



AVIS DU CONSEIL SUPERIEUR DE LA SANTE N° 8785

Inactivation et sécurisation des tissus et cellules vis-à-vis des bactéries, virus et 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

Mots clés

Keywords	Mesh terms*	Sleutelwoorden	Mots clés	Stichworte
HIV	HIV	HIV	HIV	HIV
HBV	Hepatitis B virus	HBV	HBV	HBV
HCV	Hepatitis C virus	HCV	HCV	HCV
HTLV	HTLV-i infections	HTLV	HTLV	HTLV
West Nile virus	West Nile virus	West Nile virus	West nile virus	West-Nil-Virus
Decontamination	Decontamination	Decontaminatie	Décontamination	Dekontaminierung
Sterilization	Sterilization	Sterilizatie	Stérilisation	Sterilisation
Disinfection	Disinfection	Desinfectie	Désinfection	Desinfektion
Tissue allograft	Tissue transplantation	Weefselallogreffe	Allogreffe tissulaire	Gewebe-allotransplantation
Infection transmission	Communicable diseases	Infectietransmissie	Transmission de l'infection	Infektionsübertragung
Nucleic Acid Amplification techniques	Nucleic Acid Amplification techniques	NAT	NAT	NAT
Serology	Serology	Serologie	Sérologie	Serologie

* MeSH (Medical Subject Headings) is the NLM controlled vocabulary thesaurus used for indexing articles for PubMed.

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	6
2. ELABORATION ET ARGUMENTATION	6
2.1. MÉTHODOLOGIE	6
3. DÉFINITION, CLASSIFICATION ET GÉNÉRALITÉS	7
3.1. DÉFINITION	7
3.1.1. Définition.....	7
3.1.2. Caractéristiques des virus.....	7
3.1.3. Cycle viral.....	8
3.1.4. Structure virale	8
3.2. TAXONOMIE VIRALE	9
3.3. APERÇU DE LA SITUATION.....	9
4. DIAGNOSTIC DES INFECTIONS VIRALES	11
4.1. INTRODUCTION	11
4.2. FACTEURS ANTÉRIEURS À L'ANALYSE	11
4.2.1. Type de donneur	11
4.2.2. Dilution du plasma.....	12
4.3. SPECTRE DES VIRUS	12
4.3.1. HIV.....	12
4.3.2. HBV.....	13
4.3.3. HCV.....	14
4.3.4. HTLV-1/2.....	15
4.3.5. Agents infectieux spécifiques.....	16
4.3.6. Tests disponibles.....	18
4.3.7. Validation des tests diagnostiques in vivo contre post mortem	27
4.3.8. Interprétation des résultats des tests	28
5. INVENTAIRE DES PUBLICATIONS : TRANSMISSION DES INFECTIONS VIRALES PAR LES TISSUS	29
5.1. INTRODUCTION	29
5.2. HBV	29
5.3. HCV	30
5.4. HIV.....	31
5.5. HTLV.....	33
5.6. RAGE.....	33
5.7. CMV.....	33
5.8. VIRUS À ORGANOTROPISME	34
5.9. INFECTIONS ÉMERGENTES	34
6. PREVENTION DES INFECTIONS VIRALES	35
6.1. CRITÈRES DE SÉLECTION LORS DU PRÉLÈVEMENT.....	35
6.1.1. Dossier médical.....	35
6.1.2. Critères d'exclusion généraux pour les donneurs vivants et décédés.....	35
6.1.3. Facteurs de risque à dépister chez les donneurs vivants/décédés	36
6.1.4. Preuves cliniques d'infections virales.....	37
6.1.5. Preuves physiques d'infections virales	38
6.2. TESTS SÉROLOGIQUES.....	38
6.2.1. Exigences générales pour le dosage des marqueurs biologiques (UE, 2006; AR, 2009)..	38
6.2.2. Tests de dépistage virologique pour les donneurs de cellules et de tissus vivants et décédés (à l'exception des donneurs de gamètes).....	39
7. DESINFECTION – STERILISATION	40
7.1. INTRODUCTION	40

7.2.	DESCRIPTION DES CONCEPTS	40
7.3.	NETTOYAGE MÉCANIQUE	41
7.3.1.	Contexte	41
7.3.2.	Application aux allogreffes	41
7.4.	TRAITEMENT	42
7.4.1.	Demineralized Bone Matrix (DBM).....	42
7.5.	TRAITEMENT CHIMIQUE.....	42
7.5.1.	Peroxydes.....	43
7.5.2.	Chlorhexidine	47
7.5.3.	Dérivés du chlore	49
7.5.4.	Agents alkylants	50
7.5.5.	Antiseptiques mercuriels organiques	52
7.5.6.	Alcools.....	53
7.5.7.	Iode et iodophores.....	55
7.5.8.	Agents tensioactifs	56
7.5.9.	Stérilisation chimique Biocleanse®	57
7.5.10.	CO ₂ supercritique	58
7.6.	STÉRILISATION PAR LE GAZ.....	59
7.6.1.	Oxyde d'éthylène.....	59
7.6.2.	Bêta-propiolactone	61
7.6.3.	Formaldéhyde	62
7.6.4.	Peroxyde d'hydrogène	62
7.6.5.	Acide peracétique.....	62
7.7.	MÉTHODES DE STÉRILISATION PHYSIQUE	63
7.7.1.	Stérilisation par la chaleur (autoclave à vapeur – chaleur sèche)	63
7.7.2.	« Système Lobator sd-2 »	64
7.7.3.	Stérilisation par plasma à basse température.....	64
7.7.4.	Stérilisation/désinfection par rayons UV/impulsions	65
7.7.5.	Stérilisation par micro-ondes.....	67
7.7.6.	Irradiation gamma et stérilisation par faisceau d'électrons	67
7.8.	TECHNIQUES DE PRÉSERVATION.....	74
7.8.1.	Congélation	74
7.8.2.	Cryopréservation	75
7.8.3.	Lyophilisation.....	76
7.8.4.	Glycérol	77
8.	CONSIDERATIONS FINALES	80
9.	REFERENCES	82
10.	COMPOSITION DU GROUPE DE TRAVAIL.....	95
	Au sujet du Conseil Supérieur de la Santé (CSS).....	96

ABREVIATIONS ET SYMBOLES

AATB	<i>American Association of Tissue Banks</i>
Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ag	Antigène
AIEA	Agence internationale de l'Énergie atomique
APA	Acide peracétique
AR	Arrêté royal
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomal
BMPs	<i>Bone morphogenetic proteins</i> ou protéines osseuses structurales
CB	(Donneur à) cœur battant
CDC	<i>Centers for Disease Control</i>
CE	Label européen
CH ₃ COOH	Acide acétique
Cialit	Sodium-2-éthyl-mercuri-mercapto-benzoxazole-5-carboxylique acide
CLIA	Dosage immunologique par chimioluminescence
CMV	Cytomégalovirus
CNB	(Donneur à) cœur non battant
CoV	Coronavirus
CSS	Conseil Supérieur de la Santé
D ₁₀	Réduction de 10 % de la quantité initiale des bactéries/virions
DBM	<i>Deminerized bone matrix</i>
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DO	Densité optique
EATB	<i>European Association of Tissue Banks</i>
EBAA	<i>Eye Bank Association of America</i>
EBV	<i>Epstein-Barr virus</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (acide éthylène diamine tétra-acétique)
EIA	<i>Enzyme immunoassay</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G +	Micro-organisme Gram-positif
G -	Micro-organisme Gram-négatif
GAG	Glycosaminoglycane
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HAV	<i>Hepatitis A Virus</i>
HBc	<i>Hepatitis B core</i>
HBsAg	<i>Hepatitis B surface antigen</i> ou Antigène de surface de l'hépatite B
HBV	Hépatite B virus
HCl	<i>Hydrogen chloride</i> ou Acide chloridique
HCV	Hépatite C virus
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HPA	<i>Hybridisation protection assay</i>
HSV	<i>Herpes simplex virus</i>
HTLV	<i>Human T-cell lymphotropic virus</i>
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IgG	<i>Immunoglobuline G</i>
IgM	<i>Immunoglobuline M</i>
LD ₅₀	<i>Lethal dose for 50 % of the tested population</i>
LIA	<i>Line immunoassay</i>
MMLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>

MMWR	<i>Morbidity and mortality weekly report</i>
NASBA	<i>Nucleic acid sequence based amplification</i>
NAT	<i>Nucleic Acid Amplification Testing</i>
NIBSC	<i>National Institute for Biological Standards and Control</i>
OSHA	<i>Occupational Safety and Health Administration</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline ou tampon phosphate</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PES	<i>Stérilisation acide peracétique-éthanol</i>
PPV	<i>Positive predictive value</i>
PVP	<i>Polyvinyl-pyrrolidon</i>
PVP-I	<i>Povidone-iodine</i>
QCA	<i>Dérivés de l'ammonium quaternaire</i>
Rnase H	<i>Ribonuclease H</i>
RT	<i>Reverse transcriptase ou transcriptase inverse</i>
SaBTO	<i>Advisory Committee on the Safety of Blood, Tissues and Organs</i>
SAL	<i>Sterility assurance level</i>
SARS	<i>Severe acute respiratory syndrome</i>
SIDA	<i>Syndrome d'immunodéficience acquise</i>
TCID ₅₀	<i>Median tissue culture infective dose</i>
TIFI	<i>Test d'immunofluorescence indirecte</i>
TMA	<i>Transcription-mediated amplification</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TRIP	<i>Test de radio-immunoprécipitation</i>
UK	<i>United Kingdom</i>
UKBTS	<i>United Kingdom Blood Transfusion Services</i>
UV	<i>Ultraviolet</i>
VHP	<i>Vapour-phase hydrogen peroxide</i>
VPP	<i>Valeur prédictive positive</i>
VRS	<i>Virus respiratoire syncytial</i>
USA	<i>Etats-Unis</i>
WIP	<i>Werkgroep infectiepreventie ou groupe de travail sur la prévention des infections</i>
WNV	<i>West Nile virus</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

1. INTRODUCTION

Il ressort des statistiques relatives à la transplantation d'allogreffes d'origine humaine que celles-ci occupent une place grandissante dans les soins de santé. Chaque année en Europe, des centaines de milliers de patients subissent un traitement médical nécessitant l'utilisation de ces matériaux. Bien que l'utilité thérapeutique de la transplantation allogène humaine soit reconnue depuis des dizaines d'années, il faut tenir compte de ce que la transmission de maladies par l'intermédiaire de ces allogreffes ne peut être totalement exclue. Il va de soi que ces tissus, destinés à une transplantation, doivent être analysés quant à leurs garanties en matière sanitaire conformément à l'état de nos connaissances scientifiques actuelles. La plupart des maladies transmissibles peuvent être évitées grâce à un examen minutieux du donneur et de ses produits dérivés. Les allogreffes doivent être traitées et conservées avec soin. Malgré la grande sensibilité des tests sérologiques et ADN actuels dans la détection des virus et de leurs marqueurs, une fenêtre sérologique subsiste entre le moment de la contamination et le moment où celle-ci peut être mise en évidence dans le sang. Si des tissus, cellules ou organes sont prélevés durant cette période, une contamination peut être transmise sans qu'elle ne soit décelable au moment-même. Il subsiste également un risque de transmission d'agents infectieux inconnus. Il est donc important d'appliquer des méthodes d'inactivation à ces agents transmissibles présents dans les tissus, cellules et organes humains.

Afin de pouvoir répondre à la problématique et, sur base des connaissances, d'émettre des recommandations et de modifier les standards de qualité pour les allogreffes en Belgique et accroître, de la sorte, la sécurité des tissus, cellules et organes d'origine humaine, un groupe de travail *ad hoc* a été constitué. Ce groupe se compose d'experts dans les disciplines suivantes: banque de cellules et tissus, biologie, biologie clinique, anatomopathologie, hygiène hospitalière, chirurgie orthopédique, coordination des transplantations, thérapie cellulaire, médecine de la reproduction, dermatologie, sciences médicales, etc.

Après avoir été approuvé par le groupe de travail *ad hoc*, l'avis a été soumis pour approbation au groupe de travail permanent « cellules, tissus et organes d'origine humaine et animale » qui, à son tour, a marqué son accord à ce sujet.

Les recommandations pratiques concernant les tests de laboratoire et les méthodes d'inactivation virologiques sont repris dans les standards de qualité spécifiques relatifs aux différents matériels corporels humains.

2. ELABORATION ET ARGUMENTATION

2.1. MÉTHODOLOGIE

La littérature a été compulsée de mars 2006 à octobre 2011 dans les moteurs de recherche Sumsearch, Medline (Pubmed) et Google, sur la base des mots clés suivants: *[hepatitis C virus] and [hepatitis B virus] and [HIV] and [HTLV] and [West Nile virus] and [transmission] and [infection] and [allograft] and [tissue] and [bone] and [tendon] and [skin] and [cornea] and [tympano-ossicular graft] and [heart valve] and [prevention] and [serology] and [nucleic acid amplification] and [decontamination] and [sterilization] and [disinfection] and [gamma irradiation] and [peroxide] and [rinse] and [peracetic acid] and [chlorhexidine] and [formaldehyde] and [glutaraldehyde] and [alcohol] and [methanol] and [iodide] and [cryopreservation] and [glycerol] and [lyophilization]*. Les sites Internet des organisations suivantes ont également été explorés: Conseil supérieur de la Santé (CSS), le Moniteur Belge, *European Union law*, *Department of Health United Kingdom (UK)*, *Food and Drug Administration (FDA)*, *World Health Organization (WHO)*, *Centers for Disease Control (CDC)*.

3. DÉFINITION, CLASSIFICATION ET GÉNÉRALITÉS

3.1. DÉFINITION

3.1.1. Définition

Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires. 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 (Dimmock et al., 2007; Murray et al., 1998).

3.1.2. Caractéristiques des virus

➤ Ils sont très petits

Cette caractéristique a été une des premières observées. La taille des virus varie de 20 nm pour le parvovirus à 300 nm pour les poxvirus. Ces derniers se situent à la limite inférieure de la détection au microscope optique. Afin d'observer les virus, des microscopes électroniques sont utilisés.

➤ Ils se multiplient

Lors des premières expériences, les chercheurs sont parvenus à transmettre une maladie à l'aide d'un ultrafiltrat, obtenu à partir de matériel infectieux. Ils ont alors d'abord pensé être peut-être en présence d'une toxine. Néanmoins, le fait que l'infection puisse être transmise sur plusieurs générations a montré que quelque chose se multipliait dans l'hôte.

➤ Ils sont composés de plusieurs éléments

Au contraire des cellules, qui sont toutes issues de la division d'une cellule mère, les virus sont composés d'éléments produits séparément : acide nucléique, enzymes et protéines structurales. Après avoir infecté une cellule, le virus disparaît et se décompose en ses divers éléments. Des particules virales ne peuvent être retrouvées qu'après une phase de multiplication et d'assemblage.

➤ Ils contiennent une seule sorte d'acide nucléique

Le code génétique des virus peut être porté soit par de l'ARN (acide ribonucléique), soit par de l'ADN (acide désoxyribonucléique). Toutefois, une particule virale ne contient qu'une seule de ces formes. Ainsi, le virus du SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise), ou HIV (*Human immunodeficiency virus*), contient de l'ARN, tandis que le virus de l'hépatite B (HBV) contient de l'ADN.

➤ Ils sont strictement dépendants du métabolisme d'une cellule

Hors d'une cellule, un virus est totalement inactif. Pour se multiplier, il doit pouvoir utiliser les différents éléments cellulaires (enzymes, ribosomes, etc.). Les virus simples, qui ne contiennent pas d'enzymes, sont particulièrement dépendants des cellules. Les virus plus complexes, en revanche, contiennent parfois une grande quantité de protéines régulatrices.

➤ Ils sont spécifiques à une cellule et donc, à un hôte

Les virus humains infectent principalement les humains. En outre, dans l'organisme humain, ils ciblent certaines cellules. Ainsi, les virus de l'hépatite infectent essentiellement ou exclusivement les hépatocytes, tandis que le HIV infecte les lymphocytes CD4 positifs du système immunitaire (Dimmock et al., 2007; Murray et al., 1998).

3.1.3. Cycle viral

Le cycle viral diffère considérablement d'un virus à l'autre. Toutefois, nous pouvons décrire quelques étapes générales. La première est la reconnaissance de l'hôte et la liaison entre la cellule et le virus (*attachement*). Ensuite, le virus pénètre dans la cellule grâce à divers mécanismes. Vient ensuite le démantèlement, c'est-à-dire la libération de l'acide nucléique de la capsidie et de l'enveloppe. L'étape suivante est celle de la réplication, où le code génétique se multiplie et où de l'ARNm (ARN messager) et des protéines sont fabriquées. Au cours de la phase d'assemblage, les différents éléments sont assemblés de manière à former un virus. Dans certains cas, une maturation peut ensuite avoir lieu. Enfin, les particules virales sont libérées en grand nombre par divers mécanismes (Dimmock et al., 2007; Murray et al., 1998).

3.1.4. Structure virale

Comme dit précédemment, les virus se composent principalement d'un code génétique porté par un acide nucléique, à savoir soit l'ARN, soit l'ADN. Cet acide nucléique est associé à des nucléoprotéines qui stabilisent le tout et forment le noyau du virus. Ce noyau, ainsi que des enzymes, sont enfermés dans une capsidie composée d'éléments répétitifs appelés capsomères. L'ensemble porte le nom de nucléocapsidie. Certains virus, appelés virus nus, ne possèdent qu'une nucléocapsidie comme structure. Les sites de reconnaissance cellulaire (récepteurs) sont intégrés dans la structure de la capsidie. Les virus enveloppés sont entourés d'une enveloppe provenant de membranes cellulaires, composée d'une double couche lipidique. La matrice garantit la structure entre cette enveloppe et la capsidie. Des glycoprotéines virales de surface sont intégrées dans l'enveloppe et jouent notamment le rôle de récepteur cellulaire. La Figure 1 et le Tableau 1 présentent quelques caractéristiques générales des virus nus et des virus enveloppés. Il existe des exceptions à ces règles générales (Büchen-Osmond, 2003; Dimmock et al., 2007; Murray et al., 1998).

Figure 1 : Composants de base d'un virion

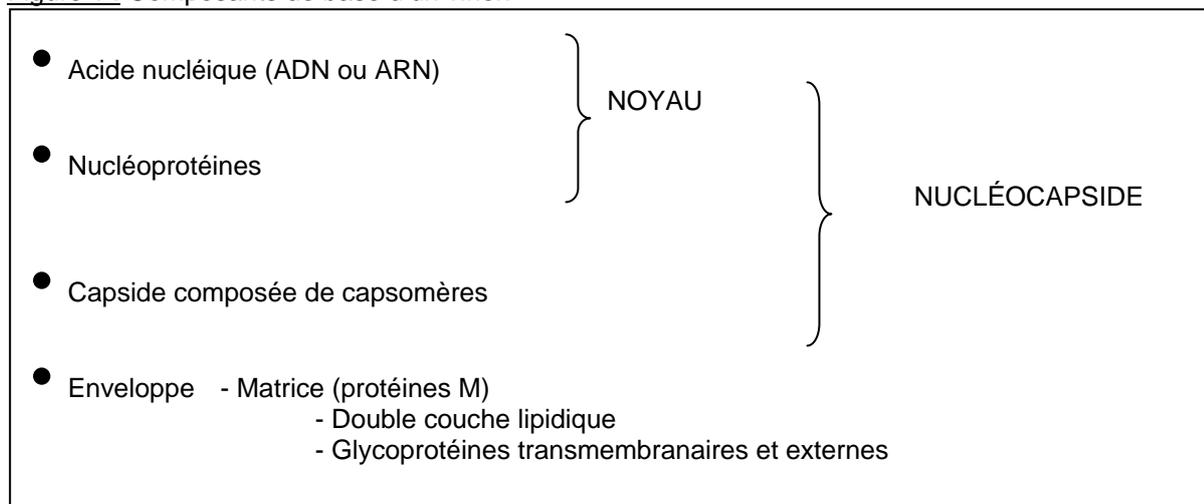


Tableau 1 : Structure virale (modifié d'après Murray et al., 1998).

Capsidie nue	Avec enveloppe
Composant à la surface	
● Protéines	● Membrane : ○ Lipides ○ Glycoprotéines
Caractéristiques	
Stable dans le milieu ambiant en présence de :	Instable dans le milieu ambiant – est endommagé par :
● Acides ● Température ● Protéases	● Acides ● Détergents/solvants ● Dessèchement

<ul style="list-style-type: none"> • Détergents • Dessèchement <p>Est libéré par la cellule par lyse ou exocytose</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Chaleur <p>Est libéré par des bourgeons qui se forment sur la membrane cellulaire, par lyse cellulaire ou par exocytose</p>
Conséquences	
<ul style="list-style-type: none"> • Peut se propager facilement (instruments, contact de main à main, poussière, gouttelettes) • Peut se dessécher et rester infectieux • Peut survivre dans le système gastro-intestinal • Peut résister aux détergents et à un traitement inapproprié des eaux usées • Des anticorps peuvent suffire pour offrir une protection immunitaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Doit rester dans un milieu stabilisant ou passer directement d'une cellule à une autre • Ne peut pas survivre longtemps dans le tractus gastro-intestinal (sauf en cas de diarrhée) • Se propage via les grosses gouttes, les sécrétions, les transplantations d'organes et les transfusions sanguines • Ne doit pas tuer la cellule pour se propager • Un anticorps et une réponse immunitaire médiée par les cellules peuvent être nécessaires en vue de la protection et de la maîtrise • Déclenche une hypersensibilité et une inflammation qui provoquent l'immunopathogénèse

3.2. TAXONOMIE VIRALE

La classification virale consiste à nommer les virus et à les insérer dans un système taxonomique. Cette classification fait l'objet d'un débat permanent. Actuellement, il existe deux systèmes de classification : le système ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) et la classification de Baltimore qui classe les virus en 7 groupes.

Le système ICTV utilise une classification linnéenne comportant les niveaux suivants : ordre, famille, sous-famille, genre et espèce. Le suffixe « -virales » identifie l'ordre. Les familles sont identifiées par le suffixe « -idae », les sous-familles par le suffixe « -virinae » et les genres par « virus ». Jusqu'à présent, 6 ordres de virus ont été déterminés par l'ICTV.

La classification de Baltimore repose sur la combinaison du type d'acide nucléique viral (ADN ou ARN, simple ou double brin, sens) et la méthode de réplication. Il s'agit de la classification que nous utilisons tout au long de ce document.

La classification sur la base de la pathologie, autrefois très utilisée, est aujourd'hui dépassée. Le HBV et le virus de l'hépatite C (HCV), par exemple, sont tous deux des virus de l'hépatite, mais ils ont peu de caractéristiques virologiques communes.

3.3. APERÇU DE LA SITUATION

1. 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 certains tissus. Les principaux virus concernés à cet égard sont le HIV, le HBV et le 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.
2. 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 contient 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 parfois aucun symptôme. Le Tableau 2 ci-dessous donne un aperçu de quelques virus importants. Le problème se pose surtout pour le HCV et le HIV ainsi que, dans une moindre mesure, pour le HBV.

Tableau 2 : Caractéristiques de quelques virus importants sur le plan clinique (mod. de De Clercq, 1998).

Virus	Taille (nm)	Enveloppe	Génome	Famille	Période d'incubation Formation Ag/As (jours)
HBV	42 - 47	Oui	ADN	<i>Hepadnaviridae</i>	45 - 160
HCV	30 - 60	Oui	(+) ARN	<i>Flaviridae</i>	20 - 120
HIV	80 - 100	Oui	(+) ARN	<i>Retroviridae</i>	14 - 45
HTLV	80 - 100	Oui	(+) ARN	<i>Retroviridae</i>	Quelques semaines
Virus d'Epstein-Barr (EBV)	100 - 150	Oui	ADN	<i>Herpesviridae</i>	30 - 50
CMV	100 - 150	Oui	ADN	<i>Herpesviridae</i>	minimum 21

- Les virus sont sujets à une variation génétique importante, en particulier les virus à 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. Ce principe s'applique surtout aux infections iatrogènes par le HIV et le HCV (De Clercq, 1998; Dimmock et al., 2007).
- Certains virus tels que le CMV et le HTLV sont strictement cellulaires et sont donc transmis par les 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 de préférence subir un dépistage du CMV et du HTLV (FDA, 2007a). La cornée, la sclérotique, la peau, les os, les tendons, les ligaments, le cartilage, les valves cardiaques, la dure-mère et les ovocytes ne sont pas des cellules vivantes riches en leucocytes (FDA, 2007a).

4. DIAGNOSTIC DES INFECTIONS VIRALES

4.1. INTRODUCTION

Le risque de transmission d'agents infectieux par le biais de tissus est un sujet important depuis les premiers rapports de l'utilisation de tissus humains à des fins de transplantation. Au fil des ans, les banques de tissus ont mis au point diverses approches interdisciplinaires de dépistage des agents infectieux chez les donneurs cadavériques potentiels, mais aussi sur les tissus et greffes dérivés de ces donneurs. Pour le dépistage des infections virales, des tests sérologiques et des tests NAT (pratiqués sur un échantillon de sérum ou de plasma du donneur) portant le label européen (CE) sont utilisés (AR, 2009).

En outre, les tests doivent être réalisés dans un laboratoire agréé.

Dans la suite de ce document, nous souhaitons attirer l'attention sur les différents virus importants dans le cadre d'une transmission éventuelle par le biais des tissus, le contexte des tests et les problèmes de nature technique susceptibles de se poser lors de la réalisation de tests sérologiques sur du sang de personnes décédées.

4.2. FACTEURS ANTERIEURS A L'ANALYSE

4.2.1. Type de donneur

La qualité de l'échantillon sanguin d'un donneur dépend fortement de la situation dans laquelle le donneur se trouve au moment de la prise de sang. Le CSS distingue trois cas.

4.2.1.1. Donneurs à cœur battant (CB) et donneurs à cœur non battant (CNB)

Les donneurs CB cèdent leurs organes après avoir été déclarés en état de mort cérébrale (décès constaté sur la base de critères neurologiques). Entre-temps, ces donneurs continuent à bénéficier d'une assistance cardiorespiratoire afin que leur sang puisse être prélevé par la voie normale (comme chez les donneurs vivants). Les donneurs CNB (décès constaté sur la base de critères cardiorespiratoires classiques) présentent un arrêt cardiocirculatoire depuis 30 minutes au maximum (à l'exclusion de la période de réanimation). Chez ces personnes aussi, le sang peut être prélevé par la voie normale.

4.2.1.2. Donneurs cadavériques

Les donneurs cadavériques ne peuvent plus être pris en considération en vue d'un don d'organes car l'arrêt cardiocirculatoire dure depuis trop longtemps. Les tissus peuvent encore être prélevés durant 24 à 48 heures *post mortem* (selon le type de tissu, cf. normes de qualité spécifiques). Pour les donneurs décédés, les échantillons de sang doivent être prélevés dans les 48 h précédant le décès. Si cela s'avère impossible, les échantillons doivent être prélevés le plus vite possible et dans tous les cas, endéans les 24 heures qui suivent le décès (AR, 2009).

Les échantillons de sang *post mortem* seront de préférence prélevés dans le cœur, la veine sous-clavière ou la veine fémorale (SaBTO, 2011). Il faut toujours éviter les endroits proches de lignes intraveineuses (SaBTO, 2011).

4.2.1.3. Donneurs vivants

Un échantillon de sang prélevé au moment du don ou, à défaut, dans un délai de 7 jours suivant le don est utilisable en vue du premier contrôle sérologique d'un donneur de tissus/cellules (AR, 2009). Si les tissus et cellules de donneurs vivants allogènes peuvent être conservés pendant une longue durée, de nouveaux échantillons seront prélevés après 180 jours afin de procéder à nouveau aux tests sérologiques. Ces cas sont les seuls dans lesquels l'échantillon peut être prélevé entre 30 jours avant et 7 jours après le don (AR, 2009).

4.2.2. Dilution du plasma

Si un donneur a perdu une quantité importante de sang, toutes les perfusions intraveineuses (sang et produits sanguins, colloïdes ou cristalloïdes) subies par le donneur au cours des 48 heures précédant le prélèvement de l'échantillon ou le décès seront évaluées afin de vérifier la dilution éventuelle du plasma du donneur (analyse des risques) et la validité des tests sérologiques (SaBTO, 2011).

Si l'hémodilution est supérieure à 50 %, l'échantillon sanguin sera rejeté, hormis si une technique d'analyse validée à cet effet a été utilisée ou si un échantillon sanguin prélevé avant la transfusion est disponible (CSS 7691-1, 2007; EU, 2006). Le calcul général suivant est utile afin de déterminer le volume maximal autorisé de la transfusion : $[(X \times 45):2]$ ml, où X = le poids du patient exprimé en kilos. Si le volume obtenu est inférieur à cette valeur (soit 50 % du volume plasmatique initial), l'échantillon sanguin concerné peut être utilisé. Si une quantité plus importante doit être transfusée, il convient d'utiliser un échantillon antérieur à la transfusion.

Toutefois, cette règle des 50 % peut être remise en question. Le *Centraal Laboratorium van bloedtransfusie* néerlandais a rapporté que les Ac anti-HCV peuvent encore être identifiés après une dilution de 1:32. Les Ac anti-HIV se comportent de la même manière. La règle des 50 % est sûre mais pas vraiment réaliste. Elle ne tient pas compte des dilutions successives des protéines dans le plasma perdu, qui entraîne une diminution des concentrations en protéines moins importante que prévu (Koopman-van Gemert, 1996). Rose et al. (2001) ont également constaté qu'il n'existe aucune preuve que la règle des 50 % de l'hémodilution soit un niveau acceptable pour l'obtention de tests sérologiques précis et que l'hémodilution peut avoir un impact négatif sur la sensibilité du test. Les tests NAT actuels utilisent du sang cadavérique dilué à raison de 1/5 afin de limiter l'influence possible des substances inhibitrices (FDA, 2009; FDA, 2007b).

Grâce à une réaction d'amplification, un test NAT reconnaît un acide nucléique spécifique du génome viral et détecte la présence d'un virus avant que des Ac spécifiques n'entrent en action (CSS, 2005). Une hémodilution de 50 % ne pose pas de problème en soi lors de la réalisation d'un test NAT, d'autant plus que le virus continue à se multiplier (10^7 à 10^9 virions/jour). Dans ce cas, l'exclusion du donneur est uniquement liée au risque de transfusions multiples.

Un test NAT peut être réalisé sur les lymphocytes d'un patient afin de dépister l'ADN du HIV. Le HIV et l'ADN cellulaire peuvent subir une amplification afin de connaître le nombre de cellules étudiées. Dès lors, le test de dépistage de l'ADN est plus fiable que le test de dépistage de l'ARN car il exclut le facteur « dilution » (CSS, 2005).

4.3. SPECTRE DES VIRUS

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

4.3.1. HIV

Il existe différents sous-types du HIV : les tests devraient rechercher le HIV-1 et le HIV-2. La virémie survient en moyenne 10 jours après l'infection, tandis que les Ac ne sont détectables qu'après 22 jours en moyenne. Entre-temps, le test peut donner un résultat positif pour l'antigène (Ag) p24 du HIV-1 (Fischer-Fröhlich & Lauchart, 2004).

Les statistiques pour l'année 2011 nous apprennent que la prévalence du HIV parmi les donateurs de sang belges était de 0,8/100.000 habitants (http://www.fagg-afmps.be/nl/binaries/Bloed%202004%20-%202011_tcm290-73802.pdf). Aux Pays-Bas, un nouveau cas atteint du HIV (incidence de 2,5/100.000 habitants) est apparu en 2011 avec une prévalence de 0/100.000 parmi les donateurs de sang (Sanquin, 2011). En 2009, l'incidence du HIV (nouveaux cas confirmés) était de 5,7/100.000 habitants dans l'Union européenne et pour la même année, de 10,3/100.000 habitants en Belgique (http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1111_SUR_Annual_Epidemiological_Report_on_Communicable_Diseases_in_Europe.pdf).

La prévalence réelle parmi la population générale reste inconnue car seuls les cas qui se présentent en vue de passer un test de dépistage sont connus. Dans la zone couverte par l'*Eurotransplant Foundation* (organisation pour l'échange d'organes aux Pays-Bas, en Belgique, au Luxembourg, en Allemagne et en Autriche), le pourcentage annuel de donneurs dont le dépistage du HIV est positif est de 0,1 % (Patijn et al., 1993). Challine et al. (2004) ont rapporté la présence d'Ac anti-HIV chez 12,4 % des donneurs de cornée, 0,3 % des donneurs de tissus et 0,9 % des donneurs d'organes. Les auteurs attribuent le pourcentage élevé chez les donneurs de cornée au grand nombre de résultats faux positifs dus à une hémolyse et un ictère (*post mortem*) (Challine et al., 2004). Stanworth et al. (2000) ont constaté que 40/1.833 donneurs (2 %) présentaient à plusieurs reprises des tests de dépistage réactifs pour le HIV dans la banque de tissus cadavériques du Royaume-Uni. La prévalence du HIV chez les donneurs de tissus se situe entre celle des donneurs de sang et celle de la population générale, car les donneurs de tissus sont plus représentatifs de la population générale que les donneurs de sang et parce qu'ils sont sélectionnés en fonction de leurs antécédents, d'un examen physique et d'entretiens avec les proches parents. Toutefois, l'entretien direct avec les donneurs de sang est plus efficace (Zou et al., 2004).

Un test de dépistage réactif (*enzyme immuno assay* – EIA) nécessite un test de confirmation (Western Blot, par exemple) (Angelis et al., 2003). Depuis l'approbation des tests NAT, la FDA a arrêté les tests de dépistage de l'Ag p24 du HIV. Des données ont montré que l'ARN du HIV-1 donne plus rapidement un résultat positif que les tests de dépistage de l'Ag p24 du HIV durant la période de fenêtre peu après l'infection et que tous les donneurs positifs pour l'Ag p24 du HIV le sont aussi pour l'ARN du HIV (Stramer et al., 2004). Des tests NAT pour le HIV ont également été approuvés par la FDA en ce qui concerne le sang cadavérique. Toutefois, en 2003, Laperche et al. (2003) ont rapporté qu'un test NAT de détection de l'ARN du HIV, chez des sujets positifs pour l'Ac anti-HIV-1 possédant une charge virale faible, ne permettait pas de détecter l'ARN du HIV jusque dans 11 % des échantillons. Ils recommandent donc fortement de conserver les tests sérologiques (Ac anti-HIV) en complément aux tests NAT afin de garantir la sécurité des produits sanguins. L'Arrêté royal (AR) du 28/09/2009 le prescrit également: le test devant au minimum être réalisé chez les donneurs vivants est le dépistage des Ac 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 (AR, 2009). Notons également que l'AR du 28/09/2009 prescrit que les tests doivent être effectués par un laboratoire agréé utilisant un kit de test portant le label CE : le type de test doit être validé en vue de l'objectif visé, conformément à l'état actuel de la science (AR, 2009). En outre, un test HIV, HBV et HCV NAT permet d'éviter un deuxième contrôle sérologique après 6 mois chez les donneurs vivants (AR, 2009). Le back-screening des Ac anti-HIV-1 et anti-HIV-2 des receveurs d'organes trois mois après la transplantation peut également ajouter un degré de sécurisation.

Notons à cet égard que l'AR du 28/09/2009 n'autorise les échantillons autres que le sérum ou plasma, à savoir les autres liquides et les sécrétions tels que l'humeur aqueuse et le corps vitré, 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.

4.3.2. HBV

L'Ag de surface de l'hépatite B (HBsAg) est le marqueur sérologique de l'infection par le HBV. Des Ac contre l'Ag 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'Ac contre l'Ag de surface (Ac anti-HBs) (Chung et al., 2001). Alors que le HBsAg est détectable 60 jours après l'infection par le HBV, la PCR met en évidence des particules de HBV 25 jours auparavant dans le sang (Fischer-Fröhlich & Lauchart, 2004).

Les statistiques pour l'année 2011 nous apprennent que l'incidence pour le HBV parmi les donneurs de sang belges était de 0,8/100.000 habitants (http://www.fagg-famfs.be/nl/binaries/Bloed%202004%20-%202011_tcm290-73802.pdf). Aux Pays-bas, la

prévalence du HBV était 1,6/100.000 chez les donneurs de sang (Sanquin, 2011). Cette même année, l'incidence était de 33/100.000 (13 nouveaux cas) (Sanquin, 2011). Une étude sérologique néerlandaise (projet PIENTER 1995-1996, RIVM, 2011) a révélé que 2,1 % de la population néerlandaise générale avait un jour été infectée par le virus de l'hépatite B (RIVM, 2011).

En 2009, l'incidence du HBV (nouveaux cas confirmés) était de 1,2/100.000 habitants dans l'Union européenne et de 1,2/100.000 habitants en Belgique (http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1111_SUR_Annual_Epidemiological_Report_on_Communicable_Diseases_in_Europe.pdf).

Stanworth et al. (2000) ont mis en évidence 14 % (249/1.833 donneurs) d'échantillons positifs à plusieurs reprises pour le HBsAg dans des banques de tissus cadavériques au Royaume-Uni. Toutefois, ce pourcentage variait de 0 % à 42 % selon la banque de tissus.

Dans le domaine du don de tissus, le temps disponible permet largement de pratiquer un dépistage approfondi du virus de l'hépatite B afin que les porteurs à un faible niveau de HBV puissent être identifiés. Les Ac anti-HBc peuvent y contribuer.

Les échantillons dont le test de dépistage des Ac anti-HBc est réactif et dont le test de dépistage des HBsAg est négatif doivent subir une évaluation supplémentaire des risques (EU, 2006). Si dans ce cas, les Ac anti-HBs sont positifs et qu'un test HBV NAT est négatif, cela implique que le test positif Ac anti-HBc n'est pas une contre-indication à la libération dans l'intention d'une application sur l'homme (KB, 2009).

L'AR du 28/09/2009 stipule que les tests devant au minimum être réalisés chez les donneurs vivants sont le dépistage des HBsAg et des Ac anti-HBc, tandis que chez les donneurs décédés, un test NAT pour le HBV doit également être réalisé, sauf si une étape d'inactivation validée du virus concerné est incluse (AR, 2009). Chez les donneurs vivants, l'AR (2006) et l'UE (2006) 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 (AR, 2009).

4.3.3. HCV

Les Ac anti-HCV indiquent une infection par le HCV, 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 Ac anti-HCV ne sont détectables qu'après 80 jours en moyenne. Chaque donneur positif pour les Ac 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 effet, la virémie peut persister ou ne pas être détectable par intermittence (Fischer-Fröhlich & Lauchart, 2004). Inversement, un test sérologique peut ne pas détecter une part importante de personnes infectées. Des cas de patients présentant une virémie persistante sans séroconversion dans le laps de temps prévu ont été décrits (Stramer et al., 2004 ; Schmidt et al., 1997). Challine et al (2004) ont étudié 2.119 donneurs d'organes séronégatifs pour le HCV et 631 donneurs de tissus séronégatifs pour le HCV, à l'aide d'un test de détection de l'acide nucléique. Cinq (0,002 %) donneurs d'organes et un (0,002 %) donneur de tissus se sont révélés positifs pour l'ARN du HCV. Ces données ont laissé penser aux auteurs que les tests de routine sur l'acide nucléique chez les donneurs d'organes et de tissus permettraient d'augmenter la sécurité virale (Challine et al., 2004). Un test HCV-NAT offre la meilleure garantie pour éviter toute transmission et est donc indiqué (CSS 8684, 2011).

Aux Pays-Bas, en 2009, l'incidence du HCV chez les donneurs de sang était de 0,021 % (10 cas), tandis que la prévalence était de 0 % (0 cas) (Sanquin, 2009).

Les statistiques pour l'année 2011 nous apprennent que l'incidence pour le HCV parmi les donneurs de sang belges était de 0,8/100.000 habitants. Aux Pays-bas, la l'incidence pour HCV était 17,9/100.000 chez les donneurs de sang et la prévalence de 0/100.000 (0 cas) (Sanquin,

2011). La prévalence des Ac anti-HCV parmi la population générale (Pays-Bas) est inconnue, mais elle atteint probablement 0,3 à 0,4 % (RIVM, 2011). En 2009, l'incidence du HCV (cas confirmés) était de 8,2/100.000 habitants dans l'Union européenne et de 0,32/100.000 habitants en Belgique (http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1111_SUR_Annual_Epidemiological_Report_on_Communicable_Diseases_in_Europe.pdf).

Boix et al. (1998) ont constaté, en Espagne, une incidence de l'infection par le HCV plus élevée chez les donneurs vivants de tête fémorale (3,82 %) que chez les donneurs de sang (0,57 %) (RIVM, 2011). Challine et al. (2004) ont rapporté la présence d'Ac anti-HCV chez 3,4 % des donneurs de cornée, 0,5 % des donneurs de tissus et 4,4 % des donneurs d'organes.

Stanworth et al. (2000) ont étudié les tests de dépistage réactifs répétés du HCV dans des banques de tissus cadavériques au Royaume-Uni. 59/1.833 (3 %) donneurs présentaient un test de dépistage réactif répété pour les Ac anti-HCV. Certains laboratoires ont rapporté que l'hémolyse était associée à la durée jusqu'au prélèvement de l'échantillon ou au pourcentage d'échantillons réactifs. Les laboratoires présentant le plus grand nombre d'échantillons réactifs répétés autorisaient le prélèvement du sang plus de 24 heures *post mortem*. Ils utilisaient les kits de dépistage d'Access et Amerlite.

