



## **AVIS DU CONSEIL SUPERIEUR DE LA SANTE 8763**

### **Inactivation et sécurisation des tissus et cellules par rapport aux bactéries, virus ou prions : étude de la littérature**

#### **Partie II: Bactéries, champignons et moisissures**

Septembre 2014

#### **EXECUTIVE SUMMARY**

Cette partie examine les risques liés à la transmission de bactéries, champignons et moisissures lors de la transplantation de tissus et cellules. La classification microbiologique et les mécanismes de typage sont tout d'abord développés.

Historiquement parlant, les bactéries ont été classées sur la base de leurs propriétés phénotypiques telles que la morphologie, les caractéristiques biochimiques, le typage sérologique et le schéma de sensibilité. Nombre de ces caractéristiques constituent de mauvais paramètres pour établir une parenté génétique mais donnent une information descriptive pour reconnaître les taxons. Les bactéries peuvent en outre être classées selon une méthode analytique utilisant des composants cellulaires chimiques. La méthode MALDI-TOF en est une application récente introduite dans de nombreux laboratoires. La méthode de classification des bactéries la plus précise est l'analyse de leur matériel génétique. Elle peut s'effectuer au moyen de techniques telles que l'hybridation de l'ADN, l'ARNr similarity, l'AFLP ADN fingerprinting...

Afin d'identifier une bactérie comme appartenant à un genre et une espèce, il est possible d'utiliser des tests biochimiques et immunologiques basés sur la culture ou des techniques basées sur l'acide nucléique. Une caractérisation plus approfondie des micro-organismes peut être très utile pour le typage épidémiologique. Dans ce cas également, les techniques moléculaires prennent une place sans cesse croissante.

Sur le plan clinique, une distinction peut être opérée entre les commensaux, les pathogènes et les pathogènes opportunistes. Le modèle dommage-réponse de Casadevall distingue 6 classes différentes de pathogènes en fonction du résultat ('le préjudice chez l'hôte') de l'interaction entre hôte et micro-organisme.

Les principes généraux importants pour un bon examen microbiologique, à savoir le matériel de transport, les conditions de transport, les échantillons testés, les milieux et méthodes de culture, sont abordés également.

La prise d'échantillons adéquats pour l'examen microbiologique est essentielle. Les biopsies s'avèrent être les plus représentatives mais leur prélèvement n'est pas toujours possible.

Le coton-tige ou écouvillon présente comme désavantage que les quantités de matériel prélevé sont parfois très faibles et aussi relarguées. Lors de la culture, on retrouve, dans des conditions optimales, maximum 10% des germes présents sur l'écouvillon. En outre, les bactéries meurent rapidement sur le coton par dessèchement, oxydation et en raison des substances toxiques présentes sur le coton. Les milieux de transport (Stuart ou Amies) offrent une meilleure protection pour la viabilité des bactéries aérobies et certainement des bactéries anaérobies. Récemment,

un nouveau type d'écouvillon a été développé, le Eswab® (Copan), qui permet une meilleure collecte des échantillons et aussi un détachement plus efficace que les écouvillons conventionnels en Dacron ou rayonne. Les liquides de ponction peuvent être collectés au moyen d'une seringue et, comme le sang, être transférés dans un milieu de culture liquide.

Le transport d'échantillons vers le laboratoire de microbiologie doit s'effectuer le plus rapidement possible afin de garantir (en particulier pour les échantillons de tissus) la viabilité des micro-organismes délicats et d'empêcher la prolifération de micro-organismes à croissance rapide. Si un transport rapide n'est pas possible, tous les échantillons doivent être conservés au frais dans l'attente de celui-ci (4°C), à l'exception de ceux déjà mis en culture sur un milieu de culture.

Les types d'échantillons les plus courants que le laboratoire reçoit pour traitement sont, en ce qui concerne les tissus et cellules, le sang, les liquides de ponction et le matériel tissulaire et cellulaire.

Pour prélever un échantillon de sang, il faut pénétrer dans le vaisseau sanguin au travers de la peau. Chaque prélèvement de sang nécessite la prise en compte d'une asepsie stricte car la peau est toujours colonisée par la flore commensale susceptible de provoquer une contamination secondaire de l'échantillon. Etant donné qu'en cas de bactériémie seulement 1 à 100 germes sont présents par 100 ml de sang, il est nécessaire de prélever chez les adultes au moins 30 à 40 ml de sang (2 à 5 ml chez les enfants) et de le répartir entre deux flacons d'hémoculture (aérobie et anaérobie).

Les fragments de tissus obtenus par biopsie doivent toujours être maintenus humides afin de prévenir le dessèchement. Il est préférable d'inoculer le fragment dans sa totalité dans un bouillon de culture (p. ex. thioglycolate ou Wilkins Chalgren broth).

