



Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information website.

Elsevier hereby grants permission to make all its COVID-19-related research that is available on the COVID-19 resource centre - including this research content - immediately available in PubMed Central and other publicly funded repositories, such as the WHO COVID database with rights for unrestricted research re-use and analyses in any form or by any means with acknowledgement of the original source. These permissions are granted for free by Elsevier for as long as the COVID-19 resource centre remains active.

SÉANCE ÉDUCATIONNELLE

# Évolution des techniques de préparation des produits sanguins labiles (PSL) : inactivation des pathogènes dans les PSL

## Pathogen inactivation in labile blood products

C. Naegelen<sup>a,\*</sup>, H. Isola<sup>b,\*</sup>, D. Dernis<sup>c</sup>, J.-P. Maurel<sup>d</sup>, R. Tardivel<sup>e</sup>, S. Bois<sup>e</sup>, C. Vignoli<sup>f</sup>, J.-P. Cazenave<sup>b</sup>

<sup>a</sup> EFS Bourgogne–Franche-Comté, boulevard Fleming, 25000 Besançon, France

<sup>b</sup> EFS Alsace, 10, rue Spielmann, 67065 Strasbourg, France

<sup>c</sup> EFS Nord-de-France, 21, rue Camille-Guérin, 59012 Lille, France

<sup>d</sup> EFS Aquitaine–Limousin, place Amélie-Raba-Léon, 33035 Bordeaux, France

<sup>e</sup> EFS Bretagne, rue Pierre-Jean-Gineste, 35016 Rennes, France

<sup>f</sup> EFS Alpes–Méditerranée, 149, boulevard Baille, 13005 Marseille, France

### Résumé

Les techniques d'inactivation des agents pathogènes dans les produits sanguins labiles (PSL) apparaissent comme la nouvelle stratégie permettant d'augmenter la sécurité transfusionnelle face aux risques de transmission d'agents pathogènes par les PSL. Différentes techniques sont en cours de développement ou déjà validées et utilisées en France. Ces dernières ne s'appliquent que pour le plasma ou les concentrés plaquettaires. Les mécanismes d'action ainsi que l'efficacité d'inactivation et d'atténuation des agents pathogènes varient en fonction des différentes techniques. Chacune d'elles constitue un procédé de préparation composé d'opérations unitaires dont il faut s'assurer de la maîtrise dans le but de garantir la qualité et l'efficacité transfusionnelle du produit traité.

© 2009 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

### Abstract

The techniques for inactivation of pathogens in labile blood products (LBP) would appear to be the new strategy which will permit us to increase transfusion safety in the face of the risks of transmission of pathogenic agents by LBP. Various methods are in the course of development or already validated and used in France. The latter only apply however to plasma or platelet concentrates. The mechanisms of action and the efficacy of inactivation and attenuation of pathogenic agents vary with the different techniques. Each of these constitutes a preparative procedure composed of unit steps which have to be fully mastered in order to ensure the quality and transfusion efficacy of the treated product.

© 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Mots clés :** Inactivation ; Atténuation ; Agents pathogènes ; Produits sanguins labiles ; Sécurité transfusionnelle

**Keywords:** Inactivation; Attenuation; Pathogens; Labile blood products; Transfusion safety

## I. INTRODUCTION

Des progrès significatifs en matière de réduction de risque de transmission d'agents pathogènes chez les receveurs ont

\* Auteurs correspondants.

Adresses e-mail: christian.naegelen@efs.sante.fr (C. Naegelen), herve.isola@efs-alsace.fr (H. Isola).

été observés au cours des deux dernières décennies. Notamment dans les pays industrialisés où le risque transfusionnel est relativement faible grâce aux systèmes de sélection des donneurs et aux méthodes de détection permettant ainsi la destruction des produits issus de dons présentant un résultat positif aux différents marqueurs sérologiques testés. Jusqu'à présent, la stratégie a donc été, d'une part, de renforcer la sélection des donneurs et, d'autre part, de développer et de mettre en place des méthodes de détection des agents pathogènes [1–4]. Néanmoins, il persiste encore un risque résiduel de transmission de ces agents par transfusion [5]. De 2005 à 2007, le risque résiduel calculé est de 1 pour 2 950 000 transfusions pour la transmission du VIH, de 1 pour 8 300 000 pour le HTLV, de 1 pour 12 500 000 pour le virus de l'hépatite C (VHC) et de 1 pour 1 000 000 pour le virus de l'hépatite B (VHB) [6]. Outre ces risques résiduels, les incidents transfusionnels par contamination bactérienne, bien que faibles, persistent [5]. En effet, le nombre d'infections bactériennes transmises par transfusion (IBTT) en France était de 12 en l'an 2000, tous PSL confondus, dont deux de grade quatre (décès au cours ou au décours de la transfusion) impliquant des concentrés de plaquettes. En 2007, le nombre d'IBTT était de neuf dont trois de grade quatre impliquant à nouveau des concentrés plaquettaires [7]. Le rapport annuel 2006 d'hémovigilance de l'Agence française de sécurité sanitaire et des produits de santé (Afssaps) rapporte également pour 2006 des données comparables, avec sept cas, dont trois cas impliquant des concentrés de globules rouges (GR) (tous de grade 1 : absence de menace vitale immédiate ou à long terme) et quatre cas impliquant des concentrés de plaquettes d'aphérèse (CPA) (tous de grade 3 : menace vitale immédiate) [8]. Enfin, les dernières années ont mis en évidence la nécessité de prévenir le risque des agents pathogènes émergents qui peuvent poser de graves problèmes transfusionnels dans les différentes régions du monde, tels que le West Nile Virus, virus du syndrome respiratoire aigu sévère (Sras) ou le virus du Chikungunya [5]. Ainsi, au vu du nombre important d'agents pathogènes connus, de l'émergence continue de nouveaux pathogènes, la mise en place systématique de nouvelles méthodes de détection n'est pas envisageable. Les procédés d'inactivation constituent alors une nouvelle stratégie contre les agents pathogènes connus, émergents et ceux encore non-identifiés [1–5]. En effet, bien que la sécurité transfusionnelle en soit améliorée, la détection des agents pathogènes reste en effet une démarche réactive car les méthodes de détection sont en général développées une fois le pathogène identifié. L'inactivation des agents pathogènes est au contraire une démarche proactive permettant d'éliminer les éventuels agents pathogènes présents dans les produits. La plupart des méthodes existantes et en cours de développement agissent sur les acides nucléiques de ces pathogènes et permettent ainsi l'inactivation d'un large spectre d'agents pathogènes présents dans les produits sanguins. Cependant, de telles méthodes ne sont mises en place une fois leur efficacité et leur absence de toxicité démontrées [1–4].

## 2. MÉCANISME D'ACTION DES MÉTHODES D'INACTIVATION DES AGENTS PATHOGÈNES DANS LES PSL

Le principe de toute technique d'inactivation est d'utiliser un agent inactivant capable de détruire ou de réduire la charge d'agents pathogènes présents dans le PSL. Ces agents pathogènes pouvant être intracellulaires ou extracellulaires. Les techniques d'inactivation doivent de plus éviter toutes altérations chimiques ou biologiques significatives des produits thérapeutiques. Ainsi, l'efficacité d'une technique est basée sur la destruction ciblée d'un élément fonctionnel de l'agent pathogène, cet élément étant absent ou n'intervenant pas dans la fonctionnalité du composé sanguin [1].

La plupart des techniques d'inactivation utilisent des agents ayant pour cible les membranes ou les enveloppes des agents pathogènes ou leurs acides nucléiques. Les agents détruisant les membranes ou les enveloppes tels que les solvants organiques et les détergents ne peuvent être utilisés que pour les produits acellulaires. Ils sont de plus inefficaces contre les virus non enveloppés. Les agents aux mécanismes d'action ciblés sur les acides nucléiques tels que les produits chimiques photosensibles ou les agents alkylants ont un spectre d'utilisation potentiellement plus large. Les synthèses fonctionnelles par blocage de la transcription et de la translation ainsi que la prolifération par blocage de la réplication des agents microbiens présents sont stoppés sans altérer pour autant les membranes des produits cellulaires thérapeutiques. Ainsi, la plupart des agents pathogènes tels que les virus, les bactéries, les champignons ou les parasites ainsi que les leucocytes du donneur peuvent être détruits [1–4]. Les méthodes actuelles ne peuvent cependant inactiver ou détruire la plupart des spores et les agents non conventionnels tels que les prions.

