

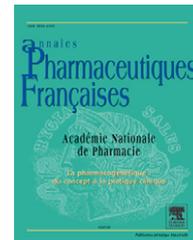


Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information website.

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.



Disponible en ligne sur www.sciencedirect.com



MISE AU POINT

La sécurité virale des médicaments d'origine biologique^{☆,☆☆}

Viral safety of biologicals

F. Barin

Laboratoire de virologie, CNR VIH, université François-Rabelais, Inserm ERI 19, CHU de Bretonneau, 37044 Tours cedex, France

Disponible sur Internet le 30 juin 2008

MOTS CLÉS

Sécurité virale ;
Protéines
thérapeutiques ;
Inactivation

Résumé Les crises sanitaires survenues dans les années 1980 ont dramatiquement contribué à la prise de conscience des risques iatrogènes liés aux médicaments d'origine biologique et, ainsi, au développement du concept de sécurité virale de ces médicaments, qu'ils soient d'origine humaine, avec notamment les médicaments dérivés du sang (MDS), animale ou issus des biotechnologies (produits par des cellules eucaryotes). La sécurité virale des médicaments repose sur trois éléments : la qualité de la matière première, le procédé de fabrication qui inclue des étapes aptes à éliminer ou à inactiver les virus et, éventuellement, les contrôles des produits intermédiaires ou finis. La qualité de la matière première est désormais aisément garantie, pour les MDS, par le *screening* des dons de sang ou de plasma (*screening* individuel ou en pool) pour les marqueurs directs (antigènes, génomes) et indirects (anticorps) de virus majeurs. La succession d'étapes de purification des principes actifs (étapes de partition), d'étapes d'inactivation des virus (traitement solvant-détergent, chauffage) et d'étapes dédiées spécifiquement à l'élimination des virus (nanofiltration) au cours du procédé de fabrication permet de réduire considérablement le risque viral. Cette réduction peut être estimée quantitativement lors des études de validation par épreuves de surcharge à échelle réduite. Les contrôles virologiques sur produits intermédiaires ou sur produits finis permettent de conforter la sécurité virale d'un médicament lorsque les contributions des deux premiers éléments, qualité de la matière première et procédé de fabrication, paraissent insuffisants. Le développement des principes et des techniques de sécurisation des médicaments d'origine biologique permet désormais de garantir au mieux l'absence d'infectiosité liée à des virus connus mais également, par anticipation, de garantir l'absence d'infectiosité liée à des virus inconnus.
© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

[☆] Présentation faite à l'Académie de pharmacie le 18 avril 2007.

^{☆☆} Certaines parties de cete revue ont fait l'objet d'une publication antérieure (Barin F et Peyre R. Sécurité virale des médicaments dérivés du sang : concepts et moyens mis en oeuvre. *Virologie* 2005,2:S7-S16).

Adresse e-mail : fbarin@med.univ-tours.fr.

KEYWORDS

Viral safety;
Biologicals;
Inactivation

Summary The viral safety of biologicals, either human blood derivatives or animal products or recombinant proteins issued from biotechnology, relies on the quality of the starting material, the manufacturing process and, if necessary, the control of the final product. The quality of the starting material is highly guaranteed for blood derivatives due to the individual screening for specific markers (antigens, genome, antibodies) for major blood borne viruses such as hepatitis B and C viruses (HBV, HCV) and human immunodeficiency virus (HIV). It can be reinforced by the detection through amplification procedures (polymerase chain reaction) in the plasma pool of genomes from viruses that have been implicated in contaminations of blood derivatives in the past (parvovirus B19, hepatitis A virus). The association in the manufacturing process of different steps dedicated to purification of plasma proteins (partitioning), virus inactivation (solvent/detergent treatment, heat inactivation) or specific procedures allowing virus removal (nanofiltration) allows to reduce the viral risk very efficiently. The validation studies using scaled down systems and model viruses allow to evaluate the virus safety of any product quantitatively. The aim of these procedures is to guarantee the lack of infectivity due to any virus, either known or unknown.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Les contaminations massives par les virus des hépatites B et C (VHB et VHC), puis par le virus de l'immunodéficience (VIH) des hémophiles recevant des facteurs de coagulation ainsi que celles par le VHC de patients recevant des immunoglobulines dans les années 1970–1980 [1–3] ont été des événements dramatiques qui ont conduit l'ensemble des professionnels, responsables de santé publique et d'agences de régulation, industriels, transfuseurs et virologues, à identifier et développer des mesures pertinentes et réalistes pour garantir pour le présent et l'avenir la sécurité virale des médicaments dérivés du sang (MDS) et ainsi apporter les meilleurs gages de sécurité aux patients qui en dépendent [4,5]. En parallèle, l'apparition de cas de maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) chez des jeunes patients traités par l'hormone de croissance d'origine extractive hypophysaire et l'émergence de l'épizootie d'encéphalopathie spongiforme bovine (BSE ou « maladie de la vache folle ») ont renforcé cette nécessité et conduit à adapter ces mesures à l'ensemble des médicaments d'origine biologique [5,6]. Les concepts de sécurité virale permettent de définir les éléments qui, avec le plus d'objectivité possible, vont contribuer à garantir la sécurité virale. En plus du but principal qui est la sécurité sanitaire individuelle et collective, cette démarche devrait permettre d'éviter la gestion dans l'urgence, souvent plus émotionnelle que rationnelle, de tout phénomène émergent d'origine virale.

L'objectif de cette revue est de présenter les concepts et moyens mis en œuvre pour garantir la sécurité virale des produits d'origine biologique. Le terme produit biologique (*biologicals* en anglais) est utilisé afin de désigner tous les médicaments ayant une origine biologique [7]. Il inclut donc :

- les vaccins bactériens et viraux ;
- les produits dérivés de bactéries, levures et cellules eucaryotes en culture (produits issus des biotechnologies et, tout particulièrement, les protéines recombinantes) ;
- les produits dérivés des tissus et des humeurs d'origine humaine et animale comme les MDS, les hormones, l'héparine, etc.

Il ne sera pas fait référence aux exigences réglementaires développées, par ailleurs, pour les MDS [8], mais uniquement aux aspects virologiques sur lesquels s'appuie

la démarche générale. Les concepts généraux seront développés en prenant comme exemple les MDS et les virus conventionnels. Nous aborderons ensuite brièvement les aspects spécifiques concernant les médicaments d'origine animale et les produits issus de cellules eucaryotes en culture. Les aspects liés à la sécurité vis-à-vis des agents transmissibles non conventionnels (ATNC, prions) n'ont pas été inclus dans cette revue, mais peuvent être retrouvés par ailleurs [9,10]. On peut cependant retenir que les mêmes concepts sont appliqués pour les prions, même si les spécificités techniques diffèrent du fait de la nature même des ATNC.

