

AVIS DU CONSEIL SUPÉRIEUR DE LA SANTÉ N 8785

Inactivation et sécurisation des tissus et des cellules vis-à-vis des bactéries, des virus ou des prions Partie III: virologie

In this science-policy advisory report, the Superior Health Council issues advice on viral inactivation and securisation of tissues and cells for safe human use

7 novembre 2012

RÉSUMÉ

Cet avis a pour but de mettre en lumière les risques de transmission de virus liés aux transplantations tissulaires et cellulaires. Le Conseil supérieur de la santé (CSS) s'est d'abord intéressé aux caractéristiques virales et aux points importants relatifs aux transplantations tissulaires/cellulaires.

Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires (chapitre 3: définition, classification et généralités). Ils ne peuvent se multiplier qu'à l'intérieur d'une cellule. Le virus se compose principalement d'un code génétique sous la forme d'un brin d'acide nucléique intégré dans une structure qui lui permet de passer en toute sécurité d'une cellule à une autre et d'un hôte à un autre. Les virus ont été identifiés pour la première fois au XIX^e siècle comme étant des agents infectieux possédant la propriété particulière de pouvoir traverser des filtres bactériens. Ils sont très petits, se multiplient, sont composés de différents éléments (acide nucléique, enzymes et protéines structurales), contiennent une seule sorte d'acide nucléique (ADN ou ARN), sont strictement dépendants du métabolisme d'une cellule et sont spécifiques à une cellule et donc à un hôte.

Un premier point important en ce qui concerne la transmission des virus par le sang, les tissus ou les organes est la durée de l'infection. Les virus qui provoquent une infection chronique représentent un risque plus grand que les virus présents durant un laps de temps limité lors d'une infection aiguë. Cet aspect est encore plus important lorsque le virus est présent dans le sang ou dans certains tissus. Les principaux virus concernés à cet égard sont le virus de l'immunodéficience humaine (HIV), le virus de l'hépatite B (HBV) et le virus de l'hépatite C (HCV). Des virus tels que le HTLV (*Human T-cell lymphotropic virus*) et certains *Herpesviridae* tels que le cytomégalovirus (CMV) provoquent également des infections chroniques, souvent à vie.

Un deuxième problème concerne la période d'incubation plus ou moins longue de la plupart de ces virus. Pendant cette incubation, il existe une période durant laquelle l'organisme ne produit pas encore d'anticorps (Ac) (facilement détectables) mais déjà des virus infectieux plus difficilement détectables, par exemple au moyen de tests NAT (*Nucleic Acid Amplification Testing*) alors que la personne ne présente aucun symptôme.

Les virus sont sujets à une variation génétique importante, en particulier les virus comportant de l'acide ribonucléique (ARN). Par conséquent, une fois infectée, la personne héberge peu à peu un mélange de divers mutants qui diffèrent plus ou moins du virus d'origine. L'analyse phylogénétique permet d'étudier les liens de parenté entre les virus et ainsi, d'avoir une idée de la source de contamination possible.

Certains virus tels que le CMV et le HTLV sont strictement liés aux cellules et sont donc transmis par des cellules ou tissus riches en leucocytes. Les donneurs de cellules/tissus vivants riches en leucocytes, tels que des cellules souches hématopoïétiques ou du sperme, doivent donc avant tout subir un dépistage du CMV et du HTLV. En revanche, ce dépistage n'est pas nécessaire chez les donneurs de cornée, sclérotique, peau, os, tendons, ligaments, cartilage, valvules cardiaques, dure-mère et ovocytes.

Afin de diagnostiquer une infection virale, des tests sérologiques (pratiqués sur un échantillon de sang du donneur), soit porteurs du label européen (CE), soit validés à cet effet, sont utilisés en tant que dispositifs médicaux pour le diagnostic *in vitro* (chapitre 4: Diagnostic des infections virales). Des données pré-analyse déterminant la qualité du résultat des tests sérologiques sont notamment le type de donneur (donneurs à cœur battant et cœur non battant, donneurs décédés et donneurs vivants) et une hémomodilution éventuelle. Les échantillons *post mortem* peuvent présenter une hémolyse risquant de compromettre la spécificité du test. D'autre part, certaines substances inhibitrices présentes dans le sang *post mortem* peuvent donner lieu à des résultats faux négatifs. L'hémomodilution peut avoir un impact négatif sur la sensibilité du test. Les échantillons autres que le sérum ou le plasma, à savoir les liquides et les sécrétions tels que l'humeur aqueuse et le corps vitré, ne sont autorisés que si cette utilisation se justifie d'un point de vue clinique et si, dans ce cas, un test validé pour ce type d'échantillon est utilisé.

Lors du dépistage des agents infectieux éventuellement présents dans le sang d'un donneur, le HIV, le HBV, le HCV et, dans des cas précis, le HTLV sont recherchés.

En Belgique, l'incidence des cas positifs pour le **HIV** parmi les donneurs de sang était de 0,8/100.000 en 2011. Un test de dépistage réactif (*enzyme immuno assay* – EIA) nécessite un test de confirmation (Western blot, par exemple). L'arrêté royal (AR) du 28/09/2009 stipule que le test devant au minimum être réalisé chez les donneurs *vivants* est la recherche des anticorps anti-HIV-1/2, tandis que chez les donneurs *décédés*, un test NAT pour le HIV doit également être réalisé, sauf si une étape d'inactivation validée du virus concerné est incluse. En outre, le test NAT peut remplacer le deuxième contrôle sérologique après 6 mois chez les donneurs *vivants*.

L'antigène de surface de l'**hépatite B** (HBsAg) est le marqueur sérologique de l'infection transmissible par le virus de l'hépatite B. En 2011, l'incidence du HBV en Belgique était de 0,8/100.000 parmi les donneurs de sang. Des anticorps contre l'antigène nucléocapsidique (Ac anti-HBc) apparaissent dans le sérum 1 à 2 semaines après l'apparition des HBsAg et précèdent de plusieurs semaines ou mois l'apparition d'anticorps contre l'antigène de surface (Ac anti-HBs). Alors que le HBsAg est détectable 60 jours après l'infection par le HBV, la *Polymerase chain reaction* (PCR) met en évidence des particules de HBV 25 jours auparavant dans le sang.