De telles techniques d'inactivation, agissant sur l'intégrité des acides nucléiques, doivent également assurer une absence de toxicité des produits transfusés chez les patients. À moins que l'agent inactivant utilisé ne soit inoffensif pour la santé humaine aux différentes doses d'exposition, les quantités résiduelles du produit doivent être éliminées ou réduites ou transformées en produits secondaires inoffensifs [1–4].

### 2.1. Les techniques physiques

#### 2.1.1. Généralités

Historiquement, les techniques physiques furent les premières méthodes disponibles et mises en œuvre en vue de sécuriser et de purifier les produits sanguins labiles.

Même si peu d'études sont disponibles, il a été établi que l'élimination du plasma par lavages consécutifs ou déplasmatisation, étudiée dans le cadre de la réduction virale, est d'une efficacité limitée. Une réduction de 99,999 % du plasma contenu dans les concentrés globulaires par lavages permet de réduire au maximum de 2 log la charge virale [9].

Les techniques de cryoconservation suivies d'une décongélation appliquées aux concentrés de GR permettent d'obtenir une déplasmatisation et une réduction de l'ordre de 2 à 3 log des leucocytes. L'efficacité de ce procédé a été rapportée par

plusieurs études cliniques qui ont montrées une diminution du risque de transmission du cytomégalovirus (CMV) [10].

Apparue dans les années 1985, la filtration pour déleucocytation des produits sanguins labiles est un procédé systématiquement appliqué en France sur les produits cellulaires depuis 1998 et depuis 2001 pour le plasma.

Les performances des dispositifs actuels permettent d'obtenir une efficacité de déleucocytation de l'ordre de 4 log sur les produits cellulaires et de 5 log lorsque les techniques sont appliquées spécifiquement au plasma soit une contamination résiduelle attendue inférieure à  $1 \times 10^6$  leucocytes par poche (concentré globulaire, concentré plaquettaire) ou inférieure à  $1 \times 10^4$  par litre (plasma).

Ces méthodes sont donc efficaces pour la réduction du risque de transmission des virus lymphotropes tels que le CMV, l'*Human T lymphotropic Virus III* (HTLV-III), l'*Epstein Barr Virus* (EBV). L'efficacité de la déleucocytation par filtration des produits sanguins labiles dans le cadre de la transmission du CMV est cliniquement établie [11,12]. Il est démontré que le risque de transmission de l'HTLV-III est également réduit par l'utilisation de produits déleucocytés [13]. De même, la déleucocytation permet de réduire d'un facteur de 4 log le nombre de copies de génome viral de l'EBV après filtration [14]. La technique de déleucocytation pour le plasma a été mise en place pour le plasma en 2001 par application du principe de précaution, notamment par rapport au prion, pathogène responsable du nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt Jakob (PrPSc). L'efficacité de cette technique n'est actuellement pas démontrée.

D'autres techniques comme l'irradiation gamma, l'irradiation aux UVB, aux UVC ont été étudiées. L'irradiation gamma a montré son efficacité sur les produits plasmatiques, mais les doses requises ne sont pas applicables aux cellules sans dommage pour celles-ci [15,16]. Les techniques d'irradiation aux UVB ou aux UVC réalisées dans des conditions opératoires précises sur des suspensions plaquettaires ont montré leur efficacité sur certains virus ou bactéries (UVB : 4 log de poliovirus, UVC : 4 log CPV, 4 log : *Staphylococcus aureus*), sans altération fonctionnelle importante des cellules. Ces procédés sont inefficaces sur d'autres virus [17] (ex : UVC : 1 log VIH [18]).

### 2.1.2. Pasteurisation du plasma

On entend par pasteurisation tout traitement de chauffage de dix heures à  $+60^\circ\text{C}$  à l'état liquide. Ce traitement est appliqué avec succès, depuis plusieurs décennies, en tant que traitement d'inactivation virale pour divers dérivés plasmatiques (albumine, antithrombine III, alpha I antitrypsine...). La pasteurisation du plasma est effectuée en présence de stabilisants composés en grande majorité de sucres ; leurs concentrations respectives ont été calculées de manière à minimiser les pertes d'activité des protéines plasmatiques labiles, sans pour autant avoir un effet protecteur des virus.

Le mélange de stabilisation comprend les composants tels que sorbitol, saccharose, gluconate de calcium, lysine et arginine.

**2.1.2.1. Sorbitol.** Ce sucre-alcool à la dose utilisée évite de façon non spécifique la formation d'agrégats protéiques

(par exemple on constate par contrôle en *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) l'absence de formation de polymères d'albumine ou de polymères d'immunoglobuline lorsque le plasma est chauffé en sa présence). De plus, le sorbitol permet d'assurer une stabilisation significative (supérieure à 80 % en moyenne) de l'activité coagulante de la plupart des facteurs de la coagulation dont le facteur VIII, le fibrinogène, le facteur V, le facteur XI et le facteur XIII, et dans une moindre mesure celle des composants du complexe prothrombinique.

**2.1.2.2. Saccharose.** Il s'agit d'un sucre dont la présence vise à compléter le rôle du sorbitol dans le contrôle de l'absence de formation d'agrégats et le maintien de l'activité biologique des protéines plasmatiques. Dans le cas présent, l'ajout de saccharose présente un intérêt spécifique dans le meilleur maintien de l'activité coagulante des composants du complexe prothrombinique tels que le facteur IX et le facteur II (supérieur à 70 %).

**2.1.2.3. Gluconate de calcium.** Le calcium, à une concentration de 1 à 10 mM, présente un effet stabilisateur établi vis-à-vis de plusieurs facteurs de la coagulation, en premier lieu le facteur VIII.

**2.1.2.4. Lysine.** Cet acide aminé est ajouté au plasma préalablement à l'étape de pasteurisation car des expérimentations ont montré que sa présence contribuait à protéger le facteur VIII et le fibrinogène d'une possible dénaturation, révélée par la perte de l'activité coagulante et la diminution du pouvoir de coagulabilité.

**2.1.2.5. Arginine.** Au même titre que la lysine, l'arginine est un acide aminé dont la présence joue un rôle favorable au maintien de l'activité de facteurs de la coagulation dont le facteur IX, ou d'anticoagulants comme la protéine C.

À l'issue du palier de température (dix heures à  $+60^\circ\text{C}$ ), les stabilisants ajoutés sont éliminés par une étape de dialyse. La stérilité bactérienne du plasma pasteurisé est assurée par une filtration sur un filtre absolu de porosité de  $0,22\ \mu\text{m}$  (Tableau 1).

## 2.2. Les techniques photochimiques

Ces techniques utilisent une molécule photosensible et un rayonnement électromagnétique. Sous l'action du rayonnement, la molécule est transformée en un photo-produit qui agit de manière irréversible sur les acides nucléiques. Leur mode d'action varie en fonction des techniques.

### 2.2.1. Amotosalen-HCl + UVA (technique Intercept® de Cerus [Pays-Bas]) : inactivation des concentrés plaquettaires et du plasma

L'amotosalen-HCl est une molécule de synthèse appartenant à la famille des psoralènes. Ce sont des composés actifs d'origine végétale qui sont depuis très longtemps connus comme étant des molécules photosensibles. Du fait de leur structure plane et de leur faible poids moléculaire, la

**Tableau 1**

Efficacité du procédé de pasteurisation du plasma sur les agents pathogènes.

Virus enveloppés	Log réduction
VIH	> 6 (> 10 min)
PrV	> 4,15 (< 2 h)
Virus Sindbis	> 5,5 (< 5 h)
Virus de la vaccine	> 4,3 (< 1 h)
Virus parainfluenza, type 3	> 6,3 (< 2 h)
Virus nus	Log reduction
Virus poliomyélique (Sabin)	> 6,23 (< 2 h)
Reovirus	3,2 (< 10 h)
Bactéries	Log réduction
Filtration stérilisante	Optimal
Parasites	Log réduction
Filtration stérilisante	Optimal

PrV : virus de la pseudo-rage.

pénétration de ces molécules à travers les membranes plasmiques est facilitée. L'amotosalen-HCl a pour propriété de se fixer au niveau de la région hélicoïdale des acides nucléiques doubles brins ou simple brin et s'intercale entre les bases azotées pyrimidiques. Une exposition au rayonnement de type UVA (320–400 nm) déclenche une réaction photochimique qui fixe par liaison covalente les molécules photo-activées aux bases pyrimidiques. Les doubles brins et les simples brins d'acides nucléiques sont ainsi fixés entre eux par de multiples liaisons covalentes (une liaison toutes les 83 paires de bases). Les photo-produits de la réaction sont rapidement expulsés de ces structures macromoléculaires. Une incubation prolongée avec un composé adsorbant (quatre à six heures) permet d'éliminer l'amotosalen HCl résiduel ainsi que les photo-produits secondaires.