En cas d'isolation de micro-organismes, quatre types de milieux de culture sont utilisés: milieux de culture universels, milieux de culture sélectifs, milieux enrichis et milieux de culture spécifiques. Les milieux de culture universels solides et liquides sont des milieux très riches dont le but est de favoriser la croissance d'un large éventail de micro-organismes; ils conviennent donc également pour les cultures de cellules et tissus. Le milieu de culture général solide le plus universel est la gélose au sang qui permet la prolifération de la plupart des bactéries importantes sur le plan médical, des champignons et moisissures. Les milieux de culture universels liquides tels que le Tryptic Soy Broth ou le bouillon de thioglycolate sont généralement utilisés pour donner une chance de proliférer à de petites quantités de bactéries (provenant surtout de liquides de ponction ou sur écouvillons) parce qu'un inoculum plus grand peut y être introduit. Le Wilkins Chalgren anaerobic broth et le thioglycolate sont des exemples de milieux liquides dans lesquels, grâce à la présence notamment d'hémine et de vitamine K, des bactéries tant aérobies qu'anaérobies peuvent proliférer.

Le sang et la moelle osseuse sont cultivés dans des flacons d'hémoculture aérobie et/ou anaérobie. Ces flacons d'hémoculture sont incubés dans des systèmes automatiques de détection microbienne. Ces systèmes offrent un monitoring permanent de la croissance microbiologique dans les flacons.

L'utilisation de milieux liquides (p. ex. thioglycolate) offre l'avantage d'être plus sensible, de pouvoir isoler les micro-organismes difficiles à cultiver et qui ne prolifèrent pas sur des plaques gélosées solides, de cultiver des bactéries anaérobies et de diluer les substances résiduelles inhibitrices (p. ex. antibiotiques) pour obtenir des quantités subinhibitrices. Les inconvénients potentiels liés aux milieux liquides sont qu'ils détectent avec une plus grande certitude les micro-organismes à croissance plus rapide que les organismes à croissance plus lente, que l'évaluation quantitative de la croissance microbienne n'est pas possible et que cette technique est plus sensible aux résultats faux positifs.

Des milieux sélectifs sont utilisés pour permettre la croissance de certains groupes de micro-organismes alors que d'autres groupes sont inhibés. Pour isoler des levures et champignons, la gélose de Sabouraud glucosée contenant du chloramphénicol constitue un milieu idéal.

La plupart des micro-organismes importants sur le plan médical présentent une croissance optimale à une température d'environ 36°C. Les champignons sont incubés tant à 36°C qu'à température ambiante (22-25°C). Alors que la plupart des bactéries importantes sur le plan médical prolifèrent dans les 48 heures, la durée d'incubation de la plupart des isolats de champignons pertinents sur le plan clinique est plus longue.

Les micro-organismes aérobies et facultativement les anaérobies se multiplient bien dans des conditions environnementales normales. Certains micro-organismes ont besoin d'une concentration accrue en CO<sub>2</sub> (5-10%) pour démarrer leur croissance. Les anaérobies stricts ne prolifèrent pas en présence d'oxygène. Une atmosphère anaérobie est obtenue dans un système fermé exempt d'oxygène.

Dans le laboratoire, la sensibilité biologique d'un micro-organisme est testée *in vitro*. Elle indique la concentration la plus basse en antibiotique nécessaire pour empêcher le micro-organisme de se multiplier: la concentration minimale inhibitrice (CMI). Pour déterminer la CMI d'un antibiotique, on permet en pratique à des micro-organismes de proliférer sur des milieux de culture standardisés avec différentes concentrations d'antibiotique, généralement des dilutions duplo ou des multiples de duplo à partir d'une concentration de 1 mg/ml. Tant le *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) que EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) possèdent des procédures validées qui peuvent être utilisées pour déterminer la sensibilité des micro-organismes.

Cette partie donne également un aperçu des rapports de cas publiés mentionnant la transmission de bactéries et champignons par la transplantation de tissus et cellules.

Des transmissions de micro-organismes aérobies à Gram positif tels que *Staphylococcus* spp., *S. pyogenes*, à Gram négatif, tels que *Pseudomonas aeruginosa* et *Serratia marcescens*, mais également des infections mortelles à *Clostridium* spp. par l'intermédiaire d'allogreffes musculosquelettiques ont été décrites (bactéries sporulantes anaérobies à Gram positif). Dans les années '50, quelques transmissions de *Mycobacterium tuberculosis* par des allogreffes de côtes ont également été décrites.

