

Prélèvement et conservation des greffons cornéens

V. Borderie, B. Delbosc, A. Fialaire-Legendre, L. Laroche

Le prélèvement de cornée est réalisé par excision in situ ou par énucléation après sélection du donneur selon les critères recommandés par les associations de banques de cornées. La conservation du greffon est assurée par les banques de cornées autorisées qui prennent également en charge le contrôle de qualité et de stérilité du greffon, la gestion des contrôles sérologiques du donneur et la traçabilité entre donneur et receveur. La conservation de la cornée peut être faite à court terme en milieu liquide à +4 °C ou bien à moyen terme en organoculture à +31 °C. Les lésions de conservation induites par ces deux techniques sont modérées et les résultats cliniques des kératoplasties transfixiantes sont bons. La stérilité du greffon est obtenue dans plus de 95 % des cas en organoculture alors qu'elle ne l'est que dans moins de 85 % des cas à +4 °C. Ces techniques de conservation doivent permettre de minimiser les risques d'échec primaire de la greffe par insuffisance de qualité du greffon et par transmission de maladie du donneur au receveur.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Greffe de cornée ; Conservation de cornée ; Prélèvement de cornée ; Microbiologie ; Endothélium cornéen ; Législation ; Banque de cornées

Plan

■ Introduction	1
■ Prélèvement	1
Cadre législatif du prélèvement	1
Sélection des donneurs	1
Technique du prélèvement	2
■ Conservation des greffons cornéens	2
Transport du prélèvement vers la banque de cornées	2
Préparation du greffon prélevé par excision in situ pour la conservation	2
Décontamination des globes oculaires prélevés par énucléation et dissection de la cornée	2
Contrôle de qualité du greffon destiné à la kératoplastie transfixiante	3
Méthodes de conservation du greffon	3
Contrôle de stérilité du greffon destiné à la kératoplastie transfixiante	6
Cession du greffon	6
■ Conclusion	7

■ Introduction

La greffe de cornée est la plus fréquente et la plus ancienne des greffes. La conservation des greffons cornéens est réservée aux banques de cornées autorisées par l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. Celles-ci assurent les contrôles de qualité et de sécurité des greffons, la traçabilité entre donneur et receveur, et permettent de faire face à des besoins spécifiques (urgence, échanges interrégionaux, appariement tissulaire entre donneur et receveur).

■ Prélèvement

Cadre législatif du prélèvement [1, 2]

Le prélèvement de cornée est effectué sur une personne décédée, qu'il s'agisse d'une mort encéphalique chez une personne sous assistance respiratoire avec conservation de la fonction hémodynamique ou d'un arrêt cardiaque et respiratoire persistant. Il est réalisé à la morgue (excision in situ uniquement) dans le cas d'un prélèvement sur cadavre, ou bien au bloc opératoire (excision in situ ou énucléation) dans le cas des prélèvements sur donneur en mort cérébrale. L'anonymat entre donneur et receveur doit être respecté. Le principe de gratuité du don doit être garanti. Les règles de bonnes pratiques de prélèvement doivent être respectées. Des fiches techniques et des recommandations sont éditées par l'Agence de biomédecine pour harmoniser les pratiques.

Sélection des donneurs

En France, la sélection clinique du donneur est légalement sous la responsabilité du médecin préleveur. Lorsque le cadavre est conservé en chambre réfrigérée et que le délai de réfrigération du corps n'excède pas 4 heures, le prélèvement peut être réalisé dans les 48 heures suivant le décès du donneur. Les associations européenne (European Eye Bank Association [EEBA]) et américaine (Eye Bank Association of America [EBAA]) des banques d'yeux ont proposé des critères de sélection des donneurs. Les contre-indications au prélèvement à but thérapeutique comportent les affections neurologiques potentiellement transmissibles : rage, maladie de Creutzfeldt-Jakob, traitement par hormone de croissance d'origine humaine, intervention chirurgicale comportant l'utilisation de dure-mère d'origine humaine ou intervention neurochirurgicale non documentée sur ce point, sclérose en plaques, sclérose latérale amyotrophique, maladie d'Alzheimer (et autres démences),

encéphalite sclérosante subaiguë, rubéole congénitale, syndrome de Reye et encéphalite virale aiguë ou d'origine inconnue. Les autres contre-indications sont l'infection à VIH et les donneurs à haut risque de contamination par le VIH (virus de l'immuno-déficience humaine), les hépatites virales et ictères d'origine inconnue, les septicémies fongiques, la syphilis, la tuberculose active, la lèpre, certaines maladies parasitaires (paludisme, leishmaniose, trypanosomiase et échinococcose), les hémopathies, les tumeurs malignes oculaires, inflammations oculaires aiguës et pathologies cornéennes. Le respect de ces contre-indications est sous la responsabilité du médecin préleveur. En termes de pronostic de la greffe, il n'y a aucune raison pour mettre une limite supérieure à l'âge des donneurs. De nombreuses études ont montré que la survie du greffon ne diminue pas avec l'âge du donneur [3-9].

Lorsqu'une sérologie est positive pour les virus VIH 1 ou 2, HTLV 1 ou 2 (virus du lymphome humain à cellules T), pour les hépatites B ou C, ou pour la syphilis, toute greffe est interdite.

Technique du prélèvement

Le prélèvement est réalisé par excision in situ, le plus souvent, ou par énucléation [10]. Il s'accompagne d'une ponction de sang faite par voie sous-clavière ou intracardiaque pour les sérologies et la sérothèque (prélèvement sur tubes secs). Si un typage HLA (*human leucocytes antigen*) du donneur doit être réalisé, un prélèvement supplémentaire de sang sur tubes citratés est réalisé. La plupart des équipes françaises utilisent du matériel à usage unique pour assurer les prélèvements.

Prélèvement par excision in situ

Les règles d'asepsie habituelle doivent être respectées (utilisation de gants stériles, champ opératoire et instruments stériles). Il est important de décontaminer la peau et la surface oculaire et conjonctivale à la polyvidone iodée (Bétadine® 5 %), suivie d'un rinçage au sérum physiologique. La conjonctive est désinsérée au limbe. La cornée est prélevée avec une collerette sclérale de 2 à 3 mm par trépanation ou dissection au bistouri et aux ciseaux de microchirurgie. Il est important de ne pas effondrer la chambre antérieure lors de la dissection afin de ne pas léser l'endothélium cornéen. La cornée est directement placée dans un flacon rempli de milieu de transport. La restauration des téguments (conformateur ou prothèse oculaire de la couleur des yeux du donneur, fermeture des paupières après instillation d'une goutte de colle cyanoacrylique sous les paupières) doit être réalisée avec soin après quelques minutes afin de ne pas méconnaître un éventuel suintement sérohémostatique. Si un tel suintement survient, il faut surélever la tête, appliquer une colle hémostatique dans la cavité orbitaire et comprimer celle-ci à l'aide d'une boule de coton.