Des études comparant le sérum et le plasma dans diverses conditions de conservation ont montré que la conservation à température ambiante entraînait une forte diminution de la concentration de l'ARN du HCV. Des cycles répétés de congélation/décongélation peuvent également provoquer une diminution de la charge virale (Busch et al., 1992; Strong et al., 2005). D'autres auteurs affirment le contraire (cf. 4.4.3.6.3.5 : stabilité de l'échantillon). La plupart des centres réalisent deux tests de dépistage si le premier n'est pas négatif. Des tests de confirmation (immunoblot, par exemple) sont réalisés si deux tests de dépistage ne sont pas positifs. L'introduction des tests NAT pour le HCV, qui utilisent de l'ARN viral, a conduit à une plus grande précision du diagnostic de l'infection par le HCV (Angelis et al., 2003). Les NAT ont remplacé l'immunoblot recombinant comme test de confirmation favori (Scott & Gretch, 2007).

L'AR du 28/09/2009 stipule que le test devant au minimum être réalisé chez les donneurs *vivants* est le dépistage des Ac 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. Ce test NAT est également recommandé par le CSS chez les donneurs *décédés* (2007) comme sécurisation supplémentaire, outre un back-screening trois mois plus tard chez le receveur de l'organe (CSS 7691-1, 2007). Selon la Directive européenne, le test NAT permet de ne pas procéder au deuxième contrôle sérologique pour le HCV chez les donneurs *vivants* (AR, 2007 ; UE, 2006). La répétition des tests peut également être omise lorsque le traitement comprend une inactivation validée du HCV (UE, 2006; AR, 2009).

4.3.4. HTLV-1/2

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. Trois facteurs déterminent le risque d'infection par le HTLV : la prévalence du HTLV-1/2 parmi les donneurs de tissus et d'organes, la voie de transmission (le HTLV se transmet par le biais des produits cellulaires mais pas des produits plasmatiques) et la morbidité d'une infection par le HTLV-1 (les patients transplantés courent peut-être un risque plus élevé d'immunosuppression). Le HTLV-1 est essentiellement présent dans le sud-ouest du Japon, les Caraïbes, l'Afrique centrale et dans certaines régions d'Amérique du sud. La transmission s'effectue principalement par contact sexuel et de la mère à l'enfant. Le HTLV-2 est endémique en Amérique du Nord et du Sud chez les Américains de souche (Zaaijer, 1996; ECDC, 2012). Toutefois, la prévalence et l'incidence dans la population générale n'est presque pas connue dans la plupart des régions du monde. Aucune étude représentative pour la

population européenne ou nord-américaine, n'a été effectuée. Tant en Europe qu'aux EU, les chiffres chez les donneurs de sang montrent une prévalence similaire faible : 1-1,5/10.000 pour les US et 0,46/10.000 pour l'Europe (ECDC, 2012).

Taylor et al. (2005) ont réalisé une étude multicentrique de la séroprévalence du HTLV-1 et du HTLV-2 chez les femmes enceintes en Europe. 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 prévalence la plus élevée a été observée en France, avec 1,15/1.000 femmes enceintes pour le HTLV-1 (Taylor et al., 2005). La prévalence extrapolée des infections par le HTLV-1/2 en Belgique est de 0,8/1.000 femmes enceintes (Taylor et al., 2005). L'infection par le HTLV est 10 fois plus fréquente chez les femmes jeunes qui consultent à la clinique prénatale que chez les donneurs de sang (Taylor et al., 2005). Zou et al. (2004) ont calculé la prévalence des Ac anti-HTLV parmi 11.391 donneurs de tissus aux États-Unis. Elle s'est avérée être de 0,068 %. L'incidence, calculée à partir de l'incidence des donneurs de sang, était de 5.586 par 10⁵ personnes-années.

L'Union européenne et l'AR du 28 septembre 2009 recommandent de tester les Ac 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 (UE, 2006; AR, 2009).

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, par exemple en Belgique (Angelis et al., 2003). Une confirmation par Western blot n'est pas opportune pour les transplantations d'organes (Angelis et al., 2003) mais peut être envisagée pour les transplantations de tissus.

Une étude française portant sur 4.230 donneurs potentiels entre 1992 et 1994 a identifié 7 donneurs dont le test de dépistage du HTLV-1/2 (ELISA) était positif. Chez 4 de ces 7 donneurs, une confirmation par Western blot a pu être réalisée. Deux de ces quatre blots ont confirmé la positivité au HTLV (0,47/1.000) (Claquin et al., 1996).

4.3.5. Agents infectieux spécifiques

En mai 2005, aux États-Unis (USA), la FDA a édicté de nouvelles directives relatives aux cellules, tissus et produits humains dérivés de tissus. Les maladies transmissibles utiles à mentionner sont décrites dans ce document et exigent un dépistage approprié des donneurs (dossier médical, anamnèse, évaluation des risques). Il s'agit notamment du virus du Nil occidental (WNV, *West Nile Virus*), du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS, *Severe acute respiratory syndrome*), des poxvirus et de la xénotransplantation. Nous allons essentiellement nous intéresser à la transmission du WNV et du SRAS.

4.3.5.1. WNV

4.3.5.1.1. Définition du cas du WNV

Une virémie transitoire survient 1 à 3 jours après l'infection par le WNV par une piqûre de moustique et dure de 1 à 11 jours. La plupart des personnes infectées par le WNV ne présentent aucun symptôme. Environ 20 % des personnes infectées développent des symptômes légers qui ne sont pas différenciables d'autres infections virales (FDA, 2007a). Ces symptômes peuvent être les suivants : fièvre, mal de tête, douleur à un autre endroit du corps, douleur oculaire, rash cutané généralisé ou hypertrophie des ganglions lymphatiques. 0,01 % des personnes développent une maladie grave telle qu'une encéphalite, une méningite, une méningo-encéphalite et une paralysie flasque aiguë.

Une céphalée, une fièvre élevée, une raideur de la nuque, une stupeur, une désorientation, un coma, des tremblements, des convulsions et une faiblesse musculaire ou une paralysie peuvent être des signes de maladie grave (FDA, 2005a).

4.3.5.1.2. *Epidemiologie*

Le WNV vient très probablement d'Afrique et est maintenant répandu partout dans le monde. Des épidémies limitées dans le temps et l'espace se produisent en Europe à des moments imprévisibles. Dans les années 1960, le virus est apparu en Camargue (France). Une des premières grandes épidémies date de 1996-1997 en Roumanie. Depuis lors, des infections ont été rapportées chez des personnes et/ou des chevaux en République tchèque (1997), en France (2000, 2003, 2004, 2006), en Espagne (2004), en Italie (1998, 2008, 2009), en Hongrie (2000-2009), en Roumanie (1997-2001, 2003-2009) et au Portugal (2004). En août-septembre 2010, une grande épidémie s'est produite au nord de la Grèce, en Roumanie, en Hongrie, en Italie et en Espagne, à proximité de Volgograd (Russie) et de la Turquie (<http://www.ecdc.europa.eu/>).

4.3.5.1.3. *Risque de transmission*

Le WNV est un flavivirus transmis à l'homme par une piqûre de moustique. Il a été décrit pour la première fois aux États-Unis en 1999 et est réapparu chaque année depuis. Des cas de transmission chez l'homme ont été mis en évidence aux États-Unis. Plusieurs pays européens (parmi lesquels la Belgique) ont dès lors décidé d'interdire toute prise de sang en vue d'une transfusion au cours des 28 jours suivant le retour d'une zone du territoire américain où des cas de transmission ont été avérés (CSS, 2003).

En septembre 2005, la transmission du WNV a été confirmée chez trois des quatre receveurs d'organes d'un même donneur. Deux des trois receveurs ont souffert d'encéphalite due au WNV et sont restés comateux (MMWR, 2005).

4.3.5.1.4. *Gravité de l'effet*

Le WNV peut être mortel ou mettre la vie du patient en danger, il peut entraîner une perte fonctionnelle permanente ou des dommages permanents d'une partie du corps et il peut nécessiter une intervention médicale ou chirurgicale afin de prévenir les dommages permanents ou la perte fonctionnelle permanente (FDA, 2007a).

4.3.5.1.5. *Disponibilité d'un dépistage et/ou de tests*

Aux États-Unis, depuis 2003, le sang est soumis à un dépistage du WNV au moyen d'un test NAT (MMWR, 2005). Depuis peu, le dépistage du WNV chez les donneurs d'organes et de tissus peut être réalisé à l'aide d'un NAT (Procleix[®] WNV Assay) validé par la FDA sur le plasma à la fois de donneurs vivants et de sang cadavérique (FDA, 2007b). À l'Institut de Médecine Tropicale, un EIA est pratiqué afin de dépister le WNV (<http://www.enivd.org/>; Goubau & Van Gompel, 2000). La FDA possède une liste de tests de détection de l'acide nucléique approuvés pour le WNV (FDA, 2011).

4.3.5.1.6. *Critères d'exclusion des donneurs*

En Belgique, le don de sang est interdit au cours des 28 jours suivant le retour d'une zone du territoire américain où des cas de transmission du WNV ont été signalés (CSS, 2003; CE, 2004). Ni l'UE (CE, 2006), ni les normes de qualité du CSS pour les allogreffes de tissus (CSS, 2007), ni l'AR du 28 septembre 2009 (AR, 2009) ne mentionnent de manière spécifique le WNV dans les virus éventuels à dépister.

En ce qui concerne le don de tissus et de cellules, les consignes suivantes, rédigées par l'*American Association of Tissue Banks* (AATB) (2008), s'appliquent : les personnes présentant un diagnostic clinique ou une suspicion d'infection par le WNV (y compris un diagnostic basé sur des symptômes et/ou une infection par le WNV confirmée par un test NAT) sont interdites de don pendant 120 jours.

Les UKBTS (*United Kingdom Blood Transfusion Services*) estiment que les personnes qui reviennent d'une zone endémique peuvent faire un don au plus tôt 6 mois après leur retour. Ce délai peut être raccourci à 28 jours après leur retour si elles ne présentent aucun symptôme ou preuve de maladie entre-temps (UKBTS & NIBSC, 2011).

4.3.5.2. SRAS

4.3.5.2.1. Définition du cas de SRAS suspecté

Maladie respiratoire qui doit remplir les critères cliniques et épidémiologiques suivants (FDA, 2003; OMS, 2004) :

- température > 38°C **et**
- une ou plusieurs preuves cliniques de maladie respiratoire (toux, essoufflement, hypoxie...) et preuves radiographiques de pneumonie ou de syndrome de détresse respiratoire, ou à l'autopsie, preuves cohérentes avec une pneumonie ou un syndrome de détresse respiratoire sans cause claire, **et**
- au cours des dix jours après le début des symptômes, séjour dans une zone désignée par le CDC comme étant une zone touchée par le SRAS **OU** dans les dix jours suivant le début des symptômes, contact proche avec une personne atteinte de SRAS suspecté ou avéré.

4.3.5.2.2. Risque de transmission

La possibilité de transmission par le sang, les cellules et les tissus n'est pas claire. Le coronavirus SARS-CoV a été isolé dans des reins, des poumons et du liquide de lavage broncho-alvéolaire infectés mais une seule fois dans le sang d'un patient infecté, au moyen de l'amplification de l'acide nucléique. Les personnes atteintes de SRAS pourraient être virémiques avant le début des symptômes et après leur disparition. La transmission du SRAS par des cellules et des tissus prélevés au cours de cette phase est possible (FDA, 2003).

Il est conseillé de surveiller les flambées et en fonction de celles-ci, de procéder ou non au dépistage du virus du SRAS. Cette mesure est valable non seulement pour le SRAS, mais aussi pour tous les pathogènes émergents qui pourraient donner lieu à une flambée et qui se transmettent par les tissus et les cellules.

4.3.5.2.3. Critères d'exclusion des donneurs

Selon l'UKBTS, un donneur peut être inclus lorsque plus de 21 jours se sont écoulés depuis son retour d'une région où le SARS est endémique ou depuis le contact avec une personne atteinte du SRAS, et que le donneur est resté sain (UKBTS & NIBSC, 2011).

4.3.5.3. CMV

Dans certains cas, selon l'anamnèse du donneur, il peut être utile de déterminer le statut CMV du donneur (EU, 2006; Rose et al., 2001).

4.3.6. Tests disponibles

4.3.6.1. Tests de dépistage : ELISA

4.3.6.1.1. Principe du test

Parmi tous les tests de diagnostic des infections virales, le test ELISA est le plus utilisé afin de doser des Ac dans de grandes séries d'échantillons sériques (test *de dépistage*) (Van der Groen, 1991; FDA, 2007b). De nombreux centres utilisent un test ELISA pour le dosage des Ag du VIH/Ac anti-HIV, Ag HBs, Ac anti-HBc, Ac anti-HBs, Ag HBe, Ac anti-HBe et Ac anti-HCV. La première génération de tests ELISA utilisait le lysat de cellules infectées par le virus comme Ag. Des réactions non spécifiques avec les protéines cellulaires présentes dans la préparation d'Ag donnaient parfois lieu à des résultats faux positifs.

Le clonage de séquences de nucléotides a permis de créer des polypeptides antigéniques du virus grâce à la technologie de l'ADN recombinant et à la synthèse chimique. La deuxième génération de tests ELISA donne ainsi moins de résultats faux positifs.

Les tests ELISA peuvent être utilisés afin de détecter des Ac antiviraux. Lors d'un test ELISA, les Ag viraux sont fixés sur une surface fixe (fond d'un puits d'une plaque de microtitrage à 96 puits

ou support en plastique). L'échantillon sérique ou plasmatique est mis à incuber en même temps que l'Ag immobilisé. Les Ac spécifiques contre le virus se lient à l'Ag. Ces Ac liés sont mis en évidence à l'aide d'un Ac anti-humain marqué par une enzyme (conjugué) qui lors de l'ajout d'un substrat adéquat, décomposera ce dernier et provoquera la formation d'un produit coloré. L'intensité de la couleur (qui indique la quantité de produit formé et est exprimée en unités de densité optique (DO)) est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. Dans cette méthode ELISA indirecte, la quantité d'Ac antiviraux est corrélée avec l'intensité de la couleur et la lecture de la DO. Pour chaque test ELISA, une valeur de référence de la DO (*cut-off point*) est déterminée. Au-delà de cette valeur, le test est interprété comme réagissant aux Ac contre le virus. Dans la méthode ELISA compétitive, un Ac antiviral marqué par une enzyme est ajouté à l'échantillon sérologique du patient et entre en compétition avec les Ac du patient pour se lier à l'Ag immobilisé. Plus la quantité d'Ac présente dans le sérum du patient est élevée, moins l'Ac marqué par l'enzyme peut se lier à l'Ag et moins la couleur se développe. Une grande compétence est nécessaire afin de réaliser les tests ELISA correctement (Van der Groen, 1991).

Les tests ELISA peuvent aussi être utilisés pour détecter des Ag viraux. Les Ag viraux structuraux sont liés à un Ac antiviral spécifique immobilisé. L'Ag lié est visualisé grâce à l'ajout d'un conjugué marqué par une enzyme et d'un substrat. Si des Ag sont présents, une couleur apparaîtra dans le puits de la plaque de microtitrage. Les résultats positifs pour les Ag sont toujours confirmés par un test de « neutralisation » au cours duquel l'Ag est mis à incuber avec un Ac antiviral de référence. Si l'Ag est présent, l'ajout d'un Ac antiviral entraînera une diminution de la DO du test de l'Ag (Van der Groen, 1991).

4.3.6.1.2. Sensibilité et spécificité

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 de ce fait faible (86,5 % - 100 %). Aucune différence significative n'a été observée entre la première et la deuxième génération de tests ELISA en termes de sensibilité et de spécificité. 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.

Le Tableau 3 présente un aperçu des causes possibles des résultats faux positifs ou faux négatifs (Fischer-Fröhlich & Lauchart, 2004). Novick et al. ont montré qu'il existe une différence significative en ce qui concerne les performances de différents kits de test lors du test sur du sérum cadavérique fortement hémolysé, par rapport à des échantillons sanguins normaux de donneurs vivants. Le nombre de résultats faux positifs diffère selon le test utilisé (Novick et al., 1996). Afin d'éviter les résultats faux positifs dus à l'hémolyse, Fischer-Fröhlich et al. recommandent de centrifuger les échantillons au plus vite et de séparer le sérum (Fischer-Fröhlich & Lauchart, 2004).

La précision du test est largement influencée par la prévalence des Ac parmi la population étudiée et sera de préférence exprimée par la valeur prédictive d'un test. La valeur prédictive positive (VPP ou PPV, cf. Formule 1) indique le nombre de personnes réellement positives au HIV parmi toutes les personnes dont le résultat du test est positif. Ainsi, la VPP d'un test ELISA possédant une sensibilité de 100 % et une spécificité de 99,5 % parmi une population où la prévalence est de 0,01 % et 6 % sera respectivement de 2 % et 92,7 %. Par conséquent, dans les populations où la prévalence du HIV 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 appelés tests de confirmation (Van der Groen, 1991).

Formule 1 : Positive predictive value (PPV)

$$PPV = \frac{(\text{sensitivity})(\text{prevalence})}{(\text{sensitivity})(\text{prevalence}) + (1 - \text{specificity})(1 - \text{prevalence})}$$

Tableau 3 : Causes possibles de résultats faux négatifs et faux positifs aux tests sérologiques (Fischer-Fröhlich & Lauchart, 2004).

Résultat faux négatif	Résultat faux positif
<ul style="list-style-type: none"> • Hémodilution • Période de fenêtre diagnostique et période de séroconversion • Test réalisé sur un compartiment erroné (si des tests des anticorps indiquent qu'une virémie est improbable, la PCR sera négative dans le sang mais pas dans le tissu cible du virus, par exemple) • Test réalisé à l'aide d'une méthode erronée (les mutants ne sont pas toujours détectés par une méthode de dépistage spécifique, par exemple) 	<ul style="list-style-type: none"> • Contamination de l'échantillon de sang par de la fibrine, des érythrocytes et des produits de dégradation tissulaire • Des réactions croisées d'anticorps contre d'autres déterminants surviennent car les tests de dépistage sont des systèmes de mesure biologiques. Des tests de confirmation sont nécessaires.

4.3.6.2. Confirmation par la détection d'Ac antiviraux

4.3.6.2.1. Western blot

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 (obtenues à partir de lysats viraux ou de protéines virales inactivées séparées par électrophorèse), disposées en bandes individuelles sur une membrane de nitrocellulose, sont mises à incuber avec le sérum du patient. Les Ac du sérum du patient qui étaient liés aux protéines virales individuelles sont mis en évidence au moyen d'un conjugué d'immunoglobuline G (IgG) anti-humaine marqué par une enzyme, qui après l'ajout d'un substrat approprié, donne lieu à l'apparition de bandes colorées. Le Western blot permet donc d'observer visuellement et séparément la réaction des Ac antiviraux avec chacune des protéines virales structurales (Van der Groen, 1991). 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 (Hodinka, 2010).

4.3.6.2.2. LIA (Line immunoassay)

Les LIA 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 (Van der Groen, 1991). L'immunoblot Inno-LIA permet de confirmer un test de dépistage positif pour le HCV, tandis qu'un blot de confirmation Inno-LIA HIV est utilisé pour la confirmation d'un test de dépistage positif pour le HIV, par exemple.

4.3.6.2.3. Test d'immunofluorescence indirecte (TIFI)

Les TIFI sont des tests rapides, simples et peu coûteux qui permettent une détection qualitative et quantitative des immunoglobulines M (IgM) et des IgG dans des échantillons cliniques (Hodinka, 2010).

Des cellules infectées par un virus, fixées à l'acétone et immobilisées sur des lames de verre, sont mises en contact avec le sérum du patient. Des Ac spécifiques se lient aux Ag viraux présents à la surface et dans le cytoplasme des cellules. Ils sont ensuite rendus visibles à la lumière ultraviolette (UV) grâce à l'ajout du conjugué d'IgG anti-humaine marquée par une molécule fluorescente et peuvent être observés au microscope à UV. Réalisée par un laborantin expérimenté, ce TIFI est aussi précis que le Western blot (Van der Groen, 1991). Par conséquent, une certaine expérience est requise pour la lecture et l'interprétation correctes de ces tests (Hodinka, 1991).

4.3.6.2.4. Test de radio-immunoprécipitation (TRIP)

Le TRIP est un test très sensible et spécifique qui est de préférence utilisé pour confirmer l'existence d'Ac formés contre des protéines virales structurales. Des acides aminés marqués par un isotope radioactif sont incorporés dans des protéines virales. Ces dernières sont mises à incuber avec le sérum du patient. Les complexes antigène-anticorps radioactifs formés sont absorbés sur des billes de protéines A-séraphose, puis sont élués et les complexes protéine-anticorps sont séparés par électrophorèse sur gel (Van der Groen, 1991). L'utilisation du TRIP pour la détection des virus a été en grande partie abandonnée au profit des tests ELISA; ce TRIP présente des inconvénients tels que les risques inhérents à la manipulation de substances radioactives, les licences nécessaires, la durée de conservation brève des radionucléides et les exigences spécifiques relatives au traitement des déchets (Hodinka, 1991).

4.3.6.3. Confirmation par la mise en évidence d'ADN/ARN viral : test d'amplification de l'acide nucléique

Aujourd'hui, des tests NAT approuvés par la FDA peuvent être utilisés sur des échantillons sanguins de donneurs (de tissus) vivants et cadavériques (FDA, 2011). Les tests NAT peuvent réduire la « fenêtre » existant au début d'une infection en ce qui concerne les tests sérologiques. La « fenêtre » est la période comprise entre la contamination et le moment où le virus peut être mis en évidence dans le sang au moyen de tests ciblant les Ac, les Ag, l'ADN ou l'ARN. Durant cette période de « fenêtre », il est possible que le sang du donneur soit contaminé alors que le résultat du test est encore négatif (FDA, 2007b; Sanquin, 2006). À l'heure actuelle, des tests NAT approuvés par la FDA peuvent être utilisés sur un pool de sang (FDA, 2011).

Les différents tests NAT possèdent trois étapes en commun:

- 1) préparation de l'échantillon, y compris la concentration virale et l'extraction de l'acide nucléique ;
- 2) amplification de l'ADN/ARN cible ;
- 3) détection du produit amplifié (Grant & Busch, 2002).

Les tests NAT peuvent être subdivisés en tests qualitatifs (amplification médiée par la transcription, par exemple) et tests quantitatifs (amplification de l'ADN branché, transcriptase inverse ou *reverse transcriptase* (RT)-PCR, par exemple). Comme les tests NAT qualitatifs de détection de l'ARN du HCV possèdent une meilleure sensibilité que les tests NAT quantitatifs, il est prudent d'analyser à nouveau tous les échantillons négatifs à l'aide de tests NAT qualitatifs plus sensibles (Scott & Gretch, 2007; Desombere et al., 2005).

4.3.6.3.1. Amplification cyclique : PCR

La PCR a été mise au point en 1983 afin d'amplifier l'ADN *in vitro* au moyen d'une ADN polymérase (Whiley & Siouts, 2010).

Afin de mettre en évidence un petit nombre de particules virales dans le sang d'un patient, il est possible d'utiliser un test très sensible capable de multiplier la petite quantité de copies d'ADN de manière à ce qu'elle atteigne un niveau pouvant être mis en évidence. Pour ce faire, il convient de disposer de deux fragments d'ADN simple brin (amorces) qui peuvent être hybridés avec l'ADN qui se trouve avant et après le fragment souhaité. La procédure de multiplication consiste en la répétition d'un cycle en trois parties. Ce cycle comprend une étape de chauffage où les

deux brins complémentaires de l'ADN sont séparés, de manière à obtenir de l'ADN simple brin (dénaturation). Ensuite, une étape de renaturation permet d'hybrider les deux amorces avec leurs bases complémentaires. Les complexes ADN-amorce forment le point de départ de l'enzyme ADN polymérase qui allonge la chaîne. La répétition du cycle entraîne une augmentation exponentielle de la quantité d'ADN entre les amorces : chaque nouvelle copie formée sert de matériel de départ lors du cycle suivant. La multiplication de l'ADN est caractérisée après la séparation par électrophorèse, selon la taille des molécules du fragment d'ADN amplifié (Van der Groen, 1991). Les fragments amplifiés peuvent être détectés à l'aide de bromure d'éthidium sur un gel d'agarose, de sondes spécifiques à la séquence porteuses d'une étiquette radioactive ou chimioluminescente ou d'enzymes catalysant un changement de couleur (Grant & Busch, 2002). Aujourd'hui, la PCR en temps réel est généralement utilisée. Des molécules fluorescentes sont alors ajoutées aux composants du mélange de réactifs de la PCR. La libération de ces molécules entraîne une augmentation du signal fluorescent lors de l'amplification de la PCR (Whiley & Sioots, 2010).

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 (Whiley & Sioots, 2010). Des tests commerciaux sont disponibles pour la détection du HIV, du HBV, du HCV et du CMV, mais de nombreux protocoles de PCR ont également été développés en interne (Whiley & Sioots, 2010).

4.3.6.3.2. Amplification de la cible

Ce document décrit les deux techniques les plus utilisées (amplification d'acide nucléique basée sur la séquence et amplification médiée par la transcription). Il est également possible d'utiliser l'amplification par déplacement de brin (*strand displacement amplification*) et l'amplification en cercle roulant (*rolling circle amplification*), bien que ces techniques n'aient pas été développées pour le diagnostic virologique (Whiley & Sioots, 2010).

4.3.6.3.2.1. Amplification d'acide nucléique basée sur la séquence

La technique NASBA (*nucleic acid sequence based amplification*), dont le brevet est détenu par Organon Teknika, est une alternative à la PCR en vue de l'analyse des acides nucléiques. La NASBA est un processus d'amplification enzymatique isotherme. La spécificité de la réaction est déterminée par deux amorces oligonucléotidiques spécifiques à la cible ARN recherchée. En outre, une des deux amorces contient le site de fixation pour le consensus T7 ARN polymérase (Whiley & Sioots, 2010). Le produit de réaction, qui se compose principalement d'ARN monobrin, peut être détecté facilement lors de tests sensibles basés sur l'hybridation non radioactive. Bien qu'en théorie, la NASBA puisse être utilisée pour l'amplification de l'ADN et de l'ARN, elle est mieux adaptée à l'amplification de l'ARN et est donc une technique puissante de détection de l'ARN viral tel que le génome du HCV ou du HIV-1 (Sillekens, 1996).

4.3.6.3.2.2. Amplification médiée par la transcription

L'amplification médiée par la transcription est une variante de la technique NASBA qui utilise l'activité ribonucléase H (RNase H) de la RT présente dans la réaction, plutôt qu'une enzyme spécifique (ARNseH) (Whiley & Sioots, 2010). Comme la NASBA, cette technique utilise des conditions d'amplification isothermes et peut détecter à la fois l'ADN et l'ARN (Whiley & Sioots, 2010).

Le test Procleix[®] HIV-1/HCV (Gen-Probe) est un test **qualitatif** de détection de l'ARN du HIV-1 et/ou du HCV dans le plasma humain de donneurs de sang individuels, y compris dans les échantillons de sang de donneurs à CNB. Les pools d'un maximum de 16 échantillons provenant de donneurs de sang individuels peuvent aussi être soumis à ce test. Trois étapes ont lieu dans le tube : la préparation de l'échantillon, l'amplification de l'ARN cible du HIV-1 et du HCV par TMA et la détection des produits d'amplification au moyen d'un *hybridization protection assay* (HPA). L'ARN est isolé du plasma. Les oligonucléotides homologues aux régions hautement conservées du HIV-1 et du HCV sont hybridés avec la cible HIV-1 ou HCV si elle est présente dans l'échantillon de test. La cible hybridée est capturée sur des microparticules magnétiques qui sont

séparées du plasma par un champ magnétique. Des étapes de lavage permettent d'éliminer le plasma restant. La TMA est une méthode d'amplification de l'acide nucléique basée sur la transcription, qui utilise deux enzymes : la RT du *Moloney murine leukemia virus* (MMLV)-RT et la T7 ARN polymérase. La RT est utilisée pour générer une copie ADN de la séquence d'ARN cible. La T7 ARN polymérase produit des copies multiples de l'amplicon ARN à partir de la copie ADN. La détection s'effectue par HPA via des sondes d'acide nucléique monobrin porteuses d'une étiquette chimioluminescente complémentaires à l'amplicon. Les sondes d'acide nucléique étiquetées s'hybrident de manière spécifique avec l'amplicon. Le signal chimioluminescent produit par la sonde hybridée est mesuré dans un luminomètre et rapporté sous la forme d'unités relatives de lumière (FDA, 2007b). Strong et al. ont testé Procleix[®] et COBAS Ampliscreen[™] pour la détection du HCV, du HIV-1 et du HBV. Les échantillons hémolysés ont provoqué une inhibition complète de Procleix[®] lorsqu'ils étaient utilisés sans avoir été dilués. La dilution d'échantillons *post mortem* au moyen d'eau physiologique, dans un rapport de 1:5, a réduit l'inhibition lors de l'utilisation des deux tests. Les échantillons *post mortem* sont souvent plus fortement hémolysés, ce qui nuit à la sensibilité et la spécificité des tests (Strong et al., 2005). La technique TMA est plus sensible que les tests RT-PCR (Scott & Gretch, 2007).

4.3.6.3.3. Amplification de la sonde : réaction en chaîne par ligase

La réaction en chaîne par ligase utilise deux paires de sondes complémentaires, qui s'hybrident côte à côte sur chaque brin de la séquence d'acide nucléique cible. Chaque paire de sondes est ensuite jointe à l'autre par comblement de la brèche par l'ADN ligase. Après dénaturation, tant la séquence cible que les sondes liguées peuvent servir de modèle pour l'allongement d'autres sondes. L'utilisation d'une ADN ligase thermostable permet de répéter le cycle de la réaction comme dans la PCR, afin de dénaturer les brins et de réanneler les sondes pour obtenir une amplification exponentielle (Grant & Busch, 2002). L'avantage de cette technique est sa sensibilité aux modifications des paires de bases dans la séquence cible et la possibilité de détection automatique grâce à l'étiquetage des sondes (Whiley & Siouts, 2010). L'application commerciale de la réaction en chaîne par ligase est limitée à la détection des génomes bactériens (Whiley & Siouts, 2010).

4.3.6.3.4. Tests d'amplification du signal : ADN branché

Cette technique, décrite pour la première fois par Chiron Co. en 1987, s'avère être 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 différents types de sondes oligonucléotidiques (sondes de capture, sondes cibles, sondes branchées secondaires, sondes tertiaires courtes liées à des enzymes) (Whiley & Siouts, 2010).

Le test Versant[®] HIV-1 RNA 3.0 (ADN branché) est un test d'amplification du signal basé sur l'acide nucléique, qui permet de quantifier directement l'ARN du HIV-1 dans le plasma humain. Ce test n'est pas validé pour le sang cadavérique et n'est pas destiné au dépistage des donneurs. La méthode de l'ADN branché, contrairement à la PCR, amplifie le signal non isotopique d'une hybridation directe à la séquence cible. L'amplification du signal est linéaire. Le signal des sondes d'ADN annelées par la formation d'un réseau contrôlé de sondes oligonucléotidiques synthétiques est utilisé comme base, plutôt que l'amplification de l'acide nucléique cible (Grant & Busch, 2002). La technologie de l'ADN branché est quantitative, sensible et facile à appliquer en laboratoire. Le test Versant[®] HIV-1 RNA est une procédure d'hybridation en sandwich de l'acide nucléique. Une fois que l'ARN génomique du HIV-1 a été libéré des particules virales, l'ARN est capturé sur une plaque MicroWell munie d'un jeu de sondes de capture d'oligonucléotides synthétiques spécifiques. Les sondes de capture dotées de 17 extensions de capture individuelles et les sondes cibles composées de 81 extensions de cible individuelles se lient à différentes régions du gène pol de l'ARN viral. La sonde de multiplication s'hybride avec le pré-amplificateur, ce qui entraîne la formation d'un complexe d'ADN branché. Plusieurs copies d'une sonde porteuse d'une étiquette phosphatase alcaline sont ensuite hybridées avec ce complexe immobilisé. La détection a lieu par incubation avec un substrat

chimiluminescent. L'émission de lumière est liée directement à la quantité d'ARN du HIV-1 (FDA, 2002).

La sensibilité des tests reposant sur l'ADN branché est généralement inférieure à celle des méthodes d'amplification de la cible (Grant & Busch, 2002). Les tests de capture hybrides (pour le HBV, le CMV et le HPV, par exemple) et les tests HPA (Accu-Probe pour la détection bactérienne, par exemple) sont d'autres techniques d'amplification du signal (Whiley & Sioots, 2010).

4.3.6.3.5. Sensibilité et stabilité de l'échantillon

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 ARNases sont présentes partout et réduisent la sensibilité de la PCR (Robberecht & Van Cauwenbergh, 2004). Les ARNases et ADNases peuvent être inactivées rapidement grâce à des agents chaotropiques tels que l'isothiocyanate de guanidine 4 M. Les échantillons stabilisés peuvent être expédiés à température ambiante (Robberecht & Van Cauwenbergh, 2004). Ceci vaut à la fois pour le sang acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) (analyse ADN) et pour le matériel stabilisé à l'isothiocyanate de guanidine en vue d'une isolation de l'ARN (Robberecht & Van Cauwenbergh, 2004). La stabilisation à l'isothiocyanate de guanidine permet de conserver les échantillons pendant sept jours à température ambiante. 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 (Robberecht & Van Cauwenbergh, 2004). Les échantillons destinés à une analyse ARN doivent être congelés dans un milieu tampon à -20°C (Robberecht & Van Cauwenbergh, 2004; Neumaier et al., 1998).

Anticoagulants

L'héparine peut freiner ou inhiber l'amplification de l'ADN pendant la PCR (Robberecht & Van Cauwenbergh, 2004; Neumaier et al., 1998). D'autres anticoagulants (EDTA, citrate) provoquent également une inhibition des enzymes de restriction (Robberecht & Van Cauwenbergh, 2004). Toutefois, les techniques classiques de précipitation de l'ADN éliminent à la fois l'EDTA et le citrate, mais pas l'héparine (Robberecht & Van Cauwenbergh, 2004). Par conséquent, ces autres anticoagulants n'influencent pas la PCR (Padalko, 2005).

Selon des études de Holodniy et al., l'héparine plasmatique donne des valeurs d'ARN du HIV inférieures à celles du citrate plasmatique et de l'EDTA plasmatique (Holodniy et al., 1995).

Température

Les études portant sur les conditions de conservation des échantillons sanguins ne sont pas concordantes. Le transport des échantillons à une température de 2 à 6°C ou à température ambiante ne fait pas varier les dosages (Padalko, 2005).

- **HIV**

Le plasma doit être congelé selon les recommandations du fabricant. Le sérum possède une charge virale d'ARN du HIV-1 plus faible que le plasma EDTA et n'est donc pas recommandé (Bruisten et al., 1997). Les échantillons stabilisés à l'isothiocyanate de guanidine (pour l'analyse ARN) et les échantillons stabilisés de sang total EDTA (pour l'analyse ADN) doivent être transportés à température ambiante (Robberecht & Van Cauwenbergh, 2004).

La charge de HIV dans le sang total EDTA est stable pendant 72 heures à température ambiante. Lorsque le sang total EDTA est conservé à 4°C, le HIV se dégrade plus rapidement: la conservation à 4°C pendant plus de 24 heures n'est pas recommandée. Le plasma EDTA et le sérum présentent une charge de HIV stable pendant plusieurs mois à plusieurs années lorsqu'ils sont conservés à une température de -20°C à -70°C (Padalko, 2005).

- **HCV**

Les données relatives à la charge de HCV dans le sang total EDTA à température ambiante sont moins claires que celles concernant la charge de HIV-1. La plupart des données indiquent que le

HCV est stable pendant 72 heures à température ambiante. L'ARN du HCV se dégrade aussi plus rapidement lorsque les échantillons sont conservés à 4°C. Une conservation pendant 48 heures à 4°C n'a aucune influence (Padalko, 2005).

- **HBV**

Le HBV est plus stable que le HIV-1 et le HCV. Toutefois, les valeurs de l'ADN du HBV ont tendance à augmenter après 24 heures de conservation à 4°C (Padalko, 2005 ; Gessoni et al., 2004).

Le Tableau 4 présente un comparatif de la littérature relative aux conditions de conservation des échantillons en vue d'un dépistage sérologique.

Dilution et moment du prélèvement

Strong et al. ont montré que la dilution des échantillons sanguins permet de surmonter l'inhibition en ce qui concerne l'analyse du HIV-1, du HCV et du HBV, sans réduire la sensibilité.

Les auteurs n'ont constaté aucun effet de la durée *post mortem* sur la sensibilité pour ces virus (Strong et al., 2005). Cependant, Burtonboy et Delloye ont observé une diminution de la sensibilité de la PCR avec les échantillons collectés plus de 24 heures *post mortem* (Burtonboy & Delloye, 1996).

Tableau 4 : Influence des conditions de conservation sur la stabilité de l'échantillon/les résultats lors d'une analyse moléculaire

HIV-1		
Auteurs	Technique	Conclusion
Ahmad et al., 1999	AMPLICOR HIV-1 Monitor	<ul style="list-style-type: none"> Le HIV-1 est stable dans le plasma EDTA pendant 96 h à 4°C.
Holodniy et al., 1995	Quantiplex HIV RNA (bDNA)	<ul style="list-style-type: none"> Taux d'ARN du HIV plus élevé dans le plasma que dans le sérum. Le plasma hépariné donne un taux d'ARN plus faible qu'avec les autres anticoagulants.
Vandamme et al., 1999	NASBA HIV-1 RNA QT, AMPLICOR HIV Monitor, Quantiplex HIV (bDNA)	<ul style="list-style-type: none"> L'ARN du HIV-1 est stable dans le sang total pendant 7 jours à température ambiante. Le report du traitement jusqu'à 1 semaine à température ambiante n'a aucune influence sur le dosage de la charge virale. Pas de diminution de la charge virale de l'ARN du HIV après 2 ans à une température de -20°C à -80°C.
Holodniy et al., 2000	AMPLICOR HIV Monitor	<ul style="list-style-type: none"> La charge virale du HIV est stable dans le plasma EDTA pendant 6 h à température ambiante et à 4°C. Le transport du sang total EDTA en vue du dosage de la charge virale du HIV-1 peut avoir lieu à température ambiante, sur de la glace humide ou sèche, sans modification de la charge virale.
Holodniy et al., 1991	RT-PCR ARN HIV interne	<ul style="list-style-type: none"> L'héparine est un inhibiteur de l'amplification de l'ADN, aucune influence de l'EDTA. Pas d'inhibition de la détection qualitative du HIV avec l'héparine, mais influence quantitative. Stabilité modifiée des acides nucléiques cellulaires avec l'héparine.
Ginocchio et al., 1997	NASBA HIV-1 RNA QT	<ul style="list-style-type: none"> Taux d'ARN du HIV-1 plus élevé dans le

		<p>plasma que dans le sérum.</p> <ul style="list-style-type: none"> • L'ARN du HIV-1 est stable dans le plasma EDTA pendant 30 h à température ambiante et à 4°C. • L'ARN du HIV-1 est stable dans le plasma EDTA pendant 6 mois à -70°C.
Bruisten et al., 1997	NASBA HIV-1 RNA QT	<ul style="list-style-type: none"> • La charge virale d'ARN du HIV-1 dans le sang total EDTA diminue de manière significative après 24 h à 4°C. • La charge virale d'ARN du HIV-1 dans le sang total EDTA est stable pendant 72 heures à 25°C.
HCV		
Gessoni et al., 2000	COBAS AMPLICOR HCV	<ul style="list-style-type: none"> • L'ARN du HCV est stable à 4°C dans le sang total pendant 168 h. • Tendance à l'augmentation de la charge virale d'ARN du HCV après 24 heures à 4°C.
Damen et al., 1998	HCV NASBA-QT	<ul style="list-style-type: none"> • L'ARN du HCV dans le sang total EDTA diminue de manière significative après 24 h à 4°C. • L'ARN du HCV diminue de manière significative dans le sérum après 7 jours à 30°C. • La charge virale d'ARN du HCV reste stable dans le plasma pendant 14 jours à 4°C.
Cuypers et al., 1992	RT-PCR ARN HCV interne	<ul style="list-style-type: none"> • La conservation du sang total EDTA ou du sérum pendant 14 jours à température ambiante réduit la charge d'ARN du HCV de 3 à 4 log. • La réduction de la charge virale dans le sang total EDTA est plus marquée à 4°C qu'à température ambiante (plus grande activation des granulocytes et libération des nucléases).
.Halfon et al., 1996	(bDNA) HCV RNA Quantiplex™	<ul style="list-style-type: none"> • Disparition complète de l'ARN du HCV après 5 jours à température ambiante et après 6 mois à 4°C. • Diminution de 15,6 % de l'ARN du HCV après conservation pendant 5 jours à -20°C. • Perte de 10 % de l'ARN du HCV après 6 mois à -80°C.
HIV-1, HCV, HBV		
José et al., 2005	AMPLICOR HIV-1 Monitor	<ul style="list-style-type: none"> • L'ARN du HIV-1 est stable pendant 3 ans à -20°C et -70°C. • L'ARN du HCV est stable pendant 3,5 ans à -20°C, pour une charge virale de 100 IU/ml. • L'ADN du HBV, l'ARN du HIV et l'ARN du HCV possèdent une grande stabilité à 25°C et 5°C, à des concentrations de 10³ et 10⁴ IU/ml. • Grande stabilité de l'ADN du HBV pendant 28 jours à 5°C et 25°C.
Gessoni et al., 2004	COBAS AMPLICOR Monitor	<ul style="list-style-type: none"> • Le HCV, le HBV et le HIV sont stables à 4°C pendant 72 heures dans le sang total EDTA. • Tendance à l'augmentation de la charge virale du HCV, du HBV et du HIV après 24 heures à 4°C.