L'amotosalen-HCl se fixe également sur les lipides et les protéines. Ainsi, environ 15 % de l'amotosalen-HCl initial se fixe sur les protéines plasmiques et les plaquettes même après avoir effectué la réduction de l'amotosalen HCl et des photo-produits ; la majorité de l'amotosalen HCl étant liée aux lipides et 1 à 2 % aux protéines.

Du fait de l'activation de l'amotosalen-HCl par les rayonnements UVA, qui est absorbé par l'hémoglobine, cette technique ne peut pas s'appliquer aux concentrés de GR. Elle est efficace pour le plasma et les concentrés plaquettaires (Tableau 2). Elle inactive un large spectre d'agents pathogènes tels que les virus enveloppés et non enveloppés, les bactéries, les parasites et les leucocytes résiduels. L'inactivation des lymphocytes T est en effet supérieure à 5 log et la technique dégrade plus de paires de base (1/83) que l'irradiation par rayonnement gamma (1/37 000).

### 2.2.2. Riboflavine (vitamine B<sub>2</sub>) + UV (technique Mirasol® de Caridian [États-Unis])

La riboflavine est une molécule qui se fixe aux acides nucléiques par intercalation. Un rayonnement ultraviolet génère une photolyse du complexe macromoléculaire par transfert d'électrons et réaction d'oxydation de la guanine, une

**Tableau 2**

Efficacité du traitement par l'amotosalen HCl et les UVA sur les agents pathogènes [19–28].

Virus enveloppés	Log réduction [19–28]	
	Plaquettes	Plasma
<b>Virus de l'hépatite B</b>		
VHB (humain, souche MS-2) <sup>a</sup> in vivo chimpanzé	> 5,5 <sup>c</sup>	> 4,5
Duck Hepatitis B Virus (DHBV) (modèle pour VHB) <sup>b</sup> in vivo canard	> 6,2 <sup>c</sup>	4,6
<b>Virus de l'hépatite C</b>		
VHC (humain, souche Hutchinson) <sup>a</sup> in vivo chimpanzé	> 4,5 <sup>c</sup>	> 4,5
Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) (modèle pour VHC)	> 6,0 <sup>c</sup>	≥ 6,0
<b>VIH</b>		
VIH-1 libre	> 6,2 <sup>c</sup>	> 6,8
VIH-1 intracellulaire	> 6,1 <sup>c</sup>	> 6,4
<b>HTLV</b>		
HTLV-1	4,7 <sup>c</sup>	≥ 4,5
HTLV-2	5,1 <sup>c</sup>	> 5,7
<b>CMV</b>	> 5,9 <sup>c</sup>	–
Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV)	≥ 6,2	≥ 5,5
Virus de la vaccine	> 4,7	
West Nile Virus	> 5,5	≥ 6,8
Virus Chikungunya	> 6,4	≥ 7,6
Virus de la Dengue	> 4,0	
Influenza A H5NI (virus de la grippe aviaire)	> 5,9	> 5,7
Virus nus	Log réduction	
	Plaquettes	Plasma
Bluetongue virus, type 11	6,1–6,4 <sup>c</sup>	5,1
Parvovirus B19	2,0– > 6,0	1,8–2,8
Feline conjunctivitis virus (calicivirus)	1,7–2,4 <sup>c</sup>	
Simian adenovirus, type 15 (SV15)	0,7–2,3 <sup>c</sup>	
Human adenovirus, type 5	> 5,9	≥ 6,9
Parvovirus porcine	0–0,2 <sup>c</sup>	
<b>Bactéries Gram+</b>	Log réduction	
	Plaquettes	Plasma
<i>Bacillus cereus</i> (forme végétative)	> 5,5 <sup>c</sup>	
<i>Bacillus cereus</i> (incluant les spores)	3,6 <sup>c</sup>	
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	> 6,3 <sup>c</sup>	
<i>Listeria monocytogenes</i>	> 6,3 <sup>c</sup>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,6 <sup>c</sup>	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	> 6,6 <sup>c</sup>	> 7,3
<i>Streptococcus pyogenes</i>	> 6,8 <sup>c</sup>	
<b>Bactéries Gram–</b>	Log réduction	
	Plaquettes	Plasma
<i>Enterobacter cloacae</i>	5,9 <sup>c</sup>	
<i>Escherichia coli</i>	> 6,4 <sup>c</sup>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	> 5,6 <sup>c</sup>	≥ 7,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,5 <sup>c</sup>	
<i>Serratia marcescens</i>	> 6,7 <sup>c</sup>	
<i>Salmonella choleraesuis</i>	> 6,2 <sup>c</sup>	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	> 5,9 <sup>c</sup>	> 7,3
<b>Bactéries anaérobies</b>	Log réduction	
	Plaquettes	Plasma
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	> 6,5 <sup>c</sup>	
<i>Clostridium perfringens</i> (forme végétative)	> 7,0 <sup>c</sup>	
<i>Lactobacillus</i> spp. (anaérobie facultatif)	> 6,9 <sup>c</sup>	

Tableau 2 (Suite)

Bactéries anaérobies		Log réduction	
		Plaquettes	Plasma
<i>Propionibacterium acnes</i> (anaérobie facultatif)		> 6,7 <sup>c</sup>	
Parasites		Log réduction	
		Plaquettes	Plasma
<i>Trypanozoma cruzi</i> (maladie de Chagas)		> 5,3 <sup>c</sup>	> 5,0
<i>Plasmodium falciparum</i> (paludisme)		> 6 <sup>c</sup>	≥ 6,9
<i>Babesia microti</i>		> 5,3	> 5,3
<i>Leishmania</i> spp.			
<i>Leishmania mexicana promastigotes</i>		> 5,0	
<i>Leishmania major amastigotes</i>		> 4,3	
Spirochètes		Log réduction	
		Plaquettes	Plasma
<i>Treponema pallidum</i> (syphilis)		≥ 6,8–< 7,0 <sup>c</sup>	> 5,9
<i>Borrelia burgdorferi</i> (maladie de Lyme)		> 6,8	> 10,6
Leucocytes		inactivation	
		Plaquettes	Plasma
Lymphocytes T	> 5,4 log		
Modification ADN	Une liaison amotosalen-ADN approximativement toutes les 83 paires de bases		
Transfusion chez la souris	Prévention de la réaction greffon contre hôte chez la souris		

CMV : cytomégalo virus ; VHB : virus de l'hépatite B.

<sup>a</sup> L'infectivité de la souche humaine MS-2 du VHB et de la souche humaine Hutchinson du VHC a été mesurée après injection de concentrés plaquettaires traités par amotosalen et UVA chez trois chimpanzés [20] ou de plasmas traités par amotosalen et UVA chez deux chimpanzés [24].

<sup>b</sup> L'infectivité du DHBV a été mesurée après injection chez douze canards de concentrés plaquettaires traités par amotosalen et UVA [20] ou de plasma traités par amotosalen et UVA [24].

<sup>c</sup> Données approuvées par l'Autorité compétente (IMB) et l'Organisme notifié (TÜV).

rupture des brins des acides nucléiques et une formation de ponts covalents entre les acides nucléiques ainsi dégradés. Le nombre de cassures des acides nucléiques est de 1 pour 300 paires de base. Malgré cette photo-toxicité ciblée sur les acides nucléiques, la riboflavine est généralement reconnue non toxique. La riboflavine et ses photo-produits sont présents dans une grande variété d'aliments et la riboflavine, ses métabolites ainsi que ses photo-produits se retrouvent normalement dans le sang. Cependant, plusieurs études doivent être effectuées car le niveau de photo-produits issus de la riboflavine est considérablement élevé dans les produits traités par cette technique. Elle est développée pour inactiver le plasma et les concentrés plaquettaires. Cette technique a démontré son efficacité contre les agents pathogènes tels que les virus, les parasites, les leucocytes et certains virus non enveloppés (Tableau 3).