L'une des finalités de la sécurité virale des produits d'origine biologique est de garantir l'absence d'infectiosité liée à des virus connus mais également, par anticipation, de garantir l'absence d'infectiosité liée à des virus inconnus. Il est désormais classique de dire que, pour cela, la sécurité virale des produits biologiques repose sur trois éléments :

- la qualité de la matière première ;

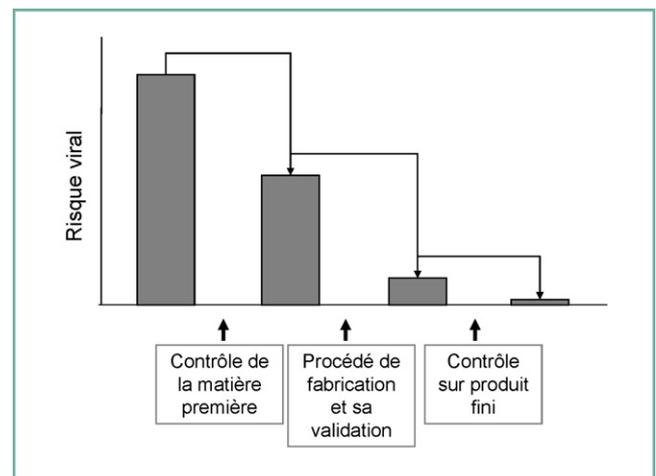


Figure 1. Les éléments contribuant à la sécurité virale des médicaments d'origine biologique.

The key factors that contribute to viral safety of biologicals.

Tableau 1 Prévalence des dons de sang dépistés par détection du génome viral (VIH et VHC) en absence d'anticorps correspondants, France [18] et États-Unis [17]. La prévalence des dons positifs en anticorps (Ac VIH Pos, Ac VHC Pos) est présentée en parallèle pour les données françaises.

Prevalence of positive blood donations by nucleic acid testing (HIV and HCV) in absence of corresponding antibodies, France [18] and USA [17]. The prevalence of antibody positive donations in France is shown for comparison.

	France	États-Unis	
Période	Juillet 2001–décembre 2003	Mars 1999–avril 2002	
Nombre de dons	6,12 millions	37,16 millions	36,97 millions
ARN VIH Pos (Ac neg)	2 (0,3/10 ⁶)	12 (0,3/10 ⁶)	
Ac VIH Pos	88 (14,4/10 ⁶)	ND	
ARN VHC Pos (Ac neg)	4 (0,7/10 ⁶)		139 (3,8/10 ⁶)
Ac VHC Pos	759 (124/10 ⁶)		ND

ND : valeurs non rapportées dans la référence [17].

ND: *not done (not available)*.

- le procédé de fabrication qui doit inclure des étapes aptes à éliminer et/ou inactiver les virus, ainsi que la validation expérimentale de leur efficacité ;
- les contrôles sur produit fini (Fig. 1).

Il est bien évident que les données de pharmacovigilance contribuent indirectement à la sécurité virale des produits d'origine biologique en alertant sur des événements de fréquence anormale. C'est ainsi que l'absence d'événements iatrogènes d'origine virale liés à l'administration de l'albumine humaine plaide en faveur du peu de risques de ce produit. À l'opposé, les nombreuses contaminations des hémophiles par les VHB et VHC et par le VIH avant 1985 [1,2], puis par le virus de l'hépatite A (VHA) et le parvovirus B19 au cours des années 1990 [11–14] ont montré combien les facteurs de coagulation pouvaient être à risque.

Concepts et moyens mis en œuvre : l'exemple des médicaments dérivés du sang

L'exemple des MDS nous permettra d'illustrer largement les trois éléments qui contribuent à la sécurité virale des produits d'origine biologique : qualité de la matière première, procédé de fabrication et validation de son efficacité et contrôles sur produit fini.

Qualité de la matière première

Les MDS actuels sont dérivés du plasma. Il est cependant évident que les critères évoqués ci-après s'appliqueraient aux dérivés cellulaires, comme l'hémoglobine, si de tels dérivés stables devaient être préparés. Il est illusoire d'envisager que le sang puisse être dépourvu de virus. En effet, en dehors de certaines infections virales qui restent localisées au niveau de la porte d'entrée (cutanées, ORL), la plupart des virus atteignent leur cible après une phase de virémie [13]. La découverte récente de virus a priori non pathogènes, dits orphelins, tels que le TTV, est même venue renforcer la notion de « flore virale normale » [15,16]. Ainsi, plus de 75% des donneurs de sang asymp-

tomatiques sont porteurs de ce virus au niveau sanguin [16]. Il convient donc d'introduire une hiérarchisation des virus dans la définition de la qualité de la matière première, certains virus considérés majeurs du fait de leur pouvoir pathogène étant recherchés au niveau de chaque don chez les donneurs de sang (qu'il s'agisse de don de sang total ou de plasmaphère), d'autres étant recherchés au niveau des pools de plasmas avant que ces pools n'entrent dans la chaîne de fabrication des MDS. La première catégorie inclut le VHB, le VHC et le VIH. La sécurisation vis-à-vis de ces virus passe par un dépistage individuel lors du don du sang : antigène HBs et anticorps anti-HBc pour le VHB, anticorps anti-VHC et anti-VIH pour les VHC et VIH. Depuis quelques années, le dépistage par mini-pool (de huit à 24 dons) de l'ARN du VHC et de l'ARN du VIH est devenu obligatoire chez les donneurs de sang dans la plupart des pays industrialisés (depuis le premier juillet 2001, en France). Cette recherche directe du génome viral par des techniques d'amplification génique (*polymerase chain reaction* [PCR] ou *transcription mediated amplification* [TMA]) vient compléter la détection des anticorps afin d'identifier essentiellement des sujets récemment contaminés, viremiques mais n'ayant pas encore séroconverti, dits dans la « fenêtre sérologique ». Les données épidémiologiques françaises et américaines sont données dans le Tableau 1 [17,18]. Elles montrent l'apport faible du dépistage génomique viral (DGV) dans ces populations de donneurs de sang, sachant que le DGV n'apporte pas non plus de garantie absolue. En effet, quelques rares cas de transmission transfusionnelle du VIH par des produits labiles ont été récemment rapportés. Ils étaient dus à des donneurs chez lesquels la charge virale était trop faible pour que le virus soit détecté une fois dilué dans les mini-pools [19,20]. Tenant compte de ces réalités, les données épidémiologiques françaises estiment le risque résiduel de collecte d'un don de sang potentiellement infectieux non éliminé par sérologie et dépistage moléculaire à 0,32/10⁶ dons pour le VIH et 0,10/10⁶ dons pour le VHC pour la période 2001–2003 [18]. Ayant conscience de ce risque résiduel, la plupart des industriels du fractionnement avaient déjà introduit la pratique du DGV, il y a quelques années, soit spontanément, soit sous l'impulsion réglementaire, sur le pool destiné au

fractionnement ou sur des mini-pools intermédiaires, tout particulièrement pour le VHC [8]. On peut donc retenir que le risque de contamination d'un pool de plasmas destiné au fractionnement est désormais excessivement faible pour ces trois virus majeurs, notamment VHC et VIH. Il peut être bon de rappeler que tout sujet potentiellement receveur de MDS, ayant donc un recours fréquent ou massif aux soins, devrait être vacciné et ainsi protégé contre le VHB.