4.3.6.4. Avantages et inconvénients comparés de la sérologie et du test NAT

Depuis le 01/12/2002, le dépistage du **HCV et du HIV** au moyen de tests NAT est obligatoire chez les **donneurs de sang** (AR, 2002). Les tests NAT se sont avérés plus efficaces en la matière que les tests sérologiques classiques car ils permettent de réduire la durée de la fenêtre (tableau 5, Sato et al., 2001; CSS 8684, 2011). Il ressort de la littérature que ces tests NAT pour le HIV et le HCV possèdent également une valeur ajoutée dans le cadre du don de matériel corporel humain (CSS 8684, 2011).

Le **HCV** est présent en très faible concentration pendant la période de fenêtre (amplification lente). L'expérience japonaise suppose que les systèmes sensibles de détection de l'ADN du HBV améliorent la sécurité générale du sang disponible (Minegishi et al., 2003). Étant donné la limite de détection relativement élevée des tests même les plus sensibles pour les HBsAg, une personne infectée peut rester négative pour les HBsAg durant quelques semaines (CSS 8684, 2011). Les tests NAT permettent de raccourcir la fenêtre dans ce cas aussi et de dépister certains mutants qui ne seraient pas détectables au moyen des tests classiques de détection des Ac (CSS 8684, 2011). En cas d'infection chronique par le HBV, les HBsAg ne peuvent pas être mis en évidence, la charge virale étant souvent faible. Les Ac anti-HBC peuvent éventuellement être présents à ce stade. Les tests NAT sont donc fortement recommandés aussi pour le HBV, en plus de la sérologie, dans le cadre du don de matériel corporel humain (CSS 8684, 2011). Il est admis que seul le test NAT pour le HCV apporte une plus-value nette uniquement dans le cadre du don de cornée (non vascularisée) (CSS 8684, 2011). L'association d'une sérologie adéquate et de tests NAT offre donc la meilleure garantie de prévention de la transmission du HIV, du HCV et du HBV.

Tableau 5 : Fenêtre lors de la sérologie et des tests NAT (Busch & Kleinman, 2000).

	HBV	HCV	HIV
Fenêtre depuis l'infection jusqu'à la détection des anticorps/antigènes	56 jours (HBsAg)	70 jours (anti-HCV)	22 jours (anti-HIV1/2)
Fenêtre lors des tests NAT	41-50 jours	10-29 jours	7-12 jours*

* test p24 entre 12 et 22 jours

4.3.7. Validation des tests diagnostiques in vivo contre post mortem

Comme il s'écoule un long laps de temps entre l'arrêt de la circulation et le prélèvement *post mortem* de sang chez les donneurs cadavériques, le sang est souvent de moins bonne qualité (hémolyse, par exemple). De ce fait, les tests sérologiques pratiqués sur ces échantillons peuvent donner des résultats faux positifs. Dans 0 à 42 % des tests de dépistage réactifs répétés pour les HBsAg, les Ac anti-HCV et les Ac anti-HIV ont été obtenus au moyen de différents kits de test commerciaux utilisés sur du sang cadavérique (Stanworth et al., 2000).

D'autre part, des inhibiteurs des tests de détection de l'acide nucléique peuvent être présents dans le sang cadavérique et donner lieu à des résultats faux négatifs. La dilution peut offrir une solution. Par conséquent, il est important que les échantillons sanguins soient prélevés au plus vite, et de préférence dans un délai de 24 heures, après l'arrêt de la circulation (SaBTO, 2011). Si le sang est prélevé plus tard, cette méthode doit être validée. Les kits de test doivent être validés pour le sang cadavérique et doivent posséder une sensibilité et une spécificité acceptables (SaBTO, 2011). Sur son site Internet, la FDA a publié une liste des tests approuvés de dépistage chez les donneurs (vivants et cadavériques) (FDA, 2011). Aujourd'hui, il existe également 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 (SaBTO, 2011). 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*. Les laboratoires individuels peuvent valider ces tests eux-mêmes, selon leurs propres procédures (SaBTO, 2011).

Notons qu'il existe encore une grande incertitude en ce qui concerne la durée de conservation idéale en vue du dosage de la charge virale. Jusqu'à présent, il n'existe aucune méthode de conservation de référence (cf. 4.3.6.3.5).

4.3.8. Interprétation des résultats des tests

Pour l'interprétation des résultats des tests, nous renvoyons à **Virologie**, chapitre 6 : **Prévention des infections**.

5. INVENTAIRE DES PUBLICATIONS : TRANSMISSION DES INFECTIONS VIRALES PAR LES TISSUS

5.1. INTRODUCTION

Alors qu'aux États-Unis, environ 150.000 allogreffes osseuses sont réalisées par an, la transmission du HCV, par exemple, lors d'allogreffes osseuses est très rare, pour diverses raisons (Trotter, 2003). Seule une petite partie des donneurs d'os est testée positive pour l'hépatite C. Lors d'une étude finlandaise, 1 seul donneur d'os sur 560 était positif pour le HCV entre 1972 et 1995 (Trotter, 2003). Aux Pays-Bas, parmi les donneurs de sang, 10 (0,021 %) nouveaux donneurs étaient positifs pour le HCV, 21 (0,045 %) pour le HBV et aucun pour le HIV en 2009 (Sanquin, 2009). L'application de recommandations (inter)nationales d'organisations professionnelles telles que l'AATB, la *European Association in Tissue Banks* (EATB), la *Eye Bank Association of America* (EBAA), d'une part, et de directives gouvernementales telles que les Arrêtés royaux et les recommandations du CSS, d'autre part, permet de sélectionner avec soin les donneurs et, éventuellement, de les rejeter sur la base de leurs antécédents médicaux et d'un examen physique. La totalité du sérum des donneurs de tissus subit des tests de dépistage du HCV, du HBV, du HIV et, éventuellement, du HTLV. Afin de réduire encore davantage le risque de transmission, des techniques de traitement telles que les antibiotiques, l'alcool et les détergents sont utilisées afin d'éliminer au maximum le sang, la moelle osseuse et les autres résidus tissulaires du matériel de l'allogreffe. Les greffes osseuses qui contiennent de la moelle osseuse comportent le plus grand risque de transmission d'infections virales. En revanche, la moelle osseuse est éliminée des greffons corticaux lors de la préparation et du traitement, de sorte que ces greffes sont associées au risque le plus faible de transmission de maladies infectieuses. La transmission du HIV, du HCV ou du HBV par la cornée ou les tissus cardiovasculaires est peu habituelle, parce que la cornée n'est pas un tissu vascularisé et que les tissus cardiovasculaires sont traités et transplantés en petites quantités (Eastlundt, 2004; Pruss et al., 2010).

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 (Trotter, 2003).

5.2. HBV

Bien que les virus ne se transmettent pas de manière efficace lors d'une transplantation de cornée, car celle-ci n'est pas vascularisée, deux cas d'infection par le HBV ont été décrits à la suite d'une **kératoplastie**. Le sérum des deux donneurs était positif pour les HBsAg (bien que les tests aient été réalisés 9 mois après le don). La clinique des receveurs et leur sérologie (également testée *a posteriori*) suggéraient une infection transmise par les donneurs (Hoft et al., 1997). Certains auteurs ont pu démontrer la présence de HBV dans le tissu cornéen de donneurs positifs pour les HBsAg, d'autres pas (Eastlund, 2004).

En ce qui concerne les transplantations d'**organes**, on sait que les donneurs négatifs pour les HBsAg, positifs pour les Ac anti-HBc et négatifs pour les Ac anti-HBs peuvent transmettre le HBV. C'est essentiellement le cas pour les donneurs de foie contaminés, moins pour les donneurs de rein et de cœur. Wachs et al. ont constaté que 1 receveur de rein sur 42, 3 receveurs de foie sur 6 et 0 receveur de cœur sur 7 étaient positifs pour les HBsAg après une transplantation provenant de donneurs positifs pour les Ac anti-HBc, négatifs pour les Ac anti-HBs et négatifs pour les HBsAg (Wachs et al., 1995). En raison de la transmission possible en présence de ce statut sérologique du HBV, les donneurs de tissus positifs pour les Ac anti-HBc sont exclus si les Ac anti-HBs protecteurs présents ne sont pas suffisants.

Shutkin a décrit pour la première fois le cas d'un patient ayant reçu une greffe **osseuse** corticale réfrigérée non traitée et ayant développé une hépatite 10 semaines plus tard. L'homme n'avait

pas reçu de transfusion sanguine. La greffe osseuse provenait de la jambe amputée d'un homme atteint d'une maladie vasculaire occlusive et de gangrène. À cette époque (1954), des tests sérologiques de dépistage du HCV et du HBV n'étaient pas encore disponibles (Eastlund, 2004; Shutkin, 1954; Shutkin, 2005).

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. Sur les neuf patients sensibles au HBV, un seul a développé des marqueurs HBV positifs. Toutefois, cinq des receveurs sensibles ont reçu des immunoglobulines du HBV ou le vaccin anti-HBV (Eastlund, 2004).

Il n'existe pas d'autres rapports concernant la transmission du HBV lors d'une transplantation d'organe, de cornée ou de valve cardiaque. Il est plus probable que des transmissions aient eu lieu par d'autres voies, mais aucun cas n'a été reconnu et publié (Eastlund, 2004).

5.3. HCV

Un rapport de cas a décrit la transmission du HCV lors d'une allogreffe **osseuse** traitée. Le traitement consistait en l'utilisation d'antibiotiques, d'alcool et de détergent avant la congélation de l'allogreffe (Trotter, 2003).

Eggen et Nordbo ont décrit un rapport de cas où du **tissu osseux** non traité était à l'origine d'une transmission du HCV. Le cas concernait un patient qui avait reçu une tête fémorale d'un donneur positif pour les Ac anti-HCV (Eggen & Nordbo, 1992). Vingt-deux semaines après l'intervention, une élévation des tests de la fonction hépatique et un test positif pour les Ac anti-HCV ont permis de diagnostiquer le HCV chez le receveur. Le receveur n'avait pas reçu de produits sanguins et ne présentait pas un profil à risque (Trotter, 2003; Eggen & Nordbo, 1992).

En juin 2002, un cas d'hépatite C aiguë survenu 6 semaines après l'implantation du tendon rotulien d'un donneur et d'une allogreffe osseuse a été rapporté au CDC (Homan et al., 2003). Le donneur était négatif pour les Ac anti-HCV (deuxième et troisième générations de tests ELISA), mais positif pour l'ARN du HCV (test AmpliCor® HCV, Roch Molecular Systems). Quarante receveurs ont reçu les tissus de ce donneur. Six ont reçu des organes, 32 des tissus et 2 les cornées. Tous les tissus avaient été traités à l'aide de produits chimiques en surface ou d'antibiotiques. Les greffons osseux avaient également été irradiés. Parmi ces 40 receveurs, 8 cas ont été répertoriés : 3 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), de cornée (n = 1) ou d'os irradié (n = 16). La fréquence des transplantations de tissus/organes négatifs pour les Ac et positifs pour l'ARN n'est pas connue. Chez les donneurs de sang, dont les caractéristiques diffèrent probablement de celles des donneurs d'organes ou de tissus, environ 4/10⁶ dons de sang proviennent de donneurs négatifs pour les Ac anti-HCV et positifs pour l'ARN du HCV (Homan et al., 2003).

Conrad et al. (1995) ont décrit la transmission du HCV découverte grâce à l'introduction d'une deuxième génération de tests de détection des Ac anti-HCV. Des échantillons de sérum provenant de la sérothèque, qui avaient été testés auparavant uniquement avec une première génération de tests de détection des Ac anti-HCV, ont été analysés au moyen d'un test de la deuxième génération. Le sérum de deux donneurs s'est avéré réactif. Les receveurs de ces donneurs ont également subi des tests sérologiques au moyen de cette deuxième génération de tests de détection des Ac anti-HCV. Quatre des cinq receveurs d'une allogreffe (**os et tendons**) du premier donneur se sont avérés réagir également à ce test de détection des Ac anti-HCV. Trois d'entre eux avaient aussi une PCR positive. L'analyse séquentielle de l'ARN du virus de

l'hépatite C de deux de ces receveurs était identique à celle du donneur. Toutefois, il est possible que le HCV soit resté dans les blocs d'os auxquels les allogreffes de tendons étaient fixées. Ces allogreffes congelées n'ont pas été traitées afin d'éliminer la moelle osseuse et les cellules sanguines (Shutkin, 1954). Le sérum de six receveurs d'une allogreffe provenant du deuxième donneur a été testé; un échantillon était positif mais l'ARN du HCV des isolats du donneur et du receveur n'était pas identique. Les allogreffes de ce donneur ont été soumises à un rayonnement gamma de 17 kGy. Cette irradiation semble donc suffisante pour inactiver le HCV dans les tissus (Trotter, 2003; Conrad et al., 1995).

Pereira et al. (1993) ont réalisé une étude parmi 716 donneurs cadavériques (1986-1990) en ce qui concerne le risque de transmission du HCV. Treize donneurs étaient positifs lors de l'emploi d'un test de détection des Ac anti-HCV de la première génération, cinq d'entre eux avaient également donné des tissus. Ces cinq donneurs étaient aussi positifs lors de l'emploi d'un test ELISA anti-HCV de la deuxième génération, et quatre lors de la PCR. Quinze patients ont reçu des tissus de ces cinq donneurs. Un receveur de tissu **osseux** congelé (1/15, 7 %) a développé une hépatite après la transplantation. Cette fréquence est beaucoup plus faible que chez les receveurs d'organes (8/15, 53 %). En théorie, la plus petite masse tissulaire, l'absence de traitement immunosuppresseur et l'absence de différences métaboliques chez les receveurs de tissus permettent la séroconversion pour le HCV. Donc, soit le HCV était absent des allogreffes des donneurs positifs pour les Ac anti-HCV, soit le traitement du tissu osseux a inactivé le HCV (Trotter, 2003; Pereira et al., 1993). Trois valves aortiques transplantées provenant de 2 donneurs positifs pour l'ARN du HCV n'ont pas provoqué d'infection chez le receveur (Pruss et al., 2010; Pereira et al., 1993). En revanche, des cas de transmission du HCV lors d'une transplantation cardiaque ont été rapportés (Pruss et al., 2010).

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. (Eastlund, 2004).

Le génome du HCV a été mis en évidence dans la cornée de 7 donneurs séropositifs pour le HCV sur 29 (Pruss et al., 2010). Néanmoins, une étude de l'EBAA 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) (Pruss et al., 2010).

Notons que la plupart des cas rapportés de transmission de virus concernaient des tissus qui n'avaient pas été traités ou dans lesquels le virus n'avaient pas été inactivé (Pruss et al., 2010).

5.4. HIV

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 (Eastlund, 2004). 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. Patijn et al. (1993) ont rapporté que des allogreffes osseuses congelées fraîches non traitées ont transmis le HIV à quatre receveurs (Patijn et al., 1993). Le HIV a également été transmis à des receveurs de **reins**, des receveurs de **peau**, des femmes ayant subi une **insémination artificielle**, des patients hémophiles qui avaient reçu le **facteur de coagulation VIII** et des receveurs de **sang** (Buck et al., 1990; Borchi et al., 2010). Un cas fatal a été signalé au CDC en 1984. Il s'agissait d'une femme qui, à cette époque (il n'existait pas encore de test du dépistage du HIV), avait reçu une greffe **osseuse** dans le cadre d'une fusion latérale due à une scoliose progressive. Bien que la femme se soit plainte de fièvre et d'une hypertrophie des ganglions lymphatiques 21 jours après la transplantation, le diagnostic d'infection par le HIV n'a été posé que 4 ans plus tard. Le donneur était un homme de 52 ans qui avait donné une tête fémorale lors de la pose d'une prothèse de hanche totale. Chez le donneur, le SIDA n'a été diagnostiqué que 2 ans après le don (1986) (Eastlund et al. 2004; CDC, 1988). Aujourd'hui, ce donneur ne serait plus pris en

considération car il souffrait d'une lymphadénopathie et était un toxicomane intraveineux (Eastlund, 2004). Avant le dépistage du HIV, 12 autres receveurs ont reçu une allogreffe osseuse lyophilisée non stérilisée provenant d'un donneur cadavérique infecté par le HIV (1985). Quatre de ces receveurs ont subi une séroconversion (Eastlund, 2004; Pruss et al., 2010).

Simonds a rapporté la transmission du HIV par un donneur de 22 ans séronégatif pour le HIV-1, mort d'une blessure par balle. Ce patient a donné quatre organes solides et 54 autres tissus. Les 4 receveurs d'**organe** (cœur, foie, rein gauche et rein droit) et 3 receveurs d'**os** congelé non traité (tête fémorale droite, tête fémorale gauche, **tendon rotulien**, fémur proximal) ont été infectés par le HIV-1 (Simonds et al., 1992; Asselmeier et al., 1993). Notons que 25 autres allogreffes (tendons, ligaments et os) traitées (éthanol et/ou lyophilisation) provenant de ce donneur n'ont pas entraîné la transmission du HIV au receveur (Pruss et al., 2010). Ce donneur avait subi des tests mais avait été déclaré séronégatif pour le HIV. À cette époque, le test de dépistage du HIV était nouveau et peu sensible (Eastlund, 2004).

En 1985, un homme de 58 ans a reçu un greffon osseux lyophilisé provenant d'un donneur infecté par le HIV. Cet homme et au moins deux des 12 autres patients qui avaient reçu des greffes osseuses de ce donneur sont décédés plus tard du SIDA (Karcher, 1997). Dans ce cas également, le donneur, qui était toxicomane, ne serait pas pris en considération dans les circonstances actuelles.

En 1987, un cas de transmission du HIV par un donneur à plusieurs receveurs (rein et foie) a été rapporté au CDC. Le donneur était négatif pour les Ac anti-HIV (ELISA) lors du test sérologique réalisé immédiatement après 56 transfusions de sang et cristalloïdes. Lors de la réalisation de nouveaux tests sur le donneur, 48 heures plus tard, ceux-ci étaient positifs en raison du remplissage d'immunoglobulines provenant de sites extravasculaires. La FDA a alors élaboré des règles relatives à l'hémodilution (Strong et al., 2005; CDC, 1987).

Pour terminer, en 1996, une tête fémorale congelée infectée par le HIV a été donnée par un homme taiwanais qui n'avait pas été testé pour le HIV. Ce greffon osseux a été transplanté chez une femme de 34 ans qui a subi une séroconversion 5 mois plus tard (Eastlund, 2004; Pruss et al., 2010).

Clarke est le seul à avoir rapporté un cas de transmission du HIV lors d'une allogreffe de **peau** non stérilisée. La peau du donneur a été utilisée avant que les résultats des tests sérologiques soient disponibles. Le receveur présentait une réponse faiblement positive pour les Ac anti-HIV 37 jours après l'application de l'allogreffe (Clarke, 1987). Il n'a jamais été rapporté si ce patient a développé le SIDA (CDC, 1988). Toutefois, Kealy a rapporté dans *The Lancet* (1987) la description d'une transmission du HIV chez un patient brûlé, à Londres, lors d'une allogreffe cutanée cadavérique provenant d'un donneur infecté par le HIV. Le receveur était positif pour le HIV et est décédé quatre ans plus tard. Il s'agissait probablement du rapport de cas de Clarke (1987). À ce jour, la transmission du HIV lors de la transplantation d'autres types d'allogreffes n'a pas été rapportée dans la littérature (Patijn et al., 1993). 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 (Eastlund, 2004; Patijn et al., 1993). Eastlund a signalé plusieurs rapports où des cornées infectées par le HIV ont été transplantées sans infecter le receveur (CDC, 1988; Eastlund, 2004; Pereira et al., 1993; Simonds et al., 1992).

Des rapports de cas de transmission du HIV lors de la transplantation de **moelle osseuse** n'ont pas encore été documentés. Toutefois, les cellules progénitrices de la moelle osseuse peuvent être infectées *in vitro* par le HIV. Par conséquent, les cellules de la moelle osseuse d'un patient positif pour le HIV pourraient transmettre le virus (Patijn et al., 1993).

La transmission du HIV par les allogreffes peut avoir lieu de deux manières. Les virions libres sont la première de ces manières. Les virions sont infectieux mais fragiles et sensibles à la plupart des techniques de stérilisation, principalement aux détergents en raison de leur enveloppe lipidique. Le deuxième mode de transmission concerne la transmission des cellules hôtes infectées qui présentent un ADN proviral latent. Ce type de transmission est moins sensible à la stérilisation (Janssens de Varebeke et al., 1998).

5.5. HTLV

Sanzen et al. ont publié un cas de transmission du HTLV-1 après la transplantation d'une allogreffe de **tête fémorale** non traitée congelée. L'infection d'origine provenait d'un donneur de sang séropositif pour le HTLV-1. Un seul des 16 receveurs a subi une séroconversion. Quatre ans plus tard (1991), ce receveur a donné sa tête fémorale lors de la pose d'une prothèse de hanche totale. La tête fémorale a été conservée dans la banque osseuse, à une température de -80°C. Un homme de 76 ans a reçu cette tête fémorale à la suite du détachement de sa prothèse de hanche. Il n'a développé aucun signe de maladie associée au HTLV-1 mais ses tests sanguins étaient positifs pour les Ac anti-HTLV-1 (Sanzen & Carlsson, 1997).

Le HTLV est une contre-indication en raison du risque de transmission de l'infection et du développement consécutif d'une leucémie à lymphocytes T de l'adulte ou d'une myélopathie. Le virus peut aussi être transmis lors d'une transfusion de sang provenant de donneurs positifs pour le HTLV-1 (Sanzen & Carlsson, 1997).

5.6. RAGE

La rage est une encéphalomyélite virale aiguë, mortelle dans pratiquement 100 % des cas (Bronnert et al., 2007). Au Texas, 5 receveurs d'**organe** (foie, poumon, fragment de l'artère iliaque, rein gauche et rein droit) ont été diagnostiqués comme étant atteints de la rage. Le donneur commun souffrait d'une détérioration mentale grave et d'une fièvre modérée provoquée par une hémorragie sous-arachnoïdienne ayant entraîné un engagement cérébral et la mort. Ce donneur présentait des preuves (Ac antirabiques) d'une infection par le virus de la rage (CDC, 2004a; CDC, 2004b; Eastlund, 2004). Auparavant, la transmission de la rage avait déjà été rapportée chez huit receveurs de **cornée** dans cinq pays : Thaïlande, Inde, Iran, États-Unis et France (CDC, 1999). On sait depuis longtemps que les yeux d'animaux et d'humains infectés peuvent contenir le virus de la rage. Houff et al. ont mentionné un rapport de cas de transmission de la rage lors d'une greffe de cornée chez une femme de 37 ans. Le virus de la rage n'a pas été retrouvé dans les yeux du donneur ni du receveur. La voie d'entrée possible du virus est le nerf optique ou la branche ophtalmique du nerf trijumeau. Comme le receveur éprouvait une douleur dans la zone de la transplantation, il est vraisemblable, selon les auteurs, que la cornée transplantée ait été la source de l'exposition (Houff et al., 1979). En Allemagne, une femme de 26 ans en état de mort cérébrale a donné ses organes et a ainsi contaminé 6 receveurs de cornées, foie, poumon, rein et pancréas. Trois receveurs sont décédés de la rage au cours des semaines suivantes (Bronnert, 2007).

5.7. CMV

Le CMV est très fréquent parmi la population. Le virus est une cause importante de morbidité et de mortalité chez les receveurs d'organe. Shelby et Shanley ont transplanté de la **peau** de souris contaminées par le CMV à des souris négatives pour le CMV. Trois semaines plus tard, le CMV a été isolé à partir de l'urine des souris receveuses. Sur 22 patients négatifs pour le CMV ayant reçu des allogreffes cutanées cadavériques, 5 étaient positifs pour le CMV (22,7 %) et présentaient des preuves de maladie virale (pneumonie à CMV, fièvre, hépatite, diarrhée). Ce pourcentage est similaire à celui de la transmission du CMV lors d'une transplantation d'organe (Eastlund, 2004; Kealy, 1997). Hormis cette étude limitée, aucune étude détaillée n'a été réalisée afin de déterminer si la transmission du CMV lors d'allogreffes cutanées pouvait être associée à

la maladie symptomatique dans une même mesure que lors des transplantations d'organes provenant de donneurs positifs pour le CMV (Eastlund, 2004).

Les patients brûlés peuvent également acquérir une infection par le CMV, mais celle-ci s'accompagne généralement de moins de complications que chez les receveurs d'organe. Ce fait peut être imputé à l'immunosuppression moins sévère chez les patients brûlés que celle induite par les médicaments destinés à prévenir le rejet d'organe (Eastlund, 2004).

Sur les 25 receveurs séronégatifs qui ont reçu une **cornée** d'un donneur séropositif, seuls deux ont subi une séroconversion (Eastlund, 2004).

5.8. VIRUS À ORGANOTROPISME

Il est possible que la transmission du virus *Herpes simplex* (HSV) associée à la cornée pose un problème; des cas isolés de transmission cliniquement pertinente ont été rapportés (Pruss et al., 2010). Le HSV a effectivement été retrouvé en grand nombre dans des cellules stromales cornéennes, mais un seul cas de transmission via une greffe de cornée a été rapporté. L'infection a touché la cornée du receveur cinq jours après l'implantation (Eastlund, 2004). Il faudra peut-être en tenir compte à l'avenir lors de la sélection des donneurs.

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 possible en cas de transmission par une allogreffe cardiovasculaire (Pruss et al., 2010). Des virus spécifiques ont été détectés chez 47 % des receveurs d'une greffe cardiaque et chez 60 % des donneurs, ce qui suggère un risque significatif de transmission du virus en cas de transplantation d'un cœur ou de valves cardiaques (Donoso et al., 2005). Le parvovirus B19 a été transmis à quelques receveurs de dérivés plasmatiques, d'érythrocytes, de plaquettes et de plasma traités par solvant-détergent (Eastlund, 2004).

5.9. INFECTIONS EMERGENTES

Ces dernières années, le WNV apparaît le plus souvent sous la forme d'épidémies en Europe. Il a été transmis lors de transplantations d'organes, lors de transfusions de sang, par voie transplacentaire et par voie percutanée lors de piqûres d'aiguille accidentelles (Eastlund, 2004; CDC, 2005).

6. PREVENTION DES INFECTIONS VIRALES

6.1. CRITERES DE SELECTION LORS DU PRÉLÈVEMENT

Lors de la sélection d'un donneur de cellules/tissus potentiel, il convient d'étudier dans son dossier médical les critères d'exclusion généraux du don de cellules/tissus, 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. Les critères relatifs aux donneurs de gamètes ne sont pas pris en considération ici. Ces critères généraux d'exclusion s'appliquent aux donneurs vivants allogènes qu'aux donneurs décédés. Des critères d'exclusion spécifiques peuvent être établis pour ces donneurs, notamment la grossesse (à l'exception des donneurs de sang de cordon, de cellules hématopoïétiques ou de membrane amniotique), l'allaitement et le risque de transmission d'affections héréditaires (AR, 2009).

6.1.1. Dossier médical

Les données pertinentes sont notamment les suivantes :

- Résultats de laboratoire;
- Conclusions d'examens radiologiques.

Antécédents médicaux :

- Comptes rendus de consultations, d'opérations;
- Rapport d'autopsie.

6.1.2. Critères d'exclusion généraux pour les donneurs vivants et décédés

Les critères généraux relatifs à l'exclusion de la transmission possible d'infections virales sont énumérés ci-dessous (AR, 2009).

- Cause du décès inconnue, sauf si l'autopsie révèle la cause du décès et qu'aucun des critères généraux d'exclusion exposés dans la présente section ne s'applique.
- Maladie d'origine inconnue dans l'anamnèse.
- Les infections systémiques qui ne sont pas maîtrisées au moment du décès, notamment les maladies bactériennes, les infections virales, fongiques ou parasitaires généralisées et les infections locales des tissus et des cellules à donner. Les donneurs atteints d'une septicémie peuvent être pris en considération pour un don de cornée si la cornée est préservée par organoculture afin de détecter toute contamination bactérienne éventuelle de la cornée.
- Antécédents, indications cliniques ou indications de laboratoire d'un risque de transmission du HIV, de l'hépatite B chronique ou aiguë (sauf chez les personnes dont l'état immunitaire est avéré), de l'hépatite C ou du HTLV-1/2 ou des indications de facteurs de risque de ces infections.
- Indications selon lesquelles les résultats des examens effectués sur les échantillons de sang des donneurs seront invalidés en raison de l'apparition d'une hémodilution, si aucun échantillon de sang prélevé avant transfusion n'est disponible ou en raison d'un traitement par immunosuppresseurs.
- Indications d'autres facteurs de risque de maladies transmissibles sur la base d'une évaluation des risques, compte tenu des voyages effectués par le donneur et de son exposition au risque ainsi que de la prévalence locale des maladies infectieuses.
- Présence sur le corps du donneur de signes indiquant un risque de maladie transmissible.
- Vaccination récente au moyen d'un virus atténué vivant lorsqu'un risque de transmission est jugé existant.
- Transplantation d'une xénogreffe.
- Présence ou suspicion d'une maladie neurologique dégénérative du système nerveux central, éventuellement d'origine infectieuse (origine inconnue), y compris la démence (maladie d'Alzheimer ou sclérose en plaque, par exemple).

Pour les critères d'exclusion supplémentaires lorsque les donneurs sont des enfants décédés, nous renvoyons à AR du 28/09/2009.

6.1.3. Facteurs de risque à dépister chez les donneurs vivants/décédés

La FDA et l'AATB spécifient les facteurs de risque pertinents liés aux infections (Tableau 6, FDA, 2007a; AATB, 2008). Ils sont cités dans le tableau 6. La directive européenne décrit cela plutôt de façon générale dans les annexes I et III comme c'est décrit au point 6.1.2. du présent avis (EU, 2006).

	Facteur de risque pour :		
	HIV	HBV	HCV
1. Hommes ayant eu des relations sexuelles avec d'autres hommes au cours des 5 dernières années	x	x	
2. Personnes ayant pris de la drogue par injection intraveineuse, intramusculaire ou sous-cutanée au cours des 5 dernières années	x	x	x
3. Personnes atteintes d'hémophilie ou d'autres troubles liés de la coagulation sanguine, auxquelles des concentrés de facteurs de coagulation humains ont été administrés au cours des 5 dernières années	x	x	x
4. Personnes ayant eu des relations sexuelles en échange d'argent ou de drogue au cours des 5 dernières années	x	x	x
5. Personnes ayant eu des relations sexuelles, au cours des 12 derniers mois, avec une personne décrite aux 4 points précédents ou avec une personne dont on sait qu'elle est atteinte d'une infection par le HIV, d'une infection par le virus de l'hépatite B ou d'une infection cliniquement active par le virus de l'hépatite C	x	x	x
6. Les enfants de mères atteintes ou exposées à un risque d'infection par le HIV, âgés de 18 mois au maximum, ou ayant été allaités au cours des 12 derniers mois	x		
7. Les personnes internées ou les personnes ayant été incarcérées durant plus de 72 heures au cours de 12 derniers mois	x	x	x
8. Les personnes ayant été exposées, au cours des 12 derniers mois, à du sang dont on sait ou soupçonne qu'il était contaminé par le HIV, le HBV et/ou le HCV, par inoculation percutanée (piqûre d'aiguille accidentelle, par ex.) ou par contact avec une plaie ouverte, une peau non intacte ou une muqueuse	x	x	x
9. Les personnes ayant cohabité, au cours des 12 mois précédant le don, avec une personne atteinte d'hépatite B ou d'hépatite C cliniquement active (même ménage, utilisation d'une cuisine ou salle de bains commune, par exemple)		x	x
10. Personnes s'étant fait tatouer, percer les oreilles ou percer une autre partie du corps à l'aide d'instruments non stériles, au cours des 12 mois précédant le don			x
11. Personnes chez qui une hépatite virale symptomatique clinique a été diagnostiquée dans le passé, après l'âge de 11 ans, sauf s'il existe des preuves qu'il s'agissait d'une infection par le virus de l'hépatite A, l'EBV ou le CMV		x	x
12. Personnes ou leurs partenaires sexuel(le)s nés ou ayant vécu dans certains pays d'Afrique après 1977			
13. Y compris les personnes qui ont subi une transfusion sanguine ou un traitement médical impliquant du sang dans ces pays après 1977			
*Remarque: si l'établissement utilise un test qui détecte le HIV-O, les points 12) et 13) peuvent être omis	x (HIV groupe O)		
14. Les personnes présentant un diagnostic médical d'infection par le WNV (sur la base des symptômes et/ou des résultats de laboratoire et ou d'une virémie confirmée du WNV) sont exclues pendant 120 jours à compter du diagnostic ou du début des symptômes de la maladie; ce qui suit est recommandé.			

6.1.4. Preuves cliniques d'infections virales

Un donneur décédé (froid) ou un donneur multi-organes est examiné afin de relever les signes physiques d'affections transmissibles pertinentes et les signes de facteurs de risque de telles maladies. Dans la mesure du possible, un donneur décédé sera autopsié.

Les donneurs vivants allogènes sont sélectionnés sur la base de leur santé et de l'anamnèse médicale pratiquée au moyen d'un questionnaire et d'un entretien avec un professionnel de la santé compétent, ayant suivi une formation à cet effet (AR, 2009).

La section suivante énumère les points auxquels il convient d'être attentif d'un point de vue **clinique** lors du dépistage spécifique des maladies infectieuses virales transmissibles, notamment le HIV, l'hépatite, le WNV et le HTLV (FDA, 2007a; AATB, 2008) :

6.1.4.1. Infection par le HIV

- Test de dépistage réactif préalable pour le HIV;
- Perte de poids inexplicquée;
- Sueurs nocturnes inexplicquées;
- Colorations bleu-violet sur ou sous la peau ou les muqueuses, typiques du sarcome de Kaposi;
- Lymphadénopathies généralisées pendant plus de 1 mois;
- Température supérieure à 38,6°C sans raison explicable pendant plus de 10 jours;
- Toux ou essoufflement persistant inexplicqué;
- Infections opportunistes;
- Diarrhée persistante inexplicquée et/ou
- Taches blanches ou taches inhabituelles persistantes inexplicquées dans la bouche.

6.1.4.2. Infection à virus de l'hépatite

- Test de dépistage réactif préalable pour le virus de l'hépatite B ou C;
- Ictère inexplicqué;
- Hépatomégalie inexplicquée et/ou
- Diagnostic antérieur d'hépatite virale symptomatique clinique après l'âge de 11 ans, sauf s'il existe des preuves qu'il s'agissait d'une infection par le virus de l'hépatite A, l'EBV ou le CMV.

6.1.4.3. Infection par le HTLV (d'application selon le type de donneur)

- Test de dépistage réactif antérieur pour le HTLV;
- Paraparésie inexplicquée et/ou
- Leucémie à lymphocytes T de l'adulte.

6.1.4.4. Infection par le WNV

Les signes et symptômes de l'infection par le WNV peuvent être aspécifiques et doivent être envisagés conjointement avec d'autres informations :

- Les symptômes légers peuvent être les suivants :
 - Fièvre, céphalée, douleurs corporelles, douleur oculaire;
 - Les symptômes légers peuvent s'accompagner d'un rash sur le corps ou d'une hypertrophie des ganglions lymphatiques.
- Les symptômes graves de la maladie peuvent être les suivants :
 - Encéphalite, méningite, méningo-encéphalite et paralysie flasque aiguë;
 - Céphalée, fièvre élevée, raideur de la nuque, stupeur, désorientation, coma, tremblements, convulsions et faiblesse musculaire ou paralysie.

6.1.5. Preuves physiques d'infections virales

Les signes physiques repris au tableau 7 sont des exemples de preuves permettant d'exclure un donneur (Tableau 7 ; FDA, 2007a; AATB, 2008). Certains signes ne sont pas une preuve physique d'infection en soi mais indiquent un comportement à haut risque pour ces infections.

Tableau 7 : Signes physiques pouvant indiquer une infection virale chez un donneur	Facteur de risque pour :		
	HIV	HBV	HCV
1. Preuve physique d'un risque de maladie sexuellement transmissible telle que maladie génitale ulcéreuse, HSV, syphilis, chancre	x	x	
2. Pour un donneur masculin, preuve physique de rapports sexuels anaux, y compris condylomes péri-anaux	x	x	
3. Preuve physique de consommation de drogue par voie percutanée dans un but non médical, par exemple traces d'injection, examiner aussi les tatouages car ils peuvent masquer des traces de piqûre	x	x	x
4. Preuve physique d'un tatouage, d'un perçage d'oreille ou d'un piercing récent. Les tatouages et les piercings réalisés au cours des 12 mois précédents à l'aide de procédures/instruments non stériles sont à risque.	x	x	x
5. Lymphadénopathie généralisée	x		
6. Candidose orale inexplicquée	x		
7. Colorations bleu-violet concordantes avec un sarcome de Kaposi	x		
8. Ictère inexplicqué, hépatomégalie		x	x

6.2. TESTS SEROLOGIQUES

6.2.1. Exigences générales pour le dosage des marqueurs biologiques (UE, 2006; AR, 2009)

- Les tests sont réalisés par un laboratoire qualifié (agrée) habilité par les autorités compétentes et qui utilise des kits de tests portant la marque CE. Le test doit être validé en vue de l'objectif visé, conformément à l'état actuel de la science.
- Les tests biologiques sont réalisés sur le sérum ou le plasma du donneur, pas sur d'autres liquides/sécrétions (humeur aqueuse ou corps vitré, par exemple), sauf s'il existe une justification clinique et si le test a été validé pour ce liquide.
- En cas d'hémodilution possible à la suite de l'administration de colloïdes, de cristalloïdes, de (dérivés du) sang, un algorithme est utilisé afin de déterminer si les tests sont valides. Si le test a été validé pour le plasma dilué à plus de 50 % ou si du sang antérieur à la transfusion est disponible, le tissu/les cellules peuvent être admis.
- Les échantillons de sang doivent être prélevés dans un délai de 24 heures *post mortem* ou de 48 heures au maximum avant le décès (AR, 2009).
- Chez les donneurs vivants, les échantillons de sang sont prélevés au moment du don ou dans un délai de 7 jours après le don. Si des tissus/cellules de donneurs vivants allogènes peuvent être conservés, de nouveaux échantillons seront prélevés après 180 jours afin de répéter les tests (l'échantillon du don peut être prélevé de 30 jours avant à 7 jours après le don).
- Si des tests NAT sont également réalisés pour le HIV, le HBV et le HCB chez un donneur vivant (à l'exception des donneurs de cellules souches de moelle osseuse et de sang périphérique), l'analyse d'un second échantillon peut être omise. Il en va de même si une étape d'inactivation des virus concernés est exécutée.
- Lors du prélèvement de cellules souches de la moelle osseuse et de sang périphérique, les échantillons de sang destinés aux tests peuvent être prélevés au cours des 30 jours précédant le don.
- Chez les donneurs néonataux, les tests biologiques sont réalisés chez la mère du donneur.

6.2.2. Tests de dépistage virologique pour les donneurs de cellules et de tissus vivants et décédés (à l'exception des donneurs de gamètes)

- **HIV-1 et 2** : *Ac anti-HIV-1 et anti-HIV-2*: un test positif est une raison d'exclusion (AR, 2009).
- **Hépatite B** :
 - *Ag de surface de l'hépatite B* : un test positif est associé au plus grand risque de transmission du HBV et est une raison d'exclusion du donneur (Chung et al. 2001).
 - *Ac anti-HBc* : si les Ag de surface de l'hépatite B sont négatifs et si les Ac anti-HBs sont positifs, il est préférable de doser les Ac anti-HBs. Si ce dernier test est également positif (≥ 10 IU/l signifie l'immunité), nous pouvons partir du principe que le donneur est rétabli d'une infection antérieure et que le tissu peut donc être utilisé. En revanche, si le test de détection des Ac anti-HBs est négatif ou laisse planer le doute, des tests complémentaires doivent être réalisés (PCR, par exemple) ou le donneur doit être rejeté (UE, 2006). L'AR du 28 septembre 2009 stipule que si le test des Ac anti-HBc et anti-HBs est positif et que le test NAT pour le HBV et le test des HBsAg sont négatifs, il n'existe pas de contre-indication à la validation du tissu (AR, 2009).
Bien que la présence d'Ac anti-HBs soit traditionnellement considérée comme une immunité et une absence d'infectivité, il a été démontré que l'immunité (Ac anti-HBs) ne fait pas disparaître le risque de transmission du HBV. Ce risque est plus grand chez les donneurs de foie que chez les receveurs de cœur ou de rein (Chung et al., 2001).
- **Hépatite C** : *Ac anti-HCV* : un test positif est une raison d'exclusion.
- Dans certains cas, d'autres tests peuvent être nécessaires, selon l'anamnèse du donneur et les caractéristiques des tissus/cellules donnés (**EBV, CMV...**) (AR, 2009).
- Chez les donneurs décédés, au moins les tests précités seront réalisés ainsi qu'un test NAT pour le HIV-1, le HBV et le HCV, sauf si une étape d'inactivation de ces virus a été utilisée (AR, 2009).
Une deuxième sérologie (anti-HIV-1/2 et anti-HCV) peut également être pratiquée chez les receveurs d'organe à partir de 3 mois après la transplantation (*back-screening*). Cette mesure peut ajouter un degré de sécurisation.
- **HTLV types 1 et 2** :
 - L'Union européenne et l'AR du 28 septembre 2009 prescrivent que des tests de dépistage des Ac anti-HTLV-1 soient réalisés chez les donneurs vivant dans une zone où l'incidence de cette infection est élevée ou provenant d'une telle zone ou dont les partenaires sexuels ou les parents proviennent d'une telle zone (AR, 2009).
- **CMV** : un test des Ac anti-CMV positif n'est pas une raison de rejet des tissus de donneurs décédés. Les tests de dépistage du CMV sont pertinents pour les tissus et cellules vivants riches en leucocytes (FDA, 2007a) : cellules souches hématopoïétiques et sperme, mais pas pour la cornée, la peau, les valves cardiaques, la dure-mère, les os, les tendons, les ligaments, le cartilage et les ovocytes.