### 2.2.3. Viro-atténuation du plasma par le bleu de méthylène (technique Theraflex® de Macopharma [France])

Le colorant bleu de méthylène est une phénothiazine. Il présente une affinité pour les acides nucléiques (paires guanine–cytosine). Après absorption d'énergie lumineuse,

Tableau 3

Efficacité du traitement par la riboflavine et les UV sur les agents pathogènes dans les études publiées [29–34].

Virus enveloppés		Log réduction
VIH		
VIH-1 libre		5,9
VIH-1 intracellulaire		4,5
Virus de la stomatite vésiculeuse		≥ 6,3
West Nile Virus		5,2
Virus Sindbis (modèle VHC)		3,2 <sup>a</sup>
PrV (modèle VHB)		2,5–3 <sup>a</sup>
Virus nus		Log réduction
Parvovirus porcin		≥ 5,0
Bactéries Gram+		Log réduction
<i>Bacillus cereus</i> (forme végétative)		1,9–2,7
<i>Staphylococcus aureus</i>		3,6–4,8
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		≥ 4,2
Bactéries Gram–		Log réduction
<i>Escherichia coli</i>		≥ 4,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		≥ 4,5
<i>Serratia marcescens</i>		4,0
Bactéries		Log réduction
<i>Orientia tsutsugamushi</i> (scrub typhus)		> 5,0
Parasites		Log réduction
<i>Trypanozoma cruzi</i> (maladie de Chagas)		5–7
<i>Leishmania</i> spp.		5–7

PrV : virus de la pseudo-rage.

<sup>a</sup> Non publié. Dossier en cours.

une réaction photodynamique produit des formes d'oxygène actives entraînant la dénaturation irréversible des acides nucléiques et de certaines protéines. La réplication et la transcription de l'ADN et/ou ARN viral sont ainsi inhibées. L'enveloppe lipidique des virus enveloppés possède une haute affinité pour le bleu de méthylène. Le colorant, localement concentré, rend ces virus sensibles à la photo-inactivation. Le colorant n'étant pas actif sur les pathogènes intracellulaires, des stratégies de lyse cellulaire (congélation–décongélation) ou de déplétion cellulaire sont déployées. Il n'est également pas actif sur les bactéries (Tableau 4).

## 2.3. Technique biochimique

### 2.3.1. Plasma viro-atténué par solvant-détergent (PVA-SD)

La méthode d'inactivation virale par solvant détergent (SD), utilisée depuis 1985 pour le traitement des facteurs de l'hémostase a pu être appliquée au plasma thérapeutique, car elle s'est avérée très efficace dans l'inactivation des virus enveloppés. Depuis 1992, l'unité de production de Bordeaux permet de fournir la France en PVA-SD.

La démonstration de la viro-atténuation dans le PVA-SD est fondée sur des études de validation in vitro et des études in vivo chez le chimpanzé. Les agents utilisés pour la réalisation de ces études de validation sont des virus représentatifs de la majorité des virus potentiellement impliqués, ou qui ont été impliqués, dans les cas de transmissions virales transfusionnelles.

**Tableau 4**

Efficacité du traitement par le bleu de méthylène sur les virus dans l'étude publiée [35].

Virus enveloppés	Log réduction
VIH	> 5,5
Virus de l'hépatite C BVDV (modèle pour VHC)	> 6,2
Virus de l'hépatite B DHBV (modèle pour VHB)	3,9
Virus grippal (influenza)	5,1
Virus de la pseudo-rage	5,4
Herpes simplex virus	> 6,5
Virus de la stomatite vésiculeuse	> 4,9
West Nile Virus	> 6,5
Virus nus	Log réduction
VHA	0
Encéphalomyocardite	0
Parvovirus porcin	0
Virus poliomyélitique	0
SV40	4,3
Adénovirus	4
Parvovirus B19	> 4
VHE	> 3,9

VHA : virus de l'hépatite A ; SV40 : simian adénovirus, type 40 ; VHE : virus de l'hépatite E.

**Tableau 5**

Efficacité du procédé solvant-détergent sur les virus.

Virus enveloppés	Log réduction
VHC	> 5,0
Virus de la stomatite vésiculeuse (modèle VHC)	> 5,1
Virus Sindbis (modèle VHC)	> 8,8
VHB	> 6,6
Virus de l'hépatite B DHBV (modèle pour VHB)	> 7,3
VIH-1	> 11,0
VIH-2	> 6,0
CMV	> 6,0
Herpes simplex virus-1	> 5,8
West Nile Virus	> 5

VHC : virus de l'hépatite C ; VHB : virus de l'hépatite B ; CMV : cytomégalovirus.

Sur la base des études de validation, le processus de production du PVA-SD :

- est considéré comme très efficace sur les virus enveloppés potentiellement présents dans le plasma et notamment efficace vis-à-vis du VIH 1/2, de l'HTLV-I/II, des virus de l'hépatite A, B et C ainsi que du CMV ;
- est sans action sur les virus nus. Cependant, des essais ont montré que certaines étapes du processus (élimination des inactivateurs) induisent une élimination de certains agents infectieux. En outre, le mélange des plasmas assure la présence d'anticorps dans le produit qui neutralisent certains virus, notamment des virus nus comme le virus de l'hépatite A (VHA) et le parvovirus B19 ;
- élimine le risque de transmission du parvovirus B19, car la recherche des acides nucléiques du Parvovirus B19 est effectuée par le site de Bordeaux sur chaque plasma entrant dans la composition du pool ;
- élimine le risque de transmission du VHA, car la norme de la Pharmacopée Européenne concernant le titre d'anti-VHA

neutralisant est constamment respectée avec les plasmas prélevés en France ( $\geq 2000$  mUI/mL) ;

- élimine les bactéries puisque le processus de production inclue une filtration stérilisante (Tableau 5).

### 3. APPLICATIONS ET PROCÉDÉS

#### 3.1. Les concentrés plaquettaires

##### 3.1.1. Amotosalen-HCl + UVA (technique Intercept®)

La technique Intercept® a été validée par l'Afssaps pour les concentrés plaquettaires d'aphérèse déleucocytés (CPAD-IA) et les mélanges de concentrés de plaquettes standards déleucocytés (MCPSD-IA). Leurs caractéristiques sont définies au *Journal officiel*. Actuellement, les concentrés plaquettaires traités par amotosalen-HCl (CP-IA) sont préparés par quatre EFS régionaux (Alsace, Réunion, Guadeloupe-Guyane, Martinique). Les CP avant traitement ont un contenu plaquettaire compris entre  $2 \times 10^{11}$  et  $7 \times 10^{11}$  plaquettes. Celles-ci sont en suspension dans une solution additive (Intersol®) et le plasma résiduel est compris entre 32 et 47 %, évitant ainsi une fixation importante de l'amotosalen-HCl sur les protéines plasmatiques. Les rayonnements UVA étant absorbés par l'hémoglobine, la concentration en GR résiduels dans le CP ne doit pas excéder  $4 \times 10^6$  GR/mL afin de garantir une illumination efficace. Un dispositif médical à usage unique (DMU) est connecté aux CP et permet d'effectuer les différentes opérations unitaires du procédé Intercept® ; addition de l'amotosalen-HCl, illumination, réduction de l'amotosalen résiduel, conservation. L'addition de 15 mL d'amotosalen-HCl 3 mM (DMU petit volume) pour les CP de volume compris entre 255 et 325 mL ou de 17,5 mL d'amotosalen HCl 3 mM (DMU grand volume) s'effectue en transférant les CP dans la poche d'illumination. La concentration en amotosalen varie ainsi entre 130 et 166  $\mu$ M, la concentration efficace étant comprise entre 120 et 180  $\mu$ M. L'opération d'illumination s'effectue sous agitation et permet de délivrer par rayonnement UVA une dose énergétique comprise entre 3,2 et 4,0 J/cm<sup>2</sup> (DMU petit volume) ou entre 3,5 et 4,3 J/cm<sup>2</sup> (DMU grand volume). Deux CP sont traités pour un cycle d'illumination compris entre quatre et six minutes. L'amotosalen résiduel et les photo-produits sont ensuite éliminés par adsorption au contact de billes adsorbantes immobilisées dans une poche contenant le CP. Cette opération s'effectue sous agitation et la durée minimale est de quatre heures (DMU petit volume) ou de six heures (DMU grand volume) avec une durée maximale limitée à 16 heures. La concentration d'amotosalen résiduel doit être inférieure ou égale à 2  $\mu$ M. Le CP issu de cette phase est conservé dans une poche de conservation pour plaquettes jusqu'à transfusion.