Les allogreffes de peau sont moins clairement à l'origine d'infections. Deux patients ayant reçu une greffe dermique acellulaire pour combler un défaut dural ont été infectés par *Propionibacterium acnes* et 1 jeune patient est décédé d'une septicémie après application, sur des brûlures dermiques profondes, d'une allogreffe de donneurs cadavériques conservées dans le glycérol et contaminée par *Pseudomonas aeruginosa*.

La transplantation de cornées a également provoqué la transmission de *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium* spp., des bactéries à Gram négatif telles que *Pseudomonas* spp. et *Klebsiella pneumoniae*, *Candida* spp., *Aspergillus* spp., et *Cryptococcus neoformans*. Ces publications concernent généralement des cornées traitées selon la méthode de conservation à froid et les bactéries semblent pouvoir survivre dans ce milieu de conservation malgré la présence d'antibiotiques.

Aucun rapport de cas de transmission d'une infection par des allogreffes tympano-ossiculaires n'a pu être retrouvé.

L'endocardite bactérienne due à l'implantation de valves cardiaques contaminées présente un taux élevé de mortalité. *Mycobacterium tuberculosis* a été transmis par des homogreffes peu de temps après la transplantation de tissus, ce qui ne se produirait vraisemblablement plus au vu des critères actuels de sélection. *Candida albicans* est aussi rapporté comme cause d'endocardite posttransplantation.

Au fil des ans, les banques de tissus ont développé différentes approches interdisciplinaires pour le dépistage des donneurs cadavériques quant à la présence d'agents infectieux mais également pour le dépistage des tissus et greffons provenant de ces donneurs. Des cultures microbiologiques sont prises en routine sur les donneurs cadavériques ou vivants au moment du prélèvement de tissus/cellules. Le contrôle microbiologique des tissus fait partie d'un groupe de

tests et procédures (antécédents médicaux, sérologie, ...) ayant pour but de réduire le risque de transformer/traiter des tissus/cellules contenant des agents infectieux.

Ces cultures microbiologiques donnent une idée quant à une bactériémie potentielle chez des donneurs qui, après examen du dossier médical et de la situation physique, seraient considérés comme non bactériémiques et elles identifient les tissus qui, au moment du prélèvement, ont été contaminés par des bactéries, des moisissures ou des levures. Les résultats de ces cultures influencent le traitement ultérieur de ces tissus (prétraitement).

Après prélèvement, les échantillons suivants peuvent être pris: écouvillons et/ou fragments tissulaires destructifs, sang ou moelle osseuse.

La méthode la plus utilisée pour la prise de cultures d'os, de cartilage et de tendons sont les écouvillons en coton permettant de racler à la fois la surface et éventuellement le canal médullaire des os longs. Différents auteurs ont cependant démontré la faible sensibilité des écouvillons.

Des inconvénients sont aussi liés à l'utilisation de matériel d'allogreffe résiduel malgré la sensibilité plus élevée de ce type d'échantillon. Du tissu situé à proximité de l'allogreffe est souvent utilisé pour la culture. Ce tissu associé n'est pas toujours indicatif des micro-organismes présents sur l'allogreffe elle-même et il s'agit souvent de petits fragments résiduels (sampling error). Une autre option consiste à combiner l'utilisation de l'écouvillon avec des fragments résiduels pour le contrôle microbiologique. Le rôle des hémocultures *post mortem* comme indicateur de septicémie et de contamination tissulaire est contesté. Ni les hémocultures ni les aspirats de moelle osseuse ne constituent des méthodes de remplacement fiables pour la culture des tissus prélevés; cependant, leur usage combiné aux cultures tissulaires peut apporter une valeur diagnostique complémentaire pour l'évaluation du donneur.

Dans la littérature relative aux banques de tissus, il n'existe en outre aucune uniformité concernant les milieux de culture, la durée d'incubation et les conditions d'incubation: de 48h à plus de 14 jours d'incubation, pour les bactéries aérobies et/ou anaérobies...

La détermination de la charge microbienne peut être importante pour le traitement ultérieur d'un tissu. Différentes méthodes (plus ou moins complexes) peuvent être utilisées.

*Treponema pallidum* est un spirochète à Gram négatif qui ne peut être cultivé sur des milieux de culture. C'est la raison pour laquelle sa présence chez les donneurs ne peut être confirmée que par des tests sanguins détectant les anticorps (non) tréponémaux.

Après le traitement des tissus au moyen d'un rinçage éventuel dans une solution antibiotique, des échantillons (écouvillons et/ou fragments de tissus) sont à nouveau prélevés juste avant l'emballage stérile pour contrôle microbiologique. On peut s'attendre à ce que des résidus d'antibiotiques exercent un certain effet bactériostatique dans le milieu de culture. Les solutions contenant des antibiotiques peuvent éventuellement être ajoutées en quantité suffisante au milieu de culture afin de diluer les antibiotiques résiduels.