7. DESINFECTION – STERILISATION

7.1. INTRODUCTION

En 2003 (une époque de réalisation routinière de tests sérologiques sur le sérum de donneurs) est paru un rapport de cas relatant la transmission du HCV par le biais d'une allogreffe osseuse. Cette allogreffe avait été traitée au moyen d'une solution antibiotique, d'alcool et de détergent, puis congelée (Trotter, 2003). Ce rapport de cas nous incite à nous demander si les méthodes de décontamination et de stérilisation disponibles et appliquées aux tissus allogéniques éliminent efficacement les virus.

Nous nous proposons d'abord de décrire l'importance du nettoyage mécanique du matériel de l'allogreffe, à l'aide d'un autre rapport de cas. Ensuite, nous aborderons les différentes procédures de décontamination et de stérilisation, plus spécifiquement celles concernant l'impact antiviral sur les tissus allogéniques. Les avantages et inconvénients de chacune de ces méthodes ont été décrits dans la mesure où il existait de la littérature à ce sujet. Nous terminerons en évoquant les techniques de préservation courantes et leurs propriétés antivirales potentielles.

Soulignons que l'analyse des procédures de décontamination et stérilisation des allogreffes n'est pas évidente à réaliser. De nombreuses études associent plusieurs méthodes, de sorte que les effets de l'une ou l'autre technique de décontamination/stérilisation ne peuvent pas être réellement déterminés. En outre, chaque étude comporte de nombreuses variables (concentration, température et durée d'action d'un agent de décontamination/stérilisation, technique de culture utilisée, etc.) qui compliquent la comparaison des études entre elles.

7.2. DESCRIPTION DES CONCEPTS

- **Décontamination**

Définition de l'*Occupational Safety and Health Administration* (OSHA) : utilisation d'agents physiques ou chimiques afin d'éliminer, inactiver ou détruire sur une surface ou un dispositif les agents pathogènes transmissibles par le sang, jusqu'à un point où ils ne peuvent plus transmettre de particules infectieuses et où la surface ou le dispositif peut être manipulé, utilisé ou éliminé en toute sécurité (Block, 2001a). Dans la pratique courante, la décontamination fait référence à tous les agents pathogènes (micro-organismes susceptibles de provoquer une maladie ou une infection) et pas uniquement à ceux transmis par le sang (Block, 2001a).

- **Désinfection**

La destruction des agents pathogènes et des autres micro-organismes au moyen de méthodes chimiques ou thermiques. La désinfection est moins mortelle que la stérilisation car elle détruit la plupart des micro-organismes pathogènes, mais pas nécessairement toutes les formes microbiennes, par exemple les spores (Block, 2001a). La désinfection permet d'éviter la transmission des agents pathogènes et d'autres micro-organismes.

- **Stérilisation**

Processus dont le but est de détruire ou d'éliminer toutes les formes viables de vie microbienne, y compris les spores bactériennes, afin d'atteindre un niveau d'assurance de stérilité (SAL, *sterility assurance level*) acceptable. Le SAL est la probabilité de survie de micro-organismes après une stérilisation terminale et une prévision de l'efficacité du processus (Block, 2001a).

- **Asepsie**

L'asepsie est la prévention de la contamination par des micro-organismes. Elle recouvre les conditions stériles des tissus, de la surface des matériaux et des locaux obtenus par l'exclusion, l'élimination ou l'extermination des micro-organismes (Block, 2001a).

- **Traitement aseptique**

Lors du traitement aseptique, les tissus sont prélevés au moyen d'une technique aseptique, puis traités dans une salle blanche (conditions stériles) (Vehmeijer, 2002).

- **Stérilisation terminale**

La stérilisation terminale utilise des techniques telles que l'irradiation ou l'oxyde d'éthylène afin d'obtenir la stérilité des tissus à une étape de stérilisation terminale. Par conséquent, l'acquisition et le traitement des tissus peuvent avoir lieu dans des conditions moins strictes. Lors de la stérilisation, le tissu se trouve dans son emballage final (Vehmeijer, 2002).

7.3. NETTOYAGE MECANIQUE

7.3.1. Contexte

Le traitement du tissu osseux commence généralement par l'élimination des résidus de tissus mous, de périoste, de sang et de moelle osseuse. Cette action réduit déjà le risque de transmission d'agents pathogènes potentiels, comme Simonds l'a démontré : les 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 (Simonds et al., 1992). Ces données soulignent l'importance du traitement, même minimal, des os. Après débridement du tissu excédentaire, les greffons sont découpés/sciés, puis lavés et plongés dans de l'eau stérile et des détergents. Le risque de transmission de maladies infectieuses est ainsi réduit (Vehmeijer, 2002).

7.3.2. Application aux allogreffes

7.3.2.1. Os

Les méthodes de traitement peuvent notamment inclure le rinçage sous haute pression à l'eau stérile, le rinçage à l'alcool et des traitements éliminant les protéines. Toutefois, cette méthode n'implique pas une stérilisation terminale (Brockbank & Siler, 2001). Des études portant sur des os fracturés vivants ont fait état d'inconvénients du nettoyage pulsé sous haute pression. Des dommages visuels à hauteur du côté de la fracture ainsi qu'un retard de la cicatrisation de la fracture ont été observés. Le lavage pulsé effectué à une basse pression (Micro-Aire Pulse Lavage 4740) de 7 bars (6 psi) permet d'éviter ces effets négatifs sur la biologie de l'os (Bhandari et al., 2001).

La formule Allowash™ (Lifenet, Virginia Beach, États-Unis) utilise des ultrasons, une centrifugation et une pression négative en association avec des réactifs tels que des détergents biologiques, des alcools et du peroxyde d'hydrogène. Cette combinaison a pour but d'augmenter la solubilité et l'élimination des composants des tissus traités. En effet, ces composants (moelle osseuse, éléments sanguins et lipides) peuvent constituer des réservoirs de transmission bactérienne, fongique et virale potentielle (Vangsbess, 2004).

7.3.2.2. Tendons

Les tendons patellaires ne résistent pas à la puissance destructrice du lavage sous haute pression. Par conséquent, les tissus mous doivent être irradiés (rayons gamma) (Brockbank & Siler, 2001).

7.4. TRAITEMENT

7.4.1. Demineralized Bone Matrix (DBM)

7.4.1.1. Activité biocide

Swenson et Arnoczky ont utilisé de l'os cortical de chats contaminés par le virus de la leucémie féline afin de tester l'activité antivirale de la déminéralisation par rapport à l'os non traité. Les fragments d'os cortical minéralisé contaminé ont été implantés chez 6 chats receveurs. Une diaphyse minéralisée contaminée a été implantée chez 6 chats receveurs et une DBM contaminée a été implantée chez 15 chats receveurs. L'Ag p27, l'ADN proviral et la formation d'Ac ont été surveillés chez ces chats. Les 6 chats ayant reçu l'os déminéralisé étaient positifs pour l'Ag p27, présentaient de l'ADN détectable (≥ 23 copies/100 ng ADN) et avaient développé des Ac au cours de la deuxième semaine suivant l'opération. Les chats ayant reçu la DBM n'ont pas présenté d'Ag p27, d'ADN viral ni d'Ac jusque et y compris la huitième semaine du test. Le processus de déminéralisation détruirait donc le virus de la leucémie féline (Swenson & Arnoczky, 2003).

Mellonig et al. ont testé l'effet antiviral de la déminéralisation dans 0,6 N HCl (Acide chloridique) avec 0,025 % d'agent virucide (éthanol combiné à un détergent anionique). D'une part, de l'os cortical humain a étéensemencé de $5,26 \times 10^9$ particules de HIV. D'autre part, l'os d'un patient décédé du SIDA a été utilisé. Les deux matériaux étaient exempts de HIV à l'issue du traitement (Sofer, 2002). Scarborough et al. ont également évalué l'efficacité de la déminéralisation lors d'études portant sur l'ensemencement par le HIV, le CMV, le poliovirus, le virus de la diarrhée bovine et le HBV du canard. Une réduction de plus de $6 \log_{10}$ de l'infectivité a été observée pour tous les virus. Le poliovirus dans 100-500 μm de poudre d'os a subi une réduction de $12 \log_{10}$ (Sofer, 2002).

7.5. TRAITEMENT CHIMIQUE

Tableau 8 : Aperçu du spectre d'action des agents désinfectants (Reybrouck, 2000; WIP, 2004).

Désinfectant	Concentration utilisée	1	2	3	4a	4b	5	6	Réduction de l'activité avec du matériel organique
Peroxydes									
Peroxyde d'hydrogène	3 %	+	+/- (à 10-25%)	+	+	+	+	+	Non
Acide peracétique	0,01 – 0,2 %	+	+	+	+	+	+	+	Non
Chlorhexidine	0,1 – 1 %	+ (G+>G-)	-	-	-	-	limité	limité	Données variables
Hypochlorite	250 – 1.000 ppm chlore libre	+	+/-	+/- *	+*	+*	+/-	+	Oui
Aldéhydes									
Formaldéhyde	État gazeux	+	+/-	+/- ***	+	+	+	+	Oui
Glutaraldéhyde	2 %	+	+	+/- **	+	+	+	+	Non
Éthanol	60 – 90 %	+	-	+	+	+	+	+	Pas de données
Composés de l'iode									
Alcool iodé	1 % dans éthanol 70 %	+	+/-	+	+	+	+	+	Oui

Iodophores (povidone iodée)	0,1 – 10 %	+	-	+/-	+	+	+/-	+	Oui
Dérivés de l'ammonium quaternaire	Selon la préparation	Uniquement sur G+	-	-	+/-	-	+/-	+	Oui
+ = actif				1 = bactéries végétatives					
+/- = action lente ou spectre incomplet				2 = spores bactériennes					
G+ : micro-organismes à Gram positif				3 = <i>Mycobacterium</i> spp.					
G- : micro-organismes à Gram négatif				4a = virus lipophiles					
* = 1.000 ppm ; +				4b = virus hydrophiles					
** = à 50°C ; +				5 = moisissures					
>*** = surtout mycobactéries non tuberculeuses				6 = levures					

7.5.1. Peroxydes

7.5.1.1. Peroxyde d'hydrogène

7.5.1.1.1. Activité biocide

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est actif sur les bactéries, les champignons, les virus et les spores. La solution à 3 % possède une action bactéricide rapide. Elle agit moins rapidement sur certaines levures, certains virus et les spores bactériennes. La solution de H₂O₂ à 6 % s'est avérée être un agent de stérilisation efficace en 6 heures, selon Rutala et al. (1993). Le H₂O₂ est un sporicide efficace à une température et une concentration (6-10 %) plus élevées (Block, 2001b). La solution de H₂O₂ à 6 % s'est révélée plus efficace que le glutaraldéhyde en tant que désinfectant de haut niveau d'endoscopes souples afin de tuer ou d'éliminer *B. subtilis* en 10 minutes de temps de contact (Block, 2001b). En général, le H₂O₂ possède une plus grande activité contre les bactéries à Gram négatif que contre les bactéries à Gram Positif (Block, 2001b). Il n'est pas actif, par exemple, sur les bactéries produisant une catalase telles que les staphylocoques (Reybrouck et al., 2000). En raison de son activité efficace sur les bactéries sporulantes anaérobies (*Clostridium* sp., par exemple), il est surtout utilisé lors du nettoyage et de la désinfection de plaies souillées où du sang coagulé doit être dissous.

Le H₂O₂ est fourni sous forme d'eau oxygénée. L'eau oxygénée contient 3 % de H₂O₂ ou libère 10 % en volume (Reybrouck et al., 2000a).

7.5.1.1.2. Applications médicales

Le H₂O₂ est surtout utilisé lors de la stérilisation par plasma (cf.7.7.3), parfois lors de la stérilisation chimique au gaz (cf. 7.6.4) (WIP, 2004).

7.5.1.1.3. Toxicité

Le H₂O₂ est entièrement transformé en résidus non toxiques : O₂ et H₂O (Block, 2001b).

Le H₂O₂ n'est pas carcinogène, pas mutagène et pas nuisible pour l'environnement (résidus dégradables non toxiques) (Joslyn, 2001). Les solutions concentrées sont irritantes pour la peau, les muqueuses et les yeux. Les gaz peuvent provoquer une inflammation du tractus respiratoire (Block, 2001b). Le H₂O₂ est génotoxique s'il n'est pas métabolisé (Malchesky, 2001).

7.5.1.1.4. Application aux allogreffes

7.5.1.1.4.1. Os

DePaula *et al.* (2005) ont voulu tester les effets d'une solution de H₂O₂ à 3 % (H₂O₂, détergent anionique et alcool) sur les propriétés ostéo-inductrices et mécaniques de l'os à une température de 34 ± 1°C. La puissance oxydante du H₂O₂ pourrait porter atteinte aux protéines osseuses structurales (BMP). Ils ont opté pour des tests de résistance à la compression, à l'impact et au frottement. Aucun effet mesurable à la contrainte maximale en compression, à l'impact et à la contrainte de frottement n'a été observé lors du traitement des os par une étape supplémentaire

au moyen de H₂O₂ à 3 %, par rapport au traitement de contrôle (Tween 80 à 1 % pendant 30 minutes, rinçage à l'eau, trempage dans l'éthanol, rinçage à l'eau). Après un traitement de 5 heures par H₂O₂, une diminution significative de l'ostéo-induction a été observée, comme le montre l'histologie chez les souris auxquelles les os traités ont été implantés. Aucune diminution significative n'a été observée lorsque le traitement par H₂O₂ n'était appliqué que pendant 1 heure (DePaula et al., 2005). Par rapport à ce que Rutala et al. avaient déjà rapporté comme ayant une action stérilisante, à savoir une solution de H₂O₂ à 6 % pendant 6 heures, la concentration et la durée ont été réduites dans cette expérience. Toutefois, DePaula et al. n'ont pas évalué l'effet antiviral de leur solution de H₂O₂.

7.5.1.1.4.2. Cornée

Une solution de H₂O₂ à 3 % est toxique pour l'œil et ne peut donc pas être utilisée comme désinfectant pour la cornée (Ahaern & Gabriel, 2001).

7.5.1.2. Acide peracétique (APA)

7.5.1.2.1. Activité biocide

À température ambiante, l'APA inhibe les bactéries à Gram positif, les bactéries à Gram négatif, les moisissures et les levures en moins de 5 minutes, à une concentration de 100 ppm (0,01 %, selon Block, %). Pour une concentration plus élevée de 0,05 % d'acide peracétique, une réduction de 4 log contre les spores de *B.subtilis* est obtenue après 30 min. Pour l'effet virucide, des concentrations plus élevées sont nécessaires: 0,1 % avec un temps de contact variables selon les études (Block SS, 2001b). L'acide peracétique à une concentration de 0,05 % est déjà bactéricide, fongicide, tuberculocide et même sporicide en une heure (Reybrouck et al., 2000). Des études de l'inactivation des prions ont donné des résultats variables (Malchesky, 2001). Toutefois, en général, les prions sont considérés comme résistants à l'APA. L'activité augmente à mesure que la concentration et la température augmentent. Une forte activité antivirale est notée (Malchesky, 2001; Huang et al., 2004). Selon le milieu de test utilisé, les virus sont inactivés en différents laps de temps (Block, 2001b). L'efficacité antivirale dépend également de la concentration, du pH et de la durée d'exposition (Huang et al., 2004). De nombreux auteurs ont utilisé une solution d'APA à 0,2 à 0,35 % et ont obtenu un effet antiviral en quelques minutes (Huang et al., 2004). Wutzler et Sauerbrei ont obtenu une réduction de 4 log pour tous les titres de virus testés (virus enveloppés et non enveloppés) lors de l'exposition à une solution d'APA à 0,2 % pendant une minute dans 80 % d'éthanol ou pendant 5 minutes dans de l'eau (Huang et al., 2004). Pour obtenir une réduction de 7,5 log du poliovirus de type 1, une solution d'APA à 0,04 % pendant 5 minutes suffit (Huang et al., 2004).

La plage de dosage est large pour les différents virus. Pour les phages, une concentration de 12 à 30 ppm d'APA pendant 5 minutes suffit, tandis que pour les virus entériques, une concentration de 2.000 ppm d'APA pendant 10 minutes est nécessaire. Selon Evans et al., une solution d'APA à 0,1 % est active sur les 8 virus animaux qu'ils ont testés (Block, 2001b). Harakeh a étudié l'effet antiviral de l'APA sur le poliovirus de type 1, l'échovirus de type 1, le virus Coxsackie B5, le rotavirus humain, le rotavirus simien SA11 et le bactériophage f₂. Les résultats ont montré que des concentrations relativement élevées d'APA étaient nécessaires pour obtenir une inactivation significative. Le rotavirus humain était le plus résistant et nécessitait 140 ppm pour obtenir une inactivation de 99,99 %. Néanmoins, cette concentration est beaucoup plus basse que les 2.000 ppm nécessaires pour inactiver les virus entériques, selon Sprossig (Block, 2001b). Le rotavirus simien SA11 était le plus sensible. Les trois entérovirus (poliovirus de type 1, échovirus et virus Coxsackie B5) ont réagi de la même manière, tandis que le bactériophage était moins résistant que les entérovirus.

Le matériel organique et les matières solides en suspension ont un effet négligeable sur l'activité virucide de l'APA (Harakeh, 1984). L'APA est actif en l'absence de matériel organique et possède une bonne hydrosolubilité. Il peut être utilisé sous une forme liquide ou gazeuse (Malchesky, 2001).

7.5.1.2.2. **Données chimiques**

L'APA est un peroxyde de formule structurale $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OOH}$. Dans l'eau (à un pH acide), il existe un équilibre entre l'acide acétique (CH_3CO), l' H_2O_2 et l'acide peracétique. Lors de la décomposition, de l'eau, de l'oxygène et du CO_2 sont formés. Les concentrations égales ou supérieures à 5 % sont corrosives et inflammables et se dégradent en libérant de l' O_2 . Les peroxydes sont thermodynamiquement instables, ce qui signifie que pour une solution d'APA à 0,2 % dans de l'eau distillée conservée à 20°C, la quantité d'APA tombe à 0,1 % après 4 semaines. Les solutions d'APA sont plus stables à un pH faible (Malchesky, 2001).

7.5.1.2.3. **Applications médicales**

L'APA est notamment utilisé comme agent de stérilisation pour les dialyseurs, les instruments médicaux et les os et tissus collagéniques destinés à être implantés ainsi que comme agent de décontamination pour les lentilles de contact et la peau et en remplacement des pansements de plaies (Malchesky, 2001).

7.5.1.2.4. **Toxicité**

L'APA est irritant et corrosif. Au contact de la peau, l'APA est irritant à des concentrations de 3,4 % ou plus. Au contact des yeux, une concentration d'au moins 0,35 % est irritante. Pour la plupart des applications, une concentration de moins de 0,35 % (3.500 ppm) est utilisée. Des études de la génotoxicité ont donné des résultats variables pour l'APA. Un produit de dégradation de l'APA, le H_2O_2 , est génotoxique s'il n'est pas métabolisé. La présence d'enzymes hépatiques permet la métabolisation du H_2O_2 en eau et oxygène. L'APA n'est pas classé comme un carcinogène et ne peut pas être considéré comme tel sur la base des données disponibles, lesquelles ne sont pas concluantes ni complètes (Malchesky, 2001). La seule étude sur le potentiel carcinogène de l'APA a été publiée par Bock en 1975 (Malchesky, 2001).

La peau de souris a été badigeonnée 5 fois par semaine avec :

- i) 0,2 ml de solution d'APA à 1 % dans de l'acétone,
- ii) une solution d'APA à 2 % dans de l'eau ou
- iii) de l'eau.

Trois des 30 souris traitées avec l'APA ont développé des tumeurs cutanées après 26 semaines. Le groupe APA (APA dans l'acétone ou l'eau) auquel appartenaient ces souris n'a pas été communiqué (Malchesky, 2001). Selon Malchesky, l'APA ne possède pas de composants résiduels toxiques (Malchesky, 2001).

7.5.1.2.5. **Application aux allogreffes**

7.5.1.2.5.1. *Peau*

Avantages

Comme désinfectant pour des allogreffes cutanées, Lomas a utilisé de l'APA à des concentrations de 0,35 %, 0,1 % et 0,035 % (v/v), appliqué sous agitation pendant 3 heures à température ambiante. Le pH de la solution d'APA a été adapté à l'aide de 1 N NaOH de manière à atteindre 7,0. Après 3 rinçages dans un tampon phosphate (PBS), la peau a été mise à incuber dans du glycérol à 50 % pendant 4 heures à 37°C, puis transférée dans du glycérol à 85 % et incubée dans les mêmes conditions pendant 4 heures. Une durée d'incubation d'au moins 90 minutes est nécessaire pour que l'APA pénètre dans les follicules pileux et dans les micro-organismes situés plus profondément dans la peau et protégés par les lipides cutanés. Une concentration de 0,35 % d'APA a provoqué des dommages histologiques significatifs aux greffes de tissus mous. Le protocole utilisant une solution d'APA à 0,1 % combinée à une conservation dans du glycérol à 85 % n'a pas présenté d'effets négatifs sur la biocompatibilité de la peau testée *in vivo*. L'épiderme est resté fixé au derme et aucune modification de la structure du derme papillaire ou réticulaire n'a été observée (Lomas *et al.*, 2003). Aucun des échantillons de peau traité n'a présenté de toxicité lors de cultures de fibroblastes cutanés humains; en d'autres termes, aucune zone d'inhibition de la prolifération des fibroblastes n'était visible autour de la biopsie cutanée. La sensibilité à la digestion de la collagénase des biopsies cutanées traitées à

l'APA n'était pas plus élevée. Il n'existait pas de différence significative en ce qui concerne la production de TNF- α (*Tumor Necrosis Factor*) monocytaire (activité pro-inflammatoire de la peau traitée) entre les monocytes des biopsies cutanées traitées et les monocytes des biopsies cutanées non traitées (Lomas et al., 2003).

Huang a également rapporté qu'un derme acellulaire stérilisé à l'APA conserve son intégrité structurale, avec une structure papillaire/réticulaire nette, une membrane basale continue avec collagène de type IV, une lamina densa, des fibrilles d'ancrage et une matrice dermique contenant du collagène, de l'élastine et des glycosaminoglycanes à l'architecture normale (Huang et al., 2004).

Inconvénients

Le derme acellulaire stérilisé à l'APA peut favoriser la prolifération des kératinocytes et des fibroblastes, en particulier s'il est conservé dans du glycérol ou du propylène glycol. Si les substrats dermiques étaient traités uniquement à l'APA et n'étaient pas conservés au moyen de glycérol ou de propylène glycol, la couche de kératine produite dans les composites serait généralement fine, voire inexistante. Une amélioration a été observée lorsque le derme traité à l'APA a été ensuite préservé au moyen de glycérol ou de propylène glycol (Huang et al., 2004).

7.5.1.2.5.2. Os

Avantages

Le traitement de l'os au moyen d'APA ne détruit pas la morphologie et la structure de l'os (Dychdala, 2001). Pruss a utilisé un modèle de blocs d'os spongieux pour évaluer l'effet inactivant de l'APA et de l'éthanol sur différents virus. Les virus testés étaient le virus de la pseudo-rage, le virus de la diarrhée bovine, le HIV de type II, le parvovirus porcin, le poliovirus et le virus de l'hépatite A (HAV) (Pruss et al., 1999). 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 \log_{10} de l'infectivité virale (*Median tissue culture infective dose: TCID₅₀*) pour le virus de la pseudo-rage, le virus de la diarrhée bovine, le parvovirus porcin et le poliovirus. Le HIV-2 s'est inactivé spontanément dans les blocs traités à l'APA mais aussi dans les blocs de contrôle. De ce fait, seule une réduction de 1,6 \log_{10} a été obtenue pour le HIV-2. Le HAV n'a pu être inactivé que par le dégraissage au moyen d'un mélange de chloroforme et méthanol (réduction de 7 \log_{10}), tandis qu'après un traitement à l'APA, une réduction de 2,9 \log_{10} seulement a été obtenue. En effet, la diffusion de l'APA dans l'os est limitée. Par conséquent, la barrière graisseuse inhibant la pénétration doit d'abord être éliminée au moyen d'un mélange de chloroforme et méthanol, par exemple. Soulignons que l'étude de Pruss n'a été validée que pour des blocs d'os $\leq 15 \text{ mm}^3$ et n'est donc pas nécessairement valable pour les grandes allogreffes structurales (Pruss et al., 1999).

7.5.1.2.5.3. Tendons

Avantages

Scheffler a étudié des allogreffes osseuses humaines os-rotule-os appariées traitées au moyen d'une solution de 2 % d'acide acétique, 96 % d'éthanol (stérilisation acide peracétique-éthanol : PES) et d'eau physiologique (v/v/v 2/1/1) ou congelées fraîches. Les propriétés visco-élastiques (contrainte, fluage) et mécaniques ont été étudiées, respectivement, au moyen d'une charge cyclique inférieure au maximum et de tests de charge jusqu'à l'échec. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes en ce qui concerne ces propriétés. Le fait que le fluage (*creep*) ou perte intrinsèque de tension n'ait pas varié indique que les éléments élastiques tels que les fibres de collagène et leurs tissus conjonctifs ne sont pas modifiés de manière substantielle par la PES (Scheffler et al., 2005).

Inconvénients

Les allogreffes de tendons humains traitées au moyen du protocole cutané à l'APA (Lomas et al., 2003) (0,1 % APA v/v pendant 3 heures à température ambiante sous agitation) sont beaucoup plus sensibles à la digestion de la collagénase que les biopsies cutanées. Une intervention

chirurgicale s'accompagne toujours d'une réponse inflammatoire durant laquelle des leucocytes activés produisent des collagénases qui peuvent éliminer la matrice tissulaire endommagée. Une allogreffe pourrait ainsi être dégradée et résorbée rapidement (Lomas et al., 2003).

7.5.1.2.5.4. Valves cardiaques

Avantages

Farrington a étudié différentes concentrations d'APA (0,1 % et 0,35 %) en ce qui concerne leur effet antiviral et les dommages causés aux valves cardiaques. Le HSV de type I (HSV-I) et le poliovirus de type I ont été testés. Tant la concentration de 0,1 % d'APA (utilisé avec 25 % d'éthanol pendant 15 minutes à 20°C) que celle de 0,35 % d'APA (10 minutes à 20°C) possédaient un effet antiviral de plus de 2 log₁₀ de réduction (Farrington et al., 2002).

Inconvénients

La morphologie des valves cardiaques traitées avec la concentration de 0,35 % d'APA a montré des dommages étendus au niveau des cellules endothéliales, notamment. La périodicité de la coloration des glycosaminoglycanes (GAG) le long des fibres de collagène a diminué. Les effets mécaniques du traitement par APA ont été étudiés. Le module d'élasticité, en tant que paramètre de la rigidité des tissus, a diminué avec le traitement au moyen de la concentration de 0,35 % d'APA. L'élasticité du tissu ou *crimp* du collagène a augmenté. Les temps de relaxation T1 et T2 ont diminué, T1 faisant référence à la mobilité des fibres principales dans le tissu environnant. Avec la concentration de 0,21 % d'APA, toutefois, tous ces paramètres sont restés inchangés par rapport au tissu de contrôle. Cependant, lorsque cette concentration plus faible de 0,21 % d'APA était combinée à une préservation dans du glycérol ou une cryoconservation comme méthode de conservation, le module d'élasticité et le temps de relaxation T2 présentaient des modifications. Néanmoins, comme l'élasticité est conservée avec la concentration de 0,21 % d'APA combinée à une préservation dans du glycérol ou une cryoconservation, la structure collagénique des valves ne serait pas atteinte de manière significative (Farrington et al., 2002). Cette concentration plus faible s'est avérée efficace comme désinfectant et a eu peu d'impact sur les propriétés biomécaniques ou morphologiques des valves traitées 6 mois après leur implantation chez des moutons (Lomas et al., 2003).

7.5.2. Chlorhexidine

7.5.2.1. Activité biocide

La chlorhexidine est active sur les bactéries végétatives à Gram positif et, dans une moindre mesure, à Gram négatif (WIP, 2004). Elle est inactive sur les spores, sauf à des températures élevées. Les bacilles acido-résistants sont inhibés mais pas tués par les solutions aqueuses. En général, les levures et les dermatophytes sont sensibles, bien qu'il existe des variations entre les espèces (Denton, 2001). L'infectivité de certains virus lipophiles (par exemple les virus enveloppés tels que le virus de la grippe, le HSV et le HIV) est inactivée rapidement par la chlorhexidine, bien que les solutions aqueuses 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 sur le HIV. Une solution de lavage des mains de chlorhexidine à 4 % et une solution de chlorhexidine à 0,5 % dans 70 % d'alcool ont toutes deux permis d'obtenir une efficacité de 100 % contre le HIV-1 après un temps de contact de 15 secondes (Denton, 2001).

7.5.2.2. Données chimiques

La chlorhexidine est un 1,6-di-(4-chlorphényl-diguanido)hexane, un bisbiguanide cationique. En général, les sels de chlorhexidine sont plus solubles dans l'alcool que dans l'eau. Le gluconate de chlorhexidine ne peut pas être ajouté directement à l'alcool pur car une précipitation risque de se produire. La chlorhexidine est compatible avec les cations tels que les dérivés de l'ammonium quaternaire (QCA) mais est incompatible avec les anions anorganiques. Les solutions aqueuses de chlorhexidine sont les plus stables à un pH de 5 à 8. Dans cette plage de pH, l'activité antibactérienne varie selon le micro-organisme et le tampon utilisé (Denton, 2001).

7.5.2.3. Applications médicales

- Désinfection cutanée;
- Désinfection chirurgicale des mains;
- Désinfection hygiénique des mains;
- Désinfection préopératoire du corps;
- Prévention des infections urinaires;
- Désinfection obstétricale de la région périnéale;
- Désinfection des brûlures au gluconate de chlorhexidine en solution aqueuse (0,01 % à 0,05 %) (Denton, 2001).

7.5.2.4. Toxicité

Les rapports d'effets indésirables de la chlorhexidine sont rares. Il n'existe pas de preuves de carcinogénéité.

Une concentration de 0,05 % de chlorhexidine n'a pas d'effet néfaste sur la cicatrisation des plaies ou le traitement des blessures. La cytotoxicité lors de la cicatrisation des plaies est contradictoire. Selon certains auteurs, la chlorhexidine favorise la cicatrisation des plaies, tandis que d'autres pensent qu'elle est cytotoxique pour les fibroblastes (Denton, 2001). Des solutions concentrées de 20 % de gluconate de chlorhexidine abîment la peau.

En cas de contact direct avec le sang (administration intraveineuse), il se produit un effet stromalytique sur les érythrocytes en raison de l'activité tensioactive de la chlorhexidine.

La chlorhexidine exerce la plus grande toxicité sur le tissu neural : le contact avec le cerveau et les méninges doit être évité. Des dommages vestibulaires et cochléaires ont été associés à l'utilisation d'une concentration de 0,05 % de chlorhexidine dans 70 % d'alcool. Des concentrations de 1 % de chlorhexidine provoquent une conjonctivite, tandis que des concentrations de 2 % de chlorhexidine sont cytotoxiques pour l'épithélium de la cornée et la conjonctive (Denton, 2001). Aucun effet toxique visuel n'a été rapporté avec des concentrations inférieures à 1 % (Denton, 2001). Les formulations avec des alcools doivent être tenues à l'écart des yeux.

Après l'exposition de cellules osseuses cultivées à des concentrations de 1 % et 4 % de gluconate de chlorhexidine, Bhandari et al. ont observé une diminution de l'activité de la phosphatase alcaline (et donc des ostéoblastes) ainsi qu'une réduction de la formation de nodules osseux. Cette constatation laisse supposer un effet toxique direct du gluconate de chlorhexidine sur les ostéoblastes (Bhandari et al., 2001).

7.5.2.5. Application aux allogreffes

7.5.2.5.1. Os/tendons

Inconvénients

Burd et al. ont étudié la concentration et le volume de gluconate de chlorhexidine nécessaire pour décontaminer des allogreffes tendon-os. Ils ont conclu que 3 litres d'une solution de gluconate de chlorhexidine à 2 % étaient nécessaires. Ils ont attiré l'attention sur les effets néfastes décrits en association avec le gluconate de chlorhexidine lors de la décontamination des tissus :

- 1) Toxicité accrue sur les granulocytes polymorphonucléaires et réduction de l'efficacité phagocytaire;
- 2) Synovite réactive intra-articulaire et chondrolyse;
- 3) Morbidité post-opératoire accrue.

Selon Wilson et al. également, une concentration de 0,05 % de diacétate de chlorhexidine a produit une ulcération synoviale, une inflammation et une accumulation intra-articulaire de fibrine chez des chevaux (Burd et al., 2000).

7.5.3. Dérivés du chlore

7.5.3.1. Dioxyde de chlore

7.5.3.1.1. *Activité biocide*

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 (Knapp & Battisti, 2001) et s'avère liée à la concentration de dioxyde de chlore. Lorsqu'une solution de dioxyde de chlore se décompose en chlorite et chlorate, l'activité antivirale diminue, ce qui confirme l'activité antivirale du radical libre dioxyde de chlore (Knapp & Battisti, 2001).

7.5.3.1.2. *Données chimiques*

Le dioxyde de chlore contient un atome de chlore et deux atomes d'oxygène et existe presque exclusivement sous la forme d'un radical libre monomère. À température ambiante, il prend la forme gazeuse. Le dioxyde de chlore est hydrosoluble. À l'état de gaz, le dioxyde de chlore est stable à des concentrations de 10 % ou moins à la pression atmosphérique (Knapp & Battisti, 2001).

7.5.3.1.3. *Applications (médicales)*

Le dioxyde de chlore est utilisé dans la désinfection de l'eau potable, des légumes et des fruits (Knapp & Battisti, 2001). Le traitement du sang et des produits sanguins est proposé afin de réduire l'infectivité du HIV dans le sang et le risque de transmission de maladies lors de la transplantation de la sclérotique et de la cornée (brevet américain) (Knapp & Battisti, 2001).

7.5.3.1.4. *Toxicité*

Lorsque le dioxyde de chlore est ingéré, il est métabolisé et excrété sous forme de chlorure et chlorite. Toutefois, en présence d'humidité et d'une exposition à la lumière, l'état gazeux du dioxyde de chlore peut donner lieu à la formation d'un mélange d'acides (Knapp & Battisti, 2001). La littérature sur la carcinogénicité du dioxyde de chlore est peu abondante. Selon les données disponibles, il n'est pas carcinogène (Knapp & Battisti, 2001).

7.5.3.1.5. *Application aux allogreffes*

7.5.3.1.5.1. *Valves cardiaques*

Dans l'étude de Farrington, du dioxyde de chlore (Dexit, Genesis Medical) a également été testé pendant 10 minutes sur des fragments de myocarde contaminés par le HSV de type I et le poliovirus de type I. Ce traitement a réduit le titre des deux virus d'environ 3 log₁₀. La microscopie électronique avec coloration au bleu de cuproline n'a montré que de légères modifications des cellules endothéliales des valves (Farrington et al., 2002). La périodicité de la coloration des GAG le long des fibres de collagène avait diminué (Farrington et al., 2002).

7.5.3.2. Hypochlorites

7.5.3.2.1. *Activité biocide*

L'hypochlorite de sodium et l'eau de Javel, principalement, sont utilisés comme hypochlorites. En Belgique, l'eau de Javel ménagère possède 8 à 10 degrés chlorométriques et contient environ 30 g (2,5 %) de chlore actif par litre. Afin que l'action bactéricide soit suffisante, la concentration d'eau de Javel doit dépasser 5 % (Reybrouck et al., 2000b). Les hypochlorites se sont avérés des agents germicides puissants permettant de maîtriser un large spectre de micro-organismes (Dychdala, 2001). Des concentrations faibles de chlore libre (100 ppm = 0,01 %) sont capables de tuer rapidement (5 minutes) des bactéries végétatives. Pour une activité mycobactéricide fiable, des concentrations plus élevées sont nécessaires (1.000 ppm). Les virus, y compris le HIV et le HBV sont inactivés en 5 minutes par une solution contenant 1.000 ppm de chlore (WIP, 2004). Grabow et al. ont montré que l'inactivation des virus au moyen d'une concentration indéterminée d'hypochlorite de sodium diffèrait selon le pH de la solution. Le HAV est tué plus

rapidement dans de l'hypochlorite de sodium que les bactéries acido-résistantes et le poliovirus (Grabow et al., 1983). Les micro-organismes sporulants sont environ 10 à 1.000 fois plus résistants au chlore que les formes végétatives. Les spores de moisissures sont également assez résistantes au chlore et nécessitent une solution de 135 à 500 ppm d'hypochlorite (0,01-0,05 %) pour obtenir une inactivation en quelques minutes. La résistance sélective des micro-organismes au chlore peut être compensée par une concentration plus élevée, un pH plus faible ou une température plus élevée (Dychdala, 2001).

7.5.3.2.2. Toxicité

Les hypochlorites ne sont pas toxiques pour l'homme aux concentrations diluées ordinaires telles que 0,01 % à 1 % de chlore actif/litre (Dychdala, 2001; Belgochlor, 2005). L'eau de Javel non diluée est nocive pour la peau (dermatite de contact) et les ongles. Les vapeurs sont gênantes, voire toxiques, pour les voies respiratoires (Belgochlor, 2005).

On ne retrouve aucune trace dans la littérature de l'utilisation des hypochlorites dans le cadre de la décontamination des allogreffes.

7.5.4. Agents alkylants

7.5.4.1. Formaldéhyde

Le formaldéhyde ou formol est un gaz incolore. Il est fortement soluble dans l'eau. Son action est influencée de manière négative par le matériel organique (Reybrouck et al., 2000a).

7.5.4.1.1. Activité biocide

À une concentration élevée, le formaldéhyde est hautement biociden : il tue toutes les cellules vivantes. À la concentration de 1 % généralement utilisée, il est fortement bactéricide, fongicide, tuberculocide (surtout sur les mycobactéries non tuberculeuses) et virucide (Reybrouck et al., 2000a). Pour une action sporicide, des concentrations élevées sont nécessaires (Reybrouck et al., 2000a). Les micro-organismes sont tués par alkylation avec des groupes amines et sulfhydryles de protéines et des atomes d'azote du cycle des bases puriques telles que la guanine (Favero & Bond, 2001).

7.5.4.1.2. Toxicité

Le formaldéhyde est toxique et mutagène. Les gaz sont irritants pour les muqueuses et la conjonctive. On tente de réduire la toxicité en diminuant la concentration et en ajoutant des sels d'ammonium quaternaire (Reybrouck et al., 2000a). La libération du formaldéhyde du tissu collagénique peut durer plusieurs semaines (Favero & Bond, 2001).

7.5.4.1.3. Application aux allogreffes

7.5.4.1.3.1. Osselets

Le formaldéhyde a été utilisé pour la conservation des osselets (Angermann & Jepson, 1991; Sataloff & Roberst, 1986). Janssens de Varebeke et al. (1998) ont étudié si après le traitement au formaldéhyde des osselets de patients positifs pour le HIV, le HIV était encore détectable au moyen d'une PCR. Un des osselets appariés de cinq patients décédés du SIDA a été traité dans une solution tampon de formaldéhyde à 4 % (pH 5,6), à 4°C pendant 2 semaines, puis a été conservé pendant 2 semaines dans une solution de Cialit (sodium-2-éthyl-mercuri-mercaptopbenzoxazole-5-carboxylique acide) dilué avec de l'eau selon un rapport de 1 :5.000. Les osselets traités ont ensuite été conservés dans des tubes secs à -70°C. L'autre osselet de la paire n'a pas été traité (contrôle) et a été lavé à l'eau physiologique, séché et conservé à -70°C. Tous les osselets ont été broyés et l'ADN proviral du HIV-1 a été recherché par PCR. Les 5 osselets traités étaient négatifs en ce qui concerne la présence d'ADN proviral du HIV-1. En revanche, trois des cinq osselets non traités contenaient de l'ADN proviral. Cette étude montre que le traitement décrit des osselets est sûr et permet d'éviter le risque de transmission du HIV (Janssens de Varebeke et al., 1998).

Meylan et al. ont étudié l'effet antiviral d'un traitement de 24 heures au moyen du paraformaldéhyde à 5 %, 0,5 % et même 0,05 % d'une part sur une lignée cellulaire lymphoblastoïde T et d'autre part sur des fragments de dure-mère lyophilisés imprégnés de cellules infectées par le HIV et de HIV acellulaire. La dure-mère lyophilisée a été utilisée afin de retenir le virus dans le tissu conjonctif et de déterminer si le virus peut être protégé contre des agents antiseptiques dans cette situation. Chacune de ces concentrations a inhibé complètement l'infectivité du HIV et une réduction de plus de 5 log a été observée dans la charge virale cultivable (Meylan et al., 1996).

