

Banques de tissus tumoraux : un enjeu de taille pour les soins comme pour la recherche

par Anne Janin

Service de Pathologie et ERM 0220 Inserm/Université Paris VII, Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital Saint Louis, 1, avenue Vellefaux, 75 010 Paris. E-mail : janin.anapath@sls.ap-hop-paris.fr

reçu le 26 novembre 2003

RÉSUMÉ

Les banques de cellules et tissus tumoraux sont constituées dans les services hospitaliers d'Anatomie pathologique et d'Hématologie à partir de prélèvements réalisés dans un but diagnostique, secondairement requalifiés pour la recherche. Elles représentent pratiquement pour les chercheurs le seul moyen d'étudier le tissu lésionnel humain. Ces études fondamentales sur des prélèvements humains sont importantes car les lignées cellulaires comme les modèles animaux reflètent très imparfaitement les lésions

humaines. Ces banques représentent aussi un enjeu important pour la qualité des soins, en permettant aux malades de bénéficier de progrès thérapeutiques ciblés, certains médicaments n'agissant que sur les cellules tumorales porteuses de marqueurs qu'il peut être utile d'identifier plusieurs années après le prélèvement. Enfin ces banques sont un outil de choix pour faciliter le transfert des découvertes scientifiques vers la pratique oncologique quotidienne.

SUMMARY Tumour banks: a major stake for both patient care and research

Tumour banks are created by pathology and haematology departments, using cell and tissue samples from patients, obtained for diagnostic purpose, and secondarily requalified for research. These banks are the most important source of human samples for research. It appears important to maintain research programs on human tissues and cells, since cell lines and animal models only partly reflect human lesions.

Tumours banks are also important for patient care, since they allow patients to benefit from recent therapeutic advances. Indeed some drugs only kill some tumour cells, which can be identified from the initial tumour samples by means of specific markers. Moreover, tumours banks are the choice tool for transferring scientific discoveries to daily patients care in oncology.

La prise en charge des malades ayant un cancer nécessite désormais des analyses moléculaires, aussi bien pour préciser certains diagnostics que pour rechercher des facteurs pronostiques ou adapter au mieux la thérapeutique. La plus grande partie de ces analyses moléculaires ne peut actuellement se faire que sur tissu tumoral congelé.

Le recueil, le traitement et la conservation de ces tissus tumoraux, selon des critères d'assurance qualité rigoureux, sont donc un pré requis indispensable pour faire bénéficier l'ensemble des malades des progrès thérapeutiques en cancérologie.

Dans la constitution et la gestion de ces banques de cellules et tissus tumoraux cryopréservés, le rôle des pathologistes est essentiel car les procédures diagnostiques impliquent un passage obligatoire par les laboratoires de pathologie de toutes les pièces opératoires et prélèvements endoscopiques. Le rôle des laboratoires d'héma-

tologie est exactement le même pour ce qui concerne les cellules leucémiques. Les compétences médicales existent donc dans tous les centres hospitaliers tant publics que privés sur le territoire national mais, actuellement, l'exérèse initiale des tumeurs est pratiquée dans presque 50 % des cas dans des structures où il n'existe pas de circuit de congélation organisé. Cette lacune est due essentiellement au fait qu'il n'existe aucune nomenclature pour la prise en charge et la conservation des cellules et tissus congelés et que, jusqu'à une date récente, aucun document ne recensait les pratiques professionnelles consensuelles.

Les particularités des cellules et tissus tumoraux traités par les hématologistes et les pathologistes sont :

– que ces cellules et tissus sont prélevés dans le cadre de procédures diagnostiques pour les malades,



- qu'il s'agit d'un matériel cellulaire et tissulaire en quantité finie,
- qu'il est impossible d'aliqoter d'emblée les prélèvements tissulaires et
- qu'il est coûteux et difficile de transporter ces échantillons sans rompre la chaîne du froid.