A titre complémentaire, des cultures peuvent être prises durant l'implantation de l'allogreffe afin de mieux évaluer le rôle éventuel de la greffe en cas d'infections posttransplantation.

Il faut noter que chaque banque de tissus doit, conformément à la Directive européenne 2004/23/CE, disposer de procédures afin de maintenir le lien entre le(s) receveur(s) transplanté(s) et le donneur. Cela permet, en cas d'effets secondaires (p. ex. infection liée à l'allogreffe) de retrouver tous les receveurs ayant reçu des tissus d'un même donneur.

Les moyens préventifs pour éviter autant que possible la transmission de bactéries/champignons comprennent notamment les critères de sélection des donneurs (dossier médical, examen clinique, tests sérologiques, ...) mais également une analyse de risque des points potentiels de contamination. Cette analyse de risque sera aussi utilisée lors du traitement des tissus/cellules dans des conditions de salle blanche ou non.

Lors du screening d'un donneur potentiel de tissus/cellules, le dossier médical doit être analysé quant aux critères généraux d'exclusion tels que mentionnés dans l'Arrêté royal de 2008/l'évidence clinique (signes de septicémie p. ex.) et physique (ulcères génitaux, lymphadénopathies p. ex.) est contrôlée pour les maladies transmissibles pertinentes.

Pour établir une analyse de risque concernant la contamination des allogreffes, la majorité des études a été réalisée sur le tissu musculosquelettique.

Les facteurs de risque potentiels suivants ont été décrits pour la contamination des allogreffes musculosquelettiques lors du prélèvement par des micro-organismes faiblement pathogènes: le nombre de personnes participant à la procédure de prélèvement, le type de greffon, le délai *post mortem*, la manipulation physique (translocation bactérienne), le prélèvement effectué à la morgue par rapport au quartier opératoire. Ont été décrits comme facteurs de risque pour les micro-organismes hautement pathogènes: un traumatisme comme cause de décès, des hémocultures positives, un prélèvement préalable d'organe et la localisation du prélèvement de tissus, le type de donneur: donneurs cadavériques.

D'autres facteurs de risque de contamination des allogreffes de peau sont la méthode d'épilation (tondeuse versus rasoir) et le type de désinfectant.

Les allogreffes de valves cardiaques et de cornées sont décontaminées dans des cocktails d'antibiotiques. La température d'incubation de ces cocktails constitue un facteur important pour l'efficacité de la décontamination.

Les allogreffes de tissus peuvent être contaminées durant le traitement par l'air ambiant et les surfaces, par le personnel, par des réactifs contaminés, des instruments chirurgicaux, du matériel de traitement, le matériel utilisé durant l'opération de transplantation ou subir une pseudocontamination au laboratoire de microbiologie.

Tous ces facteurs peuvent être utilisés pour contrôler une contamination des greffons tant lors du prélèvement que durant le traitement.

Afin de réduire autant que possible le risque infectieux pour les patients lors de la transplantation de tissus/cellules, il est nécessaire de travailler dans le cadre d'un système efficace de gestion de la qualité. Ce système comprend des tests approfondis sur le sang du donneur et les échantillons de tissus/cellules mais doit aussi inclure d'autres mesures de contrôle afin de garantir la sécurité et l'efficacité. Ces standards de qualité sont décrits dans des procédures et reposent sur les caractéristiques qui concernent à la fois la sécurité du patient et le maintien de l'efficacité clinique du produit.

A l'exemple de l'industrie pharmaceutique, le concept de salle blanche a progressivement été repris par les banques de tissus. Par le passé, les tissus étaient traités dans un environnement physique similaire à une salle d'opération. Actuellement, la règle pour les établissements de tissus veut qu'ils utilisent des salles de traitement spécialisées dont la qualité de l'air répond à une EU GMP classe A (ISO grade 5) durant le traitement du tissu qui ne subira plus aucun inactivation microbienne. L'environnement devra au moins correspondre à une GMP classe D (AR 2009).

Cette partie examine enfin une série d'agents à action décontaminante/désinfectante ou stérilisante pour lesquels il existe une évidence quant à leur efficacité et leur toxicité lors de la décontamination de tissus/cellules. Quelques techniques de conservation sont aussi brièvement abordées.

Le traitement du tissu osseux débute généralement par l'élimination mécanique du sang résiduel, des tissus mous, du périoste et de la moelle osseuse. Cette opération réduit certainement le risque de transmission d'une infection.