Prélèvement par énucléation

Le prélèvement par énucléation répond aux mêmes règles d'asepsie, de décontamination et de restauration tégumentaire. Les quatre muscles droits sont saisis à l'aide d'un crochet et sectionnés au ras de leur insertion sclérale, sauf le droit externe qui est sectionné à 5-10 mm de l'insertion tendineuse et sur lequel est placée une pince à clamper. Le tendon restant permet la manipulation ultérieure du globe. Le nerf optique et les muscles obliques sont ensuite sectionnés. Il faut veiller à ne pas ouvrir la sclère, ce qui aurait pour conséquence d'affaiblir le globe oculaire et léser l'endothélium cornéen. Le globe est rincé avec 500 ml de sérum physiologique stérile après énucléation et placé dans une chambre humide stérile.

■ Conservation des greffons cornéens [1]

La conservation des greffons cornéens est assurée par les banques de cornées autorisées. Celles-ci prennent en charge la conservation, le contrôle de qualité, le contrôle de stérilité du greffon et gèrent la réalisation des contrôles sérologiques du



Figure 1. Salle blanche (zone d'atmosphère contrôlée) de préparation des tissus. L'accès se fait par un sas.

donneur. Le tissu conservé et délivré par la banque est la cornée avec une collerette sclérale. Les prélèvements par énucléation (actuellement exceptionnels en France) subissent une étape de décontamination rigoureuse à la banque. Cette décontamination ne peut être réalisée en cas d'excision in situ.

Transport du prélèvement vers la banque de cornées

En cas d'excision in situ, le tissu prélevé est placé dans un flacon de milieu de transport (20 ml), juste après dissection. Le milieu est un milieu de conservation à +4 °C (le flacon est alors transporté dans un emballage réfrigéré à +4 °C) ou un milieu d'organoculture (le flacon est alors transporté à température ambiante). En cas de prélèvement par énucléation, le globe oculaire est transporté dans une chambre humide réfrigérée à +4 °C, cornée dirigée vers le haut. Les flacons ainsi que les tubes de sang doivent être étiquetés (identification précise du donneur, mentions légales), et accompagnés d'une fiche opérationnelle de prélèvement remplie par le médecin préleveur après lecture du dossier médical du donneur.

Préparation du greffon prélevé par excision in situ pour la conservation

Le greffon est préparé pour la conservation dans une zone classée (salle blanche), sous hotte à flux d'air laminaire (Fig. 1). Après préparation du matériel et des produits thérapeutiques annexes (milieux de conservation), le greffon et son milieu de transport sont versés dans une cupule stérile placée sur un champ opératoire stérile. Un fil de suture est passé dans l'anneau scléral du greffon et dans le bouchon du flacon de milieu de conservation, puis le greffon est introduit dans ce flacon qui est rebouché. Le flacon hermétiquement clos est ensuite placé dans la zone de conservation (étuve à 31 °C pour la conservation en organoculture, réfrigérateur à 4 °C pour la conservation en hypothermie).

Décontamination des globes oculaires prélevés par énucléation et dissection de la cornée

Le globe oculaire après décès du donneur est un prélèvement hautement contaminé. Polack [11] a retrouvé, sur 240 yeux prélevés par énucléation 4 à 14 heures après le décès, une contamination dans 100 % des cas. Les germes les plus fréquents sont *Staphylococcus epidermidis* et *aureus*, *Diphtheroides*, *Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium* et *Escherichia coli*. Il faut noter que le simple fait d'irriguer la cornée et les culs-de-sac



Figure 2. Contrôle de qualité endothéliale. Le greffon est placé après préparation dans une boîte de Pétri stérile et observé au microscope optique.

conjonctivaux avec du sérum physiologique stérile avant énucléation réduit la fréquence de la contamination des globes à 12,4 % [12].

La technique de décontamination la plus utilisée en Europe repose sur un bain dans de la polyvidone iodée. Les globes oculaires subissent un rinçage à l'eau courante filtrée (30 secondes) puis un bain dans de la polyvidone iodée (1 %, 2 minutes) suivi d'une neutralisation par le thiosulfate (30 secondes) et d'un rinçage dans du sérum physiologique. La cornée est ensuite disséquée au couteau à 45° avec une collerette sclérale de 2-3 mm. Les différents bains et la dissection sont réalisés sous hotte à flux laminaire.

La détertion mécanique du globe (rinçage à l'eau courante) diminue le taux de contamination de 86 %, et 98 % lorsqu'elle est associée à une immersion dans la polyvidone iodée 0,5 % pendant 2 minutes [13]. La polyvidone iodée est active sur staphylocoque, colibacille, *Herpes simplex virus*, VIH et *Candida*. Elle ne crée pas d'opacités épithéliales avec une concentration de 0,5 % et un temps d'immersion de 2 minutes. Les opacités sont minimales avec une concentration de 1 % et 2 minutes d'immersion. Le stroma apprécié à l'examen biomicroscopique est normal avec une concentration inférieure ou égale à 2,5 % et un temps d'immersion inférieur à 4 minutes.

Contrôle de qualité du greffon destiné à la kératoplastie transfixiante

En cas de prélèvement par énucléation, la transparence du tissu cornéen est vérifiée à la lampe à fente avant la conservation. Cette vérification n'est malheureusement pas réalisable en cas de prélèvement par excision in situ. Le greffon doit donc être examiné macroscopiquement avec la plus grande attention à toutes les étapes de la conservation pour rechercher une éventuelle taie cornéenne dont la visualisation est rendue difficile par l'œdème cornéen.

Le contrôle de qualité endothéliale est réalisé sur la cornée disséquée à l'aide d'une coloration vitale au bleu trypan pendant 1 minute puis une dilatation des espaces intercellulaires par un bain de sérum physiologique pendant 4 minutes [14]. La cornée est examinée au microscope optique dans une boîte de Pétri stérile (Fig. 2). Le bleu trypan colore en bleu le noyau des cellules mortes. La densité cellulaire endothéliale est calculée à l'aide d'une grille calibrée placée dans un des objectifs du microscope et d'un système d'analyse d'image. D'autres techniques peuvent être utilisées pour le contrôle endothélial : microscopie spéculaire, dilatation des espaces intercellulaires par une solution de sucrose 1,8 % [10].

Les critères de qualité requis pour accepter une cornée en vue d'une greffe sont ceux décrits par Pels [10] : densité supérieure à 2 000 cellules/mm², mosaïque cellulaire continue, absence de

cellules mortes après conservation, perte cellulaire au cours de la conservation inférieure à 20 %, polymorphisme modéré. Il faut y ajouter l'absence de gouttes groupées ou nombreuses et un coefficient de variation de la surface cellulaire endothéliale normal ou modérément augmenté. La densité endothéliale [15] et le coefficient de variation de la surface cellulaire endothéliale en fin de conservation ont une influence sur l'évolution de la greffe. Plus la densité du greffon est basse, plus le coefficient de variation est élevé et plus la densité endothéliale postopératoire mesurée lors de la deuxième année postopératoire est basse, ce qui pourrait diminuer la survie du greffon à long terme [3]. La présence de gouttes groupées diminue la survie du greffon et augmente le risque de développer une cornea guttata évolutive sur le greffon dans les années qui suivent la greffe [16].