Sachant que le risque d'être confronté à un pool de plasma destiné au fractionnement malgré tout contaminé ne peut être nul, toutes ces mesures d'assurance de qualité de la matière première ont surtout pour finalité de réduire au maximum la charge virale potentiellement présente. Ce sont ensuite les différentes étapes du procédé de fabrication qui permettront d'éliminer et/ou inactiver les virus résiduels. C'est dans cet esprit qu'il est également souhaitable que la présence de certains virus nus, donc résistants à certains procédés d'inactivation, soit recherchée dans les pools de plasmas destinés au fractionnement afin de limiter leur quantité. C'est le cas du parvovirus B19 et du VHA qui, tous deux, ont été à l'origine de contaminations d'hémophiles par des facteurs de coagulation dans un passé récent [11–14]. La faible fréquence de ces deux virus chez les donneurs de sang et les très rares conséquences sévères chez les sujets infectés font que le dépistage de ces deux virus sur chaque don n'est pas justifié. En revanche, ces deux virus, éventuellement présents dans un pool du fait de la collecte de sang ou de plasma chez un sujet virémique asymptomatique, peuvent se retrouver concentrés au niveau du cryoprécipité et ainsi contaminer un ou des lots de facteurs de coagulation. Le dépistage des génomes viraux de ces deux virus par les techniques très sensibles d'amplification génique trouve donc ici toute sa place afin de réduire le plus possible la charge virale potentiellement présente dans les pools de plasmas. Cette démarche est d'autant plus pertinente pour le parvovirus B19 dont l'intensité de la virémie est particulièrement impressionnante (jusqu'à 10^{11} copies de génome viral par millilitre de plasma [21]).

Un moyen complémentaire de contribuer à l'amélioration de la qualité de la matière première pour les virus VHB, VHC et VIH est de pratiquer une quarantaine. Cela est rendu possible du fait que, contrairement aux produits sanguins labiles, le plasma peut être congelé plusieurs mois avant d'être fractionné. Ainsi, la libération d'un plasma peut être autorisée dès qu'un certain délai s'est écoulé après sa collecte, sans qu'aucune séroconversion n'ait été constatée chez le donneur. Cette mesure a surtout présenté un intérêt par le passé pour sécuriser la «fenêtre sérologique», avant la mise en place des tests de détection des génomes viraux. Cela était particulièrement pertinent chez les donneurs de plasmas rémunérés, certaines de ces populations présentant une incidence d'infections virales régulièrement supérieure à celle constatée chez les donneurs bénévoles non rémunérés. Le respect de la qualité de l'entretien avec le donneur et de son examen clinique à la recherche des critères d'exclusion du don de sang est également un élément de garantie de qualité de la matière première plasmatisée, même si son apport est difficilement quantifiable.

Ce que nous venons d'évoquer ne concerne bien évidemment que les virus majeurs ou connus : on ne peut trouver ou éliminer que ce que l'on connaît et que l'on cherche, dans les limites des connaissances et des techniques. Le procédé de fabrication permettra, dans un second temps, d'éliminer ou inactiver les virions qui seraient passés au travers du crible pour les virus décrits ci-dessus et de garantir l'élimination et/ou l'inactivation de tout autre virus connu ou inconnu.

Procédé de fabrication

Le défi auquel les industriels du fractionnement ont à faire face est d'identifier, pour chaque produit d'origine plasmatisée, les étapes nécessaires et suffisantes pour obtenir un principe actif de pureté satisfaisante, présentant une sécurité virale optimale, sans que ces étapes n'altèrent ses propriétés structurales et fonctionnelles afin de garantir son activité biologique. Certains procédés d'inactivation virale drastiques (très hautes températures, pH extrêmes, formaldéhyde...) sont donc incompatibles avec le fractionnement plasmatisé, car ils conduiraient inéluctablement à la dénaturation ou la perte de fonctionnalité du principe actif. Un exemple de fractionnement des dérivés plasmatisés est présenté dans la Fig. 2. Un certain nombre de principes généraux vont être évoqués dans les lignes suivantes. Il faut garder à l'esprit que les virus sont regroupés en familles sur la base de propriétés structurales et génétiques communes. Ces propriétés structurales sont extrêmement diverses, conférant aux virus des propriétés physicochimiques très différentes d'une famille à l'autre. Ainsi, aucune étape ne permet pas d'obtenir un comportement identique pour tous les virus. C'est la combinaison de différentes étapes d'élimination et d'inactivation, efficaces à des niveaux divers sur l'ensemble des familles virales, qui permettra de caractériser un procédé robuste quant à la sécurité virale.

Les étapes aptes à éliminer les virus

Ce sont des étapes de partition telles que précipitations, filtrations, chromatographies... Au cours de ces étapes, les virus peuvent être soit séparés du principe actif, l'étape est alors contributive, soit être copurifiés avec lui. À titre d'exemple, les étapes de précipitation ont tendance à être contributives pour la sécurité virale lorsque le principe actif reste présent dans les surnageants, mais peu contributives lorsqu'il se situe au niveau du précipité. C'est ainsi que les facteurs de coagulation concentrés dans le cryoprécipité sont facilement contaminés par des virus alors que l'albumine, obtenue à partir des surnageants lors du fractionnement, est largement épargnée (Fig. 2). Il est nécessaire également de tenir compte des conditions dans lesquelles ces étapes de partition sont réalisées. Une précipitation à l'éthanol, surtout si la concentration et la durée de contact sont importantes, fera intervenir à la fois l'action anti-infectieuse de l'alcool et le phénomène de partition.

Les étapes de chromatographie sont régulièrement contributives pour éliminer les virus dès lors qu'ils ne sont pas élués avec le principe actif. Cependant, ces étapes font intervenir d'autres risques. Le premier est lié à la réuti-

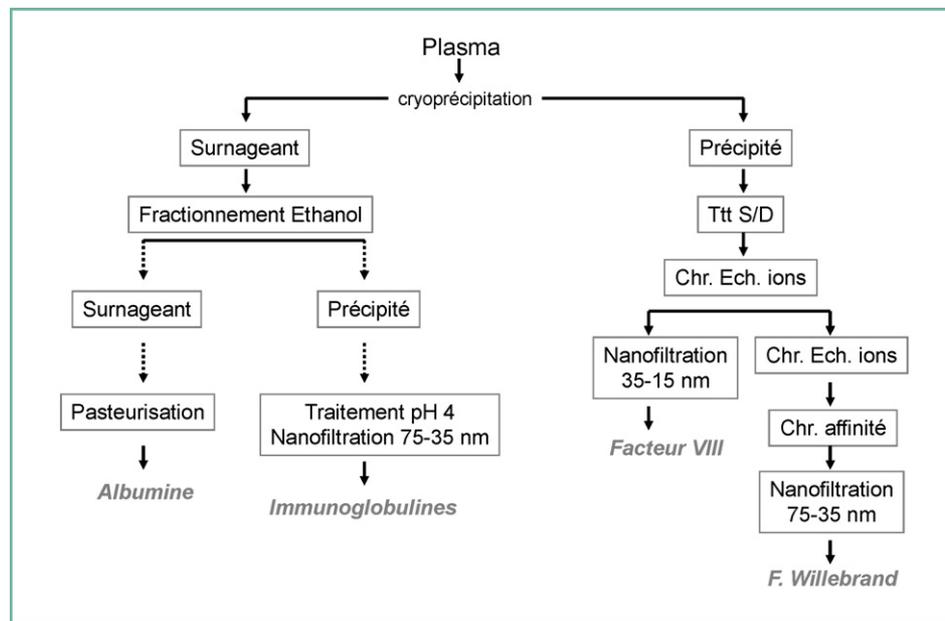


Figure 2. Fractionnement du plasma pour l'obtention de certains MDS [10].
Blood fractionation for a few plasma derivatives [10].

