

Lysat d'améboocyte de *limule*

FLACON À USAGE MULTIPLE DE PYROTELL®

Fabriqué par :  ASSOCIATES OF CAPE COD INCORPORATED
124 Belmont St., Salem Inn Drive • Falmouth, MA 02536 USA

Téléphone : (508) 540-3444
Numéro vert : (888) 395-2221
Fax : (508) 540-8680
Assistance technique : (800) 848-3248
Service client : (800) 525-8378

PN000858- FR rev8 2 MAI 2023

Réactif

Le lysat d'améboocyte de *limule* (LAL) Pyrotell® est conditionné sous forme lyophilisée dans des flacons de 2 et de 5 mL.

Associates of Cape Cod, Inc. propose des lots individuels de Pyrotell® dans une plage de sensibilités allant de 0,03 à 0,25 UE/mL selon l'étalon de référence des endotoxines USP (également appelée endotoxine étalon de référence ou RSE). La sensibilité (λ) est la concentration minimale en RSE qui produit un caillot de gel ferme dans des conditions normales. La sensibilité du lot (UE/mL) est imprimée sur l'étiquette de l'emballage et du flacon. Préciser la sensibilité souhaitée lors de la commande.

Utiliser le Pyrotell® uniquement à des fins de diagnostic in vitro. Ne pas l'utiliser pour la détection de l'endotoxémie. La toxicité de ce réactif n'a pas été déterminée ; par conséquent, une attention particulière doit être exercée lors de la manipulation de Pyrotell®.

Reconstituer le Pyrotell® comme suit :

1. Tapoter sur le flacon de Pyrotell® pour faire descendre le LAL libre en bas du flacon. Enlever la capsule et casser le vide en soulevant le bouchon gris. Ne pas contaminer l'ouverture du flacon. Ne pas injecter par le bouchon ni le réutiliser. La présence d'une petite quantité de LAL sur le bouchon n'affecte pas le test. Couvrir le flacon de Parafilm « M »® (American National Can™) lorsqu'il n'est pas utilisé.
2. Reconstituer Pyrotell® avec de l'eau de réactif LAL (LRW, voir « Réactifs de test ») ou un tampon compatible (Pyrosol® ou Pyrosol® avec indicateur de pH ou Glucashield®, disponibles tous auprès d'Associates of Cape Cod, Inc.). Ajouter 2,0 ou 5,0 mL comme indiqué sur l'étiquette du flacon. La pastille lyophilisée de LAL se dissout en quelques minutes. Avant utilisation, mélanger délicatement le contenu du flacon pour en garantir l'homogénéité. Un mélange trop vigoureux peut causer un moussage excessif qui peut entraîner une perte de sensibilité.

Conditions de stockage

Le Pyrotell® lyophilisé est relativement stable à la chaleur. S'il est conservé au réfrigérateur, il gardera sa pleine activité jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Dès réception, conserver le produit à une température de -20 à +8 °C. Les températures inférieures à -20 °C rétrécissent le bouchon, entraînant une perte de vide et une contamination possible du Pyrotell®. Des températures supérieures à 37 °C peuvent causer une détérioration rapide du Pyrotell® lyophilisé, comme en témoignent la perte de sensibilité et un jaunissement marqué du produit. Pyrotell® est expédié avec des sachets froids dans des contenants isolés pour le protéger des températures élevées.

Le réactif Pyrotell® reconstitué est généralement transparent et légèrement opalescent. Un lot présentera occasionnellement une légère turbidité uniforme. La présence de petites fibres ou de filaments n'indique pas une contamination ni n'affecte l'activité ; cependant, une précipitation de flocculent ou une couleur jaune distincte indiquent la détérioration.

Le réactif Pyrotell® reconstitué est moins stable que le produit lyophilisé ; les flacons peuvent être maintenus jusqu'à 24 heures entre 2 et 8 °C. Le réactif Pyrotell® reconstitué peut être congelé une seule fois. Le produit conservera son activité pendant trois mois s'il est congelé immédiatement après reconstitution et maintenu à une température inférieure ou égale à -20 °C. Après décongélation, il convient d'appliquer les mêmes critères visuels de qualité que pour la reconstitution initiale.