Méthodes de conservation du greffon

Conservation du globe entier en chambre humide à +4 °C

Le globe oculaire est conservé au réfrigérateur à +4 °C dans un flacon de verre, posé cornée vers le haut sur une compresse humide, avec quelques gouttes d'antibiotique. Le greffon est trépané au bloc opératoire. La durée de conservation autorisée est de 24 à 48 heures. Les conséquences de cette technique de conservation sont une libération de phosphatase acide et de lactate déshydrogénase dans l'humeur aqueuse, à l'origine d'une perte cellulaire endothéliale. Le taux de glucose dans l'humeur aqueuse diminue rapidement et devient proche de 0 quatre heures après le décès. La fonction de barrière de l'endothélium est altérée le 3^e jour [17]. L'ultrastructure de l'endothélium cornéen est altérée dès la 24^e heure de conservation. Les lésions endothéliales s'aggravent avec la durée de la conservation : turgescence mitochondriale, condensation de la chromatine, altération de la membrane nucléaire et enfin vacuolisation sévère précédant la mort cellulaire vers la 72^e ou 96^e heure [18].

La courte durée de la conservation n'autorisant aucun contrôle de stérilité du greffon en fait une technique désuète. De plus, le contrôle de qualité endothéliale avant greffe ne peut être réalisé que par microscopie spéculaire par voie transépithéliale. Celle-ci est rendue difficile par l'œdème cornéen post mortem. En France, cette méthode n'est plus utilisée.

Conservation de la cornée à court terme en milieu liquide à +4 °C

Les milieux maintiennent une activité métabolique minimum permettant la survie des cellules. La cornée est conservée au réfrigérateur à +4 °C dans un flacon contenant 20 ml de milieu, face endothéliale vers le haut. Un réchauffement à température ambiante avant utilisation est nécessaire pour rendre les antibiotiques actifs.

Ces milieux contiennent un milieu nutritif (TC 199, MEM, Dulbecco, RPMI), une substance colloïdo-osmotique (chondroïtine sulfate, Dextran T-40) permettant de lutter contre l'œdème cornéen, un tampon (Hepes, bicarbonate), des antioxydants, des antibiotiques, et un indicateur coloré de virage du pH (rouge phénol). La plupart sont des modifications du milieu décrit par McCarey et Kaufman [19]. Les milieux les plus utilisés contiennent de la chondroïtine sulfate : Optisol[®], Optisol-GS[®], Likorol[®] et Likorol-DX[®].

Les milieux avec chondroïtine sulfate et Dextran permettraient d'atteindre 12 à 14 jours de conservation. En fait, au-delà de 6-7 jours, aucun milieu n'est parfaitement fiable et le contrôle endothélial postconservation devient obligatoire. Les études cliniques font état d'une durée de conservation ne dépassant pas une semaine [20, 21].

Les conséquences de la conservation à 4 °C sont une perte cellulaire endothéliale qui augmente avec la durée de conservation, des modifications des structures cellulaires, un œdème cornéen, un pléomorphisme et un polymégathisme endothélial. Means [22] retrouve en moyenne 9,5 à 16 % de lésions cellulaires endothéliales pour une durée de conservation dans l'Optisol-GS[®] de 4 à 21 jours (étude sur la cornée humaine). L'étude de l'endothélium en microscopie électronique met en évidence des

lésions de conservation [19] : turgescence mitochondriale, condensation de la chromatine en mottes, vacuolisation, élargissement des espaces intercellulaires, aspect sinueux de la membrane cellulaire apicale, cytololyse. Modérées après une semaine, ces lésions deviennent sévères après deux semaines de conservation. La conservation en hypothermie induit une apoptose de cellules endothéliales et épithéliales et de kératocytes du greffon [23].

On ne retrouve pas de variation biochimique du milieu (pH, lactates, glucose) jusqu'au 7^e jour, mais des modifications apparaissent entre le 7^e et le 14^e jour. Il existe une libération d'enzymes lysosomiales dans le milieu qui augmente avec la durée de conservation [20].

Les différences entre les divers milieux sont essentiellement retrouvées in vitro. Ainsi, la morphologie cellulaire endothéliale est meilleure, l'œdème cornéen induit plus faible et l'ultrastructure de l'endothélium mieux respectée après conservation dans l'Optisol® que dans le Dexsol® [24]. In vivo, les études prospectives ne mettent pas en évidence de différences statistiquement significatives entre les différents milieux commercialisés, en termes de survie du greffon, de densité, de morphologie ou de perte cellulaire endothéliale postopératoire [20, 21].

L'antibiotique utilisé dans la plupart des milieux est la gentamicine. Baer [25] a étudié la survie de *Streptococcus viridans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Pseudomonas aeruginosa* dans du milieu M-K avec de la gentamicine à 100 µg/ml. Le nombre de germes est pratiquement stable pendant la durée de conservation à +4 °C (18 heures). Après 80 minutes de réchauffement à température ambiante, on obtient une diminution du nombre de germes d'au moins 2 log pour *Staphylococcus* et *Pseudomonas*, alors que *Streptococcus* reste stable. Des associations d'antibiotiques ont été étudiées. Ainsi, les associations vancomycine-gentamicine, teicoplanine-gentamicine ou pénicilline G-streptomycine-gentamicine permettent d'améliorer les capacités bactéricides des milieux de conservation. La stérilité des greffons ne peut être obtenue après conservation à +4 °C pour une durée d'environ 5 jours malgré une décontamination rigoureuse du globe oculaire. Le taux de contamination des collerettes cornéosclérales après conservation à +4 °C est compris entre 12 et 39 % selon les études publiées [10]. La présence de ces contaminations à +4 °C peut être expliquée par l'absence de modification de l'indicateur de pH du milieu de conservation (les germes présents à +4 °C ne prolifèrent pas) et par la très faible activité des antibiotiques à cette température. De plus, la courte durée de conservation ne permet pas de réaliser un contrôle microbiologique dans des conditions optimales. La fréquence des endophtalmies après conservation à 4 °C est de l'ordre de 0,35 % à 0,77 %. Leveille [26] a montré que la contamination de la collerette sclérale multiplie par 22 le risque d'endophtalmie. Les infections postopératoires transmises par un greffon contaminé conservé à +4 °C peuvent être dramatique de par la nature et la résistance du germe (pyocyaniques) [27].

Les résultats cliniques sont bons : le taux de survie du greffon est de 92 à 100 % à 1 an [20, 21]. La densité cellulaire endothéliale moyenne à 1 an est comprise entre 2 000 et 2 400 cellules/mm²[20,21]. Néanmoins, plusieurs décompensations endothéliales primaires du greffon ont été publiées avec une fréquence allant jusqu'à 4 % des greffes réalisées en fonction des séries publiées [10, 28].