lisation des supports (gels) chromatographiques. En effet, certains virus peuvent s'adsorber et donc se concentrer sur certains de ces supports et il est alors indispensable de les désinfecter avant réutilisation. Cela est en général réalisé par des traitements standardisés à la soude : c'est ce que l'on appelle la sanitisation des supports chromatographiques. Parmi les gels de chromatographie susceptibles d'adsorber les virus, on peut citer les gels sensibilisés à l'héparine utilisés pour des chromatographies d'affinité, car de nombreux virus interagissent avec les héparane-sulfates [22]. Le second de ces risques est l'introduction de virus adventices via des substances biologiques fixées sur les supports chromatographiques. C'est le cas de l'héparine, produit d'extraction animale (porcine) que nous venons d'évoquer, mais aussi des anticorps monoclonaux (pour la plupart d'origine murine) utilisés pour purifier certains principes actifs par chromatographie d'affinité. Il faudra alors s'assurer que ces produits d'origine animale ne sont pas contaminés eux-mêmes par des virus provenant de l'espèce animale dont ils sont issus ou par des virus introduits accidentellement lors de la production du produit concerné (par exemple, virus bovins contaminant le sérum de veau utilisé pour la culture d'une lignée cellulaire productrice d'anticorps monoclonaux).

Les étapes aptes à inactiver les virus

Ces étapes font intervenir des procédés physiques ou chimiques qui vont faire perdre leur pouvoir infectieux aux virus. Les traitements par la chaleur, notamment la pasteurisation, sont inactivants. Cependant, les différentes familles virales sont plus ou moins thermostables (Tableau 2). On peut retenir que les virus enveloppés sont en général plus sensibles à la chaleur que les virus nus. Cependant, certains virus enveloppés sont plus thermostables que d'autres ; c'est le cas des pestivirus qui montrent régulièrement des cinétiques d'inactivation plus lentes que les herpèsvirus

ou les rétrovirus. Il en est de même pour les virus nus : les parvovirus sont particulièrement thermostables, une infectiosité résiduelle bien que fortement réduite étant très régulièrement retrouvée dans les études de validation après chauffage de dix heures à 60°C. Le VHA, bien qu'appartenant à la famille des *Picornaviridae*, est inactivé par la chaleur plus lentement que les autres virus de cette famille.

L'un des progrès majeurs de la sécurité virale des MDS a été l'introduction des traitements solvant-détergent (S/D [23]). Ce type de traitement associe l'action d'un solvant des lipides (par exemple, 0,3% tri-n-butyl phosphate [TnBP]) et d'un détergent (par exemple, 1% Triton X100). Les traitements S/D vont solubiliser et donc dégrader de manière quasi instantanée et irréversible les enveloppes virales dont les lipides sont des constituants majeurs et ainsi faire perdre toute infectiosité aux virus enveloppés. Solvants et détergents sont ensuite éliminés par chromatographie. Les traitements S/D apportent donc une sécurité importante vis-à-vis des virus majeurs que sont les virus des hépatites B et C et le VIH. En revanche, ce type de traitement est absolument sans effet sur les virus nus, pour lesquels des étapes plus spécifiques devront être introduites.

D'autres procédés d'inactivation, moins génériques que les deux précédents, ont été décrits et utilisés pour certains dérivés plasmatisques. Il s'agit notamment de traitements enzymatiques (pepsine) à pH acide qui ont une action inactivante sur certains virus, notamment les virus enveloppés les plus fragiles. Ces traitements sont moins efficaces sur les virus nus, tout particulièrement les entérovirus qui sont résistants à pH acide.

La nanofiltration, procédé d'élimination physique dédié aux virus

Cette technologie est certainement, avec le traitement S/D et les traitements par la chaleur, l'une des approches qui a

Tableau 2 Principaux virus utilisés pour les études de validation des étapes d'élimination/inactivation virale des MDS. Le diamètre des virus est indiqué entre parenthèses.
Current viruses used for validation studies of blood derivatives. The diameter of the virus particles is indicated in parentheses.

	Virus enveloppés		Virus nus	
Virus à ADN	Herpesvirus (150-200 nm) (HSV, PRV)		Parvovirus (20 nm) (BPV, CPV, PPV)	
	Flavi/Pestivirus (40-60 nm) (BVDV, YFV, Sindbis)		Papovavirus (45 nm) (SV40)	
Virus à ARN	Rétrovirus (80-100 nm) (VIH)		Picornavirus (27-30 nm) (VHA, Polio, EMCV)	
	faible	moyenne	élevée	
Résistance				

HSV : *herpes simplex virus* ; PRV : *pseudorabies virus* ; BPV : *bovine parvovirus* ; CPV : *canine parvovirus* ; PPV : *porcine parvovirus* ; BVDV : *bovine viral diarrhea virus* ; YFV : *yellow fever virus* ; EMCV : *encephalomyocarditis virus*.

contribué le plus à la sécurisation des médicaments d'origine biologique au cours des années récentes [24]. Introduite il y a environ dix ans, elle consiste tout simplement en une filtration sur membranes de porosités extrêmement réduites. Les seuils de filtration peuvent être, par exemple, de 15, 35 ou 75 nm. Ainsi, toute particule de taille supérieure sera retenue et ainsi éliminée si le principe actif est lui-même présent dans le filtrat. Là encore, un compromis doit être trouvé par le fabricant pour le choix de la porosité afin que le principe actif puisse être filtré sans perte de rendement et que le maximum de virus puissent être éliminés. En effet, certaines macromolécules actives volumineuses, de structure quaternaire complexe, sont susceptibles d'être également retenues par des filtres de 15 ou 35 nm. L'une des principales raisons de l'introduction de la nanofiltration dans les procédés de fabrication des médicaments d'origine biologique a été la nécessité d'améliorer la sécurité virale vis-à-vis de virus nus, insensibles par définition au traitement S/D et bien souvent relativement — voire très — thermorésistants, tels que les parvovirus [25,26]. Bien que contributive pour les virus nus, cette technologie est bien évidemment pertinente également pour les virus enveloppés qui, de plus, sont en général de taille supérieure à la plupart des virus nus. L'une des contraintes industrielles d'une étape de nanofiltration est la nécessité d'un contrôle de qualité visant, lors de la production, à s'assurer de l'intégrité des filtres. Cela peut être réalisé par un contrôle pré- et postpassage du produit à filtrer, consistant par exemple en la filtration d'une suspension de particules inertes de type or colloïdal de taille connue et analyse du filtrat pour s'assurer du non-passage de ces particules au travers du filtre.