Collecte et préparation de l'échantillon

Les échantillons doivent être collectés de façon aseptique dans des contenants non pyrogènes. L'utilisation d'une verrerie dépyrogénée ou de plastique qualifié (selon l'USP (9)) stérile jetable est recommandée pour minimiser l'adsorption de l'endotoxine par les surfaces du contenant. Tous les contenants en plastiques ne sont pas exempts d'endotoxines détectables et une substance qu'il est possible d'extraire de certains types peut interférer avec le test LAL. Les contenants (choisis aléatoirement à partir d'un lot) peuvent être rincés avec un petit volume d'eau de réactif LAL (à température ambiante pendant une heure), et la solution de rinçage résultante peut être analysée comme un échantillon pour déterminer si le lot est acceptable.

Le pH du mélange réactionnel (échantillon dilué ajouté au Pyrotell®) doit être de 6 à 8. Ajuster le pH de l'échantillon en ajoutant du HCl, NaOH (exempt d'endotoxines détectables), ou un tampon compatible (voir n° 3 ci-dessous). Diluer la solution concentrée de HCl ou de NaOH avec de l'eau de réactif LRW et utiliser des quantités normales qui n'entraîneront pas une dilution significative de l'échantillon de test lorsqu'elle est ajustée. Ne pas ajuster le pH d'une solution saline ou de l'eau non tamponnées.

Les substances qui dénaturent les protéines, chélatent les cations, se lient aux endotoxines, ou altèrent l'état hydrophobe des endotoxines peuvent interférer avec le test. Une interférence peut être détectée comme la récupération d'une quantité d'endotoxines sensiblement supérieure ou inférieure à celle prévue lorsqu'une quantité connue de l'endotoxine étalon est ajoutée à l'échantillon (consulter la rubrique « Limitations de la procédure »). Dans la plupart des cas, la dilution de l'échantillon réduit la concentration et l'activité des substances interférentes tout en donnant des résultats de test valides. Les contrôles et schémas de dilution appropriés sont abordés sous « Procédure de test. »

Les échantillons doivent être testés dès que possible après la collecte. Il est préférable de congeler les échantillons non stériles qui seront stockés ou expédiés avant le test. Les échantillons pour lesquels il est attendu d'obtenir de faibles concentrations d'endotoxine (moins de 1 UE/mL) doivent être testés pour la perte d'endotoxine pendant le stockage.

Procédure de test

Réactifs de test

1. Flacon à usage multiple de Pyrotell® (voir description et méthode de reconstitution dans la rubrique ci-dessus).
2. LRW, non fournie avec Pyrotell® ; commander séparément. Le Pyrotell® lyophilisé doit être reconstitué avec de l'eau qui ne présente aucune endotoxine détectable dans le test LAL. Les sources d'eau recommandées incluent l'eau stérile Associates of Cape Cod, Inc. ou l'eau stérile USP pour irrigation ou injection (EPI stérile, sans bactériostatique). La limite d'endotoxines relative à l'eau USP pour irrigation ou injection est de 0,25 UE/mL ; par conséquent, l'eau pour irrigation ou injection peut présenter des endotoxines détectables lorsqu'elle est testée avec un Pyrotell® plus sensible. Pour certifier un nouveau lot d'eau en tant que LRW, reconstituer le Pyrotell® et diluer l'endotoxine étalon avec le nouveau lot d'eau pour confirmer la sensibilité du Pyrotell®. Si la sensibilité du lot au test est confirmée et que le contrôle négatif ne montre aucune augmentation de la viscosité et aucune précipitation flocculeuse, l'eau peut être utilisée. Utiliser de la LRW pour reconstituer le Pyrotell® et les étalons d'endotoxines et pour diluer les étalons d'endotoxines et les échantillons testés.
3. Tampon, non fourni avec Pyrotell® ; commander séparément si nécessaire. Le tampon Pyrosol® (réf. catalogue BR051 ou BC554) ou le tampon Glucashield® (réf. catalogue GB051) peut être utilisé à la place de l'eau de réactif LAL pour reconstituer le Pyrotell® afin de permettre de pallier un problème de pH de l'échantillon ou une interférence avec des glucanes.
4. Endotoxine standard, non fournie avec Pyrotell® ; commander séparément. L'endotoxine étalon de contrôle (CSE), réf. catalogue E0005, obtenue auprès d'Associates of Cape Cod, Inc., est utilisée pour confirmer la sensibilité du Pyrotell®, valider le produit et préparer des contrôles d'inhibition. Chaque flacon contient un poids mesuré d'endotoxines. L'étalon de référence des endotoxines USP peut être obtenu auprès de l'U.S. Pharmacopoeial Convention, Inc. Suivre les instructions du fabricant pour la reconstitution et le stockage des endotoxines étalons. Les lots de CSE peuvent présenter différentes puissances (UE/ng) quand ils sont testés avec différents lots de Pyrotell®. Demander un certificat d'analyse pour la puissance d'une endotoxine étalon de contrôle avec un lot spécifié du Pyrotell®.