Il apparaît ainsi que, pour la gestion et l'utilisation optimale de ces cellules et tissus tumoraux, un système de « banque centrale » apparaît très difficile à réaliser. Il est par contre nécessaire d'organiser un réseau d'unités fonctionnelles avec des centres de référence qui congèlent, analysent, conservent et distribuent des échantillons, et des centres de proximité qui congèlent et transmettent au centre de référence pour analyse et/ou conservation selon les protocoles convenus entre les centres de référence et les centres de proximité.

Pour l'organisation de ces banques par les pathologistes et les hématologistes, quatre étapes sont indispensables :

1) Il est nécessaire d'avoir, de la part de l'ensemble des acteurs professionnels, un consensus sur les procédures de recueil, de traitement et de conservation cellulaire et tissulaire.

2) Il est important de s'entendre sur la liste des renseignements minimaux à collecter pour les annotations cliniques, qui donnent toute leur valeur à ces banques pour les études de cancérologie. Il est important aussi, pour un fonctionnement en réseau, de s'assurer que les mêmes renseignements minimaux sont saisis pour chaque prélèvement congelé.

3) Il est nécessaire d'effectuer des mises au point et des actualisations régulières des aspects réglementaires et législatifs concernant l'information et le consentement des malades, comme l'accès et la cession des échantillons.

4) Il est important d'établir un schéma d'étude de coût, aussi bien pour la conservation que pour l'utilisation de ces tissus, que ce soit dans le cadre de procédures diagnostiques, de recherche clinique ou de recherche fondamentale.

Une série de recommandations de pratiques professionnelles a été établie avec la méthodologie de l'ANAES avec des professionnels de toute la France, des établissements publics ou des établissements privés, en associant des juristes et des économistes de la Santé. Ces recommandations de pratique professionnelles ont reçu le label ANAES en juillet 2000.

Les points clés de l'assurance qualité sont les suivants :

1. La qualité « lésionnelle » du prélèvement

Il est essentiel de s'assurer que le prélèvement porte bien sur une zone lésée et non sur du tissu adipeux ou fibreux. Il est tout aussi essentiel de s'assurer, s'il s'agit d'un prélèvement tumoral, que la tumeur n'est pas nécrosée.

Le contrôle microscopique systématique de tout prélèvement avant qu'il ne soit utilisé pour des analyses

complémentaires, cellulaires ou moléculaires, apparaît donc comme le premier critère de qualité d'une banque de tumeurs.

2. La qualité « cellulaire et moléculaire » du prélèvement

Le contrôle microscopique systématique des prélèvements permet d'évaluer en partie la qualité de la conservation cellulaire. Par contre, il ne rend pas compte de la qualité de conservation des protéines et des ARN.

On sait que la demi-vie des ARN peut être courte, de l'ordre de quelques minutes, et il est donc indispensable de connaître, pour chaque prélèvement, le délai entre le moment du prélèvement et le moment de la congélation. Pour les pièces opératoires dont l'exérèse a pu être longue, le temps d'ischémie chaude peut jouer sur la conservation des ARN. Selon les circonstances et les structures dans lesquelles les prélèvements sont réalisés, la congélation peut être plus ou moins tardive. L'important est la traçabilité des délais de congélation, afin d'éviter de faire des examens longs et coûteux à partir de prélèvements dont les ARN seront dégradés.

3. Le contrôle de la chaîne du froid

Un prélèvement congelé dans des délais très courts peut perdre sa qualité cellulaire et moléculaire initiale du fait d'une mauvaise qualité de la chaîne du froid.

L'analyse des données de la littérature montre que les protéases tissulaires ne sont complètement inactivées qu'à partir d'une température de -70°C . La dégradation des protéines et des ARN d'un tissu peut donc être liée à une conservation dans d'autres conditions que dans l'azote liquide ou dans des congélateurs à -80°C . Tout accident de conservation entraînant une remontée de la température des prélèvements a les mêmes conséquences. Une traçabilité continue de la température pendant le stockage est donc un élément de qualité indispensable.

Le transport des prélèvements est un facteur courant de rupture de la chaîne du froid. Les conditions d'emballage, les délais d'acheminement et l'état de congélation des prélèvements à l'arrivée doivent être contrôlés. La traçabilité dans ce domaine est très difficile à établir.