7.5.4.2. Glutaraldéhyde

7.5.4.2.1. Activité biocide

Dans les produits désinfectants, le glutaraldéhyde est généralement utilisé en solution de 2 % à laquelle du bicarbonate de sodium ou un tampon est ajouté pour activer la solution. Le glutaraldéhyde est un des désinfectants les plus actifs : il tue non seulement les bactéries végétatives, les mycobactéries et les virus (y compris le HBV, le HCV et le HIV), mais aussi les moisissures et les spores (Reybrouck et al., 2000a). Les virus lipophiles enveloppés sont généralement moins résistants que les virus non lipophiles (poliovirus, échovirus et virus Coxsackie, par exemple). Il existe une différence de sensibilité entre les différents types d'échovirus. Le glutaraldéhyde s'est également avéré efficace contre le rotavirus, le poliovirus acellulaire, le poliovirus cellulaire et le calicivirus félin (apparenté au virus de Norwalk) (Scott & Gorman, 2001). Le HAV est inactivé de manière dépendante du temps et de la concentration. Le HIV (acellulaire et cellulaire) a été inactivé en 2 minutes par une solution de glutaraldéhyde à 2 %. 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 (Scott & Gorman, 2001). La solution reste active en présence de matériel organique (Scott & Gorman, 2001). Lors de l'immersion dans une solution à 2 %, la stérilisation est atteinte après 6 heures de temps de contact. Un objet est désinfecté en 10 minutes (Reybrouck et al., 2000a).

7.5.4.2.2. Toxicité

Comme le formaldéhyde, le glutaraldéhyde est toxique pour toutes les cellules vivantes (Lomas et al., 2003). Le glutaraldéhyde résiduel dans les bioprothèses et le glutaraldéhyde polymère instable retenu dans le tissu réticulé ont été associés à des réactions inflammatoires, une cytotoxicité, des calcifications et une absence d'épithélialisation (endothélium). Plusieurs auteurs ont décrit la présence ou l'absence d'effets secondaires, mais lorsque des effets secondaires ont été rapportés, des concentrations plus élevées de glutaraldéhyde avaient été utilisées (solutions de 3 ppm de glutaraldéhyde, par exemple) (Jayakrishnan & Jameela, 1996).

7.5.4.2.3. Application aux allogreffes

7.5.4.2.3.1. Valves cardiaques/veines

La revue de Jayakrishnan & Jameela traite de l'application de glutaraldéhyde en vue de la réticulation des bioprothèses telles que les valves cardiaques porcines, le péricarde bovin et les veines de cordon ombilical humain. Des valves cardiaques traitées au glutaraldéhyde ont été implantées à plusieurs milliers de patients, avec un taux de réussite clinique élevé. Ces valves se sont avérées réduire avec succès la détérioration mécanique et structurelle des valves ainsi que les infections post-opératoires (Jayakrishnan & Jameela, 1996). Selon Jashari et al. (2004), toutefois, cette technique, si elle est appliquée sur des valves cardiaques humaines, entraîne une défaillance rapide des valves en raison de la dégénérescence et de la rupture de celles-ci.

7.5.5. Antiseptiques mercuriels organiques

7.5.5.1. Activité biocide

Le merthiolate (thimérosal-thiomersal) et le Cialit sont des composés organiques du mercure qui possèdent des propriétés bactériostatiques et fongistatiques (Angermann & Jepsen, 1991; Weber & Rutala, 2001). Le thimérosal a été fréquemment utilisé comme composé bactéricide du mercure à des concentrations de 0,001 % à 0,1 % (Weber & Rutala, 2001). Le Cialit ne possède pas de propriétés antivirales. Le risque d'infections virales telles que le HIV et l'hépatite constitue donc une raison de ne pas l'utiliser comme moyen de préservation du cartilage, selon Dickson & Inglis (1988). Röder et al. ont confirmé que le Cialit n'a pas d'effet sur le HIV à une concentration de 0,2 µg/ml (Röder et al., 1992). Comme le thiomersal est utilisé comme conservateur dans certains vaccins vivants atténués (grippe, par exemple), nous pouvons en déduire qu'il ne possède probablement pas d'effet antiviral.

Les dérivés du mercure sont fortement inactivés par le matériel organique (Reybrouck et al., 2000a).

7.5.5.2. Toxicité

Le thimérosal provoque des réactions allergiques (d'hypersensibilité) telles qu'une kérato-conjonctivite lors de l'utilisation de lentilles de contact et une dermatite de contact (Weber & Rutala, 2001). Cette substance est sensible à la lumière, ce qui peut réduire son efficacité (Glowacki, 2005). Le Cialit se diffuse plus facilement et est moins photosensible que le thimérosal (Cookson et al., 1988).

7.5.5.3. Application aux allogreffes

7.5.5.3.1. Os

Selon Tomford et al., les composés organiques du mercure ne conviennent pas pour conserver des allogreffes osseuses, en raison de leur toxicité. En outre, la conservation dans ces solutions ne peut avoir lieu de manière sûre que pendant de courtes périodes (Tomford et al., 1983). Le Cialit réduirait l'antigénicité de certains composants tissulaires (Cookson et al., 1988). Guntz (1954) et Sciffert (1971 et 1972) ont préservé des greffons osseux et des tendons dans du Cialit (McGlynn & Sharpe, 1982).

Munting et al. (1988) ont rapporté que le merthiolate (0,01 - 0,02 %) n'avait pas d'effet destructeur sur la DBM, mais les auteurs ont considéré cette technique comme insuffisante car le merthiolate n'est pas actif sur les spores (Glowacki, 2005).

7.5.5.3.2. Osselets

Marquet a introduit l'usage otologique du Cialit. Il a préféré le Cialit au formaldéhyde comme conservateur car le Cialit préserve mieux la compliance naturelle de la greffe. Le formaldéhyde rend le tissu plus rigide que la normale (Sataloff & Roberts, 1986). Il y a peu de temps encore, les osselets étaient surtout conservés dans du Cialit (Angermann & Jepsen, 1991). Hüttenbrink et Weidenfeller ont constaté qu'une solution de Cialit à 1:5.000 n'offrait pas une action antibactérienne suffisante et ont préféré conserver les osselets d'abord dans une solution tampon de formaldéhyde à 4 %, selon Perkins. Pour la conservation de plus longue durée, du Cialit peut être utilisé ensuite (Hüttenbrink & Weidenfeller, 1990). Strauss et al. (1983) avaient déjà recommandé cette méthode précédemment afin de diminuer l'antigénicité des osselets (Hüttenbrink & Weidenfeller, 1990).

Meylan et al. ont étudié l'effet antiviral d'un traitement de 24 heures au moyen de Cialit à raison de 1 ou 0,2 mg/ml, d'une part sur une lignée cellulaire lymphoblastoïde T et d'autre part sur des fragments de dure-mère lyophilisés imprégnés de cellules infectées par le HIV et de HIV acellulaire. La concentration de 1 mg/ml de Cialit a réduit l'infectivité de plus de 5 log₁₀, tandis que la concentration de 0,2 mg/ml a permis une réduction de 2 log₁₀. Les auteurs ont conclu qu'une fixation au formaldéhyde est nécessaire pour obtenir une diminution sûre de la viabilité du HIV (Meylan et al., 1996).

Comme les antiseptiques contenant du mercure ont été retirés du marché, le traitement des osselets par du Cialit a été abandonné et remplacé par un traitement au formaldéhyde comme agent fixant et désinfectant (CSS 8298, 2008).

7.5.6. Alcools

7.5.6.1. Éthanol

7.5.6.1.1. *Activité biocide*

La principale propriété de l'alcool éthylique (éthanol) est de tuer les micro-organismes en un laps de temps extrêmement court (moins de 1 minute). Il est utilisé de préférence à une concentration de 70 % en volume (Ali et al., 2001). L'alcool éthylique est actif sur les bactéries, les mycobactéries, les moisissures et les virus, mais il n'est pas sporicide (Reybrouck et al., 2000a). Toutefois, Ali et al. ont constaté qu'il était inexact de dire que l'éthanol ne possédait pas d'action sporicide. Les spores de *Bacillus (B.) anthracis*, par exemple, étaient tués après 48 heures en présence d'une concentration de 42 % à 100 % d'éthanol (Ali et al., 2001). L'éthanol à 70 % tue les bacilles tuberculeux en 30 secondes (Ali et al., 2001). L'éthanol est actif contre les moisissures en quelques heures (WIP, 2004). Il est actif contre les virus lipophiles enveloppés, mais pas contre les virus hydrophiles (WIP, 2004). Le HAV, un virus sans enveloppe craint en raison de sa résistance aux agents chimiques et physiques, n'a pas pu être inactivé au moyen d'éthanol à 70 % dans une étude de Rotter (1996) (Ali et al., 2001). L'efficacité de l'éthanol à 70 % (v/v) afin d'inactiver le HIV dépend de l'état du virus: sec ou en suspension (Druce, 2001). Le virus acellulaire et cellulaire en suspension peut être inactivé au moyen d'éthanol à 75 % (v/v). Le HIV à l'état sec ne peut pas être inactivé au moyen d'un traitement par éthanol à 70 % (v/v) pendant 20 minutes (Druce, 2001). Le HBV a été considéré comme extrêmement résistant aux désinfectants chimiques (Ali et al., 2001). Bond et al. (1983) et Kobayashi et al. (1984) ont constaté que le HBV était inactivé en 10 minutes par l'isopropanol à 70 % et en 2 minutes par l'éthanol à 80 % (Ali et al., 2001).

Comme les spores et certains virus ne sont pas inactivés, il reste un élément d'incertitude si l'alcool éthylique est la seule procédure de désinfection appliquée (Hallfeldt et al., 1995).

7.5.6.1.2. *Toxicité*

En général, l'alcool est toxique. À la suite d'une application locale répétée, la peau se dessèche. L'éthanol possède un effet toxique sur les ostéoblastes : il provoque une inhibition de la synthèse de l'ADN dépendante de la dose. Bhandari et al. (2001) ont constaté une réduction significative de l'activité de la phosphatase alcaline et une réduction de la formation de nodules osseux après une exposition à de l'éthanol à 10 %. Cette constatation laisse supposer un effet toxique direct de l'éthanol sur les ostéoblastes. En outre, Hooe et Steinberg (1996) ont noté une nécrose osseuse constatée au moyen d'examen histologiques sur des fémurs de rats après l'action d'éthanol à 70 % pendant 10 minutes. L'effet sur le résultat final d'une reconstruction osseuse pourrait donc être influencé de manière négative (Hooe & Steinberg, 1996).

7.5.6.1.3. *Application aux allogreffes*

7.5.6.1.3.1. Os

Bien que l'éthanol dénature les protéines, les propriétés ostéo-inductrices de la matrice osseuse ne sont pas atteintes (Angermann & Jepsen, 1991). L'éthanol est souvent utilisé, parallèlement au H₂O₂ et à l'éther, dans le traitement du tissu osseux allogène. Il est difficile de déterminer la vitesse de diffusion et la concentration de l'éthanol dans les allogreffes; cette connaissance serait cependant utile pour les allogreffes de plus grandes dimensions (Hallfeldt et al., 1995). En revanche, il est certain que l'éthanol peut pénétrer dans l'os cortical (Salzman et al., 1993).

Dans le rapport de cas de Simonds, où trois receveurs ont été infectés par le HIV-1 par le biais d'allogreffes osseuses congelées non traitées provenant d'un donneur contaminé par le HIV-1, 38 autres fragments osseux lyophilisés puis traités à l'éthanol ont été validés. À cet effet, les os ont été nettoyés dans un bain à ultrasons contenant 30 % d'éthanol. Ils ont ensuite subi un

lavage pulsé afin d'éliminer la moelle osseuse et ont, pour terminer, subi un bref traitement à l'éthanol à 100 %. Aucun de ces fragments osseux n'a donné lieu à la transmission du HIV-1 (Simonds et al., 1992).

7.5.6.1.3.2. *DBM*

L'éthanol à 50 % (pendant 24 h) n'a aucun effet néfaste sur les propriétés ostéo-inductrices de la DBM, étant donné que l'éthanol entre dans sa préparation (Tomford et al., 1983; Hallfeldt et al., 1995; Hooe & Steinberg, 1996).

7.5.6.1.3.3. *Tendons*

L'application d'éthanol à 70 % (v/v) en même temps que de la chlorhexidine à 0,02 % en vue de la décontamination de tendons humains est pratiquée depuis longtemps par l'Université Catholique de Louvain et n'a jamais été associée à des effets indésirables tels qu'une synovite ou une faiblesse de la greffe. L'éthanol pénètre dans un tendon épais selon un gradient de concentration. Trois heures sont nécessaires pour qu'une concentration de 20 % d'éthanol soit atteinte dans les parties plus profondes des tendons; cette concentration inactive le HIV *in vitro* (Anastasescou et al., 1998).

7.5.6.1.3.4. *Sclérotique*

Après le décollement de la cornée, le reste du globe oculaire est entièrement débarrassé du tissu superflu. Selon le CSS, la sclérotique peut être préservée soit dans du formaldéhyde additionné d'alcool, soit dans de l'éthanol. Dans l'éthanol à 70 %, la sclérotique est d'abord stabilisée, puis conservée pendant une durée maximale de 5 ans dans de l'éthanol à 70 % au moins, à 4°C (CSS 8293, 2007).

7.5.6.1.3.5. *Osselets*

L'alcool éthylique à 70 % a été utilisé par Sataloff et Roberts pour la conservation des osselets (Angermann & Jepson, 1991). Ils ont rapporté l'absence de problèmes infectieux parmi les receveurs d'osselets conservés au moyen de cette méthode (Sataloff & Roberts, 1986).

7.5.6.2. Méthanol

7.5.6.2.1. *Activité biocide*

Le méthanol est un agent bactéricide efficace à des concentrations de plus de 50 %. Le méthanol est actif sur des bactéries sèches en l'absence d'eau, ce qui n'est pas le cas des autres alcools (Ali et al., 2001). L'action sur les champignons nécessite une concentration plus élevée de méthanol, par rapport à l'éthanol (Ali et al., 2001). Gordon (1925) a signalé que les virus enveloppés tels que le virus de la vaccine étaient inactivés en 15 minutes par le méthanol à 80 % (Ali et al., 2001).

7.5.6.2.2. *Toxicité*

Le méthanol provoque la cécité et le décès en cas d'ingestion (Intensivist, 2011; Methanex, 2006). Il est également toxique en cas de contact avec la peau et les yeux (Methanex, 2006).

7.5.6.2.3. *Application aux allogreffes*

7.5.6.2.3.1. *Os*

Le méthanol est principalement utilisé pour dégraisser les os. Ainsi, un rapport méthanol/chloroforme de 1:1 est utilisé pendant 4 heures à 25°C (protocole d'Urist) (Kearny & Lomas, 2004). Cette étape de nettoyage est très importante pour les os et permet d'éliminer une très grande quantité de matériel organique renfermant potentiellement des micro-organismes. Après un dégraissage de l'os au moyen de méthanol/chloroforme et un traitement par APA à 1 % – éthanol à 24 %, les virus avec et sans enveloppe ont été inactivés en 5 minutes (Kao et al., 1998; Malchesky, 2001). Toutefois, ceci ne démontre pas l'effet du méthanol pur.

7.5.7. Iode et iodophores

7.5.7.1. Mécanisme d'action

Les désinfectants à base d'iode peuvent être subdivisés en trois grands groupes, selon le solvant et les substances qui forment un complexe avec l'iode :

- 1) solutions aqueuses,
- 2) solutions alcooliques,
- 3) iodophores.

Tous possèdent des propriétés chimiques et microbiologiques intrinsèquement différentes (Gottardi, 2001).

1) Solutions aqueuses :

L'iode élémentaire est peu soluble dans l'eau. L'ajout d'iodure permet d'améliorer sa solubilité. Ainsi, la solution de lugol se compose d'une solution d'iode hautement concentrée contenant 5 % d'iode et 10 % d'iodure de potassium. La solution de lugol est entièrement soluble à chaque dilution (Gottardi, 2001).

2) Solutions alcooliques :

L'iode s'équilibre avec les alcools en formant des complexes résultant en la formation de triiode (Gottardi, 2001). Les solutions alcooliques à 1 % ou 2 % sont utilisées comme désinfectant (Reybrouck et al., 2000a).

3) Iodophores :

Les iodophores sont des molécules organiques polymères capables de former des complexes d'iode et entraînant une diminution des concentrations d'équilibre de l'iode (Gottardi, 2001). Ces polymères vecteurs augmentent la solubilité de l'iode dans l'eau et servent de réservoir à partir duquel l'iode libre est libéré lentement. Les iodophores sont donc solubles dans l'eau. En outre, ces solutions possèdent des propriétés tensioactives (WIP, 2004). La concentration des produits disponibles dans le commerce est habituellement de 7,5 % à 10 % d'iode (Reybrouck et al., 2000a). Le vecteur le plus utilisé est le polyvinylpyrrolidone (PVP) ou la povidone-iodine (PVP-I) (WIP, 2004). L'activité maximale de la PVP-I est présente dans une solution de 0,1 % (WIP, 2004).

7.5.7.2. Activité biocide

Les alcools iodés sont fortement bactéricides, fongicides, virucides et tuberculocides, mais possèdent une action sporicide plus lente (Reybrouck et al., 2000a; Soyer et al., 2002; WIP, 2004). À la concentration usuelle de 7,5 % à 10 %, les iodophores (iodes liés à support) sont bactéricides, fongicides et virucides, mais pas sporicides (WIP, 2004). Selon les données de Wallhäusser (Gottardi, 2001) et le groupe de travail sur la prévention des infections (WIP-Nederland), les spores sont tuées (WIP, 2004). Le spectre de l'iode est large et comprend des virus entériques, des bactéries entériques, des kystes protozoaires, des champignons et *Trichomonas* sp. (Soyer et al., 2002). Les formulations à base d'iode possèdent une bonne activité virucide. Une concentration de 0,8 % (p/v) d'iode inactive le HIV en 1 minute en présence de sang (Reybrouck et al., 2000a). Le HIV acellulaire est inactivé de 30 à 60 secondes après l'exposition à la PVP-I à 0,5 % (p/v) (Druce, 2001).

7.5.7.3. Toxicité

Lors de l'application locale, les alcools iodés provoquent parfois une réaction allergique. Un contact trop long avec la peau provoque une dermatite chimique.

Les iodophores peuvent également provoquer une allergie (Reybrouck et al., 2000a). Les doses élevées d'iode libre (dans la teinture d'iode, par exemple) sont très toxiques si elles sont appliquées dans des cavités corporelles. Elles y provoquent un gonflement et une hémorragie des muqueuses (Gottardi, 2001). Seules les solutions d'iodophores à 0,1 % peuvent être utilisées comme liquide de rinçage dans les plaies et les cavités corporelles (WIP, 2004). Les préparations

de PVP-I ne contiennent que de faibles concentrations d'iode moléculaire libre et ont été introduites à l'origine afin d'éviter les effets toxiques (Gottardi, 2001).

Bhandari et al. (2001) ont testé l'action d'une solution de PVP-I à 1 % sur une plaque de cellules osseuses cultivées. La densité cellulaire, le nombre d'ostéoblastes et la formation de nodules osseux ont diminué. Par conséquent, le PVP-I possède aussi un effet toxique. Hooe & Steinberg (Hooe & Steinberg, 1996) ont évalué diverses solutions de décontamination sur des fémurs de rats contaminés par *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Le traitement au moyen d'une solution de PVP-I à 10 % pendant 15 minutes n'a pas provoqué de modification histologique de la morphologie osseuse normale. Néanmoins, il est possible que les protéines ostéo-inductrices (BMP) dans la matrice de l'allogreffe soient détruites (Glowacki, 2005; Hooe & Steinberg, 1996; Severyns et al., 1991). Severyns et al. (1991) ont montré que la PVP-I à 10 % est très irritante pour l'endothélium vasculaire, avec thrombose secondaire notamment. La substance s'est aussi avérée toxique pour les granulocytes et les monocytes (Severyns et al., 1991).

7.5.7.4. Application aux allogreffes

7.5.7.4.1. Cornée

Pour la conservation au chaud ou au froid de la cornée, le globe oculaire est désinfecté au moyen d'antiseptiques et/ou d'antibiotiques après décollement. La PVP-I peut être envisagée dans ce cadre (CSS 8293, 2007).

Pels et Vrensen ont montré que la toxicité de 2,5 mg/ml de PVP-I provoquait des dommages directs aux fibroblastes *in vitro*. Toutefois, une concentration de 5 mg/ml ne s'accompagne pas d'un risque de pénétration de l'iode dans le stroma cornéen et d'endommagement des fibroblastes cornéens (Pels & Vrensen, 1999). En chirurgie ophtalmologique, la PVP-I semble être le seul antiseptique non toxique pour l'épithélium. Lors de la mise en banque de routine de la cornée, une concentration de 5 mg/ml de PVP-I pendant 2 minutes réduit de manière significative la viabilité d'un certain nombre d'agents contaminants microbiens des surfaces, mais en aucun cas de la totalité d'entre eux. L'effet antiviral de ce rapport concentration/temps de la PVP-I n'a pas été mentionné. Comme l'activité de la PVP-I diminue lors de l'exposition à des substances organiques, il est conseillé d'éliminer d'abord le tissu musculaire, la conjonctive, la graisse orbitaire et les autres tissus résiduels (Pels & Vrensen, 1999).

7.5.8. Agents tensioactifs

7.5.8.1. Détergents anioniques

7.5.8.1.1. Activité biocide

Les savons et détergents ménagers appartiennent à ce groupe. Ils possèdent surtout une action nettoyante et ne peuvent pas être considérés comme des désinfectants. Les micro-organismes survivent dans les solutions et peuvent parfois s'y multiplier (Reybrouck et al., 2000).

7.5.8.1.2. Toxicité

Bhandari et al. ont étudié l'effet de différentes solutions de rinçage sur le nombre et la fonction des ostéoblastes et des ostéoclastes. Les solutions savonneuses conservent l'activité des ostéoblastes (formation d'un nodule osseux) malgré la diminution du nombre d'ostéoblastes. Le nombre d'ostéoclastes est mieux conservé avec les solutions savonneuses qu'avec l'éthanol, la PVP-I, les antibiotiques et le gluconate de chlorhexidine, par exemple (Bhandari et al., 2001).

7.5.8.2. Détergents cationiques

7.5.8.2.1. Activité biocide

Il s'agit du groupe principal d'agents tensioactifs germicides. Les QCA et les composés de phosphonium appartiennent à ce groupe. Les propriétés bactéricides sont plutôt limitées. Ces produits sont principalement actifs sur les bactéries à Gram positif. Les bactéries à Gram négatif,

et plus particulièrement *Pseudomonas* spp., sont résistantes. La prolifération de *P. aeruginosa* et *Burkholderia cepacia* dans les solutions usuelles est dès lors possible (Reybrouck et al., 2000). Les détergents cationiques ne présentent aucune activité contre les mycobactéries et les spores. Ils sont néanmoins fongicides et virucides contre les virus (enveloppés) lipophiles (Reybrouck et al., 2000; WIP, 2004). Les concentrations usuelles sont généralement de 0,4 % à 1,0 % (WIP, 2004).

Les QCAs 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 (Druce, 2001). Le chlorure de benzalkonium classique, bien connu, appartient à la première génération des QCAs.

7.5.8.2.2. Toxicité

Les détergents cationiques sont peu ou non toxiques (Reybrouck et al., 2000). Cette caractéristique est la principale raison de leur utilisation. Ils provoquent peu souvent une irritation qui, si elle survient, touche surtout la peau et les yeux (Reybrouck et al., 2000; WIP, 2004). Les résidus éventuels ne sont pas dangereux.

Tarbox et al. ont évalué l'efficacité du chlorure de benzalkonium appliqué sur les plaies de rats. Un échantillon d'implant a été greffé dans les processus spinaux, puis la plaie a été exposée à une suspension de 0,1 ml de *S. aureus*. Les tissus rincés au chlorure de benzalkonium à 0,1 % n'ont pas présenté de modifications significatives en ce qui concerne le degré d'inflammation postopératoire ou de cicatrisation de la plaie, par rapport aux plaies traitées à l'eau physiologique. L'os et le cartilage paraissaient morphologiquement normaux dans les deux groupes (Tarbox et al., 1998).

Le chlorure de benzalkonium est toxique pour l'œil et peut provoquer une érosion et une ulcération de la cornée. La LD₅₀¹ orale aiguë est de 0,30 g/kg. Le chlorure de benzalkonium à une concentration de 0,1 % dans l'eau ou dans 70 % d'alcool s'est révélé toxique pour l'oreille moyenne. Selon la durée et la longueur de l'exposition, des dommages ont été causés au vestibule et à la cochlée des oreilles moyennes exposées (Tarbox et al., 1998).

7.5.8.3. Détergents ampholytiques

Ils possèdent des propriétés similaires à celles des détergents cationiques (sous leur point isoélectrique) (Reybrouck et al., 2000).

Une modification du pH entraîne une modification de leur charge et de leurs propriétés détergentes et émulsifiantes (Merianos, 2001).

7.5.8.4. Détergents non ioniques

7.5.8.4.1. Activité biocide

Tween 80 (polysorbate 80) et Triton-X appartiennent à ce groupe. Comme les détergents anioniques, ils possèdent surtout une action nettoyante (Reybrouck et al., 2000). Ce groupe est surtout utilisé par l'industrie pharmaceutique en raison de sa faible toxicité, sa bonne compatibilité et son excellente stabilité dans les systèmes biologiques (Merianos, 2001). Les esters de polyoxyéthylène sorbitane d'acides gras sont le groupe le plus utilisé et se retrouvent surtout dans des formulations pharmaceutiques internes et externes (Merianos, 2001).

7.5.9. Stérilisation chimique Biocleanse®

BioCleanse® Tissue Sterilisation Process est une méthode de stérilisation chimique à basse température conçue par l'entreprise *Regeneration Technologies Inc.* (Alachua, États-Unis). Ce processus serait unique en ce sens qu'il élimine les bactéries, champignons, spores et virus avec et sans enveloppe non seulement à la surface de l'os, mais aussi profondément dans l'os (Vangsness, 2004). Il fait appel à des substances chimiques (solutions chimiques telles que le H₂O₂ et l'isopropanol) validées en vue de l'élimination des micro-organismes mais préservant la

¹ Lethal dose for 50 % of the tested population

résistance des tissus et la biocompatibilité (RTIX, 2001). Cette technique détruirait aussi les spores et préserverait l'intégrité mécanique de certaines allogreffes. L'efficacité de cette méthode ressort de l'absence de rapports au sujet d'infections associées aux allogreffes de tissus traités de cette manière (données non publiées du CDC; Kainer et al., 2004). Cette technique ne peut pas être appliquée sur des condyles fémoraux frais car des chondrocytes viables sont nécessaires pour le maintien de la fonction de leur cartilage (Kainer et al., 2004). Dans une étude comparative portant sur des greffes osseuses corticales traitées ou non au moyen de Biocleanse[®], ni Mroz et al. (2006), ni Mikhael et al. (2008) n'ont pu mettre en évidence de modifications significatives en ce qui concerne les propriétés mécaniques de l'os (Mroz et al., 2006; Mikhael et al., 2008). Jones et al. (2007) ont comparé des résultats similaires lorsque des allogreffes os-rotule-os étaient soumises à la stérilisation par Biocleanse[®]: aucune modification des propriétés mécaniques par rapport aux allogreffes non traitées.

7.5.10. CO₂ supercritique

7.5.10.1. Mécanisme d'action

Le CO₂ a été utilisé pendant un certain temps comme agent antimicrobien dans l'industrie agroalimentaire, sous forme liquide ou gazeuse. Un traitement remplaçant la pasteurisation des aliments est une application plus récente du CO₂ supercritique. Dans un système continu, le CO₂ mis sous pression par un liquide est pulvérisé jusqu'au point de saturation. Le CO₂ pénètre ainsi rapidement dans les micro-organismes. Lorsque la pression diminue, les cellules bactériennes se lysent (McDonnell & Pretzer, 2001). Comme le CO₂ supercritique possède la densité élevée des liquides, sa capacité de « solvant » est grande et comme il possède la faible viscosité des gaz, sa capacité de diffusion est élevée. Il est idéal pour extraire les substances des matrices poreuses telles que les os. Cet état supercritique du CO₂ est atteint à une pression critique de 7,38 mPa et une température critique de 31°C (McDonnell & Pretzer, 2001).

7.5.10.2. Activité biocide

Le CO₂ supercritique inactive de nombreux micro-organismes qui avarient les aliments, y compris des bactéries acidorésistantes et des levures thermorésistantes. Chementator a obtenu une pasteurisation complète après 13 minutes à 35°C, à une pression de 200 mPa de CO₂ et un débit de CO₂ de 29 kg/heure, dans de la sauce soja contaminée par des levures thermorésistantes (McDonnell & Pretzer, 2001). Selon Bardonnnet (Biobank, France), 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 (Bardonnnet, 2004). Les virus, le HIV-1, le virus Sindbis, le poliovirus et le virus de la pseudo-rage ont été testés avec ce procédé par l'Institut Pasteur (Paris) et ont été inactivés à raison de plus de 6 log₁₀ (Bardonnnet, 2004).

7.5.10.3. Toxicité

Le CO₂ supercritique est sûr, non toxique, non corrosif, ininflammable et facile à obtenir (Bardonnnet, 2004).

7.5.10.4. Application aux allogreffes

7.5.10.4.1. Os

En France, la banque de têtes fémorales « Biobank » utilise la procédure au CO₂ supercritique en vue de l'inactivation virale et de l'élimination des lipides, des résidus cellulaires et des protéines médullaires. Les caractéristiques structurales de l'os sont ainsi préservées, avec la carboxy-apatite et le collagène de type 1 (Bardonnnet, 2004). Une étude comparative (Laboratoire de Biomécanique de l'Ensam, Paris) a révélé que la contrainte de compression maximale (S_{max}) et le module de Young (E) ne diffèrent pas entre les os traités au CO₂ et les os non traités (Bardonnnet, 2004).

En raison de sa capacité à éliminer la moelle osseuse, le CO₂ supercritique pourrait aussi améliorer l'intégration des os (Frayssinet et al., 1998). Frayssinet et al. (1998) ont constaté que des os allogènes implantés chez des moutons après un traitement au CO₂ supercritique (12

heures, 25 mPa, 50°C) étaient bien intégrés, contrairement aux os de contrôle implantés qui étaient presque entièrement résorbés après 4 mois.

Fages et al. ont étudié l'effet antiviral du CO₂ supercritique sur le tissu osseux. Des réductions de plus de 4,0 log₁₀ pour le HIV, plus de 4,3 log₁₀ pour le virus Sindbis, plus de 6,6 log₁₀ pour le poliovirus et plus de 4,0 log₁₀ pour le virus de la pseudo-rage ont été obtenues (Sofer, 2002).

7.6. STÉRILISATION PAR LE GAZ

7.6.1. Oxyde d'éthylène

7.6.1.1. Mécanisme d'action

L'oxyde d'éthylène est un gaz qui possède une grande capacité de pénétration. La capacité germicide du gaz est influencée par sa concentration, la température et l'humidité relative. Pour chaque augmentation de 10°C de la température, l'activité de l'oxyde d'éthylène est triplée. La stérilisation est généralement effectuée à une température comprise entre 50°C et 60°C (Reybrouck et al., 2000b).

7.6.1.2. Activité biocide

Un cycle normal de stérilisation à l'oxyde d'éthylène dure 240 minutes et inactive 10³⁰ micro-organismes, y compris des spores bactériennes (Kearny, 1998). L'oxyde d'éthylène 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 (Doherty et al., 1993). Selon Druce, l'oxyde d'éthylène est une méthode de stérilisation efficace en vue de l'inactivation du HIV (Brockbank & Silver, 2001; Druce, 2001).

7.6.1.3. Toxicité

L'oxyde d'éthylène est cytotoxique (Lomas et al., 2001), tératogène, mutagène et génotoxique (Lomas et al., 2003; Reybrouck et al., 2000b).

En raison de son inflammabilité, le gaz doit être manipulé avec prudence. Dès que l'air contient plus de 3 % d'oxyde d'éthylène, il existe un risque d'explosion (Reybrouck et al., 2000).

L'oxyde d'éthylène est un gaz toxique qui forme des produits de réaction toxiques tels que la chlorhydrine d'éthylène (Lomas et al., 2003). Cette chlorhydrine d'éthylène peut persister dans une allogreffe (Jackson et al., 1990). 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 (Brockbank & Siler, 2001). Selon Veen, l'oxyde d'éthylène et ses métabolites peuvent être réduits au minimum afin d'obtenir des allogreffes osseuses sûres. Pour ce faire, il convient de recourir à un rinçage minutieux des greffes osseuses au moyen d'eau désionisée afin d'éliminer la graisse, la moelle osseuse et les tissus mous. Ensuite, il faut exécuter un cycle à froid de stérilisation à l'oxyde d'éthylène afin d'éviter les températures élevées, puis lyophiliser et aérer les greffes (Veen, 1994).

L'AATB a mis à disposition un tableau indiquant la quantité résiduelle maximale d'oxyde d'éthylène ou de ses métabolites pouvant subsister dans les allogreffes après la stérilisation (Brockbank & Siler, 2001). En Allemagne, la quantité résiduelle maximale d'oxyde d'éthylène est beaucoup plus basse qu'aux Etats-Unis : quel que soit le poids du tissu, un maximum de 1 ppm de résidus chimiques est autorisé (Bettin et al., 1999).

7.6.1.4. Application aux allogreffes

7.6.1.4.1. Peau

Avantages

Dans une étude de Chakrabarty et al., la stérilisation de la peau à l'oxyde d'éthylène a provoqué de légers dommages aux structures dermiques. Les dommages étaient surtout localisés dans le derme réticulaire. Toutefois, si cette méthode était combinée avec un traitement préalable au

glycérol, il y avait peu de dégâts. Lors d'une stérilisation combinée au glycérol/oxyde d'éthylène, la matrice dermique présente une bonne morphologie, bonne flexion et bonne résistance à la traction associées à de bonnes performances en ce qui concerne la production de « composites dermo-épidermiques » reconstruits (Chakrabarty et al., 1999; Huang et al., 2004). Les Ag de la membrane basale sont retenus après le traitement par oxyde d'éthylène, ce qui est essentiel pour l'ancrage des kératinocytes *in vitro* (Chakrabarty et al., 1999).

Inconvénients

Étant donné les inquiétudes au sujet de la sécurité des produits de réaction de l'oxyde d'éthylène (chlorhydrate d'éthylène), cette méthode de stérilisation est beaucoup moins utilisée au Royaume-Uni, mais aussi dans d'autres pays d'Europe et aux États-Unis (Huang et al., 2004).

7.6.1.4.2. Os

Avantages

L'oxyde d'éthylène était autrefois la méthode de stérilisation de prédilection pour le tissu osseux. Toutefois, aujourd'hui, son usage a reculé (au profit de l'irradiation gamma) en raison de la présence de résidus chimiques dans l'os (Vangsness et al., 2003). Si les os traités à l'oxyde d'éthylène sont lyophilisés, les résidus d'oxyde d'éthylène sont éliminés et ne posent pas de problème (Brockbank & Siler, 2001; Hallfeldt et al., 1995).

Inconvénients

L'effet négatif possible du traitement par oxyde d'éthylène sur les allogreffes osseuses fait l'objet d'une importante controverse.

Toutefois, Thoren et Aspenberg ont constaté que les greffes osseuses stérilisées à l'oxyde d'éthylène étaient incorporées plus lentement que les greffes non traitées dans l'os hôte (Kearny & Lomas, 2004). Aucun résidu d'oxyde d'éthylène n'a été trouvé dans les greffes. On suppose que l'oxyde d'éthylène alkyle les BMPs, modifiant ainsi leur fonction et provoquant une diminution de l'ostéogénèse. D'autres auteurs ont associé l'oxyde d'éthylène à une déplétion de la capacité ostéo-inductrice et des propriétés biomécaniques des allogreffes osseuses (Ferreira et al., 2000). Selon Moore et al. et Sigholm et al., l'oxyde d'éthylène ne porte pas atteinte à la capacité ostéo-inductrice (Kearny & Lomas, 2004).

En outre, on a constaté que plus la concentration d'oxyde d'éthylène résiduelle est élevée, plus l'activité de la culture de fibroblastes est faible (Vangsness et al., 2003). Kurdyk et al. ont montré que l'os stérilisé à l'oxyde d'éthylène ne perturbait pas la croissance des fibroblastes gingivaux humains *in vitro* (Hallfeldt et al., 1995).

7.6.1.4.3. DBM

L'oxyde d'éthylène nuit à l'ostéo-induction de la DBM en endommageant les BMP (Brockbank & Siler, 2001). Selon Doherty et al., une exposition d'une heure à l'oxyde d'éthylène (testée avec *B. subtilis*) stérilise l'os humain déminéralisé, mais réduit le potentiel ostéo-inducteur (diminution de la quantité de calcium) de l'os et provoque des modifications ultrastructurales (Doherty et al., 1993). Aspenberg a constaté que la capacité inductrice de l'os est anéantie d'une manière dépendante de la dose. Il a utilisé des diaphyses fémorales dégraissées comme matériel de test. Après 30 minutes de traitement à l'oxyde d'éthylène, la quantité de calcium par poids de matrice sèche implantée est tombée à 32 % de celle des implants de contrôle non traités. Après 240 minutes de traitement à l'oxyde d'éthylène, il n'y avait plus d'induction osseuse (Aspenberg et al., 1990). D'autres auteurs affirment que la DBM traitée à l'oxyde d'éthylène possède une bonne ostéogénicité (Hallfeldt et al., 1995).

Lomas et al. ont rapporté que la stérilisation à l'oxyde d'éthylène ne pouvait pas rendre la DBM pro-inflammatoire. Seule la présence de petites particules de DBM (< 20 µm de diamètre) a pu rendre la DBM pro-inflammatoire. La DBM traitée à l'oxyde d'éthylène retient plus de chlorhydrate d'éthylène que l'os minéralisé. Néanmoins, la quantité résiduelle de chlorhydrate d'éthylène dans la DBM ne provoque pas d'inflammation ni de cytotoxicité dans les cellules mononucléaires. Les concentrations de chlorhydrate d'éthylène étaient inférieures (85 ppm) à la quantité maximale autorisée pour les petites greffes tissulaires (250 ppm) (Lomas et al., 2001).

Ces études permettent de conclure qu'une bonne stérilisation peut être obtenue avec l'oxyde d'éthylène, sans inactivation de la DBM. Une température basse est critique afin de prévenir la dénaturation pendant le traitement. Une délipidation approfondie réduit la rétention d'oxyde d'éthylène et de ses produits de réaction (Prolo et al., 1980).

7.6.1.4.4. Tendons

Avantages

Bettin et al. ont comparé les caractéristiques biomécaniques de ligaments collatéraux médiaux de mouton, soit irradiés avec 26 kGy, soit traités par oxyde d'éthylène. Le traitement par oxyde d'éthylène possédait un effet beaucoup moins négatif sur la charge maximale que l'irradiation. Peu de modifications ont été observées en ce qui concerne les propriétés mécaniques des ligaments à une température de stérilisation de 45°C. Bettin et al. recommandent donc l'oxyde d'éthylène pour la stérilisation de petites greffes os-ligament (< 3 cm), le temps d'aération restant inférieur à 10 jours (Bettin et al., 1999).

Inconvénients

Lors de la stérilisation à l'oxyde d'éthylène des tendons, des résidus chimiques se forment et peuvent rester dans ce tissu, devenir toxiques et provoquer une inflammation chronique et un échec de la greffe (Brockbank & Siler, 2001). Jackson a décrit 7 patients (sur une série de 109) ayant développé une réaction intra-articulaire persistante à une allogreffe os-rotule-os lyophilisée implantée qui avait été stérilisée à l'oxyde d'éthylène. La réaction chronique se caractérisait par un épanchement de synovie persistant avec particules de collagène et réaction inflammatoire cellulaire (surtout lymphocytaire). De la chlorhydrine d'éthylène a été trouvée dans l'articulation et l'allogreffe (Jackson et al., 1990). Chez tous les patients, l'allogreffe a dû être retirée afin d'enrayer l'inflammation. Par conséquent, Jackson déconseille la stérilisation d'allogreffes musculo-squelettiques lyophilisées au moyen d'oxyde d'éthylène. (Jackson et al., 1990; Kainer et al., 2004). Selon l'étude expérimentale de Lomas et al., les particules de collagène proprement dites seraient responsables de la réaction inflammatoire (Kearny, 1998).

Lors du suivi, 2 ans après l'implantation des allogreffes os-rotule-os lyophilisées traitées à l'oxyde d'éthylène chez 36 patients, Roberts et al. ont constaté une dégradation complète de la greffe (visible à la radiographie sous la forme de grands kystes fémoraux) chez 8 patients, lors d'une intervention de révision (Vangsness et al., 2003; Roberts et al., 1991). En ce qui concerne les tendons, la lyophilisation ne semble donc pas avoir d'effet stimulant sur l'élimination des résidus d'oxyde d'éthylène.

Conclusion: La loi n'interdit pas l'utilisation de l'oxyde d'éthylène mais est repris dans la législation du travail (règlement général sur la protection du travail - CSS 7848 recommandations en matière de stérilisation, 2006): la concentration en oxyde d'éthylène doit faire l'objet d'un suivi lorsque le personnel y est exposé par inhalation ou par contact. Les quantités résiduelles maximales d'oxyde d'éthylène ou de ses métabolites qui peuvent subsister après stérilisation des allogreffes sont mentionnées dans différentes sources (AATB en Bettin D, et al. Arch Orthop Trauma Surg 1999;119:236-240). Tous ces risques limitent l'utilisation d'oxyde d'éthylène pour la stérilisation des cellules et des tissus avec pour conséquence une analyse de risque favorable par rapport à d'autres traitements possibles d'inactivation.

