil, ces dispositifs au point d'utilisation ne doivent pas contaminer l'eau. Le rinçage rapide de la résistivité et du COT (carbone organique total) des filtres neufs lors de leur première utilisation est un avantage

considérable et constitue une bonne indication d'une contribution très faible sur la durée à la contamination de l'eau produite. Il s'agit d'un point crucial car il est impossible d'assurer le contrôle continu de la pureté de l'eau après le filtre. Le rinçage rapide du Biofiltre, à la fois en termes de COT et de résistivité, est représenté ci-dessous

### Rinçage du COT et de la résistivité du Biofiltre

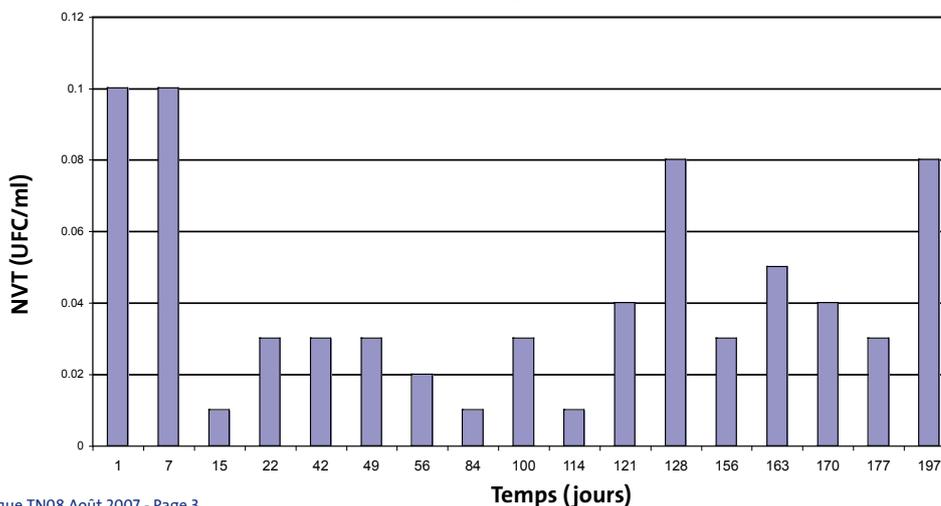


## L'épreuve des bactéries

Dans l'Option-Q, les concentrations en bactéries sont maintenues à des niveaux très faibles par la filtration initiale assurée par osmose inverse et par la recirculation ultérieure à travers une chambre à UV qui expose l'eau à une lumière UV intense à 254 et 185 nm. La formation inévitable d'un film biologique est limitée par une désinfection régulière. Les traces finales de bactéries sont éliminées par le Biofiltre qui assure une filtration bactérienne à 0,2µm. Exposé à une solution d'alimentation d'épreuve contenant  $1 \times 10^7$  UFC/ml, le Biofiltre a complètement éliminé les bactéries, soit une réduction logarithmique >8.

Les valeurs classiques (numération viable totale - NVT) à la sortie d'un Option-Q équipé d'un Biofiltre sur une période de 6 mois sont mises en évidence dans le graphique ci-dessous.

### NVT à la sortie d'un Option-Q avec Biofiltre



## Résumé

Le Biofiltre, lorsqu'il équipe l'Option-Q, se montre très efficace pour produire une eau exempte d'impuretés biologiquement actives. Ceci rend son utilisation tout indiquée dans les applications qui exigent une eau ultrapure exempte d'endotoxines, une eau sans bactéries et une eau ultrapure sans nucléases.

## Références

- Ref 1: Dawson ME (1998) LAL update. Associates of Cape Cod; Vol. 16: 1-4  
Ref 2: Nagano M, Takahashi Y, Katagiri S (1999) J. Reprod. Dev.; 45: 239-242  
Ref 3: Dumoulin JC, Menheere PP, Evers JL (1991) Human Reproduction; 6: 730-734  
Ref 4: Stacey G (2007) in Medicines from Animal Cell Culture. Stacey G, Davis J. John Wiley & Sons, Chichester, Chapitre 31