4. L'absence de contamination

Comme pour tout prélèvement biologique, la contamination par des agents infectieux extérieurs au prélèvement doit être prévenue.

Deux contraintes sont particulières aux prélèvements cellulaires et tissulaires.

Les prélèvements destinés à être mis en culture doivent être prélevés, transportés et manipulés dans des conditions stériles. Ils doivent aussi être mis en culture le plus rapidement possible et transportés dans des milieux adaptés à leur nature et au type d'examen prévu.

Les prélèvements destinés à des extractions d'ARN doivent être recueillis, manipulés et conservés dans des conditions évitant les contaminations par les RNases qui sont ubiquitaires. Le port de gants est indispensable, ainsi que l'utilisation de matériel "RNase free" et l'utilisation de lames jetables pour les cryostats et les coupes macroscopiques.

5. La quantification du matériel conservé et distribué

Les progrès du dépistage font que les tumeurs analysées en pathologie sont en moyenne de plus petite taille qu'elles ne l'étaient il y a dix ans. Les progrès de l'imagerie font aussi que les examens initiaux peuvent être faits à partir de ponctions au trocart dirigées par l'imagerie. Le matériel analysé en pathologie est donc de volume de plus en plus réduit alors que les examens réalistes sur extractions tissulaires sont de plus en plus nombreux.

Il est donc important d'évaluer la surface du bloc tissulaire congelé et de distribuer le tissu par tranches d'épaisseur connue, afin de pouvoir réaliser plusieurs analyses différentes à partir d'un même prélèvement de taille réduite. Ceci implique d'évaluer la quantité minimale d'ADN, d'ARN ou de protéines nécessaires pour chaque examen. La distribution sous forme de tranches de 10 à 40 µm d'épaisseur permet de mettre directement le matériel dans le tampon de lyse et d'avoir de bons rendements d'extraction pour les acides nucléiques.

La traçabilité sur la quantité de matériel distribué permet de suivre la quantité de matériel restant pour chaque prélèvement.

6. La qualité des bases de données

– Base de données concernant le malade et sa pathologie : un consensus entre tous les acteurs concernés par les analyses tissulaires est indispensable au recueil, pour chaque prélèvement, des renseignements minimaux nécessaires à l'interprétation des résultats des analyses tissulaires, et à la conservation et la transmission de ces données dans le respect de la législation de la CNIL.

– Base de données concernant le prélèvement : tous les éléments de traçabilité sur les délais, la température, la taille et la distribution du prélèvement doivent être consignés et consultables par des personnes autorisées.

7. Le respect de la législation

En matière d'information et/ou de consentement du malade : selon que le prélèvement a été fait uniquement pour la recherche, ou prélevé dans le cadre de procédures diagnostiques.

En matière de constitution, de gestion et de transmission de fichiers nominatifs.

En matière d'importation et d'exportation de prélèvements d'origine humaine.

L'ORGANISATION DES BANQUES DE TUMEURS EN EUROPE ET AUX ÉTATS-UNIS

Plusieurs réseaux de banques de cellules et tissus pathologiques sont organisées aux États-Unis. En matière de tumeurs humaines, l'analyse, la collecte et le stockage sont organisés dans de grands centres universitaires et une ligne budgétaire du National Cancer Institute est destinée à ces banques. La seule banque organisée et

financée à l'échelon fédéral est celle de l'Armed Force Institute of Pathology. Environ 20 millions de spécimens ont été répertoriés dans ces différentes banques.

Des recommandations de pratique professionnelle ont été établies par un groupe de pathologistes du NIH-NCI. À l'échelon national, la National Bioethics Advisory Commission a édité des recommandations intitulées "Biological use of human tissues" qui comprennent plusieurs chapitres sur les tissus pathologiques.

Un travail considérable a également été accompli au Canada sous l'égide du Medical Research Council qui met à jour régulièrement ses données depuis 1998.