##### 3.1.2. Riboflavine + UV (technique Mirasol®)

Les études de validation sont en cours pour les CP traités par la technique Mirasol. Cette technique exige des CP dont les

plaquettes sont en suspension dans 100 % de plasma. Le CP est transféré par connexion stérile dans la poche d'illumination. L'addition de la solution de riboflavine s'effectue par transfert de celle-ci dans la poche d'illumination. La concentration de la riboflavine est alors approximativement de 50  $\mu\text{M}$ . L'illumination par rayonnement UV (285 à 365 nm) permet de délivrer au CP une dose énergétique de 6,2 J/mL [31]. Le temps d'exposition au rayonnement est dépendant du volume du CP qui doit être compris entre 170 et 360 mL et est de l'ordre de 10 minutes. Un CP est illuminé par cycle d'illumination. Il est ensuite conservé dans la poche jusqu'à transfusion.

### 3.1.3. UVC

Bien que non disponible en France et encore à l'étude, un procédé de réduction des pathogènes par action d'un rayonnement UVC est décrit [17]. Les mélanges de concentrés de plaquettes à traiter par cette technique sont suspendus en solution additive (35 % plasma, 65 % solution cristalloïde de conservation). Le mélange de concentrés de plaquettes déleucocytés est ensuite transféré dans une poche perméable aux rayonnements UV. La poche est illuminée (254 nm) à une dose de 0,4 J/cm<sup>2</sup> pendant 60 secondes et constamment et vigoureusement agitée (agitation orbitale). Après illumination, le produit est transféré dans une poche permettant la conservation du mélange de concentrés de plaquettes.

## 3.2. Le plasma

### 3.2.1. Préparation du plasma frais congelé viro-atténué par solvant-détergent déleucocyté

Le PVA-SD est préparé en France (EFS-Aquitaine-Limousin) à partir d'un pool de plasma de 100 donneurs maximum (contre 400 dans le reste de l'Europe). Il s'agit de pools de plasmas d'aphérèse de même groupe sanguin congelés dans les six heures suivant le prélèvement.

L'inactivation des agents pathogènes est réalisée après congélation-décongélation (qui détruit les cellules) en utilisant un solvant (tri n-butyl phosphate : TnBP) et un détergent (Triton X100). Cette technique nécessite plusieurs filtrations qui entraînent une élimination totale des cellules (et des pathogènes intracellulaires), des débris cellulaires, des antigènes (plaquet-taires, érythrocytaires, leucocytaires) et des bactéries. L'élimination des inactivateurs s'opère par addition d'huile de ricin suivie d'une chromatographie. Afin de répondre à la norme des caractéristiques des PSL (FVIIIc > 0,7 UI/mL), les plasmas de groupe O sont concentrés par ultrafiltration. Après filtration stérilisante, le plasma, produit acellulaire et stérile (chaque lot de fabrication un contrôle de stérilité et d'apyrogénicité), est réparti aseptiquement en unités de 200 mL.

### 3.2.2. Préparation du plasma viro-atténué par le bleu de méthylène

Le plasma viro-atténué par le bleu de méthylène est produit par huit laboratoires de préparation des PSL en France. Il est depuis septembre 2008 l'un des trois produits plasmatiques thérapeutiques délivré par l'EFS vers les établissements de soins.

La préparation du plasma viro-atténué est réalisée suivant un protocole standardisé combinant :

- l'utilisation d'un plasma d'aphérèse déleucocyté (moins de 10<sup>4</sup> leucocytes résiduels par litre) ;
- la mise en œuvre d'un dispositif à usage unique permettant après connexion stérile à la poche de plasma d'ajouter 85  $\mu\text{g}$  de bleu de méthylène permettant d'obtenir une concentration moyenne finale en bleu de méthylène de 0,84 à 1,13  $\mu\text{M}$  dans le plasma ;
- l'apport de l'énergie lumineuse nécessaire à l'illumination par une source émettant à 590 nm et délivrant une dose de 180 J/cm<sup>2</sup>. Quatre poches sont traitées par cycle pendant 20 à 25 minutes ;
- la filtration du plasma traité pour l'élimination du bleu de méthylène et de ses résidus photochimiques en vue d'obtenir une concentration en bleu de méthylène résiduel inférieure à 30  $\mu\text{g/L}$ . Le volume du plasma doit être compris entre 200 et 300 mL ;
- la congélation du produit viro-atténué qui doit intervenir dans les 12 heures après le prélèvement.

### 3.2.3. Préparation du plasma frais congelé viro-atténué par amotosalen

La technique Intercept® a été validée par l'Afssaps pour le plasma prélevé par aphérèse (plasma frais congelé d'aphérèse déleucocyté traité pour atténuation d'agent pathogène par Amotosalen [PFCAD-IA]). Ses caractéristiques sont définies au *Journal officiel*. Actuellement, le PFCAD-IA est préparé par l'EFS-Alsace. Le volume de plasma avant traitement doit être compris entre 385 et 650 mL. La concentration en GR résiduels ne doit pas excéder  $4 \times 10^6$  GR/mL. Un DMU est connecté au plasma et permet d'effectuer les différentes opérations unitaires du procédé Intercept ; addition de l'amotosalen, illumination, réduction de l'amotosalen résiduel, conservation. L'addition de 15 mL d'amotosalen-HCl 6 mM s'effectue en transférant le plasma dans la poche d'illumination. La concentration en amotosalen varie ainsi entre 135 et 225  $\mu\text{M}$ . L'opération d'illumination s'effectue sous agitation et permet de délivrer par rayonnement UVA une dose énergétique comprise entre 5,8 et 7,0 J/cm<sup>2</sup>. Deux plasmas de 650 mL maximum sont traités pour un cycle d'illumination compris entre six et huit minutes. L'amotosalen résiduel est ensuite éliminé par adsorption au contact de billes adsorbantes immobilisées dans un filtre. Cette opération s'effectue par transfert du plasma illuminé de la poche d'illumination vers les trois poches de conservation. La durée moyenne est inférieure à 30 minutes. La concentration d'amotosalen résiduel doit être inférieure ou égale à 2  $\mu\text{M}$ . Le plasma est ensuite réparti par gravité entre les trois poches pour constituer trois unités thérapeutiques d'un volume supérieur à 200 mL. La congélation de ces unités doit se faire dans les huit heures suivant l'heure de fin de prélèvement.

### 3.2.4. Pasteurisation

La fabrication d'un lot de plasma pasteurisé met en œuvre un volume de 100 dons (ou moins) obtenus par plasmaphérèse. En tant que matériel de départ, les plasmaphéreses se présentent

**Tableau 6**

Principes actifs : hémostase.

Analyses	Groupes A, B, AB	Groupe O
Fibrinogène (g/L)	2,5–3,1	2,8–3,6
Facteur V (UI/mL)	0,72–0,98	0,84–1,13
Facteur VIIIc (UI/mL)	0,67–0,94	0,63–0,80
Facteur XI (UI/mL)	0,11–0,39	0,13–0,42

Contrôles de routine sur plus de 300 lots de plasma viro-atténué par solvant-détergent (PVA-SD) de groupe O et plus de 600 lots de PVA-SD de groupe A, B et AB (janvier 2006 à septembre 2007).

sous forme congelée, la teneur en facteur VIII moyenne doit être égale ou supérieure à 0,7 UI/mL. Après décongélation, au lot de plasma, sont additionnés différents stabilisants ; la quantité de chacun d'eux est proportionnelle au volume de plasma mis en jeu. Après homogénéisation, le mélange est porté à une température de +60 °C pendant une durée de dix heures. En fin de pasteurisation, une étape de dialyse contre un tampon formulé en acides aminés assure l'élimination des sucres « thermo-protecteurs ». Cette dialyse est assurée par l'utilisation de membranes d'ultra-filtration de 10 KD. En fin de process, la teneur en protéines du plasma est ajustée au regard des caractéristiques visées. Avant d'être réparti aseptiquement en unités de 200 mL puis congelé, le lot de plasma ajusté subit une filtration stérilisante sur un filtre absolu de 0,22 µm. Révélée par une approche protéomique, la pasteurisation a la particularité d'être très peu dénaturante au regard de l'ensemble des protéines plasmatiques.