La validation de l'élimination ou de l'inactivation virale

La connaissance théorique du comportement de chaque étape vis-à-vis de telle ou telle famille virale permet d'estimer la capacité d'un procédé à éliminer ou inactiver les virus. Il est cependant indispensable de démontrer que le procédé fonctionne comme attendu dans la réalité, c'est-à-dire dans le contexte des contraintes environnementales (physiques, chimiques...) du procédé industriel lui-même, et de le documenter le plus précisément possible. La validation a donc pour finalité de montrer à échelle réduite en laboratoire (par exemple, au 1/100 ou 1/1000), la fiabilité ou robustesse du procédé industriel pour éliminer ou inactiver les virus. Pour cela, il faut reconstruire à l'échelle du laboratoire (*scaled-down*) plusieurs étapes du procédé industriel en respectant au plus près possible les conditions opératoires industrielles, en termes de température, pH, durée de traitement, concentration en protéines, concentrations en produits ajoutés, vitesse de filtration et pression au centimètre cube (pour les étapes de filtration), vitesse de montée en température (pour les étapes d'inactivation par la chaleur)... Le principe est donc de prélever un faible volume du produit en cours de production (produit intermédiaire), juste en amont de l'étape industrielle à valider, et de lui faire subir en laboratoire l'étape miniaturisée après l'avoir surchargé (*spiking*) avec une forte concentration connue de virus « modèle ». La détermination de la concentration du virus (titrage du pouvoir infectieux) dans le produit avant traitement et après traitement permet de calculer le facteur de réduction de l'infectiosité lié à l'étape (Fig. 3).

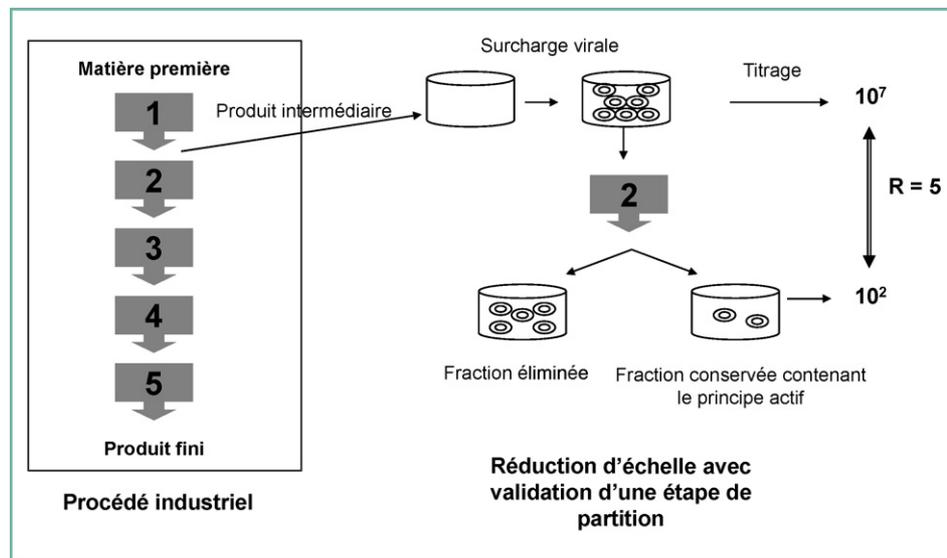


Figure 3. Principe d'une validation de l'élimination virale lors d'une étape (étape 2) de partition sélectionnée au sein d'un procédé de fabrication.

Schematic representation of the principle of validation studies, showing the scale down and a spiking experiment on a specific step (step 2).

L'objectif des études de validation virale est de fournir des éléments tangibles, concrets, démontrant que telle ou telle étape permet effectivement d'éliminer ou d'inactiver tel ou tel type de virus, susceptible de contaminer spécifiquement la matière première (par exemple, VIH, VHC ou parvovirus B19 pour le plasma) ou représentatif de familles non encore impliquées dans des contaminations liées aux produits sanguins. En d'autres termes, les virus utilisés pour les validations doivent être choisis afin de représenter à la fois les virus qui sont des contaminants majeurs du plasma mais également des virus ayant un spectre de caractéristiques physicochimiques le plus large possible afin de tester la capacité du procédé à éliminer ou inactiver les virus en général (Tableau 2). Le titrage des virus qui reste la référence est le titrage *in vitro* sur cultures cellulaires. La procédure ne peut donc être appliquée qu'à des virus qui sont aisément cultivables et quantifiables en culture cellulaire. La quantification du titre infectieux est réalisée selon les standards de la virologie classique à savoir, en fonction des propriétés cytopathiques (présence ou absence d'un effet cytolytique) et des outils disponibles pour la visualisation de chaque virus : quantification des plaques de lyse, quantification des plaques en milieu gélifié, immunofluorescence, dosage d'antigènes viraux dans les surnageants de culture... [27].

Les virus utilisés pour la validation de l'élimination/inactivation des MDS

Les contraintes expérimentales imposées par les virus eux-mêmes font qu'il est difficile de répondre exactement aux exigences évoquées ci-dessus. En effet, l'idéal serait de valider chaque procédé avec les virus majeurs impliqués dans des contaminations via les MDS. Or le VHC, le VHB et le parvovirus B19 ne sont pas ou très difficilement cultivables *in vitro* et ne peuvent donc pas être utilisés eux-mêmes pour les validations. On a alors recours à des virus modèles, culti-

vables et choisis comme étant les plus proches au sein de la même famille (Tableau 2). C'est ainsi que pour le VHC, le virus de choix est le virus de la diarrhée bovine (BVDV, pestivirus) mais que d'autres virus de la même famille peuvent également être utilisés (virus *Sindbis*, virus de la fièvre jaune — *Flaviviridae*). Les parvovirus bovin (BPV), canin (CPV) ou murin (MVM) sont utilisés en tant que modèles du parvovirus B19. Il n'existe pas encore à l'actuelle de bon modèle du virus de l'hépatite B (*Hepadnaviridae*) facilement cultivable *in vitro* permettant de quantifier précisément l'efficacité de différentes étapes vis-à-vis de ce virus. Seuls le VIH et le VHA sont régulièrement utilisés pour valider les procédés de préparation des MDS. Cependant, si les données obtenues ne doivent pas être remises en cause, il faut être conscient qu'elles l'ont été avec un nombre très limité de souches. Ces isolats sont des prototypes particulièrement adaptés et sélectionnés pour leur capacité de répllication *in vitro* et pourraient posséder des propriétés légèrement différentes des virus sauvages. Cela est d'autant plus vrai pour le VHA dont seules quelques très rares souches sont répliquatives *in vitro* [28,29]. Les isolats primaires de VIH sont, quant à eux, difficilement adaptables à la culture sur lignées cellulaires T et ne fournissent que des titres modestes lorsqu'ils sont amplifiés *in vitro* sur cellules mononucléées primaires du sang périphérique qui sont pourtant les cellules cibles *in vivo*.