En Europe, des comités nationaux d'éthique se sont mis en place dans les pays de la communauté européenne. En revanche, les textes législatifs concernant l'utilisation des prélèvements humains pour la recherche, de même que la transmission des données cliniques et biologiques associées, ne sont pas encore harmonisés. La révision des lois de bioéthique en France est en cours depuis plusieurs années. En Suède, un nouveau texte législatif, entré en vigueur le 1^{er} janvier 2003 prévoit que les prélèvements humains réalisés dans le cadre de soins doivent être détruits 6 mois après que le diagnostic a été établi, si aucun consentement à la recherche n'est associé à ce prélèvement. Sous l'égide de l'EORTC, la possibilité d'un catalogue de tumeurs humaines sur site internet entre plusieurs centres européens est actuellement à l'étude.

LES QUESTIONS D'ASSURANCE QUALITÉ SOULEVÉES PAR LES INTERFACES

Le processus de traitement et d'analyse des tissus tumoraux implique de nombreux acteurs et les interfaces sont donc multiples.

1. Avec les acteurs du bloc opératoire, se posent les questions de la responsabilité du prélèvement et de la traçabilité des délais de transmission de ces prélèvements.

La responsabilité du prélèvement et de l'information et/ou du consentement du malade incombe, dans l'état actuel de la législation française, à la personne, chirurgien, endoscopiste ou médecin, qui pratique le prélèvement.

L'évaluation et la traçabilité des délais entre le prélèvement chirurgical et la congélation sont difficiles à établir. La prise en compte de cet élément dans les différents logiciels de gestion est importante.

2. Avec les laboratoires réalisant les analyses moléculaires

Le contrôle de la qualité lésionnelle du prélèvement par analyse microscopique systématique, et la traçabilité concernant la qualité de conservation des ARN évite jusqu'à 30 % d'examens inutiles.

La quantification du matériel nécessaire pour chaque analyse moléculaire permet de réaliser plusieurs analyses à partir d'un même prélèvement de petite taille.

Un retour d'information sur la qualité comme sur le résultat des analyses moléculaires est essentiel.

3. Avec les structures de soin privées

L'organisation de réseaux pour les cellules et tissus tumoraux cryopréservés se heurte à l'absence de toute nomenclature pour les actes réalisés dans ce domaine. Les structures de soins privées sont donc plus souvent associées à des protocoles financés par des fonds d'expertise ou de recherche.

4. Pour une participation à des protocoles internationaux

Les difficultés sont plus d'ordre législatif que logistique ou scientifique.

La grande variété des lois en ce qui concerne l'information et/ou le consentement des malades, ainsi que la transmission de fichiers nominatifs, et l'exportation ou l'importation des prélèvements d'origine humaine rendent actuellement compliquée l'appartenance à des réseaux internationaux.

5. Avec les industriels

L'organisation rigoureuse de banques de cellules et tissus tumoraux amène à considérer la cession de ces éléments aux industriels. La législation dans ce domaine est encore incomplète, bien que la demande des industriels soit très forte.

Devront être considérées la cession de cellules immortalisées à partir de tissus humains tumoraux, la cession de cellules et tissus pathologiques non cultivables, donc en quantité très limitée, et la cession de cellules et tissus humains normaux enlevés pour les besoins de l'intervention chirurgicale.

Ce dernier chapitre nous permet de conclure en soulignant à quel point l'organisation de banques de tissus humains est un enjeu important pour la qualité des soins

comme pour la recherche et le développement technologique. Mais c'est aussi un problème de société, et l'adaptation du contexte législatif est primordial.

BIBLIOGRAPHIE

- Adam D., Online tumour bank aims to offer ready route to tissue banks. *Nature*, 2002, 4106, 464-465.
- Bogardus S. T., Concato J. & Feinstein A. R., Clinical epidemiological quality in molecular genetic research; the need for methodological standards. *JAMA*, 1999, 281, 1919-1926.
- Dash A., Maine I. P., Varambally S., Shen R., Chinaiyan A. M. & Rubin M. A., Changes in differential