Le lavage pulsé à faible pression semble efficace pour la réduction de la charge bactérienne sur les os et il en va de même du simple rinçage à l'eau pour les cornées.

En ce qui concerne le traitement chimique, nous examinons les performances des peroxydes, de la chlorhexidine, des hypochlorites, des agents alkylants, des antiseptiques organomercuriels, des alcools, de l'iode et des iodophores, des agents tensio-actifs, des antibiotiques, du biocleanse et du CO<sub>2</sub> supercritique.

Des études limitées décrivent les effets d'un traitement au peroxyde d'hydrogène des allogreffes d'os. En tout cas, il existe une large expérience de l'utilisation de ce produit pour la décontamination des os.

L'acide peracétique a principalement été testé pour la décontamination des allogreffes de peau. Une concentration de 0,1% d'acide peracétique combiné à du glycérol à 85 % n'a pas d'effet néfaste sur les propriétés de biocompatibilité de la peau. La croissance microbienne est freinée dans les greffons de peau après un traitement de 90 min.

Un traitement combiné de l'os au moyen d'antibiotiques et d'acide peracétique à basse pression semble avoir un effet stérilisant. Un traitement combiné au moyen d'APA et d'éthanol ne semble pas entraîner de réduction significative de l'ostéo-conductivité ou de l'ostéo-intégration de la matrice osseuse déminéralisée mais influence les propriétés biomécaniques de l'os lyophilisé.

Les valves cardiaques ne sont pas suffisamment décontaminées par 0,1% d'acide peracétique mais une concentration de 0,21% durant 30 min a un effet suffisant (réduction de 4 log<sub>10</sub>). Cette concentration plus élevée n'a pas d'effet néfaste sur la morphologie des valves cardiaques.

Une réduction significative de la flore cutanée totale est constatée après un traitement à la chlorhexidine à 4%, une application qui peut s'effectuer lors du prélèvement des allogreffes de peau: le donneur est soigneusement désinfecté avec de l'alcool iodé et du gluconate de chlorhexidine.

Quelques études ont démontré un bon effet de 2 - 4 % de gluconate de chlorhexidine sur les tendons, fascia et os. Ce traitement possède toutefois des effets néfastes potentiels tels que synovite réactive intra-articulaire et chondrolyse.

L'hypochlorite de sodium à 0,5% semble efficace comme désinfectant pour les allogreffes de peau. Les allogreffes osseuses peuvent aussi subir un traitement complémentaire au moyen d'hypochlorite de sodium à 2% contre la transmission potentielle de maladies à prions bien qu'il n'existe aucune certitude quant à la capacité de pénétration de l'hypochlorite dans les os.

Parmi les agents alkylants, le formaldéhyde à 2,7 - 4 % est utilisé pour la conservation des osselets et du tympan, ce qui en fait un produit fortement biocide. Il existe également une certaine expérience du traitement au glutaraldéhyde à 2 % des valves cardiaques et des veines mais des rapports récents indiquent une rapide dégénérescence des tissus après ce traitement.

Les antiseptiques organomercuriels ne conviennent pas pour la conservation des allogreffes d'os en raison de leur toxicité. Ces antiseptiques (principalement le Cialit) ont déjà été utilisés dans le passé pour la conservation du cartilage des côtes et de la dure mère avec de bons résultats: pas d'incidence accrue de l'absorption de la greffe de cartilage et pas d'infections par les greffes de dure mère implantées.

Cialit est surtout appliqué pour la conservation des osselets (technique de Marquet) avec préservation de la compliance naturelle de la greffe et désinfection modérée.

L'éthanol n'endommage pas les propriétés ostéo-inductrices de la matrice osseuse extracellulaire mais bien les propriétés ostéogènes de l'os cortical minéralisé. La capacité de pénétration de l'éthanol à 70 % en profondeur dans les allogreffes d'os de grande dimension reste cependant un point d'incertitude. L'éthanol à 70 % est également fréquemment utilisé pour la désinfection des tendons sans effets secondaires tels que la synovite. La sclérotique et les osselets peuvent être conservés dans de l'éthanol à 70 %.

La povidone iodée à 10 %, un iodophore, semble efficace pour la décontamination des os à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* qui survit. L'histologie des os est aussi conservée à cette concentration. Ce n'est toutefois pas le cas de la matrice osseuse déminéralisée dont l'ostéo-inductivité est endommagée par 1 % de povidone iodée. Les tendons ne semblent pas être suffisamment décontaminés par la povidone iodée à 10 % durant 30 min.

Si la concentration de povidone iodée n'est pas supérieure à 5mg/mL, la toxicité pour les fibroblastes cornéens est faible mais ne permet pas toutefois d'obtenir une décontamination complète de la cornée. La povidone iodée n'est pas appliquée pour les greffes vasculaires.