#### 4. DONNÉES ET CONTRÔLE QUALITÉ

Les données décrites ci-dessous correspondent à des valeurs obtenues après congélation et décongélation du plasma thérapeutique et après traitement pour les plaquettes.

##### 4.1. Plasma solvant-détergent

Le volume d'une poche de PVA-SD est de 200 mL. La concentration minimale en facteur VIII est 0,7 UI/mL. Les concentrations résiduelles en TnBP et en Triton X 100 sont respectivement inférieures à 2 µg/mL et à 5 µg/mL. Le mélange permet une standardisation des taux des principes actifs contenus dans le produit final, et des contrôles sont effectués sur chaque lot pour vérifier l'innocuité et l'efficacité du produit (Tableau 6). Les essais de validation ont montré que le traitement SD n'altère ni les tests de coagulation, ni les principales protéines de la coagulation, mais entraîne une diminution de l'alpha 2 anti-plasmine. Le PVA-SD ne contient pas les multimères de très haut poids moléculaire de facteur Willebrand. L'activité fonctionnelle de la protéine ADAMTS 13 est maintenue. Une recherche d'anticorps anti-HLA et anti-leucocytaire est systématiquement effectuée sur tous les lots.

##### 4.2. Plasma bleu de méthylène (PVABM)

La composition finale du plasma viro-atténué par le bleu de méthylène est décrite par plusieurs études (Tableau 7).

**Tableau 7**

Résultats des paramètres plasmatiques pour le plasma bleu de méthylène dans les études publiées [35–48].

Paramètres	Résultats plasma VA BM
Fibrinogène (FI) (g/L)	2,01 ; 1,65 ; 1,57 ; 1,80 ; 2,05 ; 1,85 ; 2,07 ; 2,11 ; 1,97 ; 2,00
Prothrombine (FII) (UI/mL)	1,00 ; 1,15 ; 1,37 ; 1,05 ; 0,95
Facteur V (UI/mL)	0,79 ; 0,84 ; 0,79 ; 0,73 ; 0,75 ; 0,84 ; 0,76
Facteur VII (UI/mL)	0,90 ; 1,10 ; 1,04 ; 0,90 ; 0,81 ; 1,02
Facteur VIII (UI/mL)	0,58 ; 0,78 ; 0,58 ; 0,58 ; 0,60 ; 0,85 ; 0,55 ; 0,70 ; 0,88 ; 0,83 ; 0,66
Facteur IX (UI/mL)	0,72 ; 1,00 ; 0,55 ; 0,62 ; 0,88
Facteur X (UI/mL)	0,90 ; 1,05 ; 1,03 ; 0,88
Facteur XI (UI/mL)	0,73 ; 1,00 ; 1,30 ; 0,84 ; 0,52
Antithrombine (UI/mL)	1,00 ; 0,78 ; 1,05 ; 0,95 ; 0,82 ; 0,96
Protéine C (UI/mL)	1,03 ; 0,93 ; 0,89
Protéine S (UI/mL)	1,11 ; 1,02 ; 0,99
Temps de prothrombine (seconde)	12,3 ; 18,6
Temps de céphaline activée ou Activated Partial Thromboplastine Time (APTT) (seconde)	39,8 ; 44 ; 40
Protéines totales (g/L)	56
Albumine (g/L)	37

La viro-atténuation du plasma par le bleu de méthylène impacte les facteurs de coagulation. Une réduction de l'ordre de 24 à 39 % du fibrinogène [49] est publiée, de 4 à 32 % du facteur V, de 13 à 33 % du facteur VIII, de 11 à 23 % du facteur IX et de 17 à 27 % du facteur XI [50]. En France, les contrôles

**Tableau 8**

Résultats des paramètres plasmatiques pour le plasma amotosalen dans l'étude publiée [51].

Paramètres	Valeurs normales	Résultats PFCAD-IA
Fibrinogène (FI) g/L	2,0–4,0	3,3 ; 2,7 <sup>a</sup>
Prothrombine FII (UI/mL)	0,7–1,3	0,9 <sup>a</sup>
Facteur Willebrand	0,5–1,5	1,0 <sup>a</sup>
Facteur V (UI/mL)	0,7–1,3	1,2 ; 1,0 <sup>a</sup>
Facteur VII (UI/mL)	0,7–1,3	1,1 ; 0,9 <sup>a</sup>
Facteur VIII (UI/mL)	0,5–1,5	0,9 ; 0,8 <sup>a</sup>
Facteur IX (UI/mL)	0,6–1,4	1,1 ; 0,8 <sup>a</sup>
Facteur X (UI/mL)	0,6–1,4	1,1 ; 0,9 <sup>a</sup>
Facteur XI (UI/mL)	0,5–1,5	1,1 ; 0,7 <sup>a</sup>
Facteur XII UI/mL	0,5–1,5	0,7 <sup>a</sup>
Antithrombine III (UI/mL)	0,8–1,3	1,0 ; 1,0 <sup>a</sup>
Protéine C (UI/mL)	0,7–1,2	1,1 ; 0,9 <sup>a</sup>
Protéine S UI/mL	0,65–1,4	1,4 ; 1,0 <sup>a</sup>
Temps de prothrombine (seconde)	8,5–10,2	9,9 ; 14,0 <sup>a</sup>
Temps de céphaline activée ou APTT (seconde)	25–42	32,0 ; 40,5 <sup>a</sup>
Plasminogène (UI/mL)	0,8–1,2	0,8 <sup>a</sup>
Alpha-2 antiplasmine (UI/mL)	0,8–1,2	0,8 <sup>a</sup>
Protéines totales (g/L)	> 50	60 <sup>a</sup>
Albumine (g/L)	35–50	37 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Données issues du dossier de validation Afssaps du PFCAD-IA « Évaluation in vitro de plasma d'aphérese traité par l'amotosalen pour inactivation des pathogènes (Intercept® Blood System) ».

**Tableau 9**

Résultats des paramètres plasmatiques pour le plasma pasteurisé.

Paramètres	Résultats des dosages en cours 18/24 mois
Fibrinogène (g/L)	2,3
Facteur VII (UI/mL)	1,0
Facteur VIII (UI/mL)	0,9
Cofacteur IL (UI/mL)	0,7
Protéines (g/L)	56
Osmolarité (mOsm/kg)	359
Facteur II (UI/mL)	0,8
Facteur V (UI/mL)	0,99
Facteur IX (UI/mL)	0,7
Facteur XI (UI/mL)	0,9
pH	7,5
Antithrombine III (UI/mL)	0,8
Protéine C (UI/mL)	0,8
Protéine S (UI/mL)	0,9
$\alpha 2$ Antiplasmine (UI/mL)	0,8
Sodium (mM/L)	138
Potassium (mM/L)	0,2

de qualité réalisés sur les six premiers mois de fabrication du PVABM montrent que la technique mise en œuvre permet d'obtenir des plasmas conformes aux caractéristiques des PSL.

**Tableau 10**

Résultats des paramètres des plaquettes traitées par riboflavine et UV dans les études publiées [30,31].

Paramètres	Résultats			
	CPAD		MCPSD	
	Jour 1	Jour 5	Jour 1	Jour 5
Concentration plaquettaire ( $10^3/\mu\text{L}$ )	1427 ; 1456	1230	1378	1306
Contenu plaquettaire ( $10^{11}$ /unité)	4,1	3,8	3,8	3,6
pH (22 °C)	7,4	7,1 ; 7,3	7,3	7,1 ; 7,3
Production de lactate (mmol/ $10^{12}$ cellules par heure)		0,032		0,059
Consommation de glucose (mmol/ $10^{12}$ cellules par heure)		0,034		0,042
pO <sub>2</sub> (mmHg)	54 ; 19	48 ; 38 ; 48	16	41 ; 37
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	35 ; 36	28 ; 28 ; 28	46	32 ; 26

CPAD : concentrés plaquettaires d'aphérèse déleucocytés ; MCPSD : mélanges de concentrés de plaquettes standards déleucocytés.