Conservation de la cornée à moyen terme en organoculture à +31 °C

Elle a été proposée par Doughman et Lindstrom vers 1975, puis modifiée par Sperling, Pels et Ehlers et introduite en France par Delbosc et Hervé. Elle constitue actuellement la méthode de conservation standard de la plupart des banques de cornées européennes. Elle permet de stimuler l'activité métabolique des cellules. La cornée est conservée à l'étuve à une température proche de la température physiologique de la cornée in vivo, dans un flacon hermétiquement clos contenant 50 à 100 ml de milieu. La cornée est suspendue dans le milieu à l'aide d'un fil passé dans le bouchon et noué au niveau de la collerette sclérale. Le milieu de conservation et la cornée sont observés

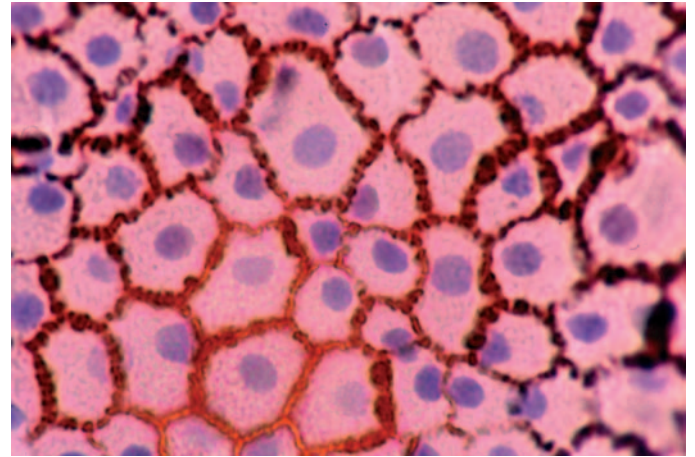


Figure 3. Morphologie de l'endothélium cornéen humain en organoculture. Double coloration par le bleu trypan et le rouge alizarine. On observe un pléomorphisme (diminution du pourcentage de cellules hexagonales), un polymégathisme (anisocytose), une excentration des noyaux et des phénomènes de rosettes et de figures de reformation.

quotidiennement et un ou plusieurs contrôles de stérilité du milieu de conservation sont effectués durant la conservation. Si le milieu devient trouble ou jaune ou que les contrôles reviennent positifs, la cornée est éliminée.

Les milieux d'organoculture comportent un milieu nutritif (MEM, Dulbecco), du sérum de veau fœtal 2 %, des tampons (Hepes, bicarbonate), des antioxydants, des antibiotiques et antifongiques (pénicilline-streptomycine-amphotéricine B, carbénicilline-amikacine-nystatine, ou ticarcilline-amikacine-nystatine) et un indicateur coloré de virage du pH (rouge phénol). La durée de conservation autorisée est de 4 à 5 semaines. Néanmoins, il est souhaitable d'utiliser le greffon le plus tôt possible après la fin de la période de quarantaine microbiologique car la densité endothéliale postopératoire du greffon est d'autant plus élevée que la durée d'organoculture est courte [3, 29]. Le milieu est renouvelé tous les 10 ou 14 jours. En France, les milieux utilisés sont le CorneaPrep® (milieu de transport) et le CorneaMax® (milieu de conservation), composés de milieu Dulbecco modifié selon Iscove, de sérum de veau fœtal 2 %, de mercaptoéthanol et thioglycérol, de pénicilline et streptomycine. Des études sont en cours pour évaluer des milieux sans sérum de veau fœtal [30].

Avant la greffe, il est nécessaire de réaliser une phase de déturgescence de 24 à 48 heures dans le même milieu additionné de Dextran T-500 afin de réduire l'œdème stromal induit par la conservation.

La température de conservation peut être de +31, +34 ou +37 °C. Sperling a montré que le nombre de figures de reformations observées au niveau de la mosaïque cellulaire endothéliale après 24 heures de conservation en organoculture est minimal à une température de +31 °C [31].

Les conséquences de la conservation en organoculture sont une perte cellulaire endothéliale par apoptose qui augmente avec la durée de conservation, des modifications des structures cellulaires, un œdème cornéen, un pléomorphisme et un polymégathisme endothélial [32-35]. La perte cellulaire endothéliale moyenne induite par la conservation est comprise entre 11 et 20 % pour une durée moyenne de conservation de 1 à 3 semaines. Elle augmente avec la durée de conservation et en fonction de la densité endothéliale avant conservation [10]. Elle n'est pas significativement influencée par l'âge du donneur ni par le délai post mortem. Schématiquement, on peut retenir que la conservation en organoculture induit une perte cellulaire endothéliale proche de 1 % par jour de conservation. Une nécrose endothéliale complète pendant la conservation doit faire suspecter la présence du virus herpétique [36, 37]. La morphologie cellulaire endothéliale est modifiée par l'organoculture. Polymégathisme, pléomorphisme, figures de rosettes et de reformation et excentration des noyaux (Fig. 3) témoignent des processus de cicatrisation endothéliale qui permettent de

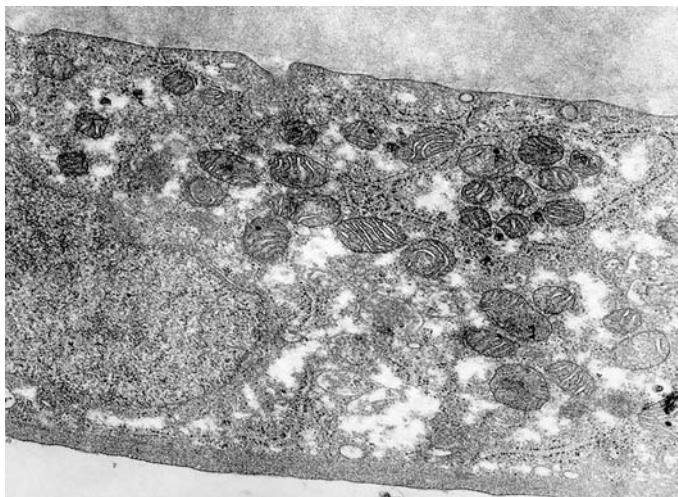


Figure 4. Ultrastructure de l'endothélium cornéen humain en organoculture. Le noyau, les membranes cellulaires et le réticulum endoplasmique sont parfaitement respectés. On observe des vacuoles dans la cellule endothéliale.

maintenir la continuité de la mosaïque cellulaire pendant toute la durée de la conservation malgré l'expulsion des cellules mortes [38]. Les lésions ultrastructurales des cellules endothéliales mises en évidence au sein des cornées conservées (vacuoles, turgescence mitochondriale, dilatation des espaces intercellulaires sans ouverture des complexes jonctionnels) sont modérées et témoignent d'un certain degré de métabolisme anaérobie. Ces lésions de conservation sont réversibles (Fig. 4).

Pels [10] a montré que l'épaisseur cornéenne augmente progressivement pendant les 8 à 10 premiers jours de conservation jusqu'à deux fois l'épaisseur normale (environ 1 000 à 1 100 μm). Cet œdème stromal est entièrement réversible après perfusion en chambre antérieure artificielle [38]. La vitesse de déturgescence diminue avec la durée de conservation. De même, le temps de déturgescence postkératoplastie transfixiante est d'autant plus long que la durée de conservation est grande.

Les deux membranes limitantes acellulaires ne sont pas lésées par la conservation, et l'architecture du stroma cornéen est respectée. L'évolution de la densité kératocytaire du stroma au cours de la conservation est encore mal connue.