Les agents tensio-actifs (détergents) possèdent principalement une action nettoyante et ne peuvent pas être considérés comme désinfectants. Des germes survivent dans ces solutions.

Les antibiotiques sont largement appliqués pour la décontamination des tissus allogéniques. En règle générale, il faut souligner que les antibiotiques ne sont pas toujours efficaces aux basses températures (p. ex. 4°C) auxquelles ils sont généralement utilisés. L'incubation de tissus dans des solutions d'antibiotiques à basse température préserve toutefois la viabilité des tissus.

Pour la décontamination des allogreffes de peau les antibiotiques suivants sont souvent utilisés: pénicilline et streptomycine, gentamicine, néomycine, kanamycine. Aucune étude n'a pu démontrer qu'une décontamination complète des allogreffes de peau peut être obtenue grâce à des traitements antibiotiques. Des résultats similaires ont été obtenus lors d'études sur des allogreffes d'os et de tendons: la bacitracine, la polymyxine B, la rifampicine et les céphalosporines ont toutes été testées à différentes concentrations et pour différentes durées d'incubation. Aucune étude n'a pu démontrer une décontamination complète des allogreffes d'os/tendons. De plus, la pénétration des antibiotiques dans le tissu dépend fortement du type d'antibiotique.

En ce qui concerne les valves cardiaques s'ajoute la difficulté que les cellules doivent rester viables. La désinfection est dès lors réalisée au moyen d'une faible dose d'antibiotiques en même temps qu'une cryoconservation afin de limiter la perte cellulaire. Strickett a montré l'efficacité de la combinaison suivante pour les valves cardiaques: incubation de 24 - 48 h à 4°C dans un milieu de culture avec de la cefoxitine, lincomycine, polymyxine B et vancomycine +/- amphotéricine B. O'Brien fut le premier à exclure totalement l'amphotéricine B (un agent antifongique relativement toxique) du protocole de désinfection, car les fibroblastes de valves cardiaques humaines cryoconservés exposés à l'amphotéricine B perdent 42 % de leur viabilité. Les concentrations résiduelles d'antibiotiques dans les tissus ne sont pas de nature à entraîner des concentrations systémiques toxiques.

Le même protocole de décontamination est souvent utilisé pour les greffes vasculaires que pour les valves cardiaques. En ce qui concerne les cornées, les antibiotiques sont généralement utilisés dans le milieu de conservation qui est maintenu à 4°C.

Il faut souligner ici une fois de plus qu'il est important d'éviter autant que possible la bactériostase lors des contrôles microbiologiques des cultures de tissus après un traitement antibiotique. La centrifugation, la mise en culture du sédiment et le charbon actif sont des méthodes adéquates pour ce faire.

BioCleanse<sup>®</sup> *Tissue Sterilisation Process* est une méthode de stérilisation chimique à basse température qui éliminerait aussi les micro-organismes profondément dans l'os. Il utilise des détergents et agents stérilisants sans autre qualification) qui éliminent les micro-organismes (et les spores) mais préservent également la résistance des tissus et la biocompatibilité. Des composants mécaniques participent aussi au processus de stérilisation en éliminant le sang et les lipides.

Le CO<sub>2</sub> supercritique possède une grande capacité de 'solvant' et une importante capacité de diffusion: idéal pour extraire des substances des matrices poreuses tels que les os. L'expérience est limitée en ce qui concerne le processus au CO<sub>2</sub> supercritique pour l'inactivation virale, l'élimination des lipides, des résidus cellulaires et des protéines médullaires. Les caractéristiques structurelles des os sont préservées grâce à cette technique.

La stérilisation des allogreffes par le gaz est possible en utilisant l'oxyde d'éthylène, la bêta-propionolactone, le formaldéhyde, le peroxyde d'hydrogène et l'acide peracétique. La bêta-propionolactone a été appliquée précédemment dans les banques de tissus pour la stérilisation des os et valves cardiaques mais a été abandonnée en raison de la toxicité de cet agent, du manque de pénétration du produit dans l'os d'une part et de la rapide dégénérescence des valves traitées d'autre part.

L'oxyde d'éthylène est un gaz à haut pouvoir de pénétration. Bien que celui-ci ait été très souvent utilisé par le passé pour la stérilisation des allogreffes musculosquelettiques et osseuses, la plupart des banques de tissus ont cessé de l'employer en raison des résidus toxiques potentiels de gaz dans les tissus. Des allogreffes d'os sûres peuvent être obtenues par un rinçage soigneux des greffes osseuses au moyen d'eau désionisée afin d'éliminer la graisse, la moelle osseuse et les tissus mous. Ensuite, un cycle froid de stérilisation à l'oxyde d'éthylène est réalisé afin d'éviter les hautes températures et les greffes sont lyophilisées et aérées.