**Tableau 11**

Résultats des paramètres des plaquettes traitées par amotosalen et UVA dans les études publiées [52–56].

Paramètres	Résultats			
	MCPSD		CPAD	
	Jour 1	Jour 5	Jour 1	Jour 5
pH (22 °C)	7,0 ; 6,9 ; 7,2	6,95 ; 7,0 ; 7,1	7,2 ; 7,2	7,2 ; 6,9
Volume plaquettaire moyen (fL)	9,1 ; 7,8	9,5 ; 8,0	8,7 ; 8,9	8,9 ; 9,1
Taux lactate (mM/L)	7,0 ; 6,0 ; 4,3	13,3 ; 8,9 ; 12,7	2,5 ; 1,7	7,8 ; 10,1
pO <sub>2</sub> (mm Hg)	133,0 ; 95,5 ; 165,2	136,2 ; 63,5 ; 166,3	135 ; 148,9	122 ; 137,7
pCO <sub>2</sub> (mm Hg)	24,9 ; 39,8 ; 30,5	18,2 ; 28,3 ; 20,5	25 ; 19,0	24 ; 22,7
p-sélectine soluble (ng/mL)	19,1	66,2	53,5 ; 25,4	158 ; 113,2
Facteur plaquettaire 4 (ng/mL)	1454	6118	2888 ; 1640	6881 ; 9276
Lactate déshydrogénase (LDH) (U <sub>37 °C</sub> /L)	167	218	150 ; 120	229 ; 198
Glycoprotéine V (gpV) soluble (ng/mL)	1139	1761	1020 ; 525	1728 ; 2289

CPAD : concentrés plaquettaires d'aphérèse déleucocytés ; MCPSD : mélanges de concentrés de plaquettes standards déleucocytés.

### 4.3. Plasma amotosalen

Les résultats des paramètres plasmatiques pour le plasma amotosalen sont présentés dans le Tableau 8.

### 4.4. Plasma pasteurisé

À la demande de l'Afssaps, une étude de stabilité portant sur 50 lots pour une période de 24 mois a été réalisée (Tableau 9).

En termes de volume, le rendement de la technique (volume plasma viro inactivé/volume plasma initial) est proche de 100 %.

### 4.5. Concentrés plaquettaires traités par riboflavine et UV

Les résultats des paramètres des plaquettes traitées par riboflavine et UV sont présentés dans le Tableau 10.

### 4.6. Concentrés plaquettaires traités par amotosalen et UVA

Les résultats des paramètres des plaquettes traitées par amotosalen et UVA sont présentés dans le Tableau 11.

## 5. CONCLUSION

De la transfusion du sang total au principe de transfusion sélective sont nés les laboratoires de préparation des PSL. L'activité principale de ces unités a été pendant de nombreuses années limitée à la séparation et à la conservation des produits sanguins. La recherche axée sur l'obtention d'un produit sanguin labile de haute qualité ayant comme objectif l'augmentation de la sécurité transfusionnelle a fait progresser les techniques et les technologies disponibles pour les laboratoires de préparation. Des méthodes d'atténuation des pathogènes sont actuellement validées, disponibles et mises en œuvre en France. Elles sont aujourd'hui essentiellement appliquées aux produits plasmatiques bien que disponibles et autorisées pour les produits plaquettaires. Des études récentes, permettent d'espérer l'introduction de concentrés globulaires traités pour atténuation des agents pathogènes en thérapeutique dans les prochaines années. L'évolution des techniques et la mise en place de celles-ci dans nos plateaux techniques devraient permettre à terme d'apporter à tous les patients des produits de haute sécurité, possédant une activité optimale et dénuée de risques infectieux majeurs.

## 6. CONFLITS D'INTÉRÊTS

Les auteurs n'ont pas déclaré de conflits d'intérêts.

## RÉFÉRENCES

- [1] Webert KE, Cserti CM, Hannon J, Lin Y, Pavenski K, Pendergrast JM, et al. Proceedings of a Consensus Conference : pathogen inactivation-making decisions about new technologies. *Transfus Med Rev* 2008;22:1–34.
- [2] McCullough J. Pathogen inactivation: a new paradigm for blood safety. *Transfusion* 2007;47:2180–4.
- [3] Klein HG, Anderson D, Bernardi MJ, Cable R, Carey W, Hoch JS, et al. Pathogen inactivation: making decisions about new technologies. Report of a consensus conference. *Transfusion* 2007;47:2338–47.
- [4] Wu YY, Snyder EL. Safety of the blood supply: role of pathogen reduction. *Blood Rev* 2003;17:111–22.
- [5] Alter HJ, Klein HG. The hazards of blood transfusion in historical perspective. *Blood* 2008;112:2617–26.
- [6] Surveillance épidémiologique des donneurs de sang en France 1992–2007, INVS, INTS, EFS, Service de santé des armées.
- [7] Rapport d'activité 2007, Pôle vigilances, Direction médicale, Établissement français du sang.
- [8] Rapport Hémovigilance 2006, Afssaps.
- [9] Friedman LI, Stromberg RR, Wagner SJ. Reducing the infectivity of blood components. What we have learned. *Immunol Invest* 1995;24:49–71.
- [10] Adler SP, Lawrence LT, Baggett J, Biro V, Sharp DE. Prevention of transfusion associated cytomegalovirus infection in very low-birth-weight infants using frozen blood and donors sero-negative for cytomegalovirus. *Transfusion* 1984;24:333–5.
- [11] Andreu G, Marinière AM, Fretz C, Emile JF, le groupe CMV de la SNTS, Bierling P, et al. Infections à cytomégalovirus post-transfusionnelles : incidence et moyens de prévention. *Rev Fr Transfus Hemobiol* 1991;34:213–32.
- [12] Bowden RA, Slichter SJ, Sayers M, Weisdorf D, Cays M, Schoch G, et al. A comparison of filtered leukocyte reduced and cytomegalovirus (CMV) seronegative blood products for the prevention of transfusion associated CMV infection after marrow transplant. *Blood* 1995;86:3598–603.
- [13] Kobayashi M, Yang M, Won KW, Takahashi TA, Ikeda H, Sekiguchi S. Leukocyte depletion of HTLV-I carrier red cell concentrates by filters. In: Sekiguchi S, editor. *Clinical application of leukocyte depletion*. Boston: Blackwell Scientific; 1993. p. 138–48.
- [14] Qu L, Xu SS, Rowe DT, Triulzi DJ. Efficacy of Epstein-Barr virus removal by leukoreduction of red blood cells. *Transfusion* 2005;45:591–5.
- [15] Kitchen AD, Mann GF, Harrison JF, Zuckerman AJ. Effect of gamma irradiation on the human immunodeficiency virus and human coagulation proteins. *Vox Sang* 1989;56:223–9.
- [16] Prodouz KN, Fratantoni JC, Boone EJ, Bonner RF. Use of laser-UV for inactivation of virus in blood products. *Blood* 1987;70:589–92.
- [17] Tolksdorf F, Walker WH, Mohr H, Gravemann U, Mueller TH. Pathogen reduction in platelet concentrates using UVC light in combination with strong agitation: effect on activation markers and storage stability. In: *AABB Annual Meeting, USA: Anaheim; 2007*.
- [18] Terpstra Fokke G, Van't Wout AB, Schuitemaker H, Van Engelenburg F, Dekkers DWC, Verhaar R, et al. Potential and limitation of UVC irradiation for the inactivation of pathogens in platelet concentrates. *Transfusion* 2008;48:304–13.
- [19] Lin L, Dikeman R, Molini B, Lukehart SA, Lane R, Dupuis K, et al. Photochemical treatment of platelet concentrates with Amotosalen and long-wavelength ultraviolet light inactivates a broad spectrum of pathogenic bacteria. *Transfusion* 2004;44:1496–504.
- [20] Lin L, Hanson CV, Alter HJ, Jauvin V, Bernard KA, Murthy KK, et al. Inactivation of viruses in platelet concentrates by photochemical treatment with Amotosalen and long-wavelength ultraviolet light. *Transfusion* 2005;45:580–90.
- [21] Pinna D, Sampson-Johannes A, Clementi M, Poli G, Rossini S, Lin L, et al. Amotosalen photochemical inactivation of severe acute respiratory syndrome coronavirus in human platelet concentrates. *Transfus Med* 2005;15:269–76.
- [22] Eastman RT, Barrett LK, Dupuis K, Buckner FS, Van Voorhis WC. Leishmania inactivation in human pheresis platelets by a psoralen (Amotosalen HCl) and long-wavelength ultraviolet irradiation. *Transfusion* 2005;45:1459–63.
- [23] Wesley C, Van Voorhis, Barrett Lynn K, Eastman Richard T, et al. *Trypanosoma cruzi* Inactivation in Human Platelet Concentrates and Plasma by a Psoralen (Amotosalen HCl) and Long-Wavelength UV. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:475–9.
- [24] Singh Y, Sawyer LS, Pinkoski L, Dupuis KW, Hsu J, Lin L, et al. Photochemical treatment of plasma with Amotosalen and long-wavelength ultraviolet light inactivates pathogens while retaining coagulation function. *Transfusion* 2006;46:1168–77.
- [25] Sawyer L, Hanson D, Castro G, Luckett W, Dubensky Jr TW, Stassinopoulos A. Inactivation of parvovirus B19 in human platelet concentrates by treatment with Amotosalen and ultraviolet A illumination. *Transfusion* 2007;47:1062–70.
- [26] Lam S, Tan HC, Tan LK, Ng LC, Teo D, Koh M. Efficacy of INTERCEPT Treatment for the Inactivation of Dengue Virus in Single-Donor Platelet Concentrate. *Transfusion* 2007;47:134A.
- [27] Grellier P, Benach J, Labaied M, Charneau S, Gil H, Monsalve G, et al. Photochemical inactivation with Amotosalen and long-wavelength ultraviolet light of Plasmodium and Babesia in platelet and plasma components. *Transfusion* 2008;48:1676–84.
- [28] Sawyer L, Dupuis K, Sampson-Johannes A. Inactivation of Influenza A H5N1 and Lymphocytic Choriomeningitis Virus by the INTERCEPT Blood System (IBS). *Transfusion* 2008;48(2S):88A.
- [29] Goodrich RP, Edrich RA, Li J, Seghatchian J. The Mirasol PRT system for pathogen reduction of platelets and plasma: an overview of current status and future trends. *Transfus Apher Sci* 2006;35:5–17.
- [30] Ruane PH, Edrich R, Gamp D, Keil SD, Leonard RL, Goodrich RP. Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light. *Transfusion* 2004;44:877–85.
- [31] Li J, de Korte D, Woolum MD, Ruane PH, Keil SD, Lockerbie O, et al. Pathogen reduction of buffy coat platelet concentrates using riboflavin and light: comparisons with pathogen-reduction technology-treated apheresis platelet products. *Vox Sang* 2004;87:82–90.