Matières et équipements (non fournis)

1. Tubes réactionnels, 10 x 75 mm, dépyrogénés, verre sodocalcique (réf. catalogue TS050). Certaines marques présentent des propriétés inhibitrices avec certains lots de Pyrotell®. Des tubes dépyrogénés sont disponibles auprès d'Associates of Cape Cod, Inc.

2. Bain-marie sans circulation ou incubateur à sec capable de maintenir une température de 37 ± 1 °C.
3. Racks à tubes à essais pour maintenir et/ou incuber les tubes réactionnels.
4. Pipettes, dispositifs de pipetage automatique avec embouts de pipettes, ou dispositifs de pipetage répété avec cylindres de seringue en plastique. Des consommables stériles sont recommandés.
5. Agitateur-mélangeur de type vortex.
6. Parafilm « M »®. Le côté en contact avec le support en papier est normalement non pyrogène.
7. Tubes de dilution non pyrogènes d'un volume suffisant pour diluer l'étalon d'endotoxines ou l'échantillon de test, par exemple réf. catalogue TB240, TB013 ou TB016C. Voir « Collecte et préparation de l'échantillon » pour d'autres contenants convenables pour les dilutions.
8. Four à air chaud capable d'atteindre 250 °C pour la dépyrogénéation de la verrerie. Les réglages de temps et de température minimum couramment utilisés sont de 30 minutes à 250 °C (1, 10).

Contrôles

Les contrôles sont nécessaires pour assurer la validité du test. Les procédures recommandées sont détaillées USP (1).

1. Contrôles d'endotoxine

- a. Série étalon d'endotoxines. Préparer un nouveau jeu de dilutions en série appropriées à partir de la solution d'endotoxine mère et mélanger chaque dilution à l'aide d'un agitateur-mélangeur vortex pendant au moins 30 secondes. Diluer de façon à ce que la série finale de dilutions doubles englobe la sensibilité (λ) du Pyrotell®. Des concentrations de 2 λ , λ , 0,5 λ et 0,25 λ sont recommandées pour confirmer la sensibilité du Pyrotell®. Utiliser aussi peu de dilutions que possible avec des volumes de pipette appropriés pour maximiser la précision.
- b. Des contrôles positifs peuvent être utilisés en l'absence d'une série de concentrations étalons pour le test des limites selon l'USP (1). La concentration du contrôle positif doit être de 2 λ .
- c. Les contrôles positifs du produit sont des contrôles d'inhibition et se composent de l'échantillon ou de l'échantillon dilué auquel l'endotoxine étalon est ajoutée. La concentration finale en endotoxines ajoutées dans l'échantillon de test doit être de 2 λ .

2. Contrôles négatifs

Le(s) contrôle(s) négatif(s) de LRW doivent être inclus dans chaque lot d'échantillons testés. Lors de la réalisation du test pour les facteurs interférents (1), l'échantillon utilisé pour diluer l'endotoxine étalon est également traité comme un contrôle négatif.

Préparation de l'échantillon pour le test des limites ou l'analyse quantitative

Soit diluer l'échantillon jusqu'à la concentration requise pour effectuer le test des limites (réussite/échec) (1) ou pour effectuer une analyse quantitative en testant une série de concentrations (des exemples des deux types de tests figurent dans la rubrique « Résultats et interprétation »). Les dilutions peuvent être effectuées dans des tubes de dilution et le volume testé transféré dans les tubes réactionnels, ou les dilutions peuvent être effectuées directement dans les tubes réactionnels pour laisser le volume testé, soit 0,1 mL, dans chaque tube. La dilution testée dans le cadre du test des limites est déterminée à partir de la sensibilité du Pyrotell® et de la limite d'endotoxines de l'échantillon. Se reporter à « Limitations de la procédure » pour une explication et le calcul de la dilution maximale acceptable (MVD).