Si le test pour les anticorps anti-HBc est réactif et que le test pour les HBsAg est négatif, les anticorps anti-HBs seront dosés. Si le test pour les anticorps anti-HBs est positif, nous pouvons partir du principe que le donneur est rétabli d'une infection antérieure et que le tissu peut donc être utilisé. L'AR du 28/09/2009 exige un test pour les HBsAg et les anticorps anti-HBc chez les donneurs *vivants* ainsi qu'un test NAT pour le HBV chez les donneurs *décédés*, sauf si une étape d'inactivation validée du virus concerné est incluse. Chez les donneurs *vivants*, l'AR et l'UE stipulent que soit des tests sérologiques répétés après 6 mois, soit un test NAT pour le HBV doivent être réalisés sur l'échantillon initial (en remplacement du deuxième échantillon sanguin). La répétition des tests peut également être omise lorsque le traitement comprend une inactivation validée du HBV.

Les anticorps anti-HCV indiquent une infection par le virus **de l'hépatite C**, alors que l'exclusion d'une virémie ne peut être démontrée que par une PCR du HCV. La virémie du HCV survient 20 jours après l'infection, tandis que les anticorps anti-HCV ne sont détectables qu'après 80 jours en moyenne. Chaque donneur positif pour les anticorps anti-HCV doit être considéré comme infectieux, quels que soient les résultats d'une PCR du HCV, jusqu'à ce que des tests de confirmation excluent une infection par le HCV. En 2011, l'incidence du HCV était de 0,8/100.000 parmi les donneurs de sang belges. L'AR du 28/09/2009 stipule que le test devant au minimum

être réalisé chez les donneurs *vivants* est le dépistage des anticorps anti-HCV, tandis que chez les donneurs *décédés*, un test NAT pour le HCV doit également être réalisé, sauf si une étape d'inactivation validée du virus concerné est incluse. Le test NAT permet de ne pas procéder au deuxième contrôle sérologique pour le HCV chez les donneurs *vivants* 6 mois après la transplantation. La répétition des tests peut également être omise lorsque le traitement comprend une inactivation validée du HCV.

L'infection par le HTLV-1 peut provoquer une maladie neurologique, la myélopathie associée au **HTLV** ou paraparésie spastique tropicale, et la leucémie à lymphocytes T de l'adulte après une période de latence pouvant aller de plusieurs années à plusieurs décennies. Le HTLV-2 n'a pas encore été associé à une maladie. En Belgique, la prévalence du HTLV-1 était de 0,2/1.000 femmes enceintes et celle du HTLV-2 de 0,6/1.000 femmes enceintes. La séroprévalence du HTLV est estimée à 1-7/100.000 habitants en Europe. L'Union européenne et l'AR du 28 septembre 2009 recommandent de tester les anticorps anti-HTLV chez les donneurs provenant d'une zone où l'incidence du HTLV est élevée ou dont les partenaires sexuels ou les parents proviennent d'une telle zone.

En dépit d'un test de dépistage sensible et spécifique du HTLV-1/2, de nombreux résultats faux positifs sont observés dans les zones où la prévalence est faible (en Belgique, par exemple). Une confirmation par Western blot n'est pas opportune pour les transplantations d'organes mais peut être envisagée pour les transplantations de tissus.

Le virus du Nil occidental (WNV, *West Nile virus*) et le virus provoquant le syndrome respiratoire aigu sévère (SARS) sont d'autres agents infectieux pour lesquels un dépistage peut être effectué chez les donneurs, selon la prévalence dans une région donnée. Ni la directive européenne, ni l'AR du 28 septembre 2009 ne mentionnent de manière spécifique le **virus du Nil occidental** parmi les virus éventuels à dépister.

La possibilité de transmission du **SARS** par le sang, les cellules et les tissus n'est pas claire. Les personnes atteintes du SARS pourraient être virémiques avant le début des symptômes et après leur disparition. La transmission du SARS par des cellules et des tissus prélevés au cours de cette phase est possible. Il est conseillé de surveiller les flambées et en fonction de celles-ci, de procéder ou non au dépistage du virus du SARS.

Parmi tous les **tests** de diagnostic des infections virales, le test *Enzyme-linked immunosorbent assay* (**ELISA**) est le plus utilisé afin de doser des anticorps dans de grandes séries d'échantillons sériques (**test de dépistage**). De nombreux centres utilisent un test ELISA pour le dosage des antigènes du HIV/anticorps anti-HIV, antigènes HBs, anticorps anti-HBc, anticorps anti-HBs et anticorps anti-HCV. La première génération de tests ELISA utilisait le lysat de cellules infectées par le virus comme antigène (Ag). Le clonage de séquences de nucléotides a permis de créer des polypeptides antigéniques du virus grâce à la technologie de l'acide désoxyribonucléique (ADN) recombinant et à la synthèse chimique. La deuxième génération de tests ELISA donne ainsi moins de résultats faux positifs.

La grande majorité des tests ELISA tendent vers une sensibilité aussi élevée que possible (capacité d'un test à détecter un résultat positif pour le HIV, par exemple). Toutefois, la spécificité (capacité d'un test à détecter un résultat négatif pour le HIV, par exemple) des tests de dépistage est faible (86,5 % - 100 %). Par conséquent, la plupart des tests de dépistage sont capables de détecter les personnes positives au HIV mais évaluent aussi comme positives au HIV des personnes qui ne sont pas contaminées.

Dans les populations où la prévalence de la maladie est faible (en Belgique, par exemple), le résultat positif d'un test de dépistage doit toujours être confirmé par un autre test au moins aussi sensible et possédant une spécificité plus élevée que le test de dépistage. Ces **tests** sont dits de **confirmation**.