Les lésions épithéliales sont plus sévères et, dès le 7^e jour de conservation, seule persiste la couche basale de l'épithélium cornéen central (Fig. 5). Néanmoins, la membrane basale épithéliale et les hémidesmosomes des cellules basales sont respectés. Les *tight junctions* et le cytosquelette d'actine des cellules épithéliales ne sont pas lésés par l'organoculture [34].

Dans le milieu de conservation, le pH et le taux de glucose diminuent au cours de la conservation avec consommation d'oxygène et production de lactate [39]. Le rapport lactate/glucose est supérieur à 1. Lass [40] a montré que la diminution du pH du milieu de conservation se fait de manière régulière (diminution d'environ 0,15 unité par semaine) sur 4 semaines alors que le pH intracornéen reste stable pendant la même période.

La conservation en organoculture à +31 °C permet d'assurer la stérilité des greffons cornéens avec une fiabilité presque parfaite. Dans une étude portant sur 409 cornées conservées en organoculture et greffées, tous les liquides de conservation étaient stériles au moment de la greffe et le taux de contamination des collerettes cornéosclérales était minime (0,7 %) [41]. Cette contamination était de faible importance et pouvait correspondre à une souillure. D'autres études [1, 42] faisaient état d'un taux de contamination de 4 à 7 %. Une étude récente incluant 1 029 cornées délivrées pour la greffe rapporte un taux de contamination du milieu de déturgescence de 2,5 % [43]. Ces résultats sont nettement meilleurs que ceux obtenus après conservation à +4 °C. Cette sécurité microbiologique est le fruit d'une décontamination rigoureuse, d'une conservation à +31 °C pendant au minimum 2 semaines (période de quarantaine permettant aux germes ayant résisté à la décontamination de se

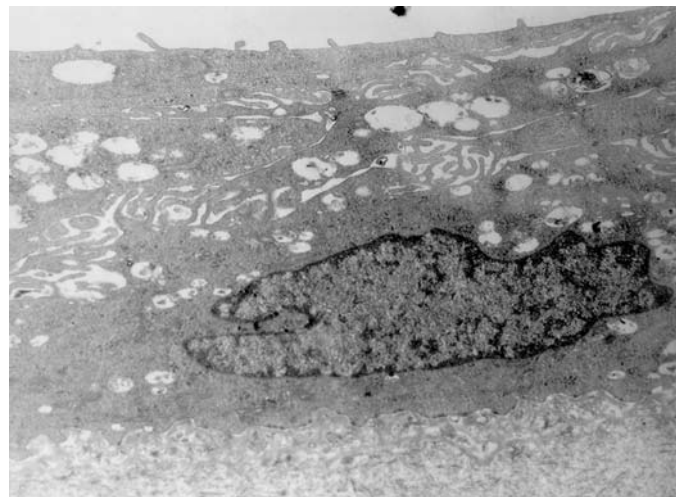


Figure 5. Ultrastructure de l'épithélium cornéen humain en organoculture. Les couches intermédiaire et superficielle de l'épithélium ont desquamé. La membrane basale et les hémidesmosomes des cellules basales sont respectés. La membrane de Bowman sous-jacente est normale.

développer et par là même de faire virer l'indicateur de pH du milieu), et du contrôle microbiologique fait au cours de la conservation. La contrepartie de la sécurité microbiologique obtenue à +31 °C est une perte de greffons par infection au cours de la conservation. La fréquence des infections lors de la conservation diminue avec l'expérience des techniciens de la banque. Un taux de contamination proche de 5-10 % semble acceptable. Les germes les plus souvent isolés pendant l'organoculture sont *Staphylococcus*, *Pseudomonas* et *Escherichia coli* ; ils sont souvent multirésistants aux antibiotiques [10, 41].

Un des buts recherchés par les promoteurs de l'organoculture était de supprimer les échecs primaires des kératoplasties transfixiantes dus à une insuffisance de qualité endothéliale du greffon. Cet objectif est atteint en dehors des rares cas de décompensation endothéliale primaire définitive du greffon dus à une infection herpétique. En termes de transparence du greffon, les résultats de la littérature au-delà de 1 an sont bons [44, 45]. Le pourcentage de greffons clairs varie entre 80 et 100 % suivant les études après un suivi de 1 à 5 ans. L'étude de Moll [44] ne retrouve pas de différences statistiques entre le pourcentage de greffons clairs à 2 ans après conservation à 31 °C dans un milieu à base de MEM, et le pourcentage de greffons clairs à 2 ans après conservation à 4 °C dans du milieu M-K. Rijnveld [45] rapporte les mêmes constatations après un suivi de 2 ans. Néanmoins, il faut noter que les effectifs de ces études comparatives sont assez faibles, compris entre 18 et 136 dans les divers groupes. L'étude de Volker-Dieben [8] porte sur des effectifs de 238 greffes dans le groupe 31 °C et 239 dans le groupe 4 °C. Après ajustement du degré de néovascularisation de la cornée du receveur, la survie sans opacification du greffon est statistiquement meilleure dans le groupe 31 °C que dans le groupe 4 °C.

L'épaisseur cornéenne centrale 2 à 60 mois après kératoplastie est normale dans les diverses études [44-46]. Les valeurs moyennes sont comprises entre 480 μm et 565 μm . Au 1^{er} jour, l'épaisseur cornéenne centrale est plus importante après conservation à 34 °C qu'après conservation à 4 °C. À partir du 21^e jour, cette différence disparaît. Les observations de Rijnveld [45] sont identiques. La période de déturgescence postopératoire du greffon est plus longue après une conservation à 31 °C qu'après une conservation à 4 °C.

La perte cellulaire endothéliale après kératoplastie est similaire à celle observée avec les greffons conservés en hypothermie [1]. En termes d'acuité visuelle, les résultats 2 ans après kératoplastie sont bons. Les études comparant la conservation à 31 °C et celle à 4 °C [44, 45] retrouvent des résultats très proches dans les deux groupes. Dans l'étude de Moll [44], l'acuité visuelle moyenne corrigée est de 0,49 dans le groupe 31 °C et 0,47 dans le groupe 4 °C. Elle est de 1,00 dans le groupe 31 °C et 0,98 dans le groupe 4 °C, dans l'étude de Rijnveld [45].