Réalisation du test

Une **technique cohérente** est nécessaire pour obtenir des résultats satisfaisants.

1. Ajouter 0,1 mL de Pyrotell® reconstitué dans chaque tube réactionnel contenant 0,1 mL de l'échantillon de test ou de contrôle. Utiliser une pipette graduée (par incréments de 0,1 mL) ou un dispositif de pipetage automatique ou répété. Ajouter le Pyrotell® au(x) contrôle(s) négatif(s) en premier et de la concentration la plus faible à la plus élevée dans chaque série de tests où la contamination par transfert peut poser un problème. Il est recommandé d'utiliser une pipette ou une pointe de pipette neuve pour chaque entrée dans le flacon de Pyrotell®. Agiter vigoureusement le rack à tubes pendant 20 à 30 secondes pour garantir un mélange homogène. S'il n'y a que quelques tubes, chacun peut être mélangé à l'aide d'un agitateur-mélangeur vortex pendant 1 à 2 secondes. Le fait de ne pas bien mélanger est une cause fréquente de tests insatisfaisants.

2. Placer les tubes réactionnels dans de l'eau ou dans un bain sec à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 60 ± 2 minutes. La réaction commence lorsque le LAL est ajouté à l'échantillon de test mais ne se poursuit pas à un rythme optimal tant que le mélange n'atteint pas 37°C . Si un grand nombre d'échantillons sont testés en parallèle, les tests doivent être groupés en lots et lancés à des intervalles permettant la lecture de chaque échantillon dans les délais impartis.

Ne pas toucher les tubes réactionnels pendant la période d'incubation. La réaction de gélification est délicate et peut se terminer de façon irréversible si les tubes sont manipulés, agités ou soumis à des vibrations. Ne pas utiliser un bain-marie avec un agitateur ou une autre source de vibration. Immerger les tubes au-dessus du niveau du mélange réactionnel, mais pas trop profondément pour qu'ils ne flottent ou ne se déplacent pas dans les racks.

3. Retirer et lire les tubes réactionnels un à la fois directement de l'intérieur de l'eau ou du bain sec. Ne pas essayer les tubes et ne pas cogner le côté du rack pendant leur retrait. Retourner le tube d'un seul mouvement régulier ; ne pas s'interrompre à mi-chemin lors du retournement sauf s'il est évident que le gel ne s'est pas formé. Un test positif est indiqué par la formation d'un gel qui ne s'affaisse pas lorsque le tube est retourné.

Résultats et interprétation

Exemple de série étalon d'endotoxines

Confirmer la sensibilité du Pyrotell® et former le laboratoire ou le technicien en effectuant le test LAL sur une série de concentrations en endotoxines étalons connues (1) qui englobe la sensibilité indiquée sur l'étiquette (c.-à-d. 2λ , λ , $0,5\lambda$ et $0,25\lambda$). Pour cet exemple, la sensibilité du Pyrotell® (λ) est de $0,25 \text{ UE/mL}$:

Concentration en endotoxines	Résultat du test
0,5 UE/mL (2λ)	+
0,25 UE/mL (λ)	+
0,125 UE/mL ($0,5\lambda$)	-
0,06 UE/mL ($0,25\lambda$)	-
LRW (contrôle négatif)	-

Le résultat final de cette analyse est défini comme étant la concentration minimale en endotoxines permettant d'obtenir un test positif. La sensibilité indiquée sur l'étiquette du Pyrotell® est confirmée si le résultat final est λ plus ou moins une dilution double. Dans cet exemple, la concentration en endotoxines dans le dernier tube positif de la série est de $0,25 \text{ UE/mL}$ ou λ ; la sensibilité est donc confirmée. Le test serait valide (sensibilité confirmée) si le résultat final était de $0,125$ à $0,5 \text{ UE/mL}$ (l'erreur de la méthode). Pour afficher un résultat final de $0,125 \text{ UE/mL}$, le niveau de $0,06 \text{ UE/mL}$ doit être présent dans la série et être négatif.