Le Western blot, un test immunologique en phase solide, est jusqu'à présent le test de confirmation le plus utilisé. Lors de ce test, des **protéines virales** structurales séparées individuellement, disposées en bandes individuelles sur une membrane de nitrocellulose, sont mises à incuber avec le sérum du patient. Les anticorps du sérum du patient qui étaient liés aux

protéines virales individuelles sont mis en évidence au moyen d'un conjugué «anticorps anti-immunoglobuline G humaine – enzyme», qui après l'ajout d'un substrat approprié, donne lieu à l'apparition de bandes colorées. Ces tests sont très sensibles et surtout très spécifiques, mais ils sont très exigeants d'un point de vue technique, relativement chers et sujets à interprétation en raison de l'évaluation généralement subjective.

Les LIA (*line immunoassays*) sont une deuxième génération de tests de confirmation. Des protéines virales recombinantes individuelles très bien caractérisées et/ou des peptides synthétiques sont appliqués en quantités contrôlées et de manière mécanique, sous forme de ligne, sur une bandelette servant de support. Ces bandelettes sont plus faciles à lire, interpréter et normaliser que les Western blots.

Les tests par immunofluorescence ou par radio-immunoprécipitation sont également très sensibles et spécifiques.

La mise en évidence **d'ADN/ARN viral** est un autre moyen de confirmation.

Aujourd'hui, des tests NAT approuvés par la *Food and Drug Administration* (FDA) peuvent être utilisés sur des échantillons sanguins de donneurs vivants et décédés. Il existe des tests NAT triples pour le dosage du HIV, du HCV et du HBV sur le sang (sérum/plasma), pratiqués sur des plates-formes automatisées. Ces systèmes sont déjà utilisés de manière routinière dans les banques de sang et ont été validés en vue du dépistage chez les donneurs de tissus, y compris pour les tests du sang *post mortem*.

La PCR a été mise au point en 1983 afin d'amplifier l'ADN *in vitro* au moyen d'une ADN polymérase. La technologie PCR a facilité la détection rapide et sensible d'un large éventail de virus pertinents d'un point de vue clinique, notamment des virus à ARN par RT-PCR.

Les deux techniques d'*amplification de la cible* les plus utilisées sont l'amplification d'acide nucléique basée sur la séquence et l'amplification médiée par la transcription.

La technique NASBA (*nucleic acid sequence based amplification*) est une alternative à la PCR pour l'analyse des acides nucléiques et est la mieux adaptée à l'amplification de l'ARN. De ce fait, elle est une technique puissante de détection de l'ARN viral tel que celui du HCV ou du HIV-1.

L'amplification médiée par la transcription est une variante de la technique NASBA qui utilise l'activité ribonucléasique H (RNase H) de la transcriptase inverse (RT) présente dans la réaction, plutôt que celle d'une enzyme spécifique (RNase H).

La technique d'*amplification du signal* au moyen d'ADN branché s'est avérée un des systèmes d'amplification du signal les plus polyvalents à ce jour. L'amplification du signal utilisant l'ADN branché intègre différentes étapes d'hybridation simultanée qui utilisent plusieurs types de sondes oligonucléotidiques (sondes de capture, sondes cibles, sondes branchées secondaires, sondes tertiaires courtes liées à des enzymes). La sensibilité des tests reposant sur l'ADN branché est généralement inférieure à celle des méthodes d'amplification de la cible.

Lors du prélèvement d'un échantillon en vue d'une analyse génétique, il est important de préserver **la stabilité de l'échantillon**, en particulier en ce qui concerne l'ARN. Les RNases sont présentes partout et réduisent la sensibilité de la PCR. Les échantillons non stabilisés doivent être congelés rapidement et expédiés sur de la glace sèche. Les échantillons destinés à une analyse ADN seront de préférence conservés dans 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5-8,0 et à 4°C. Les échantillons destinés à une analyse ARN doivent être congelés dans un milieu tampon à -20°C. L'héparine peut ralentir ou inhiber l'amplification de l'ADN pendant la PCR. De nombreuses études ont été réalisées sur la stabilité du HIV, du HCV et du HBV dans différents tubes de prélèvement (plasma, sérum), à différentes températures et pendant différentes durées. Les résultats ne sont pas toujours concordants.

Alors qu'aux États-Unis, environ 150.000 allogreffes osseuses sont réalisées par an, la **transmission des infections** lors de celles-ci est très rare, pour diverses raisons (chapitre 5 : Inventaires des publications : transmissions virales par des tissus):

- la faible prévalence du HIV, du HCV et du HBV parmi les donneurs de matériel corporel humain,

- la sélection soigneuse des donneurs et
- l'élimination maximale du sang, de la moelle osseuse et des autres résidus tissulaires du matériel corporel.

La transmission du HIV, du HCV ou du HBV par la cornée ou les tissus cardiovasculaires est peu fréquente, probablement parce que la cornée n'est pas un tissu vascularisé et que les tissus cardiovasculaires sont traités et transplantés en petites quantités.

La plupart des cas de transmission de maladies virales datent d'une époque où il n'existait pas encore de tests sérologiques pour le HBV, le HCV et le HIV.

Deux cas d'infection par le HBV ont été décrits à la suite d'une kératoplastie. Certains auteurs ont pu démontrer la présence de **HBV** dans le tissu cornéen de donneurs positifs pour les HBsAg, d'autres pas. En 2005, Shutkin a décrit pour la première fois le cas d'un patient ayant reçu une greffe d'os cortical réfrigérée non traitée et ayant développé une hépatite 10 semaines plus tard. La capacité des valves cardiaques humaines à transmettre le HBV a été démontrée lors d'une étude de 31 patients ayant reçu des valves cardiaques de donneurs positifs pour les HBsAg. Vingt-deux receveurs étaient immunisés ou positifs pour les HBsAg avant la transplantation. Un des neufs patients sensibles au HBV a développé des marqueurs HBV positifs.

La transmission du **HCV** lors d'allogreffes osseuses traitées ou pas (au moyen d'antibiotiques, d'alcool et de détergents) a été décrite par Eggen et Nordbo, Conrad *et al.*, Homan *et al.* et Pereira *et al.*

En juin 2002, Homan a décrit une série de cas de transmission du virus de l'hépatite C via les tissus d'un même donneur transplantés à une quarantaine de receveurs. Tous les tissus avaient été traités à l'aide de produits chimiques en surface ou d'antibiotiques. Les greffes osseuses avaient également été irradiées. Parmi les receveurs, 8 cas ont été répertoriés: 3 des 6 patients qui avaient reçu des organes, 1 receveur d'une veine saphène (nombre total de receveurs de veine saphène n = 2), 1 des receveurs d'une greffe de tendon (n = 3) et 3 receveurs d'une greffe osseuse avec tendon (n = 3) ont été infectés. Aucune transmission n'a eu lieu chez les receveurs de peau (n = 2) ou d'os irradié (n = 16).