7.6.2. Bêta-propiolactone

7.6.2.1. Activité biocide

La bêta-propiolactone serait 4.000 fois plus active que l'oxyde d'éthylène (Joslyn, 2001). L'inactivation microbienne est due à l'alkylation de l'ADN. L'activité antimicrobienne dépend de la concentration, la température et l'humidité. L'activité biocide optimale nécessite une humidité de 70 à 75 %. Le gaz est un agent antiviral efficace, selon Dawson et al. (Joslyn, 2001).

Scheidler et al. ont testé l'inactivation de virus dans le plasma humain au moyen d'un traitement à froid à la bêta-propiolactone. Le HIV-2 et un HIV simien n'ont diminué que de 0 à 3 log₁₀ dans le

plasma. D'autres virus, tels que le virus de la forêt de Semliki (succédané pour le HCV) et le virus de l'encéphalite murine (succédané pour le HAV), ont été inactivés avec succès (réduction de 3 à 5 \log_{10} dans le plasma). La bêta-propiolactone possède donc une capacité limitée d'inactivation des virus (Scheidler et al., 1998).

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. De plus, l'utilisation de cette méthode de stérilisation au gaz suscite la méfiance car cette substance est carcinogène lors d'une exposition limitée (Joslyn, 2001).

7.6.2.2. Application aux allogreffes

7.6.2.2.1. Os

Cette technique a été appliquée dans les banques d'os au début, mais elle a été abandonnée en raison de sa toxicité (Tomford et al., 1983; Veen, 1994).

7.6.2.2.2. Valves cardiaques

Cette technique a parfois été appliquée au début de l'ère des transplantations de valves cardiaques humaines. Les valves cardiaques étaient prélevées de manière non stérile, puis stérilisées dans de la bêta-propiolactone et conservées dans un milieu de Hank à 4°C ou lyophilisées. Les tissus traités de cette manière débouchaient rapidement sur un échec en raison de la dégénérescence de la valve et d'une rupture (Jashari et al., 2004).

7.6.3. Formaldéhyde

Le formaldéhyde peut être utilisé en solution (cf. 7.5.4.1) et sous forme gazeuse en vue de la stérilisation. Toutefois, le gaz possède une capacité de pénétration médiocre. L'exposition a lieu dans des conditions normales, à une température de 70 à 80°C obtenue par injection de vapeur. La stérilisation est ainsi possible lors de cycles d'une heure environ. L'avantage par rapport à l'oxyde d'éthylène est que le formaldéhyde gazeux n'est pas inflammable et qu'une désorption n'est pas nécessaire (Reybrouck et al., 2000).

7.6.4. Peroxyde d'hydrogène

Le H_2O_2 à l'état gazeux est un sporicide efficace à des températures de 4 à 80°C, les concentrations stérilisantes étant de 0,5 mg/l à 10 mg/l. Depuis la découverte des méthodes de stérilisation au gaz, l'application du H_2O_2 à l'état gazeux s'est développée en vue de l'utilisation à la pression atmosphérique et sous-atmosphérique. STERIS Corporation a lancé sur le marché une série 1000 de générateurs de H_2O_2 *Vapour-phase hydrogen peroxide* (VHP) connectés à un isolateur afin de fournir du H_2O_2 à la pression atmosphérique. Il existe également des systèmes de stérilisateur à vide (Joslyn, 2001).

Le H_2O_2 fait partie du procédé de stérilisation d'allogreffes BioCleanse® de l'entreprise *Regeneration Technologies*, mais en solution et non à l'état gazeux (cf. 7.5.1.1.).

7.6.5. Acide peracétique

L'acide peracétique est surtout employé à l'état liquide (cf. 7.5.1.2.).

7.7. MÉTHODES DE STÉRILISATION PHYSIQUE

7.7.1. Stérilisation par la chaleur (autoclave à vapeur – chaleur sèche)

7.7.1.1. Mécanisme d'action

Les températures élevées tuent les micro-organismes, y compris les spores. Par conséquent, ces techniques sont préférées, pour autant que les produits traités supportent les températures élevées (Reybrouck et al., 2000).

1. Chaleur humide - autoclavage

Dans un autoclave, des températures de plus de 100°C sont atteintes car le point d'ébullition augmente si la pression dans la chambre de stérilisation est supérieure à la pression atmosphérique normale. Les durées de stérilisation sont de 60 minutes à 112°C, 15 à 30 minutes à 121°C et 7 à 10 minutes à 134°C.

2. Chaleur sèche

La stérilisation par la chaleur sèche a lieu dans un four à air chaud. Les durées de stérilisation sont de 4 heures à 140°C, 2 heures à 160°C (de préférence), 1 heure à 170°C et 30 minutes à 180°C.

7.7.1.2. Activité biocide

Dans l'ensemble, les virus sont moins résistants à l'inactivation thermique que les spores bactériennes. Dans le sérum, toutefois, les virus sont bien protégés par le matériel organique environnant (Joslyn, 2001b).

Le HIV (enveloppé) est peu résistant à la chaleur et est inactivé par une exposition à 60°C pendant 30 minutes (Prolo et al., 1980). Le virus de la pseudo-rage est modérément résistant à la chaleur. Le virus de la poliomyélite de type 1 (sans enveloppe) est inactivé complètement après 30 minutes à 60°C (modérément résistant également). Le HBV (enveloppe complexe) est inactivé par une exposition de 10 heures à 60°C (Reybrouck et al., 2000). Le HAV et le parvovirus bovin, des virus sans enveloppe, sont jugés très résistants à la chaleur (Von Garrel et al., 1997; Pruss et al., 2003).

7.7.1.3. Application aux allogreffes

7.7.1.3.1. *Peau*

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 (Huang et al., 2004).

7.7.1.3.2. *Os*

L'autoclavage est sans aucun doute la méthode la plus sûre et la plus simple. Pourtant, elle ne peut pas être envisagée pour la stérilisation des os car les propriétés ostéo-inductrices se perdent et l'ostéogénèse est atteinte (Doherty et al., 1993 ; Hallfeldt et al., 1995). La stérilisation par la chaleur serait néfaste pour les propriétés biomécaniques de l'os cortical (Ferreira et al., 2000; Hallfeldt et al., 1995). Les canaux de Havers sont coagulés, ce qui entraîne une diminution de la prolifération vasculaire. L'effet de la chaleur sur le collagène est influencé par la présence de phosphates de calcium dans l'os. Bonar et Glimcher ont démontré au moyen de la diffraction des rayons X qu'après une exposition de l'os minéralisé à une température atteignant 100°C pendant 30 minutes, le collagène avait une structure normale (Angermann & Jepsen, 1991). Toutefois, le collagène se dénaturait complètement lorsque l'os déminéralisé était chauffé (Angermann & Jepsen, 199). Le collagène se dénature et se dégrade à une température supérieure à 60°C (Angermann & Jepsen, 1991). Veen a rapporté une perte de résistance à la torsion et de rigidité, en plus d'une perte de la capacité d'ostéo-induction et de remodelage de l'os stérilisé par la chaleur (Veen, 1994).

Hooe et Steinberg ont testé la propriété de décontamination de l'autoclavage à la vapeur pendant 11 minutes sur des fémurs de rats contaminés par *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Par rapport à d'autres traitements (0,6 N HCl/éthanol 70 %, gluconate de chlorhexidine/alcool, néomycine 40 mg avec polymyxine B 200.000 U/l, céfazoline 1 g/l et PVP-I 10 %), seul l'autoclavage a résulté en une absence totale de micro-organismes (Hooe & Steinberg, 1996). Malheureusement, l'autoclavage à la vapeur a aussi entraîné une nécrose des fragments osseux, constatée à l'examen histologique 40 minutes après le traitement (Hooe & Steinberg, 1996). Les propriétés antivirales de l'autoclavage n'ont pas été testées lors de cette étude.

7.7.1.3.3. DBM

Les facteurs de croissance tels que les protéoglycanes sont dénaturés par la chaleur et perdent donc leurs propriétés ostéogènes (Angermann & Jepsen, 1991; Aspenberg et al., 1990; Kearny & Lomas, 2004; Roberts et al., 1991). Par conséquent, l'autoclavage n'est pas une technique de stérilisation appropriée pour la DBM (Huang et al., 2004). Les expériences de Ferreira et al. (2000) ont montré que la DBM stérilisée à la vapeur (autoclave avec vide préalable) perdait sa capacité à former du nouveau cartilage et du nouveau tissu osseux.

7.7.1.3.4. Tendons

Le collagène des tendons est également dénaturé par la chaleur. Les tissus mous tels que les tendons coagulent. Par conséquent, cette technique ne peut pas être appliquée aux tendons (Huang et al., 2004).

7.7.2. « Système Lobator sd-2 »

Le « système Lobator sd-2 » (Telos, Marburg, Allemagne) est une nouvelle technique reposant sur la chaleur humide. Elle est surtout utilisée pour le traitement des têtes fémorales, en association avec un chauffage jusqu'à 80°C environ. Ce système facile d'utilisation possède un effet bactéricide et antiviral (Vehmeijer, 2002). Selon le fabricant, une température de 82,5°C est atteinte pendant au moins 15 minutes au centre des têtes fémorales d'un diamètre ≤ 56 mm (Scheidler et al., 1998).

Pruss et al. ont inoculé des virus sur des têtes fémorales (< 56 mm de diamètre). Ces têtes fémorales ont ensuite été traitées dans le « système Lobator sd-2 » (Pruss et al., 2003). Il s'agissait du HIV-2, du virus de la diarrhée bovine, du virus de la pseudo-rage, du HAV, du virus de la poliomyélite de type 1 et du parvovirus bovin. Dans ce système, la tête fémorale est placée dans un conteneur de désinfection en plastique, avec 300 ml de solution de Ringer stérile et un agitateur magnétique. Le conteneur est fermé et déposé dans l'appareil de chauffage. Après refroidissement, le titre de virus restant a été déterminé pour tous les virus. Tous les virus ont été inactivés jusque sous le niveau de détection, ce qui signifie que le « système Lobator sd-2 » a permis d'obtenir une réduction de plus de 4 \log_{10} . Il en a été conclu que le « système Lobator sd-2 » est efficace et sûr pour le traitement des têtes fémorales allogènes provenant de donneurs vivants (Pruss et al., 2003). La procédure d'inactivation n'est plus garantie uniquement lorsque les têtes fémorales possèdent un diamètre de plus de 60 mm (Pruss et al., 2003). En général, le diamètre des têtes fémorales varie de 30 à 70 mm, avec une moyenne de 50 mm.

Selon Pruss et al., la technique ne porte pas atteinte aux propriétés ostéo-inductrices, à la structure et à la stabilité de l'os (Pruss et al., 2003). Selon Urist (1967), en revanche, cette méthode endommage gravement les propriétés ostéo-inductrices d'une greffe (Vehmeijer, 2002). En outre, le matériau perd sa « stickiness », essentielle pour la technique d'impaction appliquée lors de la révision d'une arthroplastie de la hanche (Vehmeijer, 2002).

7.7.3. Stérilisation par plasma à basse température

7.7.3.1. Mécanisme d'action

Le plasma se définit comme un quatrième état d'agrégation de la matière, qui, d'un point de vue énergétique, se distingue des états solide, liquide et gazeux. Il peut être obtenu par des températures très élevées, des champs électriques ou des champs magnétiques. En principe, il se compose d'un nuage d'ions, d'électrons et d'espèces neutres. Avant qu'un gaz ionisé puisse

être considéré comme un plasma, le nombre de particules chargées positivement et négativement doit être plus ou moins égal. Il s'agit ici de plasma à basse température utilisé lors de procédures de stérilisation à basse pression (Jacobs & Lin, 2001).

La stérilisation au moyen du stérilisateur STERRAD® 100 utilise un plasma de gaz à basse température. Une solution de peroxyde d'hydrogène à 59 % est injectée dans une chambre sous vide. Le plasma se forme par l'application d'une énergie radiofréquence de 400 W créant un champ électrique. Dans ce plasma, le peroxyde d'hydrogène se décompose en radicaux réactifs capables de tuer les micro-organismes. Un cycle dure 75 minutes à une température n'excédant pas 50°C (Jacobs & Lin, 2001).

7.7.3.2. Activité biocide

Cette technique possède une action microbicide sur les bactéries végétatives (y compris les mycobactéries), les spores bactériennes, les levures, les moisissures et les virus (lipophiles et hydrophiles) (Jacobs & Lin, 2001). Du poliovirus de type 1 et du HSV de type 1, représentants, respectivement, des virus hydrophiles et lipophiles, le poliovirus est le plus résistant. Le traitement au moyen du stérilisateur STERRAD inactive ce virus (Jacobs & Lin, 2001). Une autre étude a testé le HIV-1, le virus respiratoire syncytial (VRS), la vaccine et le HSV-1, tous lipophiles, ainsi que le poliovirus de type 2 et le HAV, tous deux hydrophiles. La réduction du \log_{10} variait de 2,5 à 5,5 \log_{10} et aucune infectivité n'a été observée lors de ces tests (Jacobs & Lin, 2001). Une dernière expérience a testé l'effet du stérilisateur STERRAD sur le HBV du canard. Le HBV du canard séché a été réduit de 7 log et les laparoscopes souillés par du sang contaminé par le HBV du canard n'ont pas transmis le virus après un cycle STERRAD (Jacobs & Lin, 2001).

7.7.3.3. Toxicité

L'utilisation combinée de plasma et de H₂O₂ stérilise rapidement les produits sans laisser de résidus toxiques. Les composants activés se recombinent afin de donner de l'O₂, de l'H₂O et des sous-produits non toxiques (Jacobs & Lin, 2001).

7.7.3.4. Application aux allogreffes

7.7.3.4.1. Os

Kuntz et al. n'ont pu mettre en évidence aucun effet néfaste sur les propriétés biomécaniques de segments d'os corticaux après la stérilisation par plasma de H₂O₂ (Ferreira et al., 2000).

7.7.3.4.2. DBM

L'effet de la stérilisation par plasma de gaz à basse température sur les propriétés ostéo-inductrices de la matrice osseuse déminéralisée a été étudié par Ferreira et al. (2000). Une DBM stérilisée par plasma a été implantée dans les gaines musculaires de 12 rats. Les contrôles négatifs consistaient en une DBM stérilisée au moyen d'un autoclave à vide préalable (vapeur) pendant 36 minutes. Après 9 semaines, les pellets ont été retirés en vue d'un examen morphologique de la formation de cartilage, de l'os lamellaire et de la moelle osseuse. La DBM stérilisée à la vapeur ne contenait pas d'os, de cartilage ou de moelle osseuse nouvellement formés. La DBM stérilisée par plasma contenait uniquement une matrice osseuse inactive, sans formation osseuse ostéo-inductrice. Ferreira et al. (2000) ont conclu que la stérilisation par plasma avait un effet néfaste sur la capacité ostéo-inductrice de la DBM.

7.7.4. Stérilisation/désinfection par rayons UV/impulsions

7.7.4.1. Activité biocide

Les rayons UV dégradent l'ADN et sont toxiques pour les cellules des micro-organismes (Hijnen et al., 2006). Cette propriété est spécifique aux UV-C, avec un maximum à la longueur d'onde de 265 nm. Dans les hôpitaux, la lumière UV est surtout utilisée en raison de ses caractéristiques bactéricides (Reybrouck et al., 2000). Après un laps de temps suffisant, les lampes germicides

tuent tous les germes, pour autant qu'ils ne soient pas protégés contre cette action par de la poussière, de la graisse, du sang, du sérum, etc. Comme toutes les surfaces des salles d'opération ne sont pas exposées directement au rayonnement, la stérilisation est impossible (Reybrouck et al., 2000).

Les micro-organismes à Gram négatif sont plus sensibles au rayonnement UV que les micro-organismes à Gram positif. Il existe des différences au sein du même groupe de micro-organismes, mais aussi entre espèces du même genre (Gomez-Lopez et al., 2005). Leuker et Hingst ont, par exemple, constaté que parmi les micro-organismes à Gram négatif testés, *P. aeruginosa* et *Escherichia coli* étaient plus sensibles à la lumière UV que *Salmonella enteritidis* et *Serratia marcescens* (Gomez-Lopez et al., 2005). Les virus sont beaucoup plus résistants aux UV que les bactéries végétatives (Hijnen et al., 2006). Les spores (de *Bacillus subtilis* et *Clostridium perfringens*) sont nettement moins sensibles aux UV que les cellules bactériennes végétatives et également moins sensibles que les virus (Hijnen et al., 2006). Les ookystes de *Cryptosporidium parvum* sont plus sensibles aux UV que la plupart des virus, mais moins sensibles que les bactéries (Hijnen et al., 2006). La combinaison UV/bêta-propiolactone s'est avérée efficace pour l'inactivation du HBV (Stephan et al., 1981), du HAV (Frösner et al., 1983), du HCV (Prince et al., 1984) et du HIV (Prince et al., 1983) (Blatchley & Peel, 2001).

Le rotavirus, le poliovirus et le virus Coxsackie sont plus résistants au rayonnement UV que le HAV, mais moins que l'adénovirus (Hijnen et al., 2006).

La lumière pulsée intense est une technique relativement nouvelle de décontamination des surfaces et des solutions. Les micro-organismes sont tués au moyen d'impulsions à haute fréquence d'une lumière à spectre large intense, riche en UV-C (Gomez-Lopez et al., 2005). Cette méthode est efficace contre tous les micro-organismes (bactéries, champignons, spores, virus, protozoaires et kystes) (Blatchley & Peel, 2001). En raison de l'intensité maximale élevée de l'impulsion lumineuse et de la possibilité de diffuser de fortes doses d'UV en peu de temps, ce processus est plus efficace que les sources d'UV classiques. Cette lumière peut pénétrer dans les emballages et les solutions (Dunn, 2001). Toutefois, cette technique est encore en cours de développement. Jusqu'à présent, deux grandes applications sont en cours d'élaboration : la désinfection de l'eau et la stérilisation des récipients remplis de manière aseptique (Dunn, 2001). Le rotavirus ($> 4,86 \log_{10}$) et le poliovirus de type 1 ($6,23 \log_{10}$) ont été inactivés par une lumière pulsée intense (PureBright®, PurePulse Technologies, Inc. San Diego (Huffman et al., 2000)). À cet effet, Roberts et Hope ont réalisé une étude au moyen de PureBright®, un traitement en vue de l'inactivation des bactéries dans les produits pharmaceutiques. Ils ont testé son efficacité sur l'inactivation des virus. La présence de protéines dans le substrat a inhibé l'inactivation des virus. Les virus possédant un grand génome seraient les plus sensibles car ils possèdent de nombreuses cibles. Les virus avec un ADN ou ARN double brin seraient plus résistants que les virus à ADN ou ARN monobrin car ils disposent d'un mécanisme de réparation du brin endommagé. Toutefois, d'autres facteurs tels que la proportion du génome codant pour des gènes essentiels, l'emballage du génome, la structure des capsides et la présence d'une enveloppe peuvent influencer l'inactivation. Enfin, l'agrégation virale peut aussi influencer la sensibilité des virus (Roberts & Hope, 2003).

Aucune étude n'a été trouvée dans la littérature en ce qui concerne les applications aux allogreffes tissulaires.

7.7.4.2. Toxicité

Les rayons UV-C ont une action germicide, mais chez certaines personnes exposées, la zone irradiée aux UV présente une kératite et un érythème. Après un temps de latence de 4 à 6 heures, une dose excessive d'UV-C provoque une kératoconjonctivite (Reybrouck et al., 2000).

7.7.4.3. Applications médicales

Le rayonnement UV est utilisé seul, mais plus souvent en association avec la bêta-propiolactone, en vue de la désinfection ou de la « stérilisation à froid » de dérivés ou composés sanguins. Des tentatives sont réalisées afin d'inactiver les virus transmis par le sang tout en préservant l'activité biologique des produits sanguins tels que le plasma humain, le sérum humain et les facteurs de

coagulation. L'activité de l'albumine et des Ig n'est pas modifiée par la combinaison du rayonnement UV et de la bêta-propiolactone (Blatchley & Peel, 2001).

7.7.4.4. Application aux allogreffes

7.7.4.4.1. Os/DBM

Cette technique ne permet pas de savoir avec certitude si les allogreffes sont désinfectées jusqu'en leur centre. Ceci est surtout important pour les allogreffes d'os de grandes dimensions. Des modifications de la réticulation du collagène ont été constatées (Vizarova et al., 1994; Fujimore, 1985) après une exposition d'os/tendons à la lumière UV (Lietman et al., 2000). Urist et al. ont montré que la DBM perd sa capacité ostéo-inductrice après une exposition au rayonnement UV (Glowacki, 2005).

7.7.5. Stérilisation par micro-ondes

7.7.5.1. Activité biocide

Le rayonnement micro-onde s'est avéré efficace pour détruire les bactéries, virus, champignons et parasites (Dunsmuir & Gallacher, 2003). Comme l'eau absorbe les micro-ondes, ce phénomène fait probablement chauffer l'eau dans le cytoplasme des bactéries/virions. Cette augmentation de la température tue probablement le micro-organisme ou inhibe sa capacité à se multiplier (Dunsmuir & Gallacher, 2003).

Sanborn et al. ont étudié l'effet antiviral sur des cultures tissulaires dans des tubes en matière plastique inoculées avec le poliovirus de type 1, le virus para-influenza de type 1 et le bactériophage T4 (succédané pour un virus à ADN). Tous les virus ont été inactivés au cours des trois minutes suivant le traitement par micro-ondes (2,45 GHz). L'inactivation de 4 espèces à Gram négatif et 5 espèces à Gram positif a également nécessité 3 minutes. Les spores de *B. stearothermophilus* ont dû être exposées 5 minutes au rayonnement micro-onde pour être détruites, mais les spores de *B. subtilis* en suspension dans 5 ml d'eau distillée ont nécessité 11 minutes avant d'être inactivées (Sanborn et al., 1982).

7.7.5.2. Application aux allogreffes

7.7.5.2.1. Os

L'effet biomécanique des micro-ondes sur l'os a été étudié par Liebergall et al. à l'aide de fémurs de rats. Un four à micro-ondes (2,45 MHz, 1.500/800 W) a été utilisé pour le traitement hyperthermique (75°C) de fémurs. Les ostéocytes ont effectivement été tués après 60 secondes. Cette mort est survenue avant que les propriétés mécaniques des fragments osseux (résistance à la rupture et rigidité) soient atteintes. Le traitement thermique peut également perturber les propriétés ostéo-inductrices et ostéoconductrices de l'os. Les auteurs ne se prononcent pas à ce sujet (Liebergall et al., 2000).

7.7.6. Irradiation gamma et stérilisation par faisceau d'électrons

7.7.6.1. Irradiation gamma

7.7.6.1.1. Mécanisme d'action

Les rayons gamma sont un paquet d'énergie électromagnétique – un photon. Les rayons gamma sont émis par le noyau d'atomes (radioactifs) instables. En raison de leur énergie élevée, ils peuvent pénétrer dans de nombreuses matières, y compris les tissus humains (EPA, 2011). En général, le cobalt 60, un radio-isotope, est utilisé comme source de rayonnement. À la suite de l'émission de rayons bêta et gamma, le Co-60 devient du nickel, non radioactif (Hansen & Shaffer, 2001).

Une technique (*Sterways Process*) utilise les rayons gamma de manière non contrôlée. Elle consiste à stériliser les virus présents dans les produits sanguins sans inactiver les protéines.

Elle est validée pour les virus avec et sans enveloppe, avec un maintien de 90 % de l'activité des protéines telles que l'inhibiteur de l'alpha-1 protéinase, l'albumine et le fibrinogène (Reid, 1998). Aucune application de cette technique aux allogreffes n'a été trouvée.

7.7.6.1.2. **Activité biocide**

Le rayonnement gamma produit par du Co-60 provoque une modification immédiate de l'acide nucléique, laquelle entraîne un dysfonctionnement et une destruction du génome. La génération de radicaux libres, provenant principalement de l'eau liquide, est un deuxième mécanisme d'action. Ce deuxième effet est inexistant lorsque l'os est lyophilisé ou congelé au moment de l'irradiation. Par conséquent, les os congelés ou lyophilisés nécessitent une dose de rayonnement supérieure pour obtenir le même effet qu'à l'état hydraté (Vangsness et al., 2003).

Bactéries

La réduction du nombre de bactéries/virions après irradiation peut être exprimée en doses D. Il s'agit de la dose de rayonnement (exprimée en MRad ou kGy; 10 kGy = 1 MRad) nécessaire pour obtenir une réduction décimale, c'est-à-dire une réduction de 10 % du nombre initial de bactéries/virions (valeur D₁₀). Une réduction d'un facteur 1*10⁶ a été choisie comme SAL : une réduction de l'infectivité de 6 log₁₀ pour les bactéries, les champignons et les spores est conseillée afin d'atteindre le SAL lors de la stérilisation industrielle des produits médicaux (Pruss, 2004). La plupart des bactéries possèdent une valeur D₆ comprise entre 10 et 20 kGy, mais il existe des bactéries dont la valeur D₆ est de 60 kGy (Angermann & Jepsen, 1991).

La stérilité bactérienne (Tableau 9) peut être obtenue moyennant la détermination de la biocharge, de la radiosensibilité et de la dose de rayonnement (la dose dépend de l'espèce et du nombre de micro-organismes) (Brockbank & Siler, 2001). La présence de protéines (BMP, par exemple) augmente la radiorésistance des bactéries (Hansen & Shaffer, 2001). À quelques exceptions près, les spores bactériennes sont les plus résistantes au rayonnement. Les micro-organismes à Gram négatifs sont les moins résistants, tandis que les moisissures et les levures présentent une résistance intermédiaire (Hansen & Shaffer, 2001). Le rayonnement gamma est très efficace contre les bactéries à des doses de 15 à 25 kGy (Vangsness et al., 2003).

Tableau 9 : Valeur D₁₀ pour les bactéries (Hansen & Shaffer, 2001; Campbell & Li, 1999).

Micro-organisme	Valeur D ₁₀ (kGy)
<i>Escherichia coli</i>	0,31
<i>Enterobacter</i> spp.	0,31
<i>Salmonella</i> spp.	1,10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,16
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,20
<i>Streptococcus faecium</i>	2,80
<i>Campylobacter jejuni</i>	0,23
<i>Bacillus subtilis</i>	0,60
<i>Clostridium sporogenes</i>	1,60
<i>Candida krusei</i>	1,16
<i>Aspergillus niger</i>	0,04

Virus

Pour les **virus**, le rayonnement offre moins facilement une garantie (Brockbank & Siler, 2001). Les virus sont les micro-organismes les plus résistants aux rayons gamma. Pour l'inactivation de la plupart des virus (y compris le HIV), au moins 30 kGy (10 kGy = 1 Mrad) sont nécessaires (Brockbank & Siler, 2001; Fideler et al., 1994). Des valeurs D₁₀ jusqu'à 13 kGy pour certains petits virus ont été rapportées. Pour le HIV, des doses d'inactivation de 10 à 40 kGy ont été obtenues (Brockbank & Siler, 2001). Toutefois, la dose nécessaire pour obtenir un SAL de 10⁻⁶

est de 89 kGy en ce qui concerne le HIV. Cette dose excède la dose de routine recommandée pour la stérilisation des greffes osseuses (de 10 à 35 kGy). Cette dose élevée (89 kGy) entraînera la destruction de la greffe (Sofer, 2002; Campbell & Li, 1999). Afin d'atteindre une sécurité optimale, la plupart des banques de tissus intègrent différents traitements antiviraux dans leurs procédures (Brockbank & Siler, 2001).

Chaque étape d'inactivation antivirale dépend de la concentration, du temps et de la température. En outre, le degré d'infection virale varie d'un donneur à l'autre, selon la biocharge, la durée de l'exposition au virus et l'efficacité de la réponse immunitaire du donneur. La stérilisation des tissus d'un donneur peut donc nécessiter une dose de rayons plus ou moins élevée que celle des tissus d'un autre donneur infecté par le même virus (Brockbank & Siler, 2001).

7.7.6.1.3. Calcul de la dose pour les allogreffes

L'Agence internationale de l'Énergie atomique (AIEA) recommande une dose de **25 kGy** afin d'obtenir un SAL de 10^{-6} si la biocharge est d'environ 1.000 UFC par allogreffe et si la distribution de la résistance est standard (AIEA, 2004). En 2005, l'AIEA a publié un *Code of Practice for the Radiation sterilization of Tissue Allografts*. La dose de stérilisation peut être nettement inférieure à 25 kGy pour les allogreffes produites selon les procédures contrôlées standard (qui donnent lieu à une biocharge plus faible) (Nguyen et al., 2007). En France, cette dose de 25 kGy est utilisée; les modifications des propriétés biomécaniques de l'os étant peu importantes si tout surdosage de rayons est évitée (Loty et al., 1991). En Pologne, des rayons ionisants sont presque toujours utilisés pour stériliser les tissus. Une dose de 35 kGy provenant de Co-60 est généralement utilisée pour tous les tissus (ligaments, cartilage, os, sclérotique, péricarde, peau, derme acellulaire et amnios, par exemple) (Dziedzic-Goclawska et al., 2005). Des dosimètres sont utilisés pour confirmer la dose fournie par le rayonnement gamma. Il est très difficile d'atteindre un processus paramétrique avec le rayonnement gamma, en raison de la grande variabilité des produits présents à tout instant dans le champ de rayonnement. La variété et la densité des produits possèdent un impact sur la dose fournie aux autres produits qui ne se trouvent pas à proximité immédiate de l'isotope (Hansen & Shaffert, 2001). 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'arnios, le péricarde et les tendons peuvent être stérilisés facilement au moyen de cette technique. Comme la densité moyenne d'une greffe osseuse est supérieure (2 g/cm^3), l'épaisseur acceptable d'une greffe d'os cortical exposée au rayonnement gamma est d'environ 10 à 15 cm (Dziedzic-Goclawska et al., 2005).

7.7.6.2. Stérilisation par faisceau d'électrons

Comme la technique du faisceau d'électrons est bidirectionnelle, l'application du rayonnement peut être davantage contrôlée que dans le cas du rayonnement gamma (cf. Tableau 10) (Hansen & Shaffer, 2001). Comme les allogreffes humaines sont de composition hétérogène, elles doivent être répertoriées afin de déterminer la distribution de la dose nécessaire.

La durée d'exposition d'un lot de produits est de 1 à 2 heures au maximum, en raison de la dose élevée atteinte dans le générateur du faisceau d'électrons. Les points de contrôle critiques du processus peuvent être contrôlés de manière paramétrique afin de déterminer si le processus se déroule dans les limites spécifiées sans que des dosimètres soient nécessaires. Lors du traitement par faisceau d'électrons, un système de validation paramétrique peut être utilisé, car tous les aspects du processus peuvent être surveillés et contrôlés de manière indépendante. Le faisceau d'électrons ne permet de traiter qu'un seul produit se trouvant en permanence devant le faisceau (Hansen & Shaffer, 2001). 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 au faisceau d'électrons est de 3 cm (Dziedzic-Goclawska et al., 2005). En Pologne, le rayonnement gamma ou la stérilisation par faisceau d'électrons avec un accélérateur de 10 MeV est utilisé pour tous les tissus (Dziedzic-Goclawska et al., 2005).

Tableau 10 : Comparaison du rayonnement gamma et de la stérilisation par faisceau d'électrons (Hansen & Shaffer, 2001).

	Coût d'installation	Durée du traitement	Validation paramétrique (contrôle critique du processus possible)	Application contrôlée du rayonnement	Capacité de pénétration
Rayonnement gamma d'isotopes	Élevé	Heures	-	+	++
Faisceau d'électrons	Faible	Secondes	+	++	+

7.7.6.3. Toxicité des rayons gamma et du faisceau d'électrons

Le rayonnement ionisant libère de l'ozone dans l'environnement. L'ozone est irritant pour les muqueuses. Les générateurs de rayons gamma produisent plus d'ozone que les générateurs d'un faisceau d'électrons (Hansen & Shaffer, 2001). La cytotoxicité des lipides médullaires sur les cellules *osteoblast-like* et *fibroblast-like* a été étudiée par Dziedzic-Goclawska et al. (2005). L'os a été irradié au moyen de 35 kGy dans une source de Co-60 et d'un faisceau d'électrons 10 MeV à température ambiante et à -72°C. Aucune cytotoxicité n'a été constatée sur les os traités au moyen du faisceau d'électrons. À température ambiante, les rayons gamma induisent une toxicité pour les cellules *osteoblast-like* et *fibroblast-like* (Dziedzic-Goclawska et al., 2005). Autour des zones de disques osseux non dégraissés soumises au rayonnement gamma, la mort des cellules *osteoblast-like* a augmenté. Ce n'était pas le cas sur les disques d'os dégraissés soumis au rayonnement gamma (Moreau et al., 2000).

7.7.6.4. Application aux allogreffes

Dans le passé, le rayonnement gamma a été associé à des infections liées aux allogreffes (résultats non publiés du CDC) (Kainer et al., 2004). Selon d'autres auteurs, l'os stérilisé par rayonnement gamma n'aurait été à l'origine d'aucune transmission connue d'agents pathogènes (Kainer et al., 2004). L'irradiation gamma de l'os et des tissus mous modifie la structure collagénique, réduit la résistance à la traction et inactive les BMPs (Angermann & Jepsen, 1991).

7.7.6.4.1. Peau

Inconvénients

Le rayonnement ionisant possède deux effets possibles sur la structure macromoléculaire de la matrice cutanée. Premièrement, des fissures surviennent sur les liaisons et affaiblissent la matrice. Deuxièmement, en présence d'eau, des réticulations peuvent apparaître en raison des nouvelles liaisons formées entre les radicaux libres apparus. Ces réticulations rendent la matrice rigide (Kearny, 1998). Selon Ghosh et al., le rayonnement a provoqué d'importants dommages structuraux à la peau (Huang et al., 2004). Comme la peau irradiée est rigide, l'adhérence et le *take rate* du greffon de peau sont réduits (Huang et al., 2003).

7.7.6.4.2. Os

Dziedzic-Goclawska et al. (2005) ont étudié l'effet de différentes méthodes de préservation et différentes conditions d'irradiation sur les propriétés ostéo-inductrices et biomécaniques de l'os. Les dommages induits par le rayonnement se sont avérés dépendants de ce qui suit :

- 1) Conditions du rayonnement (température, dose) : selon les constatations, les os irradiés, qu'ils soient lyophilisés ou congelés, ont bien été incorporés, mais le remodelage était

supérieur et les propriétés ostéo-inductrices étaient meilleures sur les os congelés (Dziedzic-Goclawska et al., 2005).

- 2) L'état physique des greffes : la présence d'eau et d'oxygène est importante pour l'efficacité de la stérilisation. En l'absence d'eau (en cas de lyophilisation, par exemple), la résistance des micro-organismes augmente. En général, la capacité de remodelage des allogreffes congelées irradiées est supérieure à celle des allogreffes lyophilisées irradiées, bien que les deux types s'incorporent bien (Dziedzic-Goclawska et al., 2005).
- 3) La solubilité du collagène de l'os lyophilisé était élevée lors de l'irradiation par 35 kGy à température ambiante. Elle était moins marquée à -72°C. Les greffes congelées (irradiation à -72°C) et l'os frais à température ambiante présentaient une solubilité faible du collagène (Bettin et al., 1999). Les os lyophilisés irradiés (à température ambiante) se sont résorbés et n'ont pas induit d'ostéogenèse. Dans les échantillons secs, les composés polypeptiques sont brisés par le rayonnement ionisant, lequel accroît la solubilité du collagène. En revanche, les os congelés (-72°C) et les os frais (température ambiante) irradiés ont induit une ostéogenèse (Dziedzic-Goclawska et al., 2005).

Avantages

Selon les résultats de culture de tissus obtenus lors de la procédure de prélèvement, il est possible d'opter pour un **traitement aseptique** et de traiter au préalable les os à l'aide d'une dose faible (10-18 kGy) de rayons gamma. Les micro-organismes présents à la surface des greffes osseuses seront ainsi détruits, ce qui réduira la biocharge. Cette méthode ne porte pas atteinte à la résistance des greffes ni à leur incorporation. Toutefois, l'irradiation de plus grandes greffes structurales, même à une dose plus faible (10-30 kGy), est associée à un risque supérieur de fractures (Vehmeijer, 2002; Lietman et al., 2000).

Le rayonnement gamma peut également être utilisé pour la **stérilisation terminale**. Une dose jusqu'à 30 kGy est nécessaire pour détruire la totalité des bactéries et virus. Toutefois, cette dose atténue les propriétés biomécaniques des différents types de greffes et réduit l'ostéo-induction (Vehmeijer, 2002). L'irradiation gamma d'allogreffes osseuses non dégraissées entraîne une destruction des ostéoblastes (Moreau et al., 2000). Tosello, en revanche, a montré que des doses comprises entre 25 et 50 kGy ne portaient pas atteinte aux propriétés biomécaniques de l'os (Pruß et al., 2002). Lietman et al. (2000) n'ont pas observé d'augmentation de la fréquence des non-unions chez les patients qui avaient reçu une allogreffe irradiée, par rapport aux patients qui avaient reçu une allogreffe non irradiée. Ils en ont conclu qu'un rayonnement de 10 à 30 kGy n'avait pas d'impact sur le potentiel ostéo-inducteur et ostéoconducteur des greffes (contrairement au degré de résistance à la fracture).

Grieb et al. (2005) 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. Ce traitement protecteur n'a pas entraîné de modifications des **propriétés biomécaniques** (module d'élasticité et résistance à la compression) par rapport aux os de contrôle non irradiés. Notons qu'il s'agit ici des propriétés biomécaniques avant l'implantation, lesquelles ne permettent pas de se prononcer sur les fonctionnalités biomécaniques à long terme, nécessaires pour évaluer leur efficacité clinique (même degré d'ostéo-intégration après l'implantation ?) (Grieb et al., 2005; Grieb et al., 2006). Le parvovirus porcine comme virus modèle pour le parvovirus B19 et le HAV ont été inactivés à raison de 5 log₁₀. Le virus Sindbis comme succédané pour le HIV et le HCV ont été réduits de 4,9 log₁₀. Aucun effet de protection virale (pour chacun des pathogènes étudiés) n'a été observé sur la matrice osseuse traitée au moyen d'un radioprotecteur. La solution radioprotectrice n'a montré aucun effet cytotoxique sur 3 lignées cellulaires (Grieb et al., 2005).

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 +/- 5°C) a été nécessaire afin d'obtenir une réduction de 4 log₁₀. 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 afin d'obtenir un niveau élevé de sécurité. Cette recommandation est valable uniquement à des températures de -30°C, car l'infectivité virale est associée à la température pendant l'irradiation (Pruß et al., 2002).

Inconvénients

Campbell et Li ont calculé qu'une dose de rayonnement de 89 kGy est nécessaire pour obtenir un SAL de 10⁻⁶. Cette dose est supérieure à la dose recommandée pour les produits médicinaux et à la pratique actuelle dans de nombreuses banques de tissus. Elle provoquerait des dommages aux allogreffes. Par conséquent, selon Campbell et Li (1999), le rayonnement gamma ne convient pas en vue de l'inactivation des virus dans les allogreffes.

Le rayonnement gamma peut porter atteinte à la capacité **ostéo-inductrice** des greffes osseuses et réduit la **résistance à la flexion**. Si l'os était lyophilisé avant l'irradiation, les effets néfastes du rayonnement sont encore plus marqués (Brockbank & Siler, 2001; Veen, 2001). Pelker et al., Shelton et al. et Bright et al. ont montré que l'os cortical subit une perte significative de résistance à la flexion et de torsion s'il est exposé à plus de 30 kGy (Vangsness et al., 2003).

Une incidence accrue des fractures a été observée parmi les greffes osseuses irradiées, par rapport aux greffes osseuses non irradiées. Ces fractures n'étaient pas imputables à une modification des propriétés ostéo-inductrices mais à une modification des propriétés mécaniques. Mitchell et al. ont testé la résistance d'os corticaux humains exposés à un rayonnement gamma face à la propagation d'une **fracture de fatigue**. Le développement des fissures osseuses a été imité de manière expérimentale dans des conditions de charge cycliques. L'os soumis à un rayonnement gamma (31,7 kGy) a présenté une réduction significative de sa résistance à l'apparition d'une déchirure de fatigue. Ce fait serait dû aux modifications structurales du tissu osseux sous l'influence du rayonnement gamma et pas aux modifications de la composition minérale ou organique de l'os. Des doses de rayonnement de 70 kGy dégradent jusqu'à 40 % des chaînes de collagène. Ces modifications ultrastructurales ont été corrélées avec la diminution de la résistance aux fractures (test de flexion trois-points). Par conséquent, les os soumis au rayonnement gamma peuvent être davantage prédisposés aux fractures dans des conditions de charge quotidienne ordinaires (Mitchell et al., 2004).