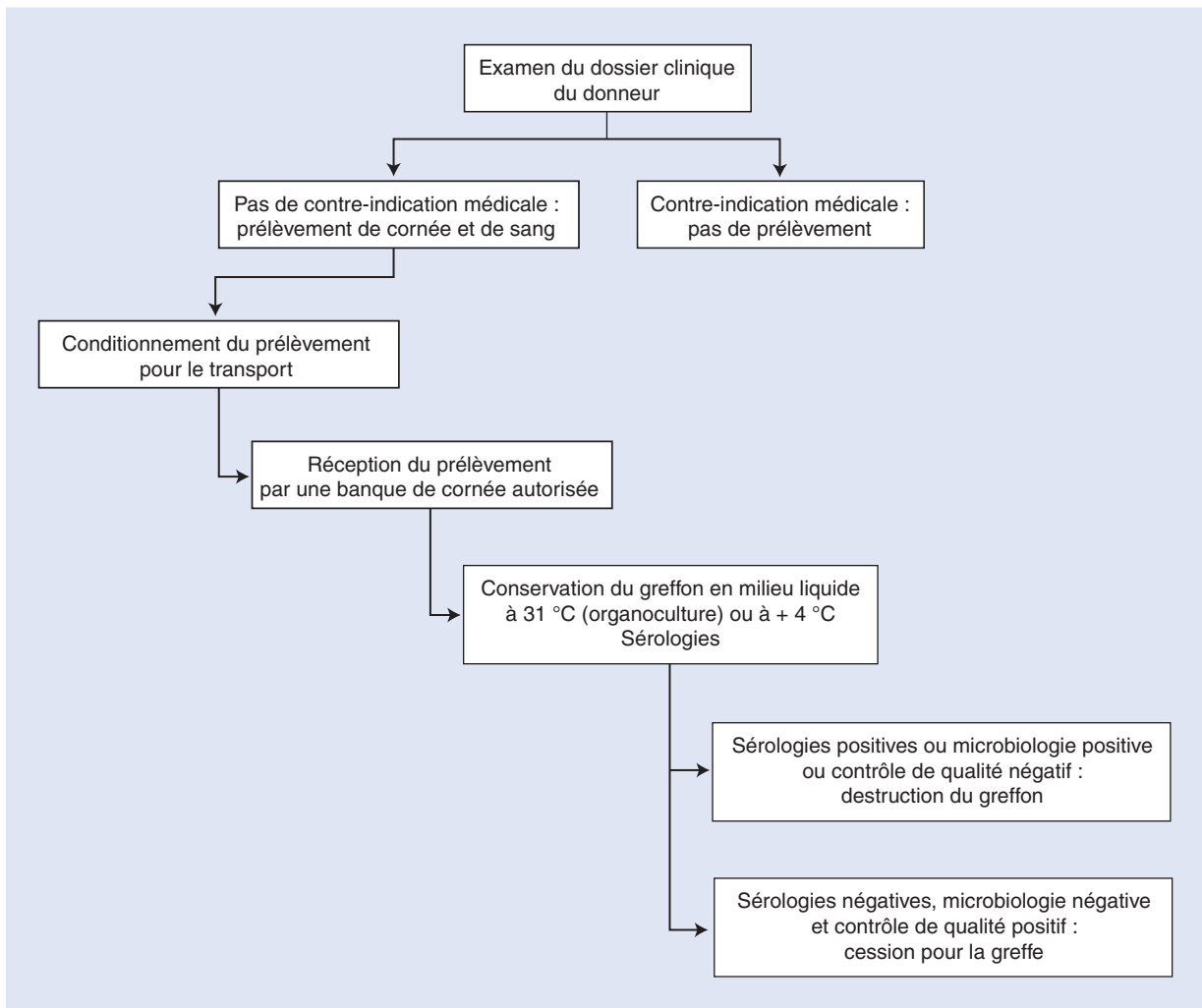


Figure 6. Arbre décisionnel. Prélèvement et conservation du greffon.

Conservation de la cornée à long terme : cryoconservation et vitrification

La cryoconservation est actuellement pratiquée dans de rares centres à l'aide de la technique de Capella et Kaufman [47] ou de protocoles issus de celle-ci. Celle-ci consiste à conserver la cornée dans une solution contenant un cryoprotecteur, le DMSO (diméthylsulfoxyde), dans une cuve d'azote liquide (-196 °C). La congélation se fait par un programme de descente en température progressive (2 °C par minute jusqu'à -14 °C, suivi d'un transfert de chaleur entraînant une remontée en température à -9 °C, puis 3 °C par minute jusqu'à -80 °C), après cryoprotection par des bains de concentration croissante en DMSO (2, 4, 6 puis 7,5 %) et sucrose (2,5, 5, 7,5 puis 10 %) à +4 °C. La décongélation est réalisée à l'aide d'un bain-marie et suivie d'une dilution du cryoprotecteur.

Les conséquences de la cryoconservation sur l'endothélium cornéen sont assez sévères : perte cellulaire, cellules multinucléées, clivage entre endothélium et membrane de Descemet, polymorphisme et pléomorphisme sévères, cytolyse.

Les résultats cliniques sont moins bons que ceux des autres méthodes mais la durée de conservation est théoriquement illimitée. La plupart des densités endothéliales postopératoires sont inférieures à 1 000 cellules/mm².

Une voie de recherche est celle de la vitrification qui permettrait, en augmentant la viscosité, d'inhiber la production de cristaux, source de lésions cellulaires. Néanmoins, la vitrification nécessite l'utilisation de fortes concentrations de cryoprotecteurs eux-mêmes toxiques pour la cellule.

La cryoconservation peut être utilisée pour conserver l'architecture du tissu cornéen (lamelles de collagène), sans conservation de la viabilité cellulaire. Cette cryoconservation permet d'avoir à disposition en permanence des greffons cornéens

destinés à des greffes architectoniques utilisables éventuellement en urgence. Le greffon est placé directement à basse température dans un tube à congélation sans programme de descente en température progressif. La température de conservation peut être -40 °C ou -80 °C pour une durée de 1 an. Avant utilisation, le greffon est incubé à température ambiante dans un flacon de milieu de déturgescence permettant de disposer d'un tissu suturable lors de l'intervention.

Contrôle de stérilité du greffon destiné à la kératoplastie transfixiante

Plusieurs méthodes sont utilisées : écouvillonnage du limbe après décontamination et avant dissection de la cornée, culture du milieu d'organoculture (trypticase soja, thioglycolate, cœur-cervelle, Sabouraud, milieux d'hémoculture), observation quotidienne du milieu d'organoculture. Le système utilisant des milieux d'hémoculture (Bactec™ Plus aérobie et Bactec™ Lytic 10 anaérobie) placés dans un incubateur spécial permet d'isoler les bactéries et les champignons avant la modification de couleur du milieu [48, 49]. À +4 °C, la durée de conservation est trop brève pour qu'un contrôle de stérilité du milieu puisse être réalisé dans des conditions satisfaisantes.

Cession du greffon (Fig. 6)

Seule une banque de cornées autorisée peut délivrer un greffon cornéen. Tous les greffons échangés doivent transiter par une banque autorisée. Dans tous les cas, un greffon ne peut être délivré pour la greffe que s'il n'y a pas de contre-indication générale chez le donneur, avec des résultats sérologiques négatifs pour le VIH, les hépatites B et C, l'HTLV et la syphilis et une négativité des contrôles de stérilité réalisés. En cas de

kératoplastie lamellaire antérieure, aucun contrôle endothélial n'est réalisé. En cas de kératoplastie transfixiante ou de kératoplastie lamellaire postérieure, l'endothélium cornéen doit satisfaire aux critères de qualité exigés avant et après conservation. Le greffon est conditionné pour le transport et accompagné de sa fiche suiveuse et de la fiche de transport. Au bloc opératoire, le chirurgien doit prendre connaissance de la fiche suiveuse sur laquelle figurent les résultats des contrôles de qualité et de stérilité du greffon, les antécédents du donneur et les résultats des sérologies. Un exemplaire signé de la fiche suiveuse est retourné à la banque de tissus afin d'assurer la traçabilité. Un dispositif de biovigilance mis en place en décembre 2003 permet de surveiller les incidents et les risques d'incidents relatifs aux greffes de tissus.