Jusqu'à présent, le HCV n'a pas été transmis lors d'allogreffes cutanées, mais l'ARN du HCV a été mis en évidence dans des allogreffes cutanées par Conrad *et al.*

Des génomes du HCV ont été mis en évidence dans des cornées. Néanmoins, une étude à grande échelle de l'*Eye Bank Association of America* n'a pu trouver aucun cas de transmission du HCV parmi plus de 400.000 transplantations de cornées (dont les donneurs avaient subi un test sérologique).

Des recherches expérimentales ont montré que le **HIV** peut être trouvé dans les os et les tendons. Le HIV vivant a été isolé à partir des os, de la moelle osseuse et des tendons de patients atteints du SIDA. Par conséquent, il est possible que le HIV soit transmis lors d'une transplantation de tissus. Divers cas de transmission du HIV lors de transplantations tissulaires ont été publiés: des receveurs d'allogreffes osseuses traitées et non traitées, de tendons ou de peau (1 cas) ainsi que des femmes qui avaient subi une insémination artificielle. Il est peu probable que le HIV puisse être transmis par la cornée car cet organe empêche l'infiltration des cellules sanguines. Bien que le HIV ait été isolé à partir de larmes, de tissu cornéen, de l'humeur aqueuse et de l'épithélium conjonctival, il n'a pas été transmis chez les patients ayant reçu une greffe de cornée d'un donneur séropositif pour le HIV.

Sanzen *et al.* ont publié le seul cas de transmission du **HTLV-1** après la transplantation d'une allogreffe de tête fémorale non traitée congelée.

La transmission de la rage a été rapportée chez des receveurs de cornée. On sait que les yeux d'animaux et d'humains infectés peuvent contenir le virus de la rage.

Le **CMV** a été transmis via la cornée et la peau.

Il est possible que la transmission du virus **Herpes simplex** (VHS) associée à la cornée pose un problème. Des cas isolés de transmission cliniquement pertinente ont été rapportés.

Les virus cardiotropes tels que le CMV, le parvovirus B19, l'entérovirus et l'adénovirus sont davantage détectés que le HCV, le HBV et le HIV et font l'objet de recherches quant à leur impact en cas de transmission par une allogreffe cardiovasculaire.

Afin de **prévenir la transmission possible d'une infection virale**, différentes pistes peuvent être explorées (chapitre 6 : Prévention des infections virales).

Il convient de relever dans le dossier médical les critères d'exclusion généraux du don de cellules/tissus et les facteurs de risque qui excluent le don (anamnèse médicale et personnelle, si possible). Les preuves cliniques et physiques (examen physique) d'affections transmissibles pertinentes seront également recherchées. Des tests sérologiques, éventuellement complétés par des tests NAT, sont recommandés par le CSS, la directive européenne et l'AR.

Divers moyens de **décontamination/désinfection ou de stérilisation** peuvent être utilisés afin de minimiser la contamination virale potentielle du matériel corporel humain (chapitre 7 : Désinfection – stérilisation).

Le traitement mécanique du tissu osseux (élimination des restes de tissus mous, du périoste, du sang et de la moelle osseuse) réduit déjà le risque de transmission d'agents pathogènes potentiels, comme Simonds l'a démontré: trois receveurs d'os non traité ont été infectés par le HIV-1 lors de la transplantation d'un fragment osseux provenant d'un donneur positif pour le HIV-1. Les 3 receveurs d'os lyophilisé, les 25 receveurs d'os traité à l'éthanol et le receveur d'os congelé frais dont la moelle osseuse a été éliminée étaient négatifs pour le HIV-1. Ces données soulignent l'importance du traitement, même minimal, des os.

Les méthodes de traitement peuvent notamment inclure le rinçage sous haute pression à l'eau stérile, l'immersion dans l'alcool et des traitements de déprotéinisation. Toutefois, ces méthodes n'impliquent pas une stérilisation terminale. La déminéralisation de l'os cortical a semblé inactiver quelques virus (virus de la leucémie féline, HIV, CMV, poliovirus, HBV du canard) dans trois études.

En ce qui concerne le **traitement chimique**, nous nous intéresserons aux performances des peroxydes, de la chlorhexidine, du dioxyde de chlore, des agents alkylants, des antiseptiques mercuriels organiques, des alcools, de l'iode et des iodophores, des agents tensioactifs, de Biocleanse et du CO₂ supercritique.

Une activité antivirale puissante a été attribuée à l'**acide peracétique** (APA), selon la concentration, le pH et la durée d'exposition. La gamme des concentrations est large pour les différents virus. Une concentration de 0,1 % d'APA associé à 85 % de glycérol n'altère pas les propriétés de biocompatibilité de la peau. Aucune étude portant sur la peau infectée par un virus n'a été trouvée. Le traitement de blocs d'os spongieux en suspension dans une culture virale, au moyen d'une solution d'APA à 1 % dans 24 % d'éthanol pendant 4 heures à température ambiante et à basse pression (200 mbar), a mis en évidence une réduction de plus de 4 log₁₀ de l'infectivité virale pour le virus de la pseudo-rage, le virus de la diarrhée bovine, le parvovirus porcine et le poliovirus. Le HIV-2 s'est inactivé spontanément dans les blocs traités à l'APA mais aussi dans les blocs de contrôle. Le HAV n'a pu être inactivé que par le dégraissage au moyen d'un mélange de chloroforme et méthanol (réduction de 7 log₁₀), tandis qu'après un traitement à l'APA, une réduction de 2,9 log₁₀ seulement a été obtenue.