- [32] Cardo LJ, Rentas FJ, Ketchum L, Salata J, Harman R, Melvin W, et al. Pathogen inactivation of *Leishmania donovani* infantum in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light. *Vox Sang* 2006;90:85–91.
- [33] Cardo LJ, Salata J, Mendez J, Reddy H, Goodrich R. Pathogen inactivation of *Trypanosoma cruzi* in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light. *Transfus Apher Sci* 2007;37:131–7.
- [34] Rentas F, Harman R, Gomez C, Salata J, Childs J, Silva T, et al. Inactivation of *Orientia tsutsugamushi* in red blood cells, plasma, and platelets with riboflavin and light, as demonstrated in an animal model. *Transfusion* 2007;47:240–7.
- [35] Williamson LM, Cardigan R, Prowse CV. Methylene blue-treated fresh frozen plasma: what is its contribution to blood safety? *Transfusion* 2003;43:1322–9.
- [36] Aznar JA, Bonanad S, Montoro JM, Hurtado C, Cid AR, Soler MA, et al. Influence of methylene blue photoinactivation treatment on coagulation factors from Fresh Frozen Plasma, cryoprecipitates and cryosupernatants. *Vox Sang* 2000;79:156–60.
- [37] Lambrecht B, Mohr H, Knüver-Hopf J, Schmitt H. Photoinactivation of viruses in human Fresh Frozen Plasma by phenothiazine dyes in combination with visible light. *Vox Sang* 1991;60:207–13.
- [38] Mohr H, Knüver-Hopf J, Lambrecht B, Scheidecker H, Schmitt H. No evidence for neoantigens in human plasma after photochemical virus inactivation. *Ann Hematol* 1992;65:224–8.
- [39] Zeiler T, Riess H, Wittman G, Hintz G, Zimmermann R, Müller C, et al. The effect of methylene blue-phototreatment on plasma proteins and in vitro coagulation capability of single-donor Fresh Frozen Plasma. *Transfusion* 1994;34:685–9.
- [40] Aznar JA, Molina R, Montoro JM. Factor VIII/von Willebrand factor complex in methylene blue-treated fresh plasma. *Transfusion* 1999;39:748–50.
- [41] Riggert J, Humpe A, Legler TJ, Wolf C, Simson G, Köhler M. Filtration of methylene blue–photooxidized plasma: influence on coagulation and cellular contamination. *Transfusion* 2001;41:82–6.
- [42] Castro E, Barea L, Gonzalez R, Bueno JL. Impact of quarantine and methylene blue/light treatment on plasma quality. *Transfusion* 1998;38(Suppl):S86.
- [43] Castrillo A, Eiras A, Casro A, Areal C, Adelantado M, Cid J, et al. Evaluation of methylene blue treated plasma. *Vox Sang* 2000;78(Suppl 1):P545.
- [44] Hornsey V, Dummond O, Young D, Docherty A, Prowse C. A potential improved approach to methylene blue virus inactivation of plasma: the Maco Pharma Maco-tronic system. *Vox Sang* 2000;78(Suppl 1):P538.
- [45] Verpoort T, Chollet S, Lebrun F, Goudalier F, Mohr H, Walker WH. Elimination of methylene blue from photo-dynamically treated virus inactivated fresh-frozen plasma: the Bluflex filter. *Transfus Clin Biol* 2001;8(Suppl 1):P147.
- [46] Seghatchian J, Krailadsiri P. What's happening: the quality of methylene blue treated. *Transfus Apher Sci* 2001;25:227–31.
- [47] Castrillo A, Eiras A, Castro A, Adelantado M, Areal C, Cid J, et al. A new evaluation of methylene blue treated plasma. *Transfus Clin Biol* 2001;8(Suppl. 1):103S.
- [48] Yarranton H, Lawrie AS, Purdy G, Mackie IJ, Machin SJ. Comparison of von Willebrand factor antigen, von Willebrand factor-cleaving protease and protein S in blood components used for treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfus Med* 2004;14:39–44.
- [49] Solheim G, Seghatchian J. The six questions of pathogen reduction technology: An overview of current opinions. *Transfus Apher Sci* 2008;39:51–7.
- [50] Solheim G. Pathogen reduction of blood components. *Transfus Apher Sci* 2008;39:75–82.
- [51] Osselaer JC, Debry C, Goffaux M, Pineau J, Calomme G, Dubuc E, et al. Coagulation function in fresh-frozen plasma prepared with two photochemical treatment methods: methylene blue and Amotosalen. *Transfusion* 2008;48:108–17.
- [52] Isola H, Kientz D, Wiesel M-L, Lin L, Mayaudon V, Cazenave J-P, et al. In vitro evaluation of Haemonetics MCS+ apheresis platelet concentrates treated with photochemical pathogen inactivation following plasma volume reduction using the INTERCEPT Preparation Set. *Vox Sang* 2006;90:128–30.
- [53] Cazenave JP, Aleil B, Wiesel ML, Laforêt M, Isola H. In vitro evaluation of pooled buffy coat platelets treated with photochemical pathogen inactivation using Amotosalen. *Vox Sang* 2004;86:201–2.
- [54] Picker SM, Speer R, Gathof BS. Functional characteristics of buffy-coat PLTs photochemically treated with Amotosalen-HCl for pathogen inactivation. *Transfusion* 2004;44:320–9.
- [55] Janetzko K, Lin L, Eichler H, Mayaudon V, Flament J, Klüter H. Implementation of the INTERCEPT Blood System for Platelets into routine blood bank manufacturing procedures: evaluation of apheresis platelets. *Vox Sang* 2004;86:239–45.
- [56] Jansen GA, van Vliet HH, Vermeij H, Beckers EA, Leebeek FW, Sonneveld P, et al. Functional characteristics of photochemically treated platelets. *Transfusion* 2004;44:313–9.