Le mécanisme d'endommagement du collagène osseux par les rayons gamma n'est pas bien connu, mais on suppose qu'il résulterait de la formation de **radicaux libres** (Akkus et al., 2005). L'irradiation de phosphates de calcium entraîne également la formation de radicaux libres stables, dont on suppose qu'ils jouent un rôle important dans la décomposition et l'endommagement de l'os à la suite de l'irradiation (Angermann & Jepsen, 1991). Akkus et al. ont donc tenté de capturer ces radicaux libres au moyen de **thio-urée** 1,5 M (CH₄N₂S, 76,12 Da). Les fragments osseux ont été irradiés (36,4 kGy en moyenne) avec et sans traitement préalable à la thio-urée. Des fragments osseux de contrôle traités et non traités à la thio-urée ont été utilisés. L'effet de la thio-urée sur les propriétés mécaniques des fragments osseux irradiés a montré que la capacité à la déformation après l'irradiation, l'énergie jusqu'à la fracture et la fatigabilité étaient plus de deux fois supérieures à celles des fragments osseux irradiés non traités. Toutefois, la thio-urée ne possédait pas un effet radioprotecteur suffisant pour amener les propriétés mécaniques au niveau de celles des os non irradiés. Les fragments osseux traités à la thio-urée avaient subi des dommages, la structure collagénique étant rompue. L'endommagement de la structure peptidique du collagène (Hamer et al., 1999) et la diminution de la densité de la réticulation intramoléculaire (Colwell et al., 1996) avaient déjà été constatées dans le cortex fémoral exposé au rayonnement gamma (Akkus et al., 2005). Comme la thio-urée réduit les dommages subis par le collagène, la résistance mécanique de l'os irradié est mieux conservée. Une autre solution consiste à irradier les os à basse température (-78°C). Les

dommages subis par le collagène sont alors moindres car la mobilité des molécules d'eau à l'état solide est limitée (Akkus et al., 2005).

Soulignons que Grieb et al. n'ont pas observé d'effets biomécaniques préjudiciables (résistance à la compression et module d'élasticité) en association avec un traitement de protection (Clearant Process[®]) des os avant leur irradiation au moyen de 50 kGy (Vangsness, 2004; Grieb et al., 2005). Ce Clearant Process[®] (Clearant Inc., Los Angeles) minimise les effets nocifs du rayonnement émis par du Co-60, grâce à

- Un traitement préalable par une solution radioprotectrice biocompatible (propylène glycol, diméthyl sulfoxyde, mannitol, tréhalose) qui minimise les effets des radicaux libres;
- La lyophilisation de l'os jusqu'à une humidité résiduelle optimale de manière à ce qu'il reste encore de l'oxygène afin d'augmenter l'effet nocif des rayons sur les micro-organismes;
- Une irradiation à basse température (-65°C) qui limite la diffusion des radicaux libres;
- L'emballage des greffes dans une configuration garantissant une distribution étroite de la dose et la préservation des basses températures pendant l'irradiation.

L'irradiation proprement dite a lieu à une dose de 50 kGy. Les cales iliaques traitées au moyen du Clearant Process[®] (3.298 ± 1.302 N) ont pu résister à une charge similaire à celle des cales non irradiées (3.192 ± 946 N). Aucune différence significative de la capacité à supporter la charge n'a été observée entre les étais corticaux irradiés et non irradiés. Tant les os congelés frais que les os traités par Clearant[®] étaient ostéo-conducteurs et présentaient une cicatrisation osseuse d'apparence normale (Hollinger et al., 2004).

7.7.6.4.3. DBM

Les doses supérieures à 10 kGy réduisent fortement la capacité ostéo-inductrice des greffes de DBM; à une dose supérieure de 30 kGy, cette capacité serait totalement détruite (Hallfeldt et al., 1995; Kearny & Lomas, 2004). Urist a affirmé, en revanche, que 80 % de la capacité ostéo-inductrice de la DBM étaient conservés à une dose de 40 kGy avec le Co-60 (Tomford et al., 1983). Selon Hallfeldt et al. (1995) également, la DBM irradiée par 25 kGy amorce une excellente ostéogenèse.

7.7.6.4.4. Tendons

Inconvénients

Les études relatives à l'effet du rayonnement gamma sur les tendons sont contradictoires : certaines mettent en évidence une diminution de la résistance, tandis que d'autres ne constatent aucun effet négatif (Brockbank & Siler, 2001).

Salehpour et al. (1995) ont observé une réduction des propriétés mécaniques lors de l'irradiation de 10 allogreffes os-rotule-os de chèvre au moyen de 4 Mrad. La résistance maximale a ainsi diminué de 46 % et la rigidité de 18 %. Les propriétés de la matière ont également été modifiées : une réduction de 37 % à la tension maximale et une réduction de 8 % dans le module ont été mises en évidence, par rapport aux allogreffes de contrôle non irradiées. La densité des réticulations dans le collagène a diminué de manière significative lors d'une irradiation au moyen de 60 kGy.

Bogdansky (2004) a rapporté une étude comparative de 0 kGy avec 15 kGy et 25 kGy sur des allogreffes os-rotule-os. Aucune différence n'a été mise en évidence en ce qui concerne les propriétés biomécaniques des allogreffes lors de la comparaison de 0 kGy et 15 kGy. Toutefois, avec une dose de 25 kGy, la charge maximale, la tension maximale et la rigidité des allogreffes ont diminué. L'entreprise Allosource (États-Unis) stérilise (SAL de 10^{-6}) les allogreffes de tissus mous au moyen de 10-15 kGy de rayons gamma, avec préservation des propriétés biomécaniques.

Fideler a montré que les allogreffes os-rotule-os perdent leurs propriétés structurales lorsqu'elles sont exposées à plus de 20 kGy (Vangsness et al., 2003).

Une autre étude s'est penchée sur les propriétés mécaniques après une charge cyclique dynamique d'allogreffes os-rotule-os soumises à un rayonnement gamma de 20 kGy. Les greffes irradiées s'allongeaient de 27 % de plus que les greffes non traitées après 1.000 cycles de 250 N. La charge à l'échec était de 1.965 N pour les greffes irradiées, contre 2.457 N pour les greffes non irradiées, soit une diminution de 20 % de la résistance des allogreffes irradiées (Curran et al., 2004). Hernigou et al. ont évalué les greffes lyophilisées avant ou après l'irradiation par 20 kGy. La lyophilisation avant irradiation a entraîné une diminution de 75 % de la résistance, tandis que les greffes lyophilisées après irradiation ont présenté une réduction de 25 % de la résistance. Cette étude conclut que dans certaines circonstances, il peut être préférable d'utiliser des greffes non irradiées (Curran et al., 2004).

Grieb et al. ont étudié l'atteinte de l'intégrité mécanique, après ou avant implantation, de greffes du semi-tendineux traitées au préalable au moyen d'un radioprotecteur, puis irradiées avec 50 kGy (à basse température). Le traitement protecteur consistait en l'application de propylène glycol, diméthyl sulfoxyde, mannitol, tréhalose pendant 4 heures, sous sonication (Grieb et al., 2006). Les contrôles étaient des tendons non irradiés et des tendons soumis à un rayonnement de 18 kGy au moyen d'une méthode existante. Des tissus broyés ont étéensemencés au moyen de *Clostridium sordellii*, du parvovirus porcin ou du virus Sindbis. Les propriétés biomécaniques des tendons ont été testées. Les pathogènes ont été inactivés à raison de 4,5 log₁₀ pour le virus Sindbis, 4,9 log₁₀ pour le parvovirus et plus de 8 log₁₀ pour *Clostridium sordellii*. Le radioprotecteur n'a eu aucun effet sur l'inactivation des pathogènes. Les tendons irradiés avec 50 kGy ont présenté d'excellentes propriétés biomécaniques (Grieb et al., 2006).

Gorschewsky et al. ont suivi des patients qui avaient reçu soit un tendon rotulien traité par Tutoplast (dégraissage, traitement osmotique, oxydation, acétone et irradiation par 15 kGy), soit une autogreffe. Après 6 ans, une rupture était survenue chez 38/186 (44,7 %) patients ayant reçu une greffe traitée par Tutoplast et chez seulement 6/186 (5,9 %) patients ayant reçu une autogreffe. L'irradiation ou la combinaison d'acétone et de l'irradiation est une raison possible de ce taux d'échec plus élevé (Gorschewsky et al., 2005).

7.7.6.4.5. Cornée et sclérotique

La stérilisation au moyen de rayons est impossible pour la cornée, car le tissu devient impropre à une transplantation (Holland & Wilhelmus, 2003). La sclérotique, en revanche, peut être préservée par une lyophilisation suivie d'un rayonnement ionisant (CSS 8293, 2007).

7.7.6.4.6. Valves cardiaques

Plusieurs auteurs ont confirmé que les rayons gamma étaient nocifs pour les performances des valves, de sorte que ceux-ci ont été complètement abandonnés. Les valves sont désormais principalement conservées par cryopréservation (Brockbank & Siler, 2001).

D'autres essais afin d'irradier les valves cardiaques ont été associés à une perte cellulaire et une détérioration structurale de la valve cardiaque (Jashari et al., 2004; Leeming et al., 2005). En outre, des études de suivi à long terme ont montré que la viabilité cellulaire est nécessaire pour la survie des greffes valvulaires (Leeming et al., 2005).

7.8. TECHNIQUES DE PRESERVATION

7.8.1. Congélation

La congélation est une méthode utilisée depuis longtemps pour conserver le tissu osseux et collagénique, comme méthode de préservation unique ou avant la lyophilisation. La température de congélation recommandée pour la conservation de longue durée des allogreffes d'os, de tendons, et de cartilage est inférieure à -40°C. À cette température, ces allogreffes peuvent être conservées jusqu'à 5 ans (CSS 8694, 2011). Une température de -20°C est jugée acceptable pour la conservation de tissus à court terme (1 mois). La congélation ne réduit pas les propriétés mécaniques des ligaments. Elle réduirait l'immunogénicité d'une greffe (Vehmeijer, 2002).

Toutefois, même aux températures les plus basses, la congélation ne permet pas une stérilisation des tissus (Angermann & Jepsen, 1991).

Bien que des études *in vitro* aient suggéré que la congélation puisse réduire le risque de transmission du HIV via les os et tendons infectés, d'autres études expérimentales et rapports cliniques ont documenté une transmission *in vivo* après transplantation d'os et tendons infectés congelés à une température atteignant -70°C (Favero & Bond, 2001; Crawford et al., 2004).

En l'absence d'agents cryoprotecteurs et de refroidissement contrôlé, la congélation tue toutes les cellules mammaliennes vivantes. Toutefois, les virus survivent à ce traitement. Buck et al. ont étudié si le HIV pouvait survivre à la mort de ses cellules-hôtes dans l'os et si le HIV extracellulaire entouré d'os pouvait survivre. De petits fragments de différents tissus ont été prélevés chez 5 individus décédés du SIDA. Un gramme de ces tissus a été broyé et placé dans des flacons de culture virale contenant le milieu de culture CMRL-1415 et 10 % de sérum de veau. Après congélation pendant 17 semaines, les tissus osseux et tendineux de ces donneurs ont de nouveau été mis en culture. Le HIV a été cultivé à partir de trois des cinq cultures d'échantillons d'os frais et de deux des quatre cultures d'échantillons de tendons frais provenant de donneurs positifs pour les Ac anti-HIV. Lorsque les échantillons congelés de ces donneurs ont été mis en culture, un seul échantillon d'os a permis de cultiver le HIV. Buck et al. ont conclu que cette étude montre que le HIV peut être isolé à partir de cultures d'os et de tendons de personnes positives pour le HIV. La congélation fait tomber la possibilité d'isoler le HIV de trois à une en ce qui concerne l'os et de deux à zéro en ce qui concerne les tendons. Comme la congélation réduit la capacité de culture du HIV, il a été supposé qu'elle réduit la charge virale (Buck et al., 1990; Asselmeier et al., 1993). L'étude de Salzman et al. a montré également que le HIV est inactivé par congélation. Des cycles multiples de congélation et décongélation provoquent des dommages cellulaires et une lyse. Par conséquent, l'ADN proviral ne peut pas survivre à cette mort cellulaire. L'Ag p24 et la RT (paramètres infectieux) n'ont pas été détectés dans les fragments osseux. Toutefois, la PCR a permis de mettre en évidence de petites quantités d'ADN proviral (Salzman et al., 1993).

Nemzek et al. ont étudié la transmission du virus de la leucémie féline via les os longs de 4 chats infectés. Des greffes d'os cortical et des greffes d'os cortical-spongieux ont été implantées chez des chats sains après un traitement par

- i) un cycle unique de congélation/décongélation;
- ii) un cycle double de congélation/décongélation ou
- iii) un cycle double de congélation/décongélation avec rinçage à l'eau afin d'éliminer la moelle osseuse.

Les chats ayant reçu la transplantation ont été suivis chaque semaine au moyen d'un test ELISA afin de détecter les Ag viraux ou d'une immunofluorescence sur cellules vivantes afin de détecter les Ac antiviraux. Toutes les allogreffes d'os cortical et d'os cortical-spongieux ont donné lieu à la transmission du virus au cours des deux semaines suivant la transplantation, dans les trois groupes de traitement. Selon cette étude, la congélation ne convient donc pas en vue de l'inactivation du HIV (Nemzek et al., 1996).

7.8.2. Cryopréservation

La cryoconservation doit avoir lieu selon une méthode validée (congélation immédiate ou technique de congélation contrôlée). Le matériel peut ensuite être conservé à une température de -40°C ou moins, pendant 5 ans au maximum après le prélèvement (CSS 8694, 2011).

La peau concernée doit être refroidie jusqu'à une température de -196°C, en association avec du glycérol à 30 % comme agent cryoprotecteur. L'intégrité fonctionnelle de l'allogreffe est ainsi conservée. Toutefois, cette technique n'inactive pas le HIV-1 (Pirnay et al., 1997).

Pour le cartilage et les chondrocytes, le diméthyl sulfoxyde (DMSO) est conseillé comme cryoprotecteur (CSS 8694, 2011).

La cryoconservation des tissus tendineux provoque des modifications histologiques qui, toutefois, n'entraînent pas de variations significatives des propriétés mécaniques (CSS 8694, 2011).

La cryoconservation est une méthode également employée pour conserver les virus à long terme. Pour ce faire, des températures de -70°C à -196°C sont utilisées. Du glycérol à 2-55 %, du DMSO ou du sucrose peuvent être utilisés comme agents de cryoconservation dans ce cadre; ces substances protègent les micro-organismes contre le dépérissement (Hubaleck, 2003).

7.8.2.1. Application aux allogreffes de peau

Van Baare et al. ont étudié si le HIV-1 présent dans la peau cadavérique pouvait être inactivé par la cryoconservation (van Baare et al., 1998). La cryoconservation n'a pas permis d'inactiver le HIV-1 ni extracellulaire ni intracellulaire (van Baare et al., 1998).

7.8.3. Lyophilisation

7.8.3.1. Mécanisme d'action/activité biocide

La lyophilisation est une méthode populaire et très satisfaisante de conservation des allogreffes osseuses, mais aussi du tissu collagénique, y compris des ligaments (Favero & Bond, 2001; Crawford et al., 2004; Uhlenhaut et al., 2005). Il s'agit d'un processus de déshydratation. Après congélation du matériel, la pression ambiante est réduite (vide) et une chaleur suffisante est ajoutée afin de sublimer de l'état solide à l'état gazeux l'eau congelée dans le matériel. Les greffes peuvent ainsi être conservées jusqu'à cinq ans à température ambiante. Cette technique porte atteinte à la résistance mécanique du matériel et est donc moins/pas appropriée pour les greffes osseuses de grandes dimensions et les tendons (Vehmeijer, 2002; Vangsnæs et al., 2003; Crawford et al., 2004; Uhlenhaut et al., 2005).

La lyophilisation ne suffit pas comme méthode d'inactivation virale pour les greffes musculo-squelettiques, car une infectivité résiduelle a pu être mise en évidence dans des modèles expérimentaux pour des virus avec ou sans enveloppe (Vangsnæs et al., 2003; Crawford et al., 2004; Uhlenhaut et al., 2005). Buck et al. ont cultivé des fragments de tissu de 5 patients décédés du SIDA. Les échantillons osseux ont été lyophilisés après 17 semaines de congélation. Les os lyophilisés ont été réhydratés dans des milieux de culture et ont ensuite été mélangés avec des cellules cibles en vue d'une culture conjointe. Toutes les cultures d'os lyophilisés ont produit le HIV. La lyophilisation ne permet donc pas d'inactiver le HIV (Buck et al., 1990).

7.8.3.2. Application aux allogreffes

7.8.3.2.1. Os

Lors d'une étude de Schena et al., la lyophilisation s'est avérée avoir un effet néfaste sur la stabilité mécanique et l'incorporation des greffes osseuses (Ferreira et al., 2000). Nahter et al. ont montré au moyen d'un modèle chat que les allogreffes corticales lyophilisées étaient significativement plus faibles que les allogreffes corticales congelées, avec une résistance à la torsion de 12 % au maximum (contre 64 % pour les allogreffes congelées) (Nather et al., 2004). La lyophilisation ne porte pas atteinte à la capacité ostéo-inductrice du tissu osseux (Vehmeijer, 2002). La lyophilisation est moins immunogène que l'os congelé frais et s'incorpore mieux que l'os congelé, selon Friedlaender (1983) et Heiple et al. (1963) (Angermann & Jepsen, 1991).

Un homme de 58 ans ayant reçu un greffon osseux lyophilisé provenant d'un donneur toxicomane a développé le SIDA. Le donneur n'avait pas été testé pour le HIV (1985). Au moins deux des douze autres receveurs de l'os de ce donneur sont décédés du SIDA (van Baare et al., 1998; Karcher, 1997). Un autre donneur de foie, reins, cœur, os et tissus mous a transmis le HIV aux receveurs d'organe et à trois des quatre receveurs d'allogreffes osseuses congelées. Trente-deux receveurs d'os lyophilisés ont été testés et se sont avérés négatifs. Il en a été conclu que la lyophilisation joue un rôle dans l'inactivation du HIV dans le tissu osseux. Les tests sériques du donneur étaient négatifs pour le HIV (Buck & Malinin, 1994). Cette étude ne permet pas de déterminer si l'absence de transmission du HIV était due au traitement du tissu ou à la nature du tissu. Toutefois, le HIV se concentre dans les leucocytes et les greffes lyophilisées sont

relativement hypocellulaires par rapport aux greffes congelées fraîches. Un facteur ou une combinaison de facteurs était probablement à l'origine de la réduction de la charge virale jusqu'au niveau sous-infectieux (Asselmeier et al., 1993).

Uhlenhaut et al. ont étudié l'inactivation quantitative de virus pertinents lorsque l'os est lyophilisé. Il s'agissait du virus Maus-Elberfeld, du parvovirus porcine et du virus de la stomatite vésiculaire. Deux cm³ de matrice osseuse ont été inoculés au moyen de ces virus, puis lyophilisés. Les titres de parvovirus n'avaient pas diminué de manière significative, tandis qu'une réduction de 3 à 7 log₁₀ a pu être obtenue pour les autres virus. Uhlenhaut et al. ont conclu que la lyophilisation ne suffit pas pour obtenir une allogreffe sûre (Uhlenhaut et al., 2005). Crawford et al. ont réalisé une étude qualitative similaire (détection de l'Ag p24 et de l'ADN proviral au moyen de la RT-PCR) sur des os et tendons lyophilisés. Ils ont inoculé le virus de la leucémie féline dans ces tissus. L'infectivité n'a pas été supprimée par la lyophilisation. La mesure dans laquelle l'infectivité a été réduite n'a pas été déterminée (Crawford et al., 2004).

7.8.3.2.2. Tendons

La lyophilisation est également utilisée pour la conservation des ligaments. Après congélation, les tendons sont lyophilisés jusqu'à une humidité résiduelle de moins de 5 %. Bien que la couleur et la résistance des tissus soient modifiées par la lyophilisation, des études n'ont mis en évidence aucun effet négatif sur le résultat clinique des reconstructions ligamentaires, tandis que d'autres estiment que l'intégrité structurale et les propriétés matérielles du collagène sont atténuées par la lyophilisation (Vangsness et al., 2003; Barbour & King, 2003).

En 1992, le cas d'un donneur infecté par le HIV-1 dont 4 fragments tendineux lyophilisés ont néanmoins été transplantés à plusieurs receveurs a été décrit. Après élimination du tissu résiduel excédentaire, les tendons ont été traités à la bacitracine et au sulfate de polymyxine B, irrigués à l'eau, emballés et congelés à -80°C. Ensuite, les tendons ont été lyophilisés jusqu'à une humidité résiduelle inférieure à 5 %. Aucun de ces tendons n'a transmis le HIV au receveur (Simonds et al., 1992).

7.8.4. Glycérol

7.8.4.1. Mécanisme d'action

Le glycérol en forte concentration agit comme un agent lyophilisant chimique (Kearny, 1998). Le glycérol élimine l'humidité des tissus et tue les cellules (van Baare et al., 1998). Le glycérol préserverait la structure des tissus et des cellules et réduirait l'antigénicité du tissu (van Baare et al., 1998).

La procédure de conservation des tissus dans le glycérol se compose d'étapes graduelles. Après nettoyage des greffes à l'eau physiologique stérile à 0,9 %, les tissus sont transférés consécutivement dans du glycérol à une concentration de 50 %, (éventuellement 75 %) et de 85 %. Ce processus a lieu sous agitation dans un agitateur (De Backere, 1994).

7.8.4.2. Activité biocide

Le glycérol possède un effet antimicrobien limité (van Baare et al., 1998; De Backere, 1994). C'est un antibactérien à action extrêmement lente (Kearny, 1998). L'effet antiviral du glycérol a été décrit par Marshall et al. (1995). Van Baare et al. (1998) ont attiré l'attention sur le fait que des espèces différentes possèdent une sensibilité différente au glycérol. Dans l'ensemble, les micro-organismes à Gram négatif sont éliminés plus rapidement que les micro-organismes à Gram positif de la peau préservée au moyen de glycérol (van Baare et al., 1998).

Outre la concentration du glycérol, la température d'incubation dans le glycérol joue un rôle important dans cet effet biocide (Marshall et al., 1995).

7.8.4.3. Application aux allogreffes

7.8.4.3.1. Peau

Pour la conservation à long terme de peau non vivante, la procédure de la glycérolisation peut être appliquée. Le glycérol pénètre dans la peau. Par conséquent, l'eau est éliminée des cellules (Ross & Kearny, 2004). La plupart des banques de tissus l'utilisent dans une concentration de 85 %, car la concentration de 98 % utilisée autrefois rend difficile la réhydratation de la peau (Kearny, 1998).

Marshall et al. (1995) ont montré que le HSV-1 intracellulaire (cultivé dans des fibroblastes dermiques humains) n'est pas inactivé après 4 semaines de conservation à 4°C dans du glycérol à 85 %, mais l'est après une semaine à 20°C dans du glycérol à 85 %. Le glycérol à 85 % n'a pas permis d'inactiver le poliovirus intracellulaire après 4 semaines à 20°C. Le glycérol à 98 % à 0°C a pu inactiver le HSV-1 après 1 semaine et le poliovirus après 2 semaines.

Les études de van Baare et al. et Marshall et al. n'ont pas porté sur l'effet du glycérol sur la réplication virale ou la viabilité virale lorsque de la peau cadavérique était traitée au moyen du procédé de glycérolisation complet. Par conséquent, Van Baare et al. ont réalisé une nouvelle étude afin de déterminer si le HIV-1 présent dans la peau cadavérique pouvait être inactivé au moyen de la méthode de glycérolisation ou de cryoconservation. L'incubation de cellules mononucléées du sang périphérique infecté par le HIV, pendant 3 heures dans du glycérol à 70 % à une température de 37°C et pendant 3 heures dans du glycérol à 85 %, a provoqué une inactivation complète du HIV-1, mesurée par la quantification du HIV dans le supernatant et la détermination du taux de RT. Le HIV-1 acellulaire est inactivé dans le glycérol à 70 % et le glycérol à 85 % à toutes les températures d'incubation. Selon ces auteurs, la peau traitée au glycérol est donc sûre en raison de l'inactivation complète du HIV-1 infectieux intracellulaire et acellulaire éventuellement présent dans les allogreffes de peau (van Baare et al., 1998). Malheureusement, il n'existe pas d'études de grande ampleur permettant de le confirmer.

Cameron et al. ont constaté que le HIV-1 acellulaire était inactivé en 30 minutes à 4°C dans des concentrations de glycérol égales ou supérieures à 70 %. Lors d'une exposition comparable, le HIV-1 associé aux cellules ou à la peau a été réduit mais pas éliminé au moyen de glycérol à 70 % ou à 85 % à 4°C. Le HIV-1 a encore pu être détecté dans la peau conservée dans du glycérol à 85 % à 4°C pendant 72 heures. Toutefois, après 5 jours, l'isolation du virus était rare. Dans le glycérol à 70 % ou 85 %, à 20°C ou 37°C, le HIV-1 associé aux cellules ou à la peau a pu être inactivé en 8 heures (Cameron et al., 2000).

Van Baare et al. ont réalisé une étude portant sur le HSV-1 et le poliovirus (van Baare et al., 1994). Le Tableau 11 montre les résultats des études de van Baare et al. (1994), Cameron et al. (2000) et Marshall et al. (1995).

Verbeken et al ont développé un protocole comportant du glycérol à 50 % et à 85 % et une incubation à 36°C dans le but de décontaminer dans un second temps une culture d'allogreffes de peau positives cryoconservées (Verbeken et al, 2012).

Tableau 11 : Le glycérol comme méthode d'inactivation virale pour la peau (modifié d'après Sofer, 2002).

	Concentration de glycérol (%)	Température (°C)	Durée	Résultat de l'inactivation	Référence
HIV-1 acellulaire	70	4	30 minutes	Complète	Cameron et al., 2000
HIV-1 associé aux cellules ou à la peau	85	4	72 heures	Incomplète	Cameron et al., 2000
HIV-1 associé aux cellules ou à la peau	85	4	5 jours	Quelques virions	Cameron et al., 2000
HIV-1 associé aux cellules ou à la peau	70 ou 85	20 ou 37	8 heures	Complète	Cameron et al., 2000
HSV-1 intracellulaire	85	4	4 semaines	Incomplète	Marshall et al., 1995
HSV-1 intracellulaire	85	20	1 semaine	Complète	Marshall et al., 1995
HSV-1 intracellulaire	98	20	1 semaine	Complète	Marshall et al., 1995
HSV-1	85	4	50 jours	Complète	van Baare et al., 1994
HSV-1	85	37	2 heures	Complète	van Baare et al., 1994
HSV-1	98	4 ou 20	0 jour	Complète	van Baare et al., 1994
Polio	85	4	4 semaines	Incomplète	Marshall et al., 1995
Polio	85	20	4 semaines	Incomplète	Marshall et al., 1995
Polio	85	37	24 heures	Complète	van Baare et al., 1994

7.8.4.3.2. Autres allogreffes

L'utilisation de glycérol comme moyen de préservation a été décrite pour la dure-mère, les valves cardiaques, les greffes vasculaires, les cornées, le cartilage costal, les os (De Backere, 1994) et le péricarde bovin (van Baare et al., 1998; De Backere, 1994). Lors d'une étude comparative portant sur le péricarde bovin fixé au moyen de glutaraldéhyde, le glycérol a dégradé et calcifié moins rapidement la dure-mère humaine traitée (Khor, 1997; Ferrans et al., 1991). Le péricarde bovin traité au glycérol pendant plus de 2 semaines a réduit de manière significative la calcification dans les explantations (Ferrans et al., 1991).

8. CONSIDERATIONS FINALES

Il est difficile d'évaluer l'efficacité des procédures d'inactivation virale sur les tissus. Les rayons gamma n'inactivent certains virus qu'à de hautes doses.

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 enregistrés en matière de techniques de détection des virus dans le sérum/plasma, des résultats faux positifs (problème de spécificité) pour le HBV, le HCV et le HIV restent possibles. Le nombre de donneurs potentiels est ainsi réduit. La raison des résultats faux positifs réside 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 au receveur. Par conséquent, il est essentiel que la sensibilité des tests de dépistage sérologique ou NAT soit excellente. La FDA a publié une liste de tests validés pour les donneurs vivants et les donneurs cadavériques (<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/LicensedProductsBLAs/BloodDonorScreening/InfectiousDisease/UCM080466>).

Aujourd'hui, il existe également des tests NAT triples pour le HIV, le HCV et le HBV, pratiqués sur des plates-formes automatisées (SaBTO, 2011). Ces systèmes, qui conviennent pour le dosage sur le sang (sérum/plasma), sont déjà utilisés de manière routinière dans les banques de sang et ont aussi été validés en vue du dépistage chez les donneurs de tissus, y compris pour les tests du sang *post mortem*. Les laboratoires individuels peuvent valider ces tests eux-mêmes, selon leurs propres procédures (SaBTO). Les banques de sang peuvent réaliser ces tests 24 heures sur vingt-quatre.

Chez les donneurs **décédés**, les Ac anti-HIV-1/2, les Ag HBs, les Ac anti-HBc et les Ac 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 (AR, 2009). Notons que ces tests de détection de l'acide nucléique offrent une sécurité supplémentaire aux patients immunocompromis qui ne forment pas toujours des Ac lors d'infections virales. Les tests HCV-NAT apportent une importante plus-value dans le cas du don de cornée ; par contre, la plus-value des autres tests NAT fait encore débat (CSS 8684, 2011). L'avis 8684 du CSS (2011) estime que le *backscreening* n'est pas une alternative aux tests NAT parce que ce *backscreening* n'est pas d'application pour tous les tissus (par ex cornée), parce que cette pratique nécessite des structures logistiques lourdes et peut être une source d'inquiétude pour les receveurs d'organe. En ce qui concerne les donneurs décédés, la Directive européenne est moins exigeante et requiert uniquement un dépistage sérologique (Ac anti-HIV-1/2, Ag HBs, Ac anti-HBc et Ac anti-HCV).

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 si les tissus du donneur concerné peuvent être conservés plus longtemps (CE, 2006; AR, 2009). Ces tests répétés sont également omis lorsqu'une étape d'inactivation validée pour les virus concernés a été utilisée lors du traitement des tissus (CE, 2006; AR, 2009).

Notons que ces directives ne s'appliquent pas aux donneurs de gamètes, d'embryons, de gonades ou de fragments de gonades, pour lesquels des informations plus spécifiques peuvent être trouvées dans l'AR (AR, 2009).

En ce qui concerne les tests virologiques spécifiques pour un type de tissu, il faut se référer aux standards de qualité spécifiques.

9. REFERENCES

- AATB - American Association of Tissues Banking. Pearson K, Dock N and Brubacker S. Standards for Tissue Banking, 12th edition; 2008.
- Ahearn D, Gabriel M. Chapter 55. Disinfection of contact lenses. In: Block S, Lippincott Williams and Wilkins, Wolters, editors. Disinfection, sterilization, and preservation; 5th Ed 2001. p. 1108.
- Ahmad M, Tashima KT, Caliendo AM, Flanigan TP. Cerebrospinal fluid and plasma HIV-1 RNA stability at 4 degrees C. AIDS 1999;13(10):1281-2.
- Akkus O, Belaney RM, Das P. Free radical scavenging alleviates the biomechanical impairment of gamma radiation sterilized bone tissue. J Orthop Res 2005;23(4):838-45.
- Ali Y, Dolan M, Fendler E, Larson E. Chapter 12. Alcohols. In: Block S, Lippincott Williams and Wilkins, Wolters, editors. Disinfection, sterilization, and preservation; 5th Ed 2001. p. 229-53.
- Allosource. Publiciteitsfolder Allosource: Safety, Quality and Service, honouring the gift of life.
- Anastasescou M, Cornu O, Banse X, Konig J, Hassoun A, Delloye C. Ethanol treatment of tendon allografts: a potential HIV inactivating procedure. Int Orthop 1998;22(4):252-4.
- Angelis M, Cooper JT, Freeman RB. Impact of donor infections on outcome of orthotopic liver transplantation. Liver Transpl 2003;9(5):451-62.
- Angermann P, Jepsen OB. Procurement, banking and decontamination of bone and collagenous tissue allografts: guidelines for infection control. J Hosp Infect 1991;17(3):159-69.
- Aspenberg P, Johnsson E, Thorngren KG. Dose-dependent reduction of bone inductive properties by ethylene oxide. J Bone Joint Surg Br 1990;72(6):1036-7.
- Asselmeier M, Caspari R, Bottenfield S. A review of allograft processing and sterilization techniques and their role in transmission of the human immunodeficiency virus. Am J Sports Med 1993;21(2):170-5.
- Barbour SA, King W. The safe and effective use of allograft tissue--an update. Am J Sports Med 2003;31(5):791-7.
- Bardonnat, R. Preparation and viral inactivation of human femoral heads using supercritical CO2 technology. Biobank, Poster, EATB Congress, Prague; 2004.
- Belgochlor. Hoe belangrijk is chloor voor de gezondheid? In: Witboek van chloor 2005. Internet:www.belgochlor.be
- Bettin D, Rullkotter V, Polster J, Fuchs S. Primary biomechanical influence of different sterilization methods on a freeze-dried bone-ligament transplant. Arch Orthop Trauma Surg 1999;119(3-4):236-40.
- Bhandari M, Adili A, Schemtisch E. The efficacy of low-pressure lavage with different irrigating solutions to remove adherent bacteria from bone. J Bone Joint Surg 2001;83:412-19
- Blatchley E, Peel M. Chapter 41. Disinfection by ultraviolet irradiation. In: Block S, Lippincott Williams and Wilkins, Wolters, editors. Disinfection, sterilization, and preservation; 5th Ed 2001. p. 823-51.
- Block S. Chapter 2. Definition of terms. In: Block S, Lippincott Williams and Wilkins, Wolters, editors. Disinfection, sterilization, and preservation; 5th Ed 2001a. p. 185-91.
- Block S. Chapter 9. Peroxygen compounds. In: Block S, Lippincott Williams and Wilkins, Wolters, editors. Disinfection, sterilization, and preservation; 5th Ed 2001b. p. 19-28.
- Bogdanský S. Oral presentation Prague, EATB Congress; 2004.
- Boix B, Lis M, Martinez M, Silvestre P, Garcia S, Garcia M. Incidence of hepatitis C infection among donors of femur heads to the tissue bank. [abstract, article in Spanish] Rev Esp Salud Publica 1998;72:267-271.
- Bond WW, Favero MS, Petersen NJ, Ebert JW. Inactivation of hepatitis B virus by intermediate-to-high-level disinfectant chemicals. J Clin Microbiol 1983;18(3):535-8.

- Borchi B, Ambu S, Bresci S, Zanazzi M, Salvadori M, Leoncini F. Case report: HIV infection from a kidney transplant. *Transplant Proc* 2010;42(6):2267-9.
- Brockbank K, Siler D. Chapter 51. Aseptic and antiseptic treatment of donated and living engineered organs and tissues. In: S. S. Block S.S. Lippincott Williams and Wilkins, Wolters, editors. *Disinfection, sterilization, and preservation*, 5th Ed., 2001. p. 1011-22.
- Bronnert J, Wilde H, Tepsumethanon V, Lumlerdacha B, Hemachudha T. Organ transplantations and rabies transmission. *J Travel Med* 2007;14(3):177-80.
- Bruisten SM, Oudshoorn P, van Swieten P, Boeser-Nunnink B, van Aarle P, Tondreau SP, et al. Stability of HIV-1 RNA in blood during specimen handling and storage prior to amplification by NASBA-QT. *J Virol Methods* 1997;67(2):199-207.
- Büchen-Osmond C. Ch. 76. Taxonomy and classification of viruses. In: Murray P, Baron E, Jorgensen J, Pfaller M, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. Volume 2, Washington: ASM Press, 2003:1217-26.
- Buck BE, Resnick L, Shah SM, Malinin TI. Human immunodeficiency virus cultured from bone. Implications for transplantation. *Clin Orthop Relat Res* 1990(251):249-53.
- Buck BE, Malinin TI. Human bone and tissue allografts. Preparation and safety. *Clin Orthop Relat Res* 1994(303):8-17.
- Burd T, Conroy BP, Meyer SC, Allen WC. The effects of chlorhexidine irrigation solution on contaminated bone-tendon allografts. *Am J Sports Med* 2000;28(2):241-4.
- Burtonboy G, Delloye C. Polymerase chain reaction in cadaveric blood and tissues. *Transplant Proc* 1996;28(5):2927-8.
- Busch MP, Wilber JC, Johnson P, Tobler L, Evans CS. Impact of specimen handling and storage on detection of hepatitis C virus RNA. *Transfusion* 1992;32(5):420-5.
- Busch M, Kleinman S. Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases: Nucleic acid amplification testing and disease transmission. *Transfusion* 2000;40:143-6.
- Cameron PU, Pagnon JC, van Baare J, Reece JC, Vardaxis NJ, Crowe SM. Efficacy and kinetics of glycerol inactivation of HIV-1 in split skin grafts. *J Med Virol* 2000;60(2):182-8.
- Campbell DG, Li P. Sterilization of HIV with irradiation: relevance to infected bone allografts. *Aust N Z J Surg* 1999;69(7):517-21.
- Caruso JL, Childs JM, Howell DN, chapter 10. Surgical pathology and diagnostic cytology of viral infections. In: Lennette's laboratory diagnosis of viral infections. 4th edition. Jerome KR, editor. Informa Healthcare; 2010. p. 151-72
- CDC – Centers for Disease Control and Prevention. Epidemiologic notes and reports human immunodeficiency virus infection transmitted from an organ donor screened for HIV antibody-North Carolina. *MMWR* 1987;36:306-8.
- CDC – Centers for Disease Control and Prevention. Epidemiologic notes and reports transmission of HIV through bone transplantation: case report and public health recommendations. *MMWR* 1988;37:597-9.
- CDC – Centers for Disease Control and Prevention. Investigation of rabies infections in organ donor and transplant recipients – Alabama, Arkansas, Oklahoma, and Texas. *MMWR* 2004a;53:1-3.
- CDC – Centers for Disease Control and Prevention. Update: investigation of rabies infections in organ donor and transplant recipients – Alabama, Arkansas, and Texas, 2004. *MMWR* 2004b;53:615-616.
- CDC – Centers for Disease Control and Prevention. West Nile virus infections in organ transplant recipients--New York and Pennsylvania, 2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2005;54(40):1021-3.
- CDC – Centers for Disease Control and Prevention. Human rabies prevention – US, 1999. *MMWR* 1999;48:RR-1.
- Chakrabarty KH, Dawson RA, Harris P, Layton C, Babu M, Gould L, et al. Development of autologous human dermal-epidermal composites based on sterilized human allodermis for clinical use. *Br J Dermatol* 1999;141(5):811-23.