Une concentration de 0,01 % d'APA (associée à 25 % d'éthanol pendant 15 minutes à 20°C) entraîne une réduction de plus de 2 log₁₀ du HSV-1 et du poliovirus de type 1. Cette concentration plus faible s'est avérée efficace comme désinfectant et a eu peu d'impact, 6 mois après leur implantation chez des moutons, sur les propriétés biomécaniques ou morphologiques des valves cardiaques traitées.

L'infectivité de certains virus lipophiles (par exemple les virus enveloppés tels que le virus de la grippe, le virus de l'herpès (HSV) et le HIV) est inactivée rapidement par la chlorhexidine, bien que les solutions aqueuses de **chlorhexidine** ne soient pas actives contre les petits virus à enveloppe protéique (notamment de nombreux virus entériques, le poliovirus, le papillomavirus – virus sans enveloppe). Une étude *in vitro* a confirmé l'effet de la chlorhexidine à 4 % (application pendant 15 secondes) sur le HIV. Toutefois, un traitement par chlorhexidine à 2-4 % est nocif pour les tissus tels que la cornée, les os et les tendons.

Le dioxyde de chlore inactive les entérovirus, les poliovirus, le rotavirus et le HIV. L'inactivation du poliovirus est plus efficace à un pH de 10,0 qu'à un pH de 6,0 et s'avère liée à la concentration de dioxyde de chlore. Le traitement par dioxyde de chlore a été proposé afin de réduire le risque de transmission de maladies lors de la transplantation de la sclérotique et de la cornée. Un traitement de 10 minutes par dioxyde de chlore de tissu myocardique contaminé par le HSV de type 1 et le poliovirus de type 1 a réduit le titre des deux virus d'environ $3 \log_{10}$. Seules de légères modifications des cellules endothéliales des valves cardiaques ayant subi ce traitement ont été observées.

À la concentration usuelle de 1 %, le **formaldéhyde** est fortement virucide. Le formaldéhyde est toxique et mutagène. Le formaldéhyde à 4 % combiné à du Cialit (Sodium-2-éthyl-mercuro-mercaptop-benzoxazole-5-carboxylique acide) à raison de 1:5.000 tue le HIV présent dans les osselets de patients positifs pour le HIV. Le HIV dans des dures-mères lyophilisées a également pu être inactivé au moyen de paraformaldéhyde à 0,05 % (traitement de 24 heures).

Le glutaraldéhyde est un des rares agents capables d'inactiver le HIV en présence de sang et lorsque le virus est protégé par l'association avec des cellules et membranes cellulaires. Comme le formaldéhyde, le glutaraldéhyde est toxique pour toutes les cellules vivantes. Cette technique entraîne rapidement l'échec des valves cardiaques humaines en raison de leur dégénérescence et rupture.

L'antiseptique mercuriel organique Cialit ne possède pas ou presque pas de propriétés antivirales. Les composés organiques du mercure ne conviennent pas pour conserver des allogreffes osseuses, en raison de leur toxicité.

L'éthanol est actif contre les virus lipophiles enveloppés, mais pas contre les virus hydrophiles. Comme certains virus ne sont pas inactivés, il reste un élément d'incertitude si l'alcool éthylique est la seule procédure de désinfection appliquée aux allogreffes.

Les propriétés ostéo-inductrices de la matrice osseuse ne sont pas modifiées par l'éthanol, au contraire des propriétés ostéogéniques de l'os cortical minéralisé. Dans le rapport de cas de Simonds, où trois receveurs ont été infectés par le HIV-1 par des allogreffes osseuses congelées non traitées provenant d'un donneur contaminé par le HIV-1, d'autres fragments osseux lyophilisés puis traités à l'éthanol ont été validés. Aucun de ces fragments osseux n'a donné lieu à la transmission du HIV-1. L'éthanol à 70 % (v/v) associé à de la chlorhexidine à 0,02 % inactive le HIV dans les tendons humains.

Une concentration de 0,8 % (p/v) **d'iode** inactive le HIV en 1 minute en présence de sang. Le HIV acellulaire est inactivé de 30 à 60 secondes après l'exposition à la PVP-I (povidone-iodine) à 0,5 % (p/v). La PVP-I modifie l'ostéo-induction et, à 10 %, est très irritante pour l'endothélium vasculaire, avec thrombose secondaire notamment.

Les dérivés de l'ammonium quaternaire sont de bons désinfectants en ce qui concerne le HIV acellulaire. Toutefois, ils ne possèdent pas une activité satisfaisante sur les virus sans enveloppe et leur action diminue en présence de matériel organique.

BioCleanse® Tissue Sterilisation Process est une méthode de stérilisation chimique à basse température qui élimine notamment les virus avec et sans enveloppe à la surface de l'os et à l'intérieur de celui-ci. Elle utilise des détergents et des agents de stérilisation non spécifiés qui préservent la résistance du tissu et la biocompatibilité.

Le CO₂ supercritique possède une grande capacité de « solvant » et une grande capacité de diffusion: il est idéal pour extraire les substances des matrices poreuses telles que les os. Les virus les plus résistants (tels que le parvovirus) présents sur des têtes fémorales ont pu être inactivés au moyen d'un traitement par CO₂ supercritique. Le HIV-1, le virus Sindbis, le poliovirus

et le virus de la pseudo-rage ont été inactivés à raison de plus de 6 log₁₀ au moyen de cette procédure. Des os allogènes implantés chez des moutons après un traitement par CO₂ supercritique ont été bien intégrés.

L'oxyde d'éthylène est un gaz qui possède une grande capacité de pénétration. Il peut inactiver des virus résistants aux agents chimiques tels que les entérovirus, le poxvirus et le parvovirus et pourrait détruire le HIV et le HBV. Bien que l'oxyde d'éthylène ait été utilisé très souvent dans le passé pour la stérilisation d'allogreffes musculo-squelettiques, la plupart des banques de tissus ont cessé de l'utiliser en raison des résidus chimiques potentiels dans les tissus.

Le bêta-propiolactone est un gaz possédant une action antivirale modérée dans le plasma humain contaminé par des virus.

Comme la bêta-propiolactone ne peut pas pénétrer dans les tissus, cette méthode ne peut pas être appliquée de manière sûre pour décontaminer ceux-ci.