Afin de répondre à la nécessaire documentation de l'efficacité d'un procédé vis-à-vis de virus ayant des propriétés physicochimiques très différentes, il est nécessaire de compléter les études de validation avec des virus représentatifs de familles autres que celles incluant les virus majeurs évoqués ci-dessus. Ainsi, un virus facilement cultivable de la famille des *Herpesviridae*, virus enveloppé à ADN, est généralement utilisé (Tableau 2). Il peut s'agir d'un virus humain, par exemple *Herpes simplex virus* (HSV) ou d'un virus animal, par exemple le virus de la pseudorange ou virus Aujeszky (PRV). Il est également habituel d'avoir recours à des virus

modèles animaux lorsque l'on veut étudier l'efficacité d'une étape sur un produit intermédiaire riche en immunoglobulines. En effet, bon nombre de virus humains, *Herpes simplex* type 1, poliovirus et VHA par exemple, sont neutralisés dès la surcharge par les anticorps neutralisants présents dans le pool de plasma d'origine du fait de la très forte prévalence de ces anticorps dans la population des donneurs de sang. Le virus PRV est alors très utile comme modèle de gros virus enveloppé à ADN et le virus de Theiler (EMCV) comme modèle de petit virus à ARN.

Du bon usage des facteurs de réduction du titre infectieux

Nous avons vu, dans la Fig. 3, le principe du calcul des facteurs de réduction. Il consiste, pour un virus donné et pour une étape donnée, à calculer la différence existant entre le nombre absolu de particules infectieuses présentes dans le produit intermédiaire surchargé avant l'étape à analyser (N_0) et le nombre absolu de particules infectieuses présentes dans la fraction contenant le principe actif après l'étape (N_f). Il est habituel et plus simple d'exprimer le facteur de réduction R en \log_{10} ; ainsi $R = \log_{10}(N_0/N_f)$. Les facteurs de réduction inférieurs à 1 ne sont jamais pris en considération, car considérés comme non significatifs. À l'opposé, on considère habituellement qu'une étape présentant un facteur de réduction supérieur à 4, soit capable de diminuer le titre infectieux d'un facteur 10 000, est très contributive. Les étapes de partition fournissent habituellement des facteurs de réduction compris entre 1 et plusieurs \log_{10} . Les étapes d'inactivation lorsque réellement efficaces fournissent des facteurs de réduction par défaut, car le virus, étant complètement inactivé, ne peut être détecté après l'étape en question. Ainsi, le facteur de réduction ne peut être supérieur au titre initial dans le produit intermédiaire surchargé. Le facteur de réduction est alors supérieur ou égal à une valeur x . Cette valeur x sera d'autant plus importante que le titre initial de virus est plus élevé. Cette limite doit toujours être présente à l'esprit. En effet, si on considère les validations de traitements S/D sur le VIH dont les titres initiaux de stock viral sont rarement supérieurs à $10^5 - 10^6$ TCID₅₀, il ne peut être constaté des facteurs de réduction supérieurs à $4-5 \log_{10}$ alors que tous les virions sont inactivés. Or il est fort probable dans l'absolu que, si des titres initiaux de $10^{10} - 10^{12}$ TCID₅₀ pouvaient être obtenus, tous les virions présents seraient très rapidement tous inactivés de la même manière et que des facteurs de réduction supérieurs ou égaux à $10 \log_{10}$ seraient alors rapportés. Cet exemple illustre la circonspection avec laquelle les résultats des validations virales doivent être analysés. Il est effectivement habituel de cumuler les facteurs de réduction des différentes étapes pour illustrer l'efficacité d'un procédé d'obtention d'un médicament d'origine biologique. Le total obtenu ne peut être qu'indicatif du niveau de sécurité vis-à-vis de familles virales différentes et ne doit pas être utilisé en tant que tel sans analyse plus approfondie. Il en résulterait une « course aux logs », argument de marketing fallacieux et non pertinent. De la même manière, ce cumul de facteurs de réduction a été utilisé pour des estimations de risque (*risk assessment*) de voir un flacon de MDS contenir encore une unité infectieuse, si la matière première devait être contaminée malgré le respect de toutes les

mesures de dépistage. Cette estimation du risque est interprétable si aucune étape n'inactive réellement les virus, mais ne peut être réalisée dès lors que des étapes parfaitement inactivantes sont intégrées dans le procédé de fabrication.

Validation de la robustesse des étapes éliminant ou inactivant les virus

Il est régulièrement utile, voire indispensable, de documenter plus précisément la validation de certaines étapes afin de mieux cerner leur robustesse.

Documentation de la balance virale

Cette notion concerne les étapes de partition pour lesquelles il est intéressant de suivre le devenir des virus qui seront en partie dans le produit collecté et, en partie, dans le produit éliminé (par exemple, précipité et culot lors d'une précipitation). La somme des charges virales trouvées dans ces deux fractions doit être proche de la charge virale initiale, dans le produit intermédiaire surchargé. L'avantage de cette documentation est qu'elle contribue à la compréhension de la réduction de la charge virale et qu'elle permet de s'assurer qu'il n'y a pas accumulation de particules infectieuses sur des supports utilisés lors de l'étape.

Documentation de la cinétique d'inactivation

L'analyse fine de la cinétique permet de mieux cerner la robustesse d'une étape d'inactivation en ce sens qu'une inactivation très rapide permet d'être confiant quant à l'efficacité du procédé alors qu'une inactivation lente fait craindre une marge de sécurité plus modeste. Il est également intéressant d'analyser cette même cinétique dans des conditions suboptimales afin de documenter, là également, la marge de sécurité apportée par l'étape d'inactivation. Ainsi, pour une étape de pasteurisation de dix heures à 60 plus ou moins 2 °C, la cinétique pourra être analysée à 60 °C (conditions optimales) mais également à une température légèrement inférieure à la borne minimale (58 °C; conditions suboptimales) afin d'analyser quelles pourraient être les conséquences d'une éventuelle dérive accidentelle du procédé industriel.

Documentation de l'efficacité de l'agent inactivant et des variations des conditions opératoires sur l'inactivation

Cela est nécessaire pour des procédés d'inactivation chimique, telle que le traitement S/D. Il est intéressant d'identifier la concentration minimale efficace de l'agent inactivant ainsi que l'absence de modification de l'inactivation en présence de caractéristiques anormales du produit intermédiaire traité (concentration en protéines, concentration en lipides..., au-delà des normes décrites dans le procédé de fabrication) afin, là encore, de s'assurer de la robustesse du procédé choisi.