Son utilisation a toutefois diminué à l'heure actuelle au profit de l'irradiation gamma. Les os traités à l'oxyde d'éthylène s'intégreraient plus lentement à l'os-hôte et il se produirait une déplétion de la capacité ostéo-inductrice et des propriétés biomécaniques. Des études relatives au maintien

des propriétés ostéo-inductrices de la matrice osseuse déminéralisée après traitement à l'oxyde d'éthylène font l'objet de controverses.

Des tendons traités à l'oxyde d'éthylène semblent également être à l'origine d'un épanchement de synovie chronique grave associé à une inflammation.

Un traitement combiné glycérol et oxyde d'éthylène de composites dermo-épidermiques n'a pas d'effet néfaste sur la morphologie de ces composites. En raison des résidus chimiques potentiels nocifs, cette méthode n'a pas connu de percée pour les allogreffes de peau.

Le formaldéhyde sous forme gazeuse possède une puissance de pénétration médiocre et n'est donc pas appliqué sous cette forme aux allogreffes. Aucune application sur les allogreffes n'est décrite pour le peroxyde d'hydrogène et l'acide peracétique en phase gazeuse.

La stérilisation par des méthodes physiques comprend la chaleur, le système Lobator sd-2, la stérilisation au gaz plasma à basse température, les rayons UV/impulsions, les micro-ondes, l'irradiation gamma et la stérilisation à faisceau d'électrons.

La stérilisation par la chaleur n'est pas applicable à la peau et aux tendons car elle dénature les protéines telles que le collagène et peut coaguler les tissus mous. La chaleur entraîne également une nécrose des fragments osseux, dénature les facteurs de croissance tels que les protéoglycanes, entraînant de ce fait une perte de capacité de la matrice osseuse déminéralisée à régénérer l'os ou le cartilage.

Une nouvelle technique est le "système Lobator sd-2" (Allemagne) principalement utilisé pour le traitement des têtes fémorales en association avec un chauffage à 80°C. Il s'agit d'un système convivial à effet bactéricide et anti-viral. Le "système Lobator sd-2" serait un système sûr et efficace pour le traitement des têtes fémorales allogéniques (< 60 mm de diamètre). La technique n'encommerait pas les propriétés ostéo-inductrices, la structure et la stabilité de l'os.

Le plasma (quatrième état d'agrégation de la matière) est composé d'un nuage d'ions, d'électrons et d'espèces neutres. La stérilisation au moyen du stérilisateur STERRAD® 100 utilise du gaz plasma à basse température. L'utilisation combinée de plasma et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stérilise rapidement les produits sans laisser de résidus toxiques. Cette technique est microbicide sur les bactéries végétatives (y compris les mycobactéries), les spores bactériennes, les levures, les moisissures et les virus. Aucun effet nocif n'a pu être mis en évidence sur les propriétés biomécaniques des segments d'os corticaux après stérilisation au plasma de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La technique ne convient toutefois pas pour la stérilisation de la matrice osseuse déminéralisée en raison de la perte de capacité ostéo-inductrice.

La stérilisation aux rayons UV ou impulsions n'a pas été étudiée pour une application aux allogreffes. La lumière pulsée intense est une technique relativement nouvelle pour la décontamination des surfaces et des solutions. Cette méthode est efficace contre tous les micro-organismes (bactéries, moisissures, levures, spores, virus, protozoaires et cystes). On ignore toutefois si les UV pénètrent de manière centrale dans les allogreffes massives d'os et des modifications du collagène apparaissent dans les os et tendons traités aux UV. La matrice osseuse déminéralisée perd son ostéo-inductivité après exposition aux UV.

Une application rare est décrite dans la littérature concernant la stérilisation aux micro-ondes de fragments de têtes de fémur contaminés. Une irradiation de deux minutes semble être efficace pour la décontamination de l'os, la réduction des propriétés biomécaniques ne se produit toutefois qu'après 60 sec.