■ Conclusion

Les exigences légales actuelles imposent au chirurgien-ophtalmologiste de pouvoir assurer un niveau de sécurité optimale à son patient tant sur le plan de la qualité du tissu greffé que sur celui de la sécurité de la greffe. Les techniques actuelles de conservation mises en œuvre par les banques de cornées doivent permettre de minimiser les risques d'échec primaire de la greffe par insuffisance de qualité du greffon et de

transmission de maladie du donneur au receveur. L'ophtalmologiste est partie prenante des structures de conservation en tant que préleveur et greffeur. L'équipe de greffe est membre de droit du comité médicotechnique de la banque de cornées à laquelle elle est affiliée.



■ Références

- [1] Borderie V, Baudrimont M, Bourcier T, Laroche L, Touzeau O. *Les greffes en ophtalmologie*. Paris: Elsevier; 2004.
- [2] Borderie V. Greffe de cornée en France et en Europe. *Encycl Méd Chir (Elsevier SAS, Paris), Ophtalmologie*, 21-750-A-15, 2005.
- [3] Borderie VM, Scheer S, Touzeau O, Védie F, Carvajal-Gonzalez S, Laroche L. Donor corneal tissue selection before penetrating keratoplasty. *Br J Ophthalmol* 1998;**82**:382-8.
- [4] Boisjoly HM, Tourigny R, Bazin R, Laughrea PA, Bubé I, Chamberland G, et al. Risk factors of corneal graft failure. *Ophthalmology* 1993;**100**:1728-35.
- [5] Chang SD, Pecego JG, Zadnik K, Danneffel MB, Mutti DO, Mannis MJ. Factors influencing graft clarity. *Cornea* 1996;**15**:577-81.
- [6] Gain P, Thuret G, Chiquet C, Rizzi P, Pugnet JL, Acquart S, et al. Cornea procurement from very old donors: post organ culture cornea outcome and recipient graft outcome. *Br J Ophthalmol* 2002;**86**:404-11.
- [7] Price FW, Whitson WE, Johns S, Gonzales JS. Risk factors for corneal graft failure. *J Refract Surg* 1996;**12**:134-47.
- [8] Volker-Dieben HJ, Kok-Van Alphen CC, Landsbergen Q, Persijn GG. Different influences on corneal graft survival in 539 transplants. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1982;**60**:190-202.
- [9] Williams KA, Roder DR, Esterman A, Muehlberg SM, Coster DJ. Factors predictive of corneal graft survival. Report from the Australian Corneal Graft Registry. *Ophthalmology* 1992;**99**:403-14.
- [10] Pels E, Schuchard Y. Organ culture in the Netherlands. In: Brightbill FS, editor. *Corneal surgery. Theory, technique and tissue*. St Louis: CV Mosby; 1993. p. 622-32.
- [11] Polack FM, Locatcher-Khorazo D, Gutierrez E. Bacteriologic study of donor eyes. Evaluation of antibacterial treatments prior to corneal grafting. *Arch Ophthalmol* 1967;**78**:219-25.
- [12] Pardos GJ, Gallagher MA. Microbial contamination of donor eyes. A retrospective study. *Arch Ophthalmol* 1982;**100**:1611-3.
- [13] Sperling S, Sorensen IG. Decontamination of cadaver corneas. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1981;**59**:126-33.
- [14] Sperling S. Evaluation of the endothelium of human donor corneas by induced dilatation of intercellular spaces and trypan blue. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1986;**224**:428-34.
- [15] Musch DC, Meyer RF, Sugar A. Predictive factors for endothelial cell loss after penetrating keratoplasty. *Arch Ophthalmol* 1993;**111**:80-3.
- [16] Borderie VM, Sabolic V, Touzeau O, Scheer S, Carvajal-Gonzalez S, Laroche L. Screening human donor corneas during organ culture for the presence of guttae. *Br J Ophthalmol* 2001;**85**:272-6.
- [17] Hull DS, Green K, Buyer J. Corneal endothelial bicarbonate fluxes following storage in moist chamber, and MK medium, and MK medium with added hydrocortisone. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1979;**18**:484-9.
- [18] Schaeffer EM. Ultrastructural changes in moist chamber corneas. *Invest Ophthalmol* 1963;**2**:272-82.
- [19] McCarey BE, Kaufman HE. Improved corneal storage. *Invest Ophthalmol* 1974;**13**:165-73.
- [20] Lass JH, Reinhart WJ, Bruner WE, Kachmer ML, Lomeo MD, Morgan KM, et al. Comparison of corneal storage in K-Sol and chondroitin sulfate corneal storage medium in human corneal transplantation. *Ophthalmology* 1989;**96**:687-8.
- [21] Lass JH, Musch DC, Gordon JF, Laing RA, The Corneal Preservation Study Group. Epidermal growth factor and insulin in corneal preservation. Results of a multi-center trial. *Ophthalmology* 1994;**101**:352-9.
- [22] Means TL, Geroski DH, Hadley A, Lynn MJ, Edlhauser HF. Viability of human corneal endothelium following Optisol-GS storage. *Arch Ophthalmol* 1995;**113**:805-9.
- [23] Nelson LR, Hodge DO, Bourne WM. In vitro comparison of Chen medium and Optisol-GS medium for human corneal storage. *Cornea* 2000;**19**:782-7.
- [24] Kaufman HE, Beuerman RW, Steinemann TL, Thompson HW, Varnell ED. Optisol corneal storage medium. *Arch Ophthalmol* 1991;**109**:864-8.

“ Points importants

Greffon cornéen

Le prélèvement de cornée à la morgue est réalisé en France par excision in situ après sélection du donneur selon les critères recommandés par les associations de banques de cornées.

Parmi les contre-indications au prélèvement, les pathologies les plus dangereuses pour le receveur sont la rage, les maladies à prions, l'hépatite B et l'infection herpétique. L'âge du donneur n'est pas une contre-indication au prélèvement.

La conservation du greffon est assurée par des banques de cornées autorisées qui prennent également en charge le contrôle de qualité et de stérilité du greffon, la gestion des contrôles sérologiques du donneur, la traçabilité entre donneur et receveur, et la distribution des greffons aux équipes de greffes.

La conservation de la cornée peut être faite à court terme (1 semaine) en milieu liquide à +4 °C ou bien à moyen terme (2 à 5 semaines) en organoculture à +31 °C. Les lésions de conservation induites par ces deux techniques sont modérées et les résultats cliniques des kératoplasties transfixiantes sont bons.

La stérilité du greffon est obtenue dans plus de 95 % des cas en organoculture alors qu'elle ne l'est que dans moins de 85 % des cas à +4 °C.