Contrôle du produit fini

Pour ce qui concerne les MDS, il est clair que ce sont les deux premiers éléments, qualité de la matière première et procédé de fabrication correctement validé, qui contribuent à la sécurité des MDS. Le contrôle sur produit fini n'a que peu ou pas d'intérêt pour les virus majeurs humains du fait des garanties apportées par les deux éléments d'amont. Cela

n'est pas le cas pour d'autres médicaments d'origine biologique lorsque le *screening* de la matière première n'est pas réalisable ou que le procédé de fabrication semble faible pour éliminer ou inactiver certaines familles virales. Cette situation est notamment rencontrée pour des médicaments d'origine animale, bovine ou porcine par exemple, pour lesquels il n'y a pas de virus à rechercher spécifiquement au stade de la matière première (absence de *screening*, comme ce peut être le cas chez les donneurs de sang). C'est ce que nous décrivons brièvement dans les lignes suivantes.

Produits biologiques d'origine animale

Les produits biologiques d'origine humaine retiennent une attention toute particulière sur le plan de la sécurité virale du fait de l'absence de barrière d'espèce. En effet, un virus humain est déjà adapté à son hôte, et une éventuelle transmission iatrogène se traduira immédiatement par l'expression clinique de la maladie, de manière similaire à l'infection naturelle. Bien que la barrière d'espèce soit régulièrement évoquée pour les virus animaux, les produits d'origine animale nécessitent cependant la même attention pour deux raisons principales. La première est que bon nombre d'infections virales humaines résultent de l'émergence d'un agent zoonotique via une transmission interspèces suivie d'adaptation à l'espèce humaine. Les épidémies récentes liées à des virus animaux hautement pathogènes pour l'homme, tels que le coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV), le virus *Nipah*, le virus *West-Nile*, ou les virus influenza aviaires, ont illustré ce phénomène de manière spectaculaire ces dernières années [30–34]. La seconde est que l'utilisation de médicaments d'origine animale, notamment ceux administrés par voie parentérale, peut fournir de nouvelles possibilités de diffusion à des virus incapables d'infecter l'homme dans des conditions naturelles. De nombreuses spécialités renferment des principes actifs ou des excipients d'origine animale [35]. On peut citer, à titre d'exemple, l'héparine et ses dérivés, des enzymes telles que la trypsine, la pepsine, la catalase, le lysozyme...

Il est en général peu envisageable d'effectuer un *screening* spécifique de virus animaux sur la matière première. À titre d'exemple, l'héparine est issue de muqueuse intestinale de porcs. Plusieurs tonnes de muqueuse intestinale porcine constituent le point de départ de l'extraction. Il est cependant exigé que les animaux soient jugés sains après examen vétérinaire et certifiés aptes à la consommation humaine.

C'est donc sur le procédé de fabrication que reposera en très grande partie la sécurité virale. Ce procédé devra intégrer des étapes aptes à éliminer les virus et des étapes aptes à les inactiver. La validation à échelle réduite de plusieurs de ces étapes à l'aide de modèles viraux pertinents permettra alors d'évaluer le niveau de sécurité du produit biologique. Il est néanmoins possible de concevoir des dérogations à ce principe de validation expérimentale dans les deux situations suivantes :

- lorsque le procédé inclut des étapes inactivantes très puissantes, telles que l'autoclavage, des traitements à pH très élevés ou très faibles à forte température pendant plusieurs heures ;

- lorsque le médicament est administré par voie orale non gastroprotégée et que la matière première brute est utilisée comme aliment chez l'homme et provient d'animaux salubres pour la consommation humaine [35].

La recherche de virus animal dans le produit fini concentré (ou dans un produit intermédiaire) avant mise en forme pharmaceutique, effectuée sur cellules animales (de la même espèce que celle dont est issue la matière première) et sur cellules humaines (espèce receveuse du médicament), permet de documenter, voire d'estimer, le risque viral résiduel. Cependant, ces contrôles ont des limites liées essentiellement à la capacité de réplication des virus dans les cellules cibles utilisées, des moyens utilisés pour les détecter et de la représentativité de l'échantillonnage utilisé pour les contrôles.

Produits biologiques issus de cellules eucaryotes en culture

Les médicaments issus des biotechnologies constituent des classes thérapeutiques en forte expansion. Il s'agit notamment et sans exhaustivité de cytokines, de facteurs de croissance et d'anticorps monoclonaux. Il est considéré que les médicaments biologiques produits par des bactéries ou des levures ne présentent pas de risque de transmission de virus animaux, dès lors que les milieux de culture sont synthétiques et/ou autoclavés et qu'aucun produit d'origine animale n'est introduit au cours de la fabrication. En revanche, les produits issus de cellules eucaryotes, tout particulièrement de cellules de mammifères, présentent un risque viral pour l'homme. En effet, du stade de la recherche-développement au stade de l'industrialisation, les cellules productrices ont subi de nombreux « passages » et ont été cultivées pendant de nombreux mois en présence de suppléments de milieux de culture (sérum de veau, trypsine, facteurs de croissance...) susceptibles d'introduire des virus adventices. Les cellules productrices sont à risque d'amplifier ces virus adventices qui peuvent alors copurifier avec le principe actif.

Comme pour les autres produits biologiques, la sécurité virale des médicaments issus de cellules eucaryotes en culture repose sur la qualité de la matière première, le procédé de fabrication et sa validation et, éventuellement, le contrôle du produit fini. Cependant, la spécificité de ces produits en termes de sécurité virale est liée à l'originalité de la matière première. La sécurité virale de la matière première est documentée par la recherche de virus sur les différentes banques cellulaires du clone d'intérêt (banque mère — *master cell bank* ; banque de travail — *working cell bank* ; cellules postproduction — *end of production cells*) et sur le produit de récolte. Les virus recherchés doivent être les virus de l'espèce dont dérive le clone cellulaire (par exemple, cellules de hamster) et les virus des espèces animales dont dérivent les suppléments utilisés pour la culture (virus porcins pour la trypsine, virus bovins pour le sérum de veau). Sachant que la totalité des lignées cellulaires de mammifères utilisées contiennent des virus endogènes dont le pouvoir pathogène pour l'homme est insuffisamment documenté, le procédé de fabrication du principe

actif contenu dans le produit de récolte doit inclure des étapes aptes à éliminer et inactiver les virus et doit être validé à échelle réduite de manière similaire à ce que nous avons vu pour les MDS et les produits d'origine animale. Le contrôle sur produit fini n'a que peu ou pas d'intérêt si les garanties apportées par les deux éléments d'amont sont suffisantes.

Conclusion

L'ensemble des démarches mises en place pour garantir la sécurité virale des médicaments dérivés du sang permet désormais de garantir une excellente sécurité vis-à-vis de virus humains majeurs, responsables des drames survenus il y a quelques années (VIH, VHC). De plus, la mise en place de procédures de qualification de la matière première et de procédés génériques d'élimination et/ou d'inactivation efficaces (traitement S/D, traitements par la chaleur, nanofiltration) permet de garantir l'absence d'infectiosité liée à des virus inconnus ou non recherchés, que l'origine soit humaine, animale ou biotechnologique.