Lorsque l'analyse d'endotoxines est répétée, la sensibilité est exprimée comme la moyenne géométrique (MG) des sensibilités individuelles :

$$MG = \text{antilog} ((\Sigma e)/f)$$

où Σe = somme du logarithme des résultats finaux, et f = nombre de résultats finaux répétés.

Le **contrôle négatif** de l'eau de réactif LRW doit donner un test négatif. Si le contrôle négatif coagule, l'eau de réactif LRW, la verrerie, ou le Pyrotell® est contaminé. Le mélange doit être transparent sans augmentation de la viscosité. Une précipitation floconneuse indique une concentration en endotoxines inférieure à la sensibilité du Pyrotell®.

En l'absence de la série d'endotoxines (1), un **contrôle positif** peut être inclus avec les tests. Le contrôle positif à 2λ est le niveau de $0,5 \text{ UE/mL}$ dans l'exemple ci-dessus. Si le contrôle positif est négatif, la sensibilité du Pyrotell® est inférieure au double de la sensibilité indiquée sur l'étiquette et le test de l'échantillon est invalide. Une perte de sensibilité peut signifier que le Pyrotell® s'est détérioré, que l'endotoxine a perdu de sa puissance (souvent à cause de l'adsorption à la surface du contenant), ou que le test n'a pas été effectué correctement.

Exemple de test des limites (réussite/échec)

Il est possible de tester une concentration d'échantillon avec une sensibilité donnée du Pyrotell® et de faire en sorte que le résultat indique si l'échantillon de test contient ou non plus ou moins d'endotoxines que sa limite. Dans cet exemple, la concentration de l'échantillon est de 1 mg/mL et la limite d'endotoxines souhaitée ou prédéterminée pour l'échantillon est de 3 UE/mg (consulter la rubrique « Limitations de la procédure »). La limite exprimée en UE/mL ,

$$(3 \text{ UE/mg}) (1 \text{ mg/mL}) = 3 \text{ UE/mL},$$

est supérieure à la sensibilité du Pyrotell®, $0,25 \text{ UE/mL}$, l'échantillon peut donc être dilué pour effectuer un test dont l'issue est une réussite ou un échec. Déterminer la dilution de l'échantillon qui indiquera une réussite, $< 3 \text{ UE/mL}$, ou un échec, $\geq 3 \text{ UE/mL}$, en divisant la limite d'endotoxines en UE/mL par la sensibilité du LAL :

$$3 \text{ UE/mL} / 0,25 \text{ UE/mL} = 12.$$

Combiner une part d'échantillon avec 11 parts de LRW pour préparer la dilution 1:12 et tester. Le résultat indiquera si l'échantillon a réussi le test à la limite de 3 UE/mL . Des contrôles positifs du produit sont inclus à la dilution de l'échantillon pour écarter la possibilité de faux négatifs.

Exemple d'une analyse de quantification

L'endotoxine est quantifiée dans une analyse en trouvant le résultat final dans une série de dilutions d'échantillon. Dans l'exemple ci-dessous, l'échantillon est dilué avec de la LRW et les dilutions du tableau sont testées ; λ est de $0,25 \text{ UE/mL}$. Les résultats sont soit positifs soit négatifs.

Dilution de l'échantillon	Résultat du test
non dilué	+
1:2	+
1:4	+
1:8	-
1:16	-
1:32	-
contrôle négatif	-

Pour calculer la concentration en endotoxines dans l'échantillon, multiplier la sensibilité du Pyrotell® (λ) par la valeur réciproque de la dilution au point final :

$$\text{Conc.} = (\lambda) (4/1) = (0,25 \text{ UE/mL}) (4) = 1 \text{ UE/mL}.$$

La concentration pour les analyses répétées est exprimée sous forme de moyenne géométrique.

Un **contrôle positif du produit** (échantillon dopé à l'endotoxine étalon à 2λ) doit être présent et mener à un test positif pour exclure les faux négatifs. Si le contrôle positif du produit est négatif et le contrôle positif est positif, l'échantillon inhibe le test LAL. L'échantillon doit être réanalysé à une plus grande dilution (sans dépasser la MVD ; consulter la rubrique « Limitations de la procédure »).