Le gaz formaldéhyde possède une capacité de pénétration plutôt médiocre et n'est donc pas utilisé comme désinfectant pour les tissus.

Les méthodes physiques utilisées pour la stérilisation sont notamment la chaleur, le système Lobator sd-2, le plasma à basse température, le rayonnement UV/lumière pulsée, les micro-ondes, le rayonnement gamma et la stérilisation par faisceau d'électrons.

Le HIV (enveloppé) est peu résistant à la chaleur et est inactivé par une exposition à 60°C pendant 30 minutes. Le HBV (enveloppe complexe), en revanche, est inactivé après 10 heures d'exposition à 60°C. Les virus sans enveloppe (HAV, par exemple) sont considérés comme très résistants à la chaleur. La chaleur dénature les protéines, telles que le collagène, et peut coaguler les tissus mous. Par conséquent, cette technique ne peut pas être appliquée à la peau et aux allogreffes de tendon. Après autoclavage, la matrice osseuse déminéralisée (DBM) perd sa capacité ostéo- et chondrogénique.

Le « système Lobator sd-2 » (Allemagne) est une nouvelle technique et est surtout utilisé pour le traitement des têtes fémorales, en association avec un chauffage à 80°C. Ce système facile d'utilisation possède un effet bactéricide et antiviral. Le « système Lobator sd-2 » serait sûr et efficace en vue de la décontamination des têtes fémorales allogènes (< 60 mm de diamètre). Les études relatives à l'effet de cette technique sur les propriétés ostéo-inductrices de l'os sont contradictoires.

Le plasma (quatrième état d'agrégation de la matière) se compose d'un nuage d'ions, d'électrons et d'espèces neutres. La stérilisation au moyen du stérilisateur STERRAD® 100 utilise un plasma de gaz à basse température. L'utilisation combinée de plasma et de H₂O₂ stérilise rapidement les produits sans laisser de résidus toxiques. Cette technique est virucide (virus hydrophiles et lipophiles). Aucun effet néfaste sur les propriétés biomécaniques de segments d'os cortical après la stérilisation par plasma de H₂O₂ n'a pu être mis en évidence. Toutefois, en raison de la perte de la capacité ostéo-inductrice, la technique ne convient pas pour la stérilisation de la matrice osseuse déminéralisée.

La stérilisation par **rayonnement ultraviolet (UV)** ou lumière pulsée n'a pas été étudiée en ce qui concerne les allogreffes. Les virus sont beaucoup plus résistants aux UV que les bactéries végétatives. La combinaison d'UV et de bêta-propiolactone s'est avérée efficace pour inactiver le HBV, le HAV, le HCV et le HIV. Le rotavirus, le poliovirus et le virus Coxsackie sont plus résistants au rayonnement UV que le HAV, mais moins que l'adénovirus. La lumière pulsée intense est une technique relativement nouvelle de décontamination des surfaces et des solutions. Cette méthode est efficace contre tous les micro-organismes, y compris les virus. La présence de protéines dans le substrat et l'agrégation virale inhibent l'inactivation des virus. Nous ne savons pas si les UV pénètrent jusqu'au cœur des allogreffes osseuses de grandes dimensions. En outre, des modifications collagéniques surviennent dans les os et tendons traités

par UV et la matrice osseuse déminéralisée perd sa capacité ostéo-inductrice après une exposition aux UV.

Une application occasionnelle de la stérilisation **par micro-ondes** de fragments de têtes fémorales contaminées a été décrite dans la littérature. Les virus sont inactivés au cours des trois minutes suivant le traitement par micro-ondes (2,45 GHz). Toutefois, le traitement par micro-ondes modifie les propriétés biomécaniques de l'os.

Le rayonnement gamma (un paquet d'énergie électromagnétique – un photon) possède une grande capacité de pénétration (y compris dans les tissus humains). Le rayonnement gamma (provenant d'une source de Co^{60}) est très efficace contre les bactéries à des doses de 15 à 25 kGy. Pour l'inactivation de la plupart des virus, au moins 30 kGy sont nécessaires. Cette dose se trouve à la limite supérieure et excède parfois la dose de routine recommandée pour la stérilisation des greffes osseuses (de 10 à 35 kGy). Les rayons gamma peuvent pénétrer jusqu'à une profondeur de 30 cm dans l'eau (densité: 1 g/cm^3). Par conséquent, la peau, l'amnios, le péricarde et les tendons peuvent être stérilisés au moyen de cette technique. Comme la densité moyenne d'une greffe est supérieure - elle est par exemple de 2 g/cm^3 dans le cas d'une greffe osseuse - l'épaisseur acceptable d'une greffe d'os cortical exposée au rayonnement gamma est d'environ 10 à 15 cm. Selon l'état physique des allogreffes osseuses (température, lyophilisation, congélation), la dose diffère et les propriétés biomécaniques de l'os peuvent être atteintes. Des agents de protection tels que le propylène glycol peuvent être utilisés afin de préserver les propriétés biomécaniques de l'os pendant l'irradiation. Les effets du rayonnement sur les tendons et la matrice osseuse déminéralisée sont contradictoires. L'irradiation gamma de l'os et des tissus mous modifierait la structure collagénique, réduirait la résistance à la traction et inactiverait les protéines morphogéniques osseuses. La cornée et les valves cardiaques ne peuvent pas être stérilisées par irradiation. Le rayonnement n'est pas non plus la technique de stérilisation idéale pour la peau car il provoque une rigidité de celle-ci et donc, une adhérence et un *take rate* (prise de greffe) moindres.

Les électrons produits par un **générateur de faisceau d'électrons** peuvent pénétrer jusqu'à une profondeur de 8 cm dans l'eau (densité: 1 g/cm^3). Comme la densité moyenne d'une greffe osseuse est supérieure à 2 g/cm^3 , l'épaisseur acceptable d'une greffe d'os cortical exposée à un faisceau d'électrons est de 3 cm. Aucune cytotoxicité n'a été constatée sur les os traités au moyen de faisceaux d'électrons. Le rayonnement gamma, en revanche, est toxique (à température ambiante) pour les cellules ostéo- et fibroblastiques.