L'irradiation gamma (un ensemble d'énergie électromagnétique - un photon) possède une capacité de pénétration élevée (y compris dans les tissus humains). L'irradiation gamma (source de Co<sup>60</sup>) est très efficace contre les bactéries à des doses de 15 à 25 kGy. Une dose d'au moins 30 kGy (10 kGy = 1 Mrad) est nécessaire pour l'inactivation de la plupart des virus. Cette dose dépasse sans doute la dose recommandée en routine pour la stérilisation des greffes osseuses (10-35 kGy). L'AIEA recommande une dose de 25 kGy pour obtenir un SAL de 10<sup>-6</sup> si la charge microbienne est d'environ 1.000 CFU par allogreffe et si la résistance présente une distribution standard. Les rayons gamma peuvent pénétrer jusqu'à une profondeur de 30 cm dans l'eau (densité: 1 g/cm<sup>3</sup>). La peau, la membrane amniotique, le péricarde et les tendons peuvent donc



être stérilisés au moyen de cette technique. Si la densité moyenne d'une greffe est supérieure, comme c'est le cas d'une allogreffe osseuse p. ex. ( $2 \text{ g/cm}^3$ ), l'épaisseur acceptable d'une greffe d'os cortical exposée aux rayons gamma est d'environ 10-15 cm. En fonction de l'état physique des allogreffes osseuses (température, lyophilisées, congelées), la dose à laquelle des dommages aux propriétés biomécaniques de l'os apparaissent est différente. Des agents de protection tels que le propylène glycol peuvent être utilisés afin de conserver les propriétés biomécaniques de l'os durant l'irradiation. Les effets du rayonnement sur les tendons et la matrice osseuse déminéralisée mentionnés dans la littérature sont contradictoires. L'irradiation gamma de l'os et des tissus mous modifierait la structure du collagène, réduirait la force tensile et inactiverait les *bone morphogenetic proteins*. Les cornées et valves cardiaques ne peuvent pas être irradiées avant stérilisation.

En ce qui concerne la peau, l'irradiation ne constitue pas non plus la technique idéale de stérilisation car elle provoque une rigidité de la peau, une moindre adhérence et donc un *take-rate* plus faible de la peau de donneur.

Les électrons d'un faisceau E-beam peuvent pénétrer jusqu'à 8 cm de profondeur dans l'eau (densité:  $1 \text{ g/cm}^3$ ). Si la densité moyenne d'une greffe osseuse est supérieure à  $2 \text{ g/cm}^3$ , l'épaisseur acceptable d'une greffe d'os cortical exposée aux rayons d'un faisceau d'électrons est d'environ 3 cm. Le faisceau d'électrons n'a pas provoqué de cytotoxicité pour les os traités. Les rayons gamma par contre sont (à température ambiante) toxiques pour les cellules ostéoblastes-like et fibroblastes-like.

Différentes techniques de conservation peuvent être appliquées à différents types d'allogreffes: la congélation, la cryoconservation, la lyophilisation, la glycérolisation.

La congélation est une méthode utilisée depuis longtemps pour la conservation des os et du tissu collagénique comme unique méthode de conservation ou avant lyophilisation. La température de congélation recommandée pour une conservation de longue durée des os, tendons ou allogreffes de cartilage (jusqu'à 5 ans) est inférieure à  $-40^\circ\text{C}$ . La congélation ne réduit pas les propriétés mécaniques des ligaments mais n'a pas d'effet stérilisant. La cryoconservation doit se dérouler selon une méthode validée (congélation immédiate ou selon une technique de congélation contrôlée). Cette technique est utilisée pour les allogreffes de peau en combinaison avec le glycérol comme cryoprotecteur, pour le cartilage et les chondrocytes avec du diméthylsulfoxyde p. ex. Les modifications histologiques dues à cette technique de conservation sont sans effet sur les propriétés mécaniques du tissu.

La lyophilisation est une méthode populaire pour la conservation de longue durée des allogreffes d'os, mais également du tissu collagénique y compris les ligaments, à température ambiante. La lyophilisation a toutefois un effet néfaste sur la stabilité mécanique et l'incorporation des allogreffes osseuses, ce qui rend cette technique moins adéquate pour les greffes osseuses de grande dimension et les tendons. La lyophilisation n'endommage pas la capacité ostéo-inductrice du tissu osseux. Elle n'a pas d'effet stérilisant sur le tissu.

Enfin, il peut être fait usage du glycérol qui, en forte concentration, agit comme un lyophilisant chimique. Le glycérol préserverait la structure des tissus et cellules et réduirait l'antigénicité du tissu. Le glycérol a des effets antimicrobiens et antiviraux limités et très lents. Pour la conservation à long terme d'allogreffes de peau non vivante, il est possible d'appliquer une procédure de glycérolisation (glycérol à 85%). Des espèces bactériennes différentes présentent donc une sensibilité différente au glycérol. Les micro-organismes à Gram négatif sont éliminés plus rapidement de la peau conservée au glycérol que les micro-organismes à Gram positif. Des études histologiques ne montrent que des modifications morphologiques subtiles de la peau conservée au glycérol n'ayant vraisemblablement aucun effet sur l'intégrité structurelle de la greffe lorsqu'elle est utilisée comme pansement.