Un contrôle de qualité de l'endothélium du greffon est réalisé en fin de conservation pour évaluer la densité cellulaire, la viabilité et la morphologie cellulaire. Une cornea guttata est également recherchée lors de ce contrôle.

Ces techniques de conservation doivent permettre de minimiser les risques d'échec primaire de la greffe par insuffisance de qualité du greffon et de transmission de maladie du donneur au receveur.

L'ophtalmologiste est partie prenante des structures de conservation en tant que préleveur et greffeur. Les équipes de prélèvement et de greffes sont en effet membres de droit du comité médicotechnique de la banque de tissus à laquelle elles sont affiliées.

- [25] Baer JC, Nirankari VS, Glaros DS. Survival of streptococcus viridans in gentamicin-supplemented McCarey-Kaufman medium. *Cornea* 1989;**8**:131-4.
- [26] Leveille AS, McMullan D, Cavanagh HD. Endophthalmitis following penetrating keratoplasty. *Ophthalmology* 1983;**90**:38-9.
- [27] Panda A, Satpathy G, Sethi HS. Survival of Pseudomonas aeruginosa in M-K preserved corneas. *Br J Ophthalmol* 2005;**89**:679-83.
- [28] Bourne WM. Endothelial cell survival on transplanted human corneas preserved at 4 C in 2.5% chondroitin sulfate for one to 13 days. *Am J Ophthalmol* 1986;**102**:382-6.
- [29] Thuret G, Chiquet C, Bernal F, Acquart S, Romanet JP, Mouillon M, et al. Prospective, randomized clinical and endothelial evaluation of 2 storage times for cornea donor tissue in organ culture at 31 degrees C. *Arch Ophthalmol* 2003;**121**:442-50.
- [30] Thuret G, Manissolle C, Campos-Guyotat L, Guyotat D, Gain P. Animal compound-free medium and poloxamer for human corneal organ culture and deswelling. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;**46**:816-22.
- [31] Sperling S. Human corneal endothelium in organ culture. The influence of temperature and medium of incubation. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1979;**57**:269-76.
- [32] Albon J, Tullo AB, Aktar S, Boulton ME. Apoptosis in the endothelium of human corneas for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;**41**:2887-93.
- [33] Borderie VM, Kantelip BM, Delbosc BY, Oppermann MT, Laroche L. Morphology, histology and ultrastructure of human C31 organ-cultured corneas. *Cornea* 1995;**14**:300-10.
- [34] Crewe JM, Armitage WJ. Integrity of epithelium and endothelium in organ-cultured human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;**42**:1757-61.
- [35] Gain P, Thuret G, Chiquet C, Dumollard JM, Mosnier JF, Burillon C, et al. Value of two mortality assessment techniques for organ cultured corneal endothelium: trypan blue versus TUNEL technique. *Br J Ophthalmol* 2002;**86**:306-10.
- [36] Cleator GM, Klapper PE, Dennett C, Sullivan AL, Bonshek RE, Marcyniuk B, et al. Corneal donor infection by herpes simplex virus: herpes simplex virus DNA in donor corneas. *Cornea* 1994;**13**:294-304.
- [37] Tullo AB, Marcyniuk B, Bonshek R, Dennett C, Cleator GM, Lewis AG, et al. Herpes virus in donor cornea. *Eye* 1990;**4**(Pt5):766-7.
- [38] Doughman DJ, Van Horn D, Rodman WP, Byrnes P, Lindstrom RL. Human corneal endothelial layer repair during organ culture. *Arch Ophthalmol* 1976;**94**:1791-6.
- [39] Delbosc B, Naegelen J, Herve P, Carbillet JP, Montard M. Conservation des cornées humaines en milieu de culture enrichi à +37°C : analyses histologiques et biochimiques. *J Fr Ophthalmol* 1987;**10**:547-55.
- [40] Lass JH, Greiner JV, Meneses P, Morgan DC, Medcalf SK, Collie DM, et al. pH of organ-stored corneas. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1988;**66**:538-43.
- [41] Borderie VM, Laroche L. Microbiologic study of organ-cultured donor corneas. *Transplantation* 1998;**66**:120-3.
- [42] Erbezzi M, Monnot PH, Michel-Briand Y, Masse M, Delbosc B. Conservation en culture d'organe à +31°C de la cornée humaine et risque infectieux. *J Fr Ophthalmol* 1995;**18**:106-13.
- [43] Zanetti E, Bruni A, Mucignat G, Camposampiero D, Frigo AC, Ponzin D. Bacterial contamination of human organ-cultured corneas. *Cornea* 2005;**24**:603-7.
- [44] Moll AC, Van Rij G, Beekhuis WH, Rennerdel De Lavalette JHC, Hermans J, Pels E, et al. Effect of donor cornea preservation in tissue culture and in McCarey-Kaufmann medium on corneal graft rejection and visual acuity. *Doc Ophthalmol* 1991;**78**:273-8.
- [45] Rijneveld WJ, Beekhuis WH, Van Rij G, Rikel Van Driel B, Pels E. Clinical comparison of grafts stored in Mc Carey-Kaufman medium at 4°C and in corneal organ culture at 31°C. *Arch Ophthalmol* 1992;**110**:203-5.
- [46] Borderie VM, Touzeau O, Bourcier T, Allouch C, Zito E, Laroche L. Outcome of graft central thickness after penetrating keratoplasty. *Ophthalmology* 2005;**112**:626-33.
- [47] Capella JA, Kaufman HE, Robbins JE. Preservation of viable corneal tissue. *Arch Ophthalmol* 1965;**74**:669-73.
- [48] Gain P, Thuret G, Chiquet C, Vautrin AC, Carricajo A, Acquart S, et al. Use of a pair of blood culture bottles for sterility testing of corneal organ culture media. *Br J Ophthalmol* 2001;**85**:1158-62.
- [49] Thuret G, Carricajo A, Vautrin AC, Raberin H, Acquart S, Garraud O, et al. Efficiency of blood culture bottles for the fungal sterility testing of corneal organ culture media. *Br J Ophthalmol* 2005;**89**:586-90.

V. Borderie (borderie@quinze-vingts.fr).

Centre hospitalier national d'ophtalmologie des Quinze-Vingts, 28, rue de Charenton, 75012 Paris, France.

B. Delbosc.

Centre hospitalier universitaire de Besançon, Hôpital Jean Minjot, 3, boulevard Alexandre-Fleming, 25030 Besançon cedex, France.

A. Fialaire-Legendre.

Banque de tissus de l'Établissement français du sang, 53, boulevard Diderot, 75012 Paris, France.

L. Laroche.

Centre hospitalier national d'ophtalmologie des Quinze-Vingts, 28, rue de Charenton, 75012 Paris, France.

Toute référence à cet article doit porter la mention : Borderie V., Delbosc B., Fialaire-Legendre A., Laroche L. Prélèvement et conservation des greffons cornéens. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Ophtalmologie, 21-205-A-20, 2007.

Disponibles sur www.emc-consulte.com



Arbres décisionnels



Iconographies supplémentaires



Vidéos / Animations



Documents légaux



Information au patient



Informations supplémentaires



Auto-évaluations