- Challine D, Pellegrin B, Bouvier-Alias M, Rigot P, Laperche L, Pawlotsky JM. HIV and hepatitis C virus RNA in seronegative organ and tissue donors. *Lancet* 2004;364(9445):1611-2.
- Chung RT, Feng S, Delmonico FL. Approach to the management of allograft recipients following the detection of hepatitis B virus in the prospective organ donor. *Am J Transplant* 2001;1(2):185-91.
- Claquin J, Romano P, Sellami F, Gassin M. Human T cell lymphotropic virus 1-2-positive nonretrieved cerebral deaths in France, 1992-1994. *Transplant Proc* 1996;28(5):2953.
- Clarke JA. HIV transmission and skin grafts. *Lancet* 1987;1(8539):983.
- Conrad EU, Gretch DR, Obermeyer KR, Moogk MS, Sayers M, Wilson JJ, et al. Transmission of the hepatitis-C virus by tissue transplantation. *J Bone Joint Surg Am* 1995;77(2):214-24.
- Cookson BD, Hoffman PN, Price T, Webster M, Fenton O. 'Cialit' as a tissue preservative: a microbiological assessment. *J Hosp Infect* 1988;11(3):263-70.
- Crawford MJ, Swenson CL, Arnoczky SP, O'Shea J, Ross H. Lyophilization does not inactivate infectious retrovirus in systemically infected bone and tendon allografts. *Am J Sports Med* 2004;32(3):580-6.
- CSS – Conseil Supérieur de la Santé. Mesures à prendre afin de prévenir la transmission du WNV par transfusion ou transplantation et pour le détecter précocement. Bruxelles:CSS; 2003. Avis 7793/2.
- CSS- Conseil Supérieur de la Santé. standards de qualité particuliers pour les allogreffes de cornées et de sclérotiques d'origine humaine destinés à une application chez l'homme – Version révisée. Bruxelles:CSS; 2007. Avis n° 8293.
- CSS- Conseil Supérieur de la Santé. Standards de qualité particuliers pour les allogreffes tympano-ossiculaire d'origine humaine destinés à une application chez l'homme. Bruxelles :CSS ; 2007. Avis n° 8298.
- CSS - Conseil Supérieur de la Santé. Standards de qualité particuliers pour les allogreffes de cornées et de sclérotiques d'origine humaine destinés à une application chez l'homme – Version révisée. Bruxelles : CSS; 2007. Avis n° 8298.
- CSS - Conseil Supérieur de la Santé. Conservation des greffons musculosquelettiques: recommandations au sujet de la température et de la durée de conservation. Bruxelles : CSS; 2011. Avis n° 8694.
- CSS - Conseil Supérieur de la Santé. Pertinence des tests NAT dans l'évaluation des donneurs de matériel corporel humain. Bruxelles: CSS; 2011. Avis n° 8684
- Curran AR, Adams DJ, Gill JL, Steiner ME, Scheller AD. The biomechanical effects of low-dose irradiation on bone-patellar tendon-bone allografts. *Am J Sports Med* 2004;32(5):1131-5.
- Cuypers HT, Bresters D, Winkel IN, Reesink HW, Weiner AJ, Houghton M, et al. Storage conditions of blood samples and primer selection affect the yield of cDNA polymerase chain reaction products of hepatitis C virus. *Clin Microbiol* 1992;30(12):3220-4.
- Damen M, Sillekens P, Sjerps M, Melsert R, Frantzen I, Reesink HW, et al. Stability of hepatitis C virus RNA during specimen handling and storage prior to NASBA amplification. *J Virol Methods* 1998;72(2):175-84.
- de Backere A. Euro Skin Bank: large scale skin-banking in Europe based on glycerol-preservation of donor skin. *Burns* 1994;20 Suppl 1:S4-9.
- De Clercq E. Virussen in het algemeen. *Begrippen van medische virologie*. Leuven: uitgeverij ACCO, 1998:1-30.
- Denton G. Chapter 15. Chlorhexidine. In: Block S, Lippincott Williams and Wilkins, Wolters, editors. *Disinfection, sterilization, and preservation*; 5th Ed 2001. p. 321-36.
- DePaula C, Truncale K, Gertzman A, Sunwoo M, Dunn M. Effects of hydrogen peroxide cleaning procedures on bone graft osteoinductivity and mechanical properties. *Cell Tissue Bank* 2005;6(4):287-98.
- Desombere I, Van Vlierberghe H, Couvent S, Clinckspoor F, Leroux-Roels G. Comparison of qualitative (COBAS AMPLICOR HCV 2.0 versus VERSANT HCV RNA) and

- quantitative (COBAS AMPLICOR HCV monitor 2.0 versus VERSANT HCV RNA 3.0) assays for hepatitis C virus (HCV) RNA detection and quantification: impact on diagnosis and treatment of HCV infections. *J Clin Microbiol* 2005;43(6):2590-7.
- Dickson WA, Inglis TJ. Cialit preserved cartilage: failure to guarantee sterility. *Br J Plast Surg* 1988;41(4):408-9.
 - Dimmock NJ, Easton AJ, Leppard KN. Introduction to modern virology. 6th ed., Malden, USA, Blackwell Publishing; 2007, p 516.
 - Doherty MJ, Mollan RA, Wilson DJ. Effect of ethylene oxide sterilization on human demineralized bone. *Biomaterials* 1993;14(13):994-8.
 - Donoso Mantke O, Meyer R, Prosch S, Nitsche A, Leitmeyer K, Kallies R, et al. High prevalence of cardiotropic viruses in myocardial tissue from explanted hearts of heart transplant recipients and heart donors: a 3-year retrospective study from a German patients' pool. *J Heart Lung Transplant* 2005;24(10):1632-8.
 - Druce J. Chapter 29. Human immunodeficiency virus. In: Block S, Lippincott Williams and Wilkins, Wolters, editors. *Disinfection, sterilization, and preservation*; 5th Ed 2001. p. 576-78.
 - Dunn J. Chapter 39. Pulsed-light disinfection of water and sterilization of blow/fill/seal manufactured aseptic pharmaceutical products. In: Block S, Lippincott Williams and Wilkins, Wolters, editors. *Disinfection, sterilization, and preservation*; 5th Ed 2001. p. 765-93.
 - Dunsmuir RA, Gallacher G. Microwave sterilization of femoral head allograft. *J Clin Microbiol* 2003;41(10):4755-7.
 - Dychdala G. Chapter 7. Chlorine and chlorine compounds. In: Block S, Lippincott Williams and Wilkins, Wolters, editors. *Disinfection, sterilization, and preservation*; 5th Ed 2001. p. 135-157.
 - Dziedzic-Goclawska A, Kaminski A, Uhrynowska-Tyszkiewicz I, Stachowicz W. Irradiation as a safety procedure in tissue banking. *Cell Tissue Bank* 2005;6(3):201-19.
 - Eastlund T. Infectious disease transmission through tissue transplantation In: Phillips G, editor. *Advances in Tissue Banking Vol 7.*, World Scientific Publishing, Singapore 2004; p. 51-131.
 - EC – European Commission. Summary table on prevention of West Nile Virus transmission by blood; 2004. [Internet: http://ec.europa.eu/health/ph_threats/human_substance/documents/blood_wnv_02_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_threats/human_substance/documents/blood_wnv_02_en.pdf)
 - ECDC. Risk assessment of HTLV-I/II transmission by tissue/cell transplantation, Part I: epidemiological review, ECDC Technical document, Stockholm, March 2012 <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/120403-RA-Human-T-lymphotropic-Virus-transmission.pdf>
 - Eggen BM, Nordbo SA. Transmission of HCV by organ transplantation. *N Engl J Med* 1992;326(6):411; author reply 2-3
 - EPA - Environmental Protection Agency. EPA Radiation Protection Program: Understanding Radiation: Gamma Rays, the basics; 2011. <http://www.epa.gov/rpdweb00/understand/gamma.html>.
 - Farrington M, Wreghitt T, Matthews I, Scarr D, Sutehall G, Hunt CJ, et al. Processing of cardiac valve allografts: 2. Effects of antimicrobial treatment on sterility, structure and mechanical properties. *Cell Tissue Bank* 2002;3(2):91-103.
 - Favero M, Bond W. Chapter 43. Chemical disinfection of medical and surgical materials. In: Block S, Lippincott Williams and Wilkins, Wolters, editors. *Disinfection, sterilization, and preservation*; 5th Ed 2001. p. 905.
 - FDA – Food and Drug Administration. HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA), Versant® Bayer. Information folder. 02446578 Rev. A; 2002.
 - FDA – Food and Drug Administration. Guidance for industry, Revised recommendations for the assessment of donor suitability and blood product safety in cases of suspected severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) or exposure to SARS, final guidance; 2003.

Internet:

<http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm080301.pdf>

- FDA – Food and Drug Administration. New FDA regulations: affect on EATB's standards for tissue, Brubacker S, abstract 14th International Congress of the European Association of Tissue Banks; 2005. p. 5
- FDA – Food and Drug Administration. Guidance for industry, Assessing suitability and blood and blood product safety in cases of known or suspected West Nile Virus infection; 2005a. Internet: <http://www.fda.gov/cber/gdlns/wnvguid.htm>
- FDA – Food and Drug Administration. Guidance for industry, Eligibility determination for donors of human cells, tissues, and cellular and tissue-based products (HCT/PS), US dept of Health and Human Services, FDA, Center for Biologics evaluation and research; 2007a. Internet: <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Tissue/ucm091345.pdf>
- FDA – Food and Drug Administration. Procleix[®] HIV-1/HCV Assay, Information folder, Gen-Probe Inc., Novartis 501037 Rev. A, 2000-2007; 2007b. Internet: <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/LicensedProductsBLAs/BloodDonorScreening/InfectiousDisease/UCM092036.pdf>
- FDA – Food and Drug Administration. Cobas[®] TaqScreen MPX Test for use on the cobas s 201 system for in vitro diagnostic use. Information folder, Roche Molecular system, 2009. Internet: <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/LicensedProductsBLAs/BloodDonorScreening/InfectiousDisease/UCM176443.pdf>
- FDA – Food and Drug Administration. Licenced Donor screening tests; 2011. Internet: <http://www.fda.gov/cber/products/testkits.htm>,
- Ferrans VJ, Milei J, Ishihara T, Storino R. Structural changes in implanted cardiac valvular bioprostheses constructed of glycerol-treated human dura mater. Eur J Cardiothorac Surg 1991;5(3):144-54.
- Ferreira S, Dernel W, Powers B, Schochet R, Kuntz C, Withrow S, et al. Effect of gas-plasma sterilization on the osteo-inductive capacity of demineralized bone matrix. Clin Orth Rel Res 2000;388:233-9
- Fiderer BM, Vangsness CT, Jr., Moore T, Li Z, Rasheed S. Effects of gamma irradiation on the human immunodeficiency virus. A study in frozen human bone-patellar ligament-bone grafts obtained from infected cadavera. J Bone Joint Surg Am 1994;76(7):1032-5.
- Fischer-Fröhlich C, Lauchart W. Viral screening in organ donation: practical considerations. Organs and tissues 2004;2:21-127
- Frayssinet P, Rouquet N, Mathon D, Autefage A, Fages J. Histological integration of allogeneic cancellous bone tissue treated by supercritical CO2 implanted in sheep bones. Biomaterials 1998;19(24):2247-53.
- Gessoni G, Barin P, Frigato A, Fezzi M, de Fusco G, Arreghini N, et al. The stability of hepatitis C virus RNA after storage at +4 degrees C. J Viral Hepat 2000;7(4):283-6.
- Gessoni G, Barin P, Valverde S, Giacomini A, Di Natale C, Orlandini E, et al. Biological qualification of blood units: considerations about the effects of sample's handling and storage on stability of nucleic acids. Transfus Apher Sci 2004;30(3):197-203.
- Ginocchio CC, Wang XP, Kaplan MH, Mulligan G, Witt D, Romano JW, et al. Effects of specimen collection, processing, and storage conditions on stability of human immunodeficiency virus type 1 RNA levels in plasma. J Clin Microbiol 1997;35(11):2886-93.
- Glowacki J. A review of osteoinductive testing methods and sterilization processes for demineralized bone. Cell Tissue Bank 2005;6(1):3-12.
- Gomez-Lopez VM, Devlieghere F, Bonduelle V, Debevere J. Factors affecting the inactivation of micro-organisms by intense light pulses. J Appl Microbiol 2005;99(3):460-70.

- Gorschewsky O, Klakow A, Riechert K, Pitzl M, Becker R. Clinical comparison of the Tutoplast allograft and autologous patellar tendon (bone-patellar tendon-bone) for the reconstruction of the anterior cruciate ligament: 2- and 6-year results. *Am J Sports Med* 2005;33(8):1202-9.
- Gottardi W. Chapter 8. Iodine and iodine compounds. In: *Disinfection, sterilization, and preservation*, 5th Ed., S. S. Block, Lippincott Williams and Wilkins, Wolters; 2001. pp. 159-83.
- Goubau P, Van Gompel A. *Wegwijzer in de microbiologie*, 3^{de} ed. Garant; 2000. p. 151-5.
- Grabow WO, Gauss-Muller V, Prozesky OW, Deinhardt F. Inactivation of hepatitis A virus and indicator organisms in water by free chlorine residuals. *Appl Environ Microbiol* 1983;46(3):619-24.
- Grant PR, Busch MP. Nucleic acid amplification technology methods used in blood donor screening. *Transfus Med* 2002;12(4):229-42.
- Grieb TA, Forng RY, Stafford RE, Lin J, Almeida J, Bogdansky S, et al. Effective use of optimized, high-dose (50 kGy) gamma irradiation for pathogen inactivation of human bone allografts. *Biomaterials* 2005;26(14):2033-42.
- Grieb TA, Forng RY, Bogdansky S, Ronholdt C, Parks B, Drohan WN, et al. High-dose gamma irradiation for soft tissue allografts: High margin of safety with biomechanical integrity. *J Orthop Res* 2006;24(5):1011-8.
- Halfon P, Khiri H, Gerolami V, Bourliere M, Feryn JM, Reynier P, et al. Impact of various handling and storage conditions on quantitative detection of hepatitis C virus RNA. *J Hepatol* 1996;25(3):307-11.
- Hallfeldt KK, Stutzle H, Puhlmann M, Kessler S, Schweiberer L. Sterilization of partially demineralized bone matrix: the effects of different sterilization techniques on osteogenetic properties. *J Surg Res* 1995;59(5):614-20.
- Hansen J, Shaffer H. Chapter 37: Sterilization and preservation by radiation sterilization. In: *Disinfection, sterilization, and preservation*, 5th Ed., S. S. Block, Lippincott Williams and Wilkins, Wolters; 2001. pp. 729-46.
- Harakeh MS. Inactivation of enteroviruses, rotaviruses and bacteriophages by peracetic acid in a municipal sewage effluent. *FEMS Microbiol Lett* 1984;23:27-30.
- Hijnen WA, Beerendonk EF, Medema GJ. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. *Water Res* 2006;40(1):3-22.
- Hodinka R chapter 9. Serologic tests in clinical virology. In: *Lenette's laboratory diagnosis of viral infections*. 4th edition. Jerome KR, editor. Informa Healthcare; 2010. p.133-50.
- Hoft R, Pflugfelder S, Forster R, Ullman S, Polack F, Schiff E. Clinical evidence for hepatitis B transmission resulting from corneal transplantation. *Cornea* 1997;16(2):132-7.
- Holland E, Wilhelmus K, EBAA. Clostridial endophthalmitis after cornea transplantation-Florida, *MMWR* 2003;52:1176-9.
- Hollinger J, Rabinowitz M, Grieb T, Lin J, Forng Y, Burges W. Microbial sterility assurance in cadaveric bone by a process that preserves the mechanical and biological integrity of allografts. folder EATB 2004, Prague.
- Holodniy M, Kim S, Katzenstein D, Konrad M, Groves E, Merigan TC. Inhibition of human immunodeficiency virus gene amplification by heparin. *J Clin Microbiol* 1991;29(4):676-9.
- Holodniy M, Mole L, Yen-Lieberman B, Margolis D, Starkey C, Carroll R, et al. Comparative stabilities of quantitative human immunodeficiency virus RNA in plasma from samples collected in VACUTAINER CPT, VACUTAINER PPT, and standard VACUTAINER tubes. *J Clin Microbiol* 1995;33(6):1562-6.
- Holodniy M, Rainen L, Herman S, Yen-Lieberman B. Stability of plasma human immunodeficiency virus load in VACUTAINER PPT plasma preparation tubes during overnight shipment. *J Clin Microbiol* 2000;38(1):323-6.
- Homan H, Gilbert D, Kemeny S, Kainer M, Kuhnert W, Jernigan D, et al. Hepatitis C virus transmission from an antibody-negative organ and tissue donor –US, 2000-2002. *MMWR* 2003;52:273-6.

- Hooe W, Steinberg B. Management of contaminated bone grafts: an experimental in vitro study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;82(1):34-7.
- Houff SA, Burton RC, Wilson RW, Henson TE, London WT, Baer GM, et al. Human-to-human transmission of rabies virus by corneal transplant. *N Engl J Med* 1979;300(11):603-4.
- Huang Q, Dawson RA, Pegg DE, Kearney JN, Macneil S. Use of peracetic acid to sterilize human donor skin for production of acellular dermal matrices for clinical use. *Wound Repair Regen* 2004;12(3):276-87.
- Huang Q, Pegg DE, Kearney JN. Banking of non-viable skin allografts using high concentrations of glycerol or propylene glycol. *Cell Tissue Bank* 2004;5(1):3-21.
- Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* 2003;46(3):205-29.
- Huffman D, Slifko T, Salisbury K, Rose J. Inactivation of bacteria, virus and *Cryptosporidium* by a point-of-use device using pulsed broad spectrum white light. *Water Res* 2000;9:2491-8
- Huttenbrink KB, Weidenfeller P. [Are cialit-preserved ossicles as middle ear implants still bacteriologically defensible? Their replacement by pre-formed implants fashioned from teeth]. *Laryngorhinootologie* 1990;69(6):327-32.
- IAEA - International Atomic Energy Agency. IAEA consultation document. Chapter 8: IAEA code of practice for the radiation sterilisation of tissue allografts: requirements for validation and routine control. p.211
- Intoxicaties 2011. internet: <http://www.intensivist.nl/intoxica.htm>
- Jackson DW, Windler GE, Simon TM. Intraarticular reaction associated with the use of freeze-dried, ethylene oxide-sterilized bone-patella tendon-bone allografts in the reconstruction of the anterior cruciate ligament. *Am J Sports Med* 1990;18(1):1-10; discussion -1.
- Jacobs P, Lin S. Chapter 38. Sterilization processes utilizing low-temperature plasma. In: Block S, Lippincott Williams and Wilkins, Wolters, editors. *Disinfection, sterilization, and preservation*; 5th Ed 2001. p. 747-763.
- Janssens de Varebeke S, Goubau P, Beuselinck HK, Somers T, Offeciers FE, Govaerts PJ. Tympano-ossicular allografts and HIV transmission. *Am J Otol* 1998;19(6):704-8.
- Jashari R, Van Hoeck B, Tabaku M, Vanderkelen A. Banking of the human heart valves and the arteries at the European homograft bank (EHB)--overview of a 14-year activity in this International Association in Brussels. *Cell Tissue Bank* 2004;5(4):239-51.
- Jayakrishnan A, Jameela SR. Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. *Biomaterials* 1996;17(5):471-84.
- Jones DB, Huddleston PM, Zobitz ME, Stuart MJ. Mechanical properties of patellar tendon allografts subjected to chemical sterilization. *Arthroscopy* 2007;23(4):400-4.
- Jose M, Gajardo R, Jorquera JI. Stability of HCV, HIV-1 and HBV nucleic acids in plasma samples under long-term storage. *Biologicals* 2005;33(1):9-16.
- Joslyn L. Chapter 16. Gaseous chemical sterilization. In: Block S, Lippincott Williams and Wilkins, Wolters, editors. *Disinfection, sterilization, and preservation*; 5th Ed 2001a. p. 337-59.
- Joslyn L. Chapter 16. Sterilization by heat. In: Block S, Lippincott Williams and Wilkins, Wolters, editors. *Disinfection, sterilization, and preservation*; 5th Ed 2001b. p. 695-728.
- Junghannss U, Steuer W, Findeisen P. [Bacteriologic studies on the preservation of bone implants]. *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg)* 1985;64(9):489-91.
- Kainer MA, Linden JV, Whaley DN, Holmes HT, Jarvis WR, Jernigan DB, et al. Clostridium infections associated with musculoskeletal-tissue allografts. *N Engl J Med* 2004;350(25):2564-71.
- Karcher HL. HIV transmitted by bone graft. *BMJ* 1997;314(7090):1300.
- Kealey GP. Disease transmission by means of allograft. *J Burn Care Rehabil* 1997;18(1 Pt 2):S10-1.
- Kearney JN. Quality issues in skin banking: a review. *Burns* 1998;24(4):299-305.

- Kearny J, Lomas R. Chapter 3.1. The osteoinductive properties of demineralised bone matrix grafts. In: *Advances in Tissue Banking* vol. 1. Philips G, World Scientific, 1st Ed, 2004; p. 43-72.
- Khor E. Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprotheses. *Biomaterials* 1997;18(2):95-105.
- Knapp JE, Battisti DL. Chapter 11. Chlorine dioxide. In: Block S, Lippincott Williams and Wilkins, Wolters, editors. *Disinfection, sterilization, and preservation*; 5th Ed 2001. p. 215-27.
- Kobayashi H, Tsuzuki M, Koshimizu K, Toyama H, Yoshihara N, Shikata T, et al. Susceptibility of hepatitis B virus to disinfectants or heat. *J Clin Microbiol* 1984;20(2):214-6.
- Koopman-van Gemert A. Hemodilution, what is right? *Transpl Proceed* 1996;28:2934-6.
- Kroes AC. Role of testing for antibody to hepatitis B core antigen to prevent transmission of hepatitis B virus in organ and tissue transplantation. *Transplant Proc* 1996;28(5):2937-8.
- Laperche S, Morel P, Deschaseaux M, Bouchardeau F, Alimardani G, Guillaume N, et al. HIV antibody screening remains indispensable for ensuring viral safety of blood components despite NAT implementation. *Transfusion* 2003;43(10):1428-32.
- Leeming JP, Lovering AM, Hunt CJ. Residual antibiotics in allograft heart valve tissue samples following antibiotic disinfection. *J Hosp Infect* 2005;60(3):231-4.
- Liebergall M, Abu-Sneineh CH, Eylon S, Mendelson S, Segal D, Simkin A. Effect of microwave oven induced mild hyperthermia on bone viability and strength. *Clin Orthop Relat Res* 2000(372):272-9.
- Lietman SA, Tomford WW, Gebhardt MC, Springfield DS, Mankin HJ. Complications of irradiated allografts in orthopaedic tumor surgery. *Clin Orthop Relat Res* 2000(375):214-7.
- Lomas RJ, Gillan HL, Matthews JB, Ingham E, Kearney JN. An evaluation of the capacity of differently prepared demineralised bone matrices (DBM) and toxic residuals of ethylene oxide (EtOx) to provoke an inflammatory response in vitro. *Biomaterials* 2001;22(9):913-21.
- Lomas RJ, Cruse-Sawyer JE, Simpson C, Ingham E, Bojar R, Kearney JN. Assessment of the biological properties of human split skin allografts disinfected with peracetic acid and preserved in glycerol. *Burns* 2003;29(6):515-25.
- Loty B, Courpied JP, Tomeno B, Kerboull M, Postel M, Forest M. [Massive bone allografts sterilized by irradiation: evaluation following 5 years of use]. *Acta Orthop Belg* 1991;57 Suppl 2:35-43.
- Marshall L, Ghosh MM, Boyce SG, MacNeil S, Freedlander E, Kudesia G. Effect of glycerol on intracellular virus survival: implications for the clinical use of glycerol-preserved cadaver skin. *Burns* 1995;21(5):356-61.
- McDonnell G, Pretzer D. Chapter 20. New and developing Chemical Antimicrobials. In: Block S, Lippincott Williams and Wilkins, Wolters, editors. *Disinfection, sterilization, and preservation*; 5th Ed 2001. p. 437.
- McGlynn M, Sharpe D. Cialit preserved homograft cartilage in nasal augmentation: a long-term review. *Br J Plast Surg* 1982;34:53-7.
- Malchesly. Chapter 49. Medical applications of peracetic acid. In: Block S, Lippincott Williams and Wilkins, Wolters, editors. *Disinfection, sterilization, and preservation*; 5th Ed 2001. p. 979-96.
- Merianos J. Chapter 14. Surface-active agents. In: *Disinfection, sterilization, and preservation*, 5th Ed., S. S. Block, Lippincott Williams and Wilkins, Wolters, 2001; p. 283-320.
- Methanex. Veiligheidsinformatieblad Methanol, Methanex. Internet: http://www.methanex.com/products/documents/MSDS_EUnederlands.pdf
- Meylan PR, Duscher A, Mudry A, Monnier P. Risk of transmission of human immunodeficiency virus infection during tympano-ossicular homograft: an experimental study. *Laryngoscope* 1996;106(3 Pt 1):334-7.

- Mikhael MM, Huddleston PM, Zobitz ME, Chen Q, Zhao KD, An KN. Mechanical strength of bone allografts subjected to chemical sterilization and other terminal processing methods. *J Biomech* 2008;41(13):2816-20.
- Minegishi K, Yoshikawa A, Kishimoto S, Yugi H, Yokoya N, Sakurada M, et al. Superiority of minipool nucleic acid amplification technology for hepatitis B virus over chemiluminescence immunoassay for hepatitis B surface antigen screening. *Vox Sang* 2003;84(4):287-91.
- Mitchell EJ, Stawarz AM, Kayacan R, Rimnac CM. The effect of gamma radiation sterilization on the fatigue crack propagation resistance of human cortical bone. *J Bone Joint Surg Am* 2004;86-A(12):2648-57.
- MMWR – Morbidity and mortality weekly report. West Nile Virus infections in organ transplant recipients – New York and Pennsylvania, August- September, MMWR 2005;54:1021.
- Moreau MF, Gallois Y, Basle MF, Chappard D. Gamma irradiation of human bone allografts alters medullary lipids and releases toxic compounds for osteoblast-like cells. *Biomaterials* 2000;21(4):369-76.
- Mroz TE, Lin EL, Summit MC, Bianchi JR, Keesling JE, Jr., Roberts M, et al. Biomechanical analysis of allograft bone treated with a novel tissue sterilization process. *Spine J* 2006;6(1):34-9.
- Murray P, Rosenthal K, Kobayashi G, Pfaller M. Viral classification, structure, and replication. In: Brown M, editor. *Medical Microbiology*, 3d ed, USA: Mosby, 1998:43-58.
- Nather A, Thambyah A, Goh JC. Biomechanical strength of deep-frozen versus lyophilized large cortical allografts. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 2004;19(5):526-33.
- Nemzek JA, Arnoczky SP, Swenson CL. Retroviral transmission in bone allotransplantation. The effects of tissue processing. *Clin Orthop Relat Res* 1996(324):275-82.
- Neumaier M, Braun A, Wagener C. Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. International Federation of Clinical Chemistry Scientific Division Committee on Molecular Biology Techniques. *Clin Chem* 1998;44(1):12-26.
- Nguyen H, Morgan DA, Forwood MR. Sterilization of allograft bone: is 25 kGy the gold standard for gamma irradiation? *Cell Tissue Bank* 2007;8(2):81-91.
- Novick SJ, Schragger JA, Nelson JA, Anderson ME, Baskin BL. Comparison of two hepatitis B surface antigen and two HIV-1 (p24) antigen EIA test kits with hemolyzed cadaveric blood specimens. *Transplant Proc* 1996;28(5):2925-6.
- Padalko E. Critically Appraised Topic: Preanalytische fase in de moleculaire diagnostiek: het belang voor viral load bepalingen 2005.
- Patijn GA, Strengers PF, Harvey M, Persijn G. Prevention of transmission of HIV by organ and tissue transplantation. HIV testing protocol and a proposal for recommendations concerning donor selection. *Transpl Int* 1993;6(3):165-72.
- Pels E, Vrensen GF. Microbial decontamination of human donor eyes with povidone-iodine: penetration, toxicity, and effectiveness. *Br J Ophthalmol* 1999;83(9):1019-26.
- Pereira BJ, Milford EL, Kirkman RL, Levey AS, Tomford WW, Leibowitz H, et al. Low risk of liver disease after tissue transplantation from donors with HCV. *Lancet* 1993;341(8849):903-4.
- Pirnay JP, Vandenvelde C, Duinslaeger L, Reper P, Vanderkelen A. HIV transmission by transplantation of allograft skin: a review of the literature. *Burns* 1997;23(1):1-5.
- Prolo DJ, Pedrotti PW, White DH. Ethylene oxide sterilization of bone, dura mater, and fascia lata for human transplantation. *Neurosurgery* 1980;6(5):529-39.
- Pruss A, Kao M, Kiesewetter H, von Versen R, Pauli G. Virus safety of avital bone tissue transplants: evaluation of sterilization steps of spongiosa cuboids using a peracetic acid-methanol mixture. *Biologicals* 1999;27(3):195-201.

- SaBTO - Advisory Committee on the Safety of Blood, Tissues and Organs. Department of Health: Guidance on the microbiological safety of human organs, tissues and cells used in transplantation; 2011. internet: http://www.dh.gov.uk/prod_consum_dh/groups/dh_digitalassets/documents/digitalasset/dh_124528.pdf
- Sacher RA, Schreiber GB, Kleinman SH. Prevention of transfusion-transmitted hepatitis. *Lancet* 2000;355(9201):331-2.
- Salehpour A, Butler DL, Proch FS, Schwartz HE, Feder SM, Doxey CM, et al. Dose-dependent response of gamma irradiation on mechanical properties and related biochemical composition of goat bone-patellar tendon-bone allografts. *J Orthop Res* 1995;13(6):898-906.
- Salzman NP, Psallidopoulos M, Prewett AB, O'Leary R. Detection of HIV in bone allografts prepared from AIDS autopsy tissue. *Clin Orthop Relat Res* 1993(292):384-90.
- Sanborn MR, Wan SK, Bulard R. Microwave sterilization of plastic tissue culture vessels for reuse. *Appl Environ Microbiol* 1982;44(4):960-4.
- Sanquin algemeen jaarverslag, Nederland, 2006. Internet: [http://www.sanquin.nl/Sanquin-nl/sqn_actueel.nsf/8551110e498bd2c8c12572110034decf/cb533d218ca12174c1256d590048b2fc/\\$FILE/Algemeen%20jaarverslag%202006.pdf](http://www.sanquin.nl/Sanquin-nl/sqn_actueel.nsf/8551110e498bd2c8c12572110034decf/cb533d218ca12174c1256d590048b2fc/$FILE/Algemeen%20jaarverslag%202006.pdf)
- Sanquin jaarverslag 2011. p. 51, Nederland. Internet: http://www.scientificreportsanquin.nl/FbContent.ashx/downloads/Sanquin_Annual_Report_2011.pdf
- Sanzen L, Carlsson A. Transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1 by a deep-frozen bone allograft. *Acta Orthop Scand* 1997;68(1):72-4.
- Sataloff RT, Roberts BR. Preservation of otologic homografts. *Am J Otol* 1986;7(3):214-7.
- Sato S, Ohhashi W, Ihara H, Sakaya S, Kato T, Ikeda H. Comparison of the sensitivity of NAT using pooled donor samples for HBV and that of a serologic HBsAg assay. *Transfusion* 2001;41(9):1107-13.
- Scheffler SU, Scherler J, Pruss A, von Versen R, Weiler A. Biomechanical comparison of human bone-patellar tendon-bone grafts after sterilization with peracetic acid ethanol. *Cell Tissue Bank* 2005;6(2):109-15.
- Scheidler A, Rokos K, Reuter T, Ebermann R, Pauli G. Inactivation of viruses by beta-propiolactone in human cryo poor plasma and IgG concentrates. *Biologicals* 1998;26(2):135-44.
- Schmidt WN, Wu P, Cederna J, Mitros FA, LaBrecque DR, Stapleton JT. Surreptitious hepatitis C virus (HCV) infection detected in the majority of patients with cryptogenic chronic hepatitis and negative HCV antibody tests. *J Infect Dis* 1997;176(1):27-33.
- Scott JD, Gretch DR. Molecular Diagnostics of Hepatitis C virus infection. *JAMA* 2007;297:724-732.
- Scott E, Gorman S. Glutaraldehyde. In: Block S, Lippincott Williams and Wilkins, Wolters, editors. *Disinfection, sterilization, and preservation*; 5th Ed 2001. p. 361-81.
- Severyns AM, Lejeune A, Rocoux G, Lejeune G. Non-toxic antiseptic irrigation with chlorhexidine in experimental revascularization in the rat. *J Hosp Infect* 1991;17(3):197-206.
- Shutkin NM. Homologous-serum hepatitis following the use of refrigerated bone-bank bone. *J Bone Joint Surg Am* 1954;36-A(1):160-2.
- Shutkin NM, Sherk HH. Homologous serum jaundice transmitted by bone bank bone: a case report. *Clin Orthop Relat Res* 2005(435):5-7.
- Sillekens PT. Qualitative and quantitative NASBA for detection of human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus infection. *Transplant Proc* 1996;28(5):2941-4.
- Simonds RJ, Holmberg SD, Hurwitz RL, Coleman TR, Bottenfield S, Conley LJ, et al. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor. *N Engl J Med* 1992;326(11):726-32.

- Sofer G. Virus inactivation in the 1990s – and into the 21st century. Part 1: skin, bone, and cells. *Biopharm* 07-2002:18-24
- Soyer J, Rouil M, Castel O. The effect of 10% povidone-iodine solution on contaminated bone allografts. *J Hosp Infect* 2002;50(3):183-7.
- Stanworth SJ, Warwick RM, Ferguson M, Barbara JA. A UK survey of virological testing of cadaver tissue donors. Microbiology Working Group of the NIBSC steering group on Tissue/Cell Banking and Engineering. *Vox Sang* 2000;79(4):227-30.
- Stramer SL, Glynn SA, Kleinman SH, Strong DM, Caglioti S, Wright DJ, et al. Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody-negative blood donors by nucleic acid-amplification testing. *N Engl J Med* 2004;351(8):760-8.
- Strong DM, Nelson K, Pierce M, Stramer SL. Preventing disease transmission by deceased tissue donors by testing blood for viral nucleic acid. *Cell Tissue Bank* 2005;6(4):255-62.
- Swenson CL, Arnoczky SP. Demineralization for inactivation of infectious retrovirus in systemically infected cortical bone: in vitro and in vivo experimental studies. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A(2):323-32.
- Tarbox BB, Conroy BP, Malicky ES, Moussa FW, Hockman DE, Anglen JO, et al. Benzalkonium chloride. A potential disinfecting irrigation solution for orthopaedic wounds. *Clin Orthop Relat Res* 1998(346):255-61.
- Taylor GP, Bodeus M, Courtois F, Pauli G, del Mistro A, Machuca A, Padua E, Andersson S, Goubau P et al. The seroepidemiology of human T-lymphotropic viruses. Types I and II in Europe: a prospective study of pregnant women. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;38:104-109.
- Tomford WW, Doppelt SH, Mankin HJ, Friedlaender GE. 1983 bone bank procedures. *Clin Orthop Relat Res* 1983(174):15-21
- Trotter JF. Transmission of hepatitis C by implantation of a processed bone graft. A case report. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A(11):2215-7.
- UE – Union Européenne. Directive 2006/17/ CE de la Commission du 8 février 2006 portant application de la directive 2004/23/CE du Parlement européen et du Conseil concernant certaines exigences techniques relatives au don, à l'obtention et au contrôle de tissus et de cellules d'origine humaine L38/40; 2006.
- Uhlenhaut C, Dorner T, Pauli G, Pruss A. Effects of lyophilization on the infectivity of enveloped and non-enveloped viruses in bone tissue. *Biomaterials* 2005;26(33):6558-64.
- UKBTS – NIBSC - United Kingdom Blood Transfusion Services and National Institute for Biological Standards and Control. 2011.
- van Baare J, Buitenwerf J, Hoekstra MJ, du Pont JS. Virucidal effect of glycerol as used in donor skin preservation. *Burns* 1994;20 Suppl 1:S77-80.
- van Baare J, Cameron PU, Vardaxis N, Pagnon J, Reece J, Middelkoop E, et al. The 1998 Lindberg Award. Comparison of glycerol preservation with cryopreservation methods on HIV-1 inactivation. *J Burn Care Rehabil* 1998;19(6):494-500.
- van Baare J, Ligtoet EE, Middelkoop E. Microbiological evaluation of glycerolized cadaveric donor skin. *Transplantation* 1998;65(7):966-70.
- Van der Groen G. Laboratoriumdiagnostiek van HIV-infecties. *Tijdschr. voor Geneeskunde* 1991;47:1515-24.
- Vandamme AM, Van Laethem K, Schmit JC, Van Wijngaerden E, Reynders M, Debyser Z, et al. Long-term stability of human immunodeficiency virus viral load and infectivity in whole blood. *Eur J Clin Invest* 1999;29(5):445-52.
- Vangsnæs T. Overview of allograft soft tissue processing, AAOS Online Bulletin, 02-2004. <http://www2.aaos.org/aaos/archives/bulletin/feb04/feature1.htm> E:AAOS Online Bulletin.htm
- Vangsnæs CT, Jr., Garcia IA, Mills CR, Kainer MA, Roberts MR, Moore TM. Allograft transplantation in the knee: tissue regulation, procurement, processing, and sterilization. *Am J Sports Med* 2003;31(3):474-81.

- Vangsness T. Overview of allograft soft tissue processing, AAOS Online Bulletin, 02-2004. <http://www2.aaos.org/aaos/archives/bulletin/feb04/feature1.htm>E:\AAOS Online Bulletin.htm
- Veen M. Chapter. 2. Literature review. In: Bone allografts. A study into bacterial contamination, sensitivity of cultures, decontamination, and contribution to postoperative infection. Doctoraatsthesis, Leiden, Nederland; 1994. p. 19-33.
- Vehmeijer W. Appendix: Processing of bone and soft tissue allografts. In: Bacterial contamination of bone allografts. Doctoraatsthesis, Nederland, 2002; p. 79-87.
- Verbeken G, Verween G, De Vos D, Pascual B, De Corte P, Richters C, De Coninck A, Roseeuw D, Ectors N, Rose T, Jennes S, Pirnay JP. Glycerol treatment as recovery procedure for cryopreserved human skin allografts positive for bacteria and fungi. Cell Tissue Bank 2012;13:1-7.
- von Garrel T, Knaepler H, Gurtler L. [Inactivation of HIV-1 in human femur heads using a heat disinfection system (Lobator SD-1)]. Unfallchirurg 1997;100(5):375-81
- Wachs ME, Amend WJ, Ascher NL, Bretan PN, Emond J, Lake JR, et al. The risk of transmission of hepatitis B from HBsAg(-), HBcAb(+), HBIgM(-) organ donors. Transplantation 1995;59(2):230-4.
- Weber D, Rutala W. Use of metals as microbicides in preventing infections in healthcare. In: Block S, Lippincott Williams and Wilkins, Wolters, editors. Disinfection, sterilization, and preservation; 5th Ed 2001. p. 425-6.
- Whiley DM, Sioots TP. Chapter 3. Molecular amplification methods in diagnostic virology. In: Jerome KR, editor. Lennette's laboratory diagnosis of viral infections, 4th Ed.; Informa Healthcare 2010. p. 19-39.
- WHO – World Health Organization. WHO guidelines for the global surveillance of severe acute respiratory syndrome, updated recommendations; 2004. Internet: http://www.who.int/csr/resources/publications/WHO_CDS_CSR_ARO_2004_1.pdf
- WIP – Werkgroep Infectiepreventie Nederland. Ziekenhuizen. Beleid reiniging, desinfectie en sterilisatie; 2004. Internet : www.wip.nl.
- Zaaijer H. Human T-lymphotropic virus infection: is it a threat? Transplant Proc 1996;28(5):2940.
- Zou S, Dodd RY, Stramer SL, Strong DM. Probability of viremia with HBV, HCV, HIV, and HTLV among tissue donors in the United States. N Engl J Med 2004;351(8):751-9.

COMPOSITION DU GROUPE DE TRAVAIL

Tous les experts ont participé *à titre personnel* au groupe de travail. Les noms des experts du CSS sont annotés d'un astérisque *.

Les experts suivants ont participé à l'élaboration de l'avis :

BAUDOUX Etienne*	Médecine, thérapie cellulaire	ULg
BEELE Hilde*	Médecine, dermatologie	UZ Gent
BOUTSEN-ECTORS Nadine*	Médecine, anatomo-pathologie	KUL
CORNU Olivier*	Médecine, chirurgie orthopédique	UCL
DELFORGE Alain*	Médecine, thérapie cellulaire	ULB
DELLOYE Christian*	Médecine, chirurgie orthopédique	UCL
DE SUTTER Petra*	Médecine reproductive	UZ Gent
GOUBAU Patrick*	Virologie	UCL
GUNS Johan*	Sciences médico-sociale	UZ Brussel
HEINEN Ernst	Histologie humaine	ULg
MUYLLE Ludo*	Médecine, biologie clinique	AFMPS - UZA, UA
PADALKO Elizaveta	Biologie clinique, virologie	UZGent / U Hasselt
PIRNAY Jean-Paul*	Sciences médicales	LabMCT MHKA
SAEGEMAN Veroniek	Médecine, biologie clinique, hygiène hospitalière	UZ Leuven
VAN GEYT Caroline*	Sciences médico-sociales	UZ Gent
VAN RIET Ivan*	Médecine, thérapie cellulaire	UZ Brussel
VANDERKELEN Alain*	Médecine, chirurgie générale	HMRA
VANSTEENBRUGGE Anne	Médecine reproductive, embryologie	CHR Namur
VERBEKEN Gilbert*	Biologie, QA/QC/RA	LabMCT MHKA

L'administration était représentée par :

BONTEZ Walter	Coordination Sang, cellules, tissus et organes	AFMPS
VANTHUYNE Kimberley	Coordination Sang, cellules, tissus et organes	AFMPS

Le groupe de travail a été présidé par Hilde BEELE et le secrétariat scientifique a été assuré par Muriel BALTES.

Au sujet du Conseil Supérieur de la Santé (CSS)

Le Conseil Supérieur de la Santé est un service fédéral relevant du SPF Santé publique, Sécurité de la Chaîne alimentaire et Environnement. Il a été fondé en 1849 et rend des avis scientifiques relatifs à la santé publique aux ministres de la santé publique et de l'environnement, à leurs administrations et à quelques agences. Ces avis sont émis sur demande ou d'initiative. Le CSS ne prend pas de décisions en matière de politique à mener, il ne les exécute pas mais il tente d'indiquer aux décideurs politiques la voie à suivre en matière de santé publique sur base des connaissances scientifiques les plus récentes.

Outre son secrétariat interne composé d'environ 25 collaborateurs, le Conseil fait appel à un large réseau de plus de 500 experts (professeurs d'université, collaborateurs d'institutions scientifiques), parmi lesquels 200 sont nommés à titre d'expert du Conseil. Les experts se réunissent au sein de groupes de travail pluridisciplinaires afin d'élaborer les avis.

En tant qu'organe officiel, le Conseil Supérieur de la Santé estime fondamental de garantir la neutralité et l'impartialité des avis scientifiques qu'il délivre. A cette fin, il s'est doté d'une structure, de règles et de procédures permettant de répondre efficacement à ces besoins et ce, à chaque étape du cheminement des avis. Les étapes clé dans cette matière sont l'analyse préalable de la demande, la désignation des experts au sein des groupes de travail, l'application d'un système de gestion des conflits d'intérêts potentiels (reposant sur des déclarations d'intérêt, un examen des conflits possibles, et un comité référent) et la validation finale des avis par le Collège (ultime organe décisionnel). Cet ensemble cohérent doit permettre la délivrance d'avis basés sur l'expertise scientifique la plus pointue disponible et ce, dans la plus grande impartialité possible.

Les avis des groupes de travail sont présentés au Collège. Après validation, ils sont transmis au requérant et au ministre de la santé publique et sont rendus publics sur le site internet (www.css-hgr.be), sauf en ce qui concerne les avis confidentiels. Un certain nombre d'entre eux sont en outre communiqués à la presse et aux groupes cibles parmi les professionnels du secteur des soins de santé.

Le CSS est également un partenaire actif dans le cadre de la construction du réseau EuSANH (*European Science Advisory Network for Health*), dont le but est d'élaborer des avis au niveau européen.

Si vous souhaitez rester informé des activités et publications du CSS, vous pouvez envoyer un mail à l'adresse suivante : info.hgr-css@health.belgium.be .