Remerciements

Cette synthèse n'aurait pas pu être écrite sans les nombreuses réunions et discussions au sein du groupe Sécurité virale de l'AFSSaPS ; les remerciements s'adressent donc à l'ensemble des membres de ce groupe, passés et présents. Le développement et la structuration des concepts de sécurité virale doivent énormément à F. Horaud et J.-H. Trouvin.

Références

- [1] Rouzioux C, Brun-Vézinet F, Couroucé AM, Gazengel C, Vergoz D, Desmyter J, et al. Immunoglobulin G antibodies to lymphadenopathy-associated virus in differently treated French and Belgian hemophiliacs. *Ann Intern Med* 1985;102:476–9.
- [2] Eyster ME, Sherman KE, Goedert JJ, Katsoulidou A, Hatzakis A. Prevalence and changes in hepatitis C virus genotypes among multitransfused persons with hemophilia. The Multicenter Hemophilia Cohort Study. *J Infect Dis* 1999;179:1062–9.
- [3] Kenny-Walsh E, for the Irish Hepatology Research Group. Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. *N Engl J Med* 1999;340:1228–33.
- [4] Horaud F. La sécurité virale des produits biologiques : aspects historiques et conceptuels. *Virologie* 1997;1:365–72.
- [5] Trouvin JH. La sécurité virale : un concept d'actualité, en perpétuelle évolution. *Virologie* 2002;6:83–7.
- [6] Brown P, Preece MA, Will RG. «Fiendly fire» in medicine: hormones, homologs, and Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1992;340:24–7.
- [7] Horaud F. Biologicals: an attempt at classification and its implication for the viral safety of products. *Dev Biol Stand (Basel, Karger)* 1993;81:17–24.
- [8] Martin M, Oualikene-Gonin W, Sainte-Marie I, Trouvin JH. Aspects réglementaires de la sécurité virale des médicaments dérivés du sang. Réglementation française et européenne. *Virologie* 2005;9:S17–24.
- [9] Lasmez C. Encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles et sécurité des produits sanguins. *Virologie* 2005;9:S37–43.
- [10] Flan B, Aubin JT. Évaluation de l'efficacité des procédés de purification des protéines plasmatiques à éliminer les agents transmissibles non conventionnels. *Virologie* 2005;9:S45–56.
- [11] Chudy M, Budek I, Keller-Stanislawski B, McCaustland KA, Neidhold S, Robertson BH, et al. A new cluster of hepatitis A infection in hemophiliacs traced to a contaminated plasma pool. *J Med Virol* 1999;57:91–9.
- [12] Johnson Z, Thornton L, Tobin A, Lawlor E, Power J, Hillary I, et al. An outbreak of hepatitis A among Irish haemophiliacs. *Int J Epidemiol* 1995;24:821–8.
- [13] Santagostino E, Mannucci PM, Gringeri A, Azzi A, Morfini M, Musso R, et al. Transmission of parvovirus B19 by coagulation factor concentrates exposed to 100 °C heat after lyophilization. *Transfusion* 1997;37:517–22.
- [14] Blumel J, Schmidt I, Effenberger W, Seitz H, Willkommen H, Brackmann HH, et al. Parvovirus B19 transmission by heat-treated clotting factor concentrates. *Transfusion* 2002;42:1473–81.
- [15] Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in post-transfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;241:92–7.
- [16] Biagini P. Les circovirus humains. *Virologie* 2002;6:19–28.
- [17] Stramer S, Glynn SA, Kleinman SH, Strong M, 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;351:760–8.
- [18] Pillonel J, Laperche S, l'Établissement Français du Sang. Trends in risk of transfusion-transmitted viral infections (HIV, HCV, HBV) in France between 1992 and 2003, and impact of nucleic acid testing (NAT). *Euro Surveill* 2005;10:5–8.
- [19] Delwart EL, Kalmin ND, Jones TS, Ladd DJ, Foley B, Tobler LH, et al. First report of human immunodeficiency virus transmission via an RNA-screened blood donation. *Vox Sang* 2004;86:171–7.
- [20] Najjoulah F, Barlet V, Renaudier P, Guitton C, Crova P, Guérin JC, et al. Failure and success of HIV tests for the prevention of HIV transmission by blood and tissue donations. *J Med Virol* 2004;73:347–9.
- [21] Aubin JT, Defer C, Vidaud M, Maniez-Montreuil M, Flan B. Large-scale screening for human parvovirus B19 DNA by PCR: application to the quality control of plasma for fractionation. *Vox Sang* 2000;78:7–12.
- [22] Spillmann D. Heparan sulfate: anchor for viral intruders? *Biochimie* 2001;83:811–7.
- [23] Horowitz D, Prince AM, Horowitz MS, Watklevicz. Viral safety of solvent detergent treated blood products. *Dev Biol Stand* 1993;81:147–61.
- [24] Burnouf T, Radosevich M. Nanofiltration of plasma-derived biopharmaceutical products. *Haemophilia* 2003;9:24–37.
- [25] Omar A, Kempf C. Removal of neutralized model parvoviruses and enteroviruses in human IgG solutions by nanofiltration. *Transfusion* 2002;42:1005–10.
- [26] Mazurier C, Poulle M, Samor B, Hilbert L, Chtourou S. In vitro study of a triple-secured von Willebrand factor concentrate. *Vox Sang* 2004;86:100–4.
- [27] Agut H, Calvez V, Barin F. Quantification des virus. *Virologie* 1997;1:S20–30.
- [28] Lemon SM. Hepatitis A virus and blood products: virus validation studies. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995;6:S20–2.
- [29] Yi M, Lemon SM. Replication of subgenomic hepatitis A virus RNAs expressing firefly luciferase is enhanced by mutations

- associated with adaptation of virus to growth in cultured cells. *J Virol* 2002;76:1171–80.
- [30] Peiris JSM, Lai ST, Poon LM, Guan Y, Yam LYC, Lim W, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 2003;361:1319–25.
- [31] Chua KB, Bellini WJ, Rota PA, Harcourt BH, Tamin A, Lam SK, et al. Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science* 2000;288:1432–5.
- [32] Anderson JF, Andreadis TG, Vossbrinck CR, Tirrell S, Wakem EM, French RA, et al. Isolation of West Nile virus from mosquitoes, crows, and a cooper's hawk in Connecticut. *Science* 1999;286:2331–3.
- [33] Peiris JSM, Yu WC, Leung CW, Cheung CY, Ng WF, Nicholls JM, et al. Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *Lancet* 2004;363:617–9.
- [34] Vabret A. Émergence et franchissement de barrière d'espèces : effet papillon. *Virologie* 2006;10:329–32.
- [35] Éloit M. Risques virologiques associés aux matières premières extraites de tissus animaux utilisées dans la fabrication des médicaments. *Virologie* 1997;1:413–22.