Grieb *et al.* ont étudié **l'effet antiviral** et biomécanique de **50 kGy** après un traitement protecteur de fragments osseux spongieux au propylène-glycol, diméthyl sulfoxyde, mannitol et tréhalose pendant 4 heures sous sonication. Grâce à ce traitement protecteur il n'y a pas eu de modifications des propriétés biomécaniques (module d'élasticité et résistance à la compression) par rapport aux os de contrôle non irradiés. Le parvovirus porcine comme virus modèle pour le parvovirus B19 et le HAV ont été inactivés à raison de $5 \log_{10}$. Le virus Sindbis comme succédané pour le HIV et le HCV ont été réduits de $4,9 \log_{10}$. Pruss *et al.* ont étudié l'inactivation virale de fragments osseux contaminés par des virus. Le virus le plus résistant était le parvovirus bovin comme succédané du parvovirus B19. Une dose de 34 kGy (à $-30 \pm 5^\circ\text{C}$) a été nécessaire afin d'obtenir une réduction de $4 \log_{10}$. Dans cette étude, le virus de la diarrhée bovine comme succédané du HCV s'est avéré le plus sensible au rayonnement et a été inactivé à raison de $\geq 6,5 \log_{10}$ à 34 kGy. Pruss *et al.* ont recommandé d'utiliser une dose de 34 kGy pour la stérilisation d'allogreffes osseuses. Cette recommandation est valable uniquement pour des températures de -30°C , car l'infectivité virale est associée à la température pendant l'irradiation.

Différentes **techniques de préservation** peuvent être appliquées aux différents types d'allogreffes: congélation, cryoconservation, lyophilisation et glycérolisation.

La congélation est une méthode utilisée depuis longtemps pour conserver des tissus osseux et fibreux, comme méthode de préservation unique ou avant la lyophilisation. La température de congélation recommandée pour la conservation de longue durée (jusqu'à 5 ans) des allogreffes

d'os, de tendons et de cartilage est inférieure à -40°C . La congélation ne réduit pas les propriétés mécaniques des ligaments, mais n'exerce pas non plus une action de stérilisation. La congélation réduit peut-être la charge virale du HIV, selon certaines études, mais elle ne permet pas d'inactiver ce virus.

La cryoconservation doit avoir lieu selon une méthode validée (congélation immédiate ou technique de congélation contrôlée). Cette technique est utilisée en association avec du glycérol comme cryoprotecteur dans le cas des allogreffes cutanées et en association avec du diméthyl sulfoxyde dans le cas du cartilage et des chondrocytes. Les modifications histologiques provoquées par cette technique de préservation n'ont aucun effet sur les propriétés mécaniques du tissu. Cette technique ne possède pas d'activité antivirale et est, au contraire, utilisée pour conserver des micro-organismes.

La lyophilisation est une méthode courante afin de conserver des allogreffes osseuses, mais aussi des tissus collagéniques (y compris des ligaments), à température ambiante pendant une longue durée. Toutefois, la lyophilisation possède un impact négatif sur la stabilité mécanique et l'incorporation des greffes osseuses, ce qui rend cette technique moins appropriée pour les grandes greffes osseuses et les tendons. La lyophilisation ne porte pas atteinte à la capacité ostéo-inductrice du tissu osseux. La lyophilisation ne suffit pas comme méthode d'inactivation virale pour les allogreffes musculo-squelettiques, car une infectivité résiduelle a pu être mise en évidence dans des modèles expérimentaux pour des virus avec ou sans enveloppe.

Enfin, citons le glycérol qui, en forte concentration, agit comme un agent lyophilisant chimique. Le **glycérol** préserverait la structure des tissus et des cellules et réduirait l'antigénicité du tissu. Il possède une action antivirale et antimicrobienne limitée et très lente.

En 2000, Cameron *et al.* ont montré que le HIV-1 (acellulaire et associé à la peau) peut être inactivé en 8 heures. L'utilisation de glycérol comme moyen de préservation a été décrite pour la peau, la dure-mère, les valves cardiaques, les greffes vasculaires, les cornées, le cartilage costal et les os.

	Demineralized bone matrix	Allogreffes osseuses	Tendons	Cornée	Peau	Valves cardiaques	Osselets	Dura mater
Nettoyage mécanique		Le lavage pulsé dosé peut être partiellement décontaminant, aucune stérilisation finale	Non résistants au lavage à haute pression, lavage pulsé dosé à valider					
Traitement chimique								
Peroxydes		<p>*H₂O₂: Max 1h de traitement pour éviter une réduction des propriétés ostéo-inductrices, l'effet antiviral insuffisamment étudié</p> <p>*acide peracétique: pénétration limitée dans l'os, 1 % d'acide peracétique dans l'éthanol 24 % pendant 4 h donne une bonne réduction virale dans les blocs osseux.</p> <p><u>Chloroforme:</u> méthanol favorise la capacité de pénétration</p>	Sensibilité élevée de la collagénase possible avec de l'acide peracétique à 0,1% pendant 3h, pas d'études sur l'effet antiviral sur des tendons contaminés	H ₂ O ₂ = toxique	0,1% d'acide peracétique ne provoque pas de dégât histologique si en combinaison avec du glycérol ou du propylène glycol, l'effet antiviral insuffisamment étudié	Acide peracétique à 0,21 % préserve les propriétés mécaniques et réduit la charge virale de 2-log (HSV-I et polio I)		
Chlorhexidine		Toxicité du gluconate de chlorhexidine 2 % pour les articulations, solutions aqueuses inactives contre les virus non enveloppés						

	Demineralized bone matrix	Allogreffes osseuses	Tendons	Cornée	Peau	Valves cardiaques	Osselets	Dura mater
Dérivés chlorés: Dioxyde de chlore						10 min d'incubation dans le dioxyde de chlore → réduction 3-log de HSV-1 et polio I dans les fragments du myocarde		
Agents alkylants: formaldéhyde							Inactivation des osselets contaminés au HIV avec 4 % de formaldéhyde + Cialit	Réduction de 5-log de la dura mater lyophilisée en présence de 0,05 % formaldéhyde
Glutaraldéhyde						Bien qu'antiviral actif, rapide dégradation des valves, pas d'application humaine dans les banques de tissus		
Antiseptiques organiques	mercuriels						Effet antiviral insuffisant et toxique. Utilisé historiquement pour la conservation des osselets	