Limitations de la procédure

La procédure est limitée par la capacité de l'échantillon à inhiber ou à désinhiber le test LAL. Si la procédure ne peut pas être validée (1) à une dilution d'échantillon ne dépassant pas la dilution maximale acceptable (MVD), le test LAL ne peut pas remplacer le test pyrogène USP. La MVD est calculée comme suit :

$$\text{MVD} = (\text{limite d'endotoxines}) (\text{concentration de la solution d'échantillon}) / (\lambda)$$

où λ est la sensibilité étiquetée en UE/mL .

Selon l'USP (1), la limite d'endotoxines pour les médicaments parentéraux est définie sur la base de la dose comme K/M, où K est le de dose seuil pyrogène d'endotoxines par kg de poids du corps ($0,2 \text{ UE/kg}$ pour les médicaments administrés par voie intrathécale et 5 UE/kg pour tous les autres produits parentéraux) et M est la dose maximale chez l'homme.

Selon l'USP (12), la limite d'endotoxines pour les dispositifs médicaux finis ne dépasse pas 20 UE/dispositif et $2,15 \text{ UE/dispositif}$ pour les dispositifs en contact avec le liquide cérébro-spinal. La limite d'endotoxines pour l'extrait de dispositif est calculée comme : $(K \times N) / V$, où K est la limite pour chaque dispositif, N est le nombre de dispositifs extraits et V est le volume total de l'extrait.

La trypsine provoquera un faux résultat positif à moins d'être dénaturée par un traitement thermique avant le test. Des substances telles que le sang, le sérum et le plasma doivent être traitées pour inactiver les inhibiteurs avant le test (11).

Valeurs attendues

Les endotoxines peuvent être quantifiées si la concentration est supérieure ou égale à la sensibilité du Pyrotell®. Les substances dérivées de sources biologiques, même après purification biochimique, peuvent encore contenir des niveaux mesurables d'endotoxines. L'eau obtenue par distillation, osmose inverse ou ultrafiltration peut contenir moins d'endotoxines que détectable tant que le processus de purification fonctionne correctement et que l'eau n'est pas contaminée après la production.

Caractéristiques spécifiques de performance

L'erreur de la méthode par caillot de gel est de plus ou moins un doublement de la dilution à la fin de l'analyse.

Bibliographie

- <85> Bacterial Endotoxins Test, Current USP.
- Howell, W. H. 1885 Observations upon the chemical composition and coagulation of the blood of *Limulus polyphemus*, *Callinectes hastatus*, and *Cucumaria* sp. Johns Hopkins University Circular 43:4-5.
- Bang, F. B. 1953 The toxic effect of a marine bacterium on *Limulus* and the formation of blood clots. Biol Bull. (Woods Hole, MA) 105:361-362.
- Levin, J., and F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345.

5. Levin, J., and F. B. Bang. 1964. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:265-274.

6. Levin, J., and F. B. Bang. 1968 Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb. Diath. Haemorrh. 19:186-197.

7. Novitsky, T. J. 1984 Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Oceanus 27:13-18.

8. Progress in Clinical and Biological Research Vol. 231, Detection of Bacterial Endotoxins with the *Limulus* Amebocyte Lysate Test. 1987. Watson, S. W., J. Levin, and T. J. Novitsky (eds), Alan R. Liss, Inc., NY.

9. <1085> Guidelines on the endotoxins test, Current USP.

10. <1228> Depyrogenation, Current USP.

11. Gould, M. C. Endotoxin in vertebrate cell culture: Its measurement and significance, p. 125-136. In: Uses and Standardization of Vertebrate Cell Cultures. In Vitro Monograph number 5, 1984 Tissue Culture Association, Gaithersburg, MD.

12. <161> Medical Devices – Bacterial Endotoxin and Pyrogen Tests, Current USP.

Notre personnel expérimenté discutera volontiers avec vous des aspects pratiques et théoriques du test LAL. Veuillez appeler si vous avez des problèmes à utiliser Pyrotell®. Nous remplacerons tous nos produits qui ne répondent pas aux spécifications ; vous devez nous en aviser avant de les retourner.