	Demineralized bone matrix	Allogreffes osseuses	Tendons	Cornée	Peau	Valves cardiaques	Osselets	Dura mater
Alcools: éthanol	50 % éthanol: Partie de la procédure de préparation, pas d'effet néfaste sur les propriétés ostéo-inductrices, effet antiviral variable	Cytotoxique pour les ostéoblastes, capacité de pénétration inconnue dans l'os, partiellement inactivant lorsque faisant partie d'une procédure de transformation	Ethanol 70 % pénètre les tendons: après 3h dans 20% d'éthanol dans les parties profondes des tendons (actif contre HIV-I)	70 % éthanol: Moyen de conservation pour les sclères (pas d'études in vitro sur l'effet antiviral)			70 % éthanol: conservation des osselets (pas d'études in vitro pour l'effet antiviral)	
Alcools: méthanol	Partie de la procédure de nettoyage des os, aussi actif comme antiviral							
Iode-iodophores		Effet toxique de polyvinyl-pyrrolidone, pas d'études antivirales in vitro		Désinfection des cornées, pas d'études antivirales				
Détergents tensio-actifs	Partie possible du processus de nettoyage des os, aussi actif comme antiviral							
CO ₂ supercritique		Réduction virale de 4 à 6-log des fragments de fémurs infectés, technique sûre, peu de littérature						

	Demineralized bone matrix	Allogreffes osseuses	Tendons	Cornée	Peau	Valves cardiaques	Osselets	Dura mater
Stérilisation par le gaz								
Oxyde d'éthylène	Stérilisation effective, pas d'inactivation des propriétés ostéo-inductrices, résidus toxiques entraînent une impossibilité d'utilisation	Utilisé historiquement, néfaste pour les propriétés biomécaniques des os, résidus toxiques avec réponse inflammatoire possible, effet antiviral très bon	Cfr allogreffes osseuses					
Bêta-propiolactone		Utilisé historiquement, toxique et puissance de pénétration insuffisante				Utilisé historiquement, dégénération des valves et rupture, puissance de pénétration insuffisante		
Méthodes de stérilisation physiques								
Chaleur	Dénaturation des protéines → technique inutilisable	Propriétés ostéo-inductrices détruites → technique inutilisable	Dénaturation du collagène → technique inutilisable			Coagulation tissus mous => technique inutilisable		
Système Lobator Sd-2: 80°C – 15 min		Réduction 4-log des virus recherchés dans les fragments de fémurs, effet équivoque sur les propriétés ostéo-inductrices, capacité de pénétration limitée						

	Demineralized bone matrix	Allogreffes osseuses	Tendons	Cornée	Peau	Valves cardiaques	Osselets	Dura mater
Stérilisation par plasma à basse température	Effet antiviral bon, effet néfaste sur les propriétés ostéo-inductrices (données limitées)	Effet antiviral bon, pas d'effet néfaste sur les propriétés biomécaniques (données limitées)						
Rayons UV	Perte des propriétés ostéo-inductrices, pas d'études in vitro de l'effet antiviral	Capacité de pénétration inconnue, pas d'études in vitro de l'effet antiviral						
Micro-ondes		Effet antiviral actif lors d'une irradiation 3 min à 2,45 GHz, effets néfastes sur le tissu osseux, étude insuffisante (1 seule étude)						
Irradiation gamma et stérilisation par faisceau d'électrons	Effets variables sur les propriétés ostéo-inductrices de l'os, dépendant des conditions d'irradiation	Effets variables sur les propriétés biomécaniques de l'os, dépendant des conditions d'irradiation	Effets variables sur les propriétés mécaniques des tendons, dépendant des conditions d'irradiation		Dégât structurel lors d'irradiation gamma, raideur de la peau	Dégât structurel lors d'irradiation gamma		

De manière générale (chapitre 8 : considérations finales), il est difficile d'évaluer l'efficacité des procédures d'inactivation virale sur les tissus. Souvent, la question est de savoir si la capacité de pénétration du traitement est suffisante et quels en sont les effets nocifs sur la structure tissulaire. La transmission virale peut très bien être évitée non seulement par les tests sérologiques et les tests NAT mais aussi grâce à une sélection méticuleuse des donneurs potentiels de tissus/cellules, un traitement des tissus par des méthodes adaptées (nettoyage mécanique, rinçage) qui conduisent à la réduction du risque infectieux.

Bien que d'immenses progrès aient déjà été réalisés en matière de techniques de détection des virus dans le sérum/plasma, des résultats faux positifs (problème de spécificité) restent possibles. Le nombre de donneurs potentiels est ainsi réduit. Les causes des résultats faux positifs résident notamment dans l'hémolyse et la présence de substances inhibitrices dans le sang *post mortem*. Des résultats faux négatifs sont aussi possibles et sont beaucoup plus dangereux pour la sécurité de la greffe, étant donné qu'ils impliquent une possibilité de transmission d'une infection virale au receveur. Par conséquent, il est essentiel que la sensibilité des tests de dépistage sérologiques ou NAT soit excellente (cf. site de la FDA pour la liste des tests validés chez les donneurs vivants et décédés (c'est-à-dire le sang *post mortem*)).

Chez les donneurs **décédés**, les anticorps anti-HIV-1/2, les antigènes HBs, les anticorps anti-HBc et les anticorps anti-HCV, au moins, seront recherchés, et un test NAT pour le HIV-1, le HBV et le HCV sera réalisé, sauf si une étape d'inactivation de ces virus a été utilisée.

Si des tests NAT pour le HIV, le HBV et le HCV sont réalisés chez un donneur **vivant** (à l'exception des donneurs de gamètes, cellules souches et sang périphérique), le deuxième examen sérologique devant normalement avoir lieu 180 jours après le don peut être omis. Ces tests répétés sont également omis lorsqu'une étape d'inactivation validée pour les virus concernés a été utilisée lors du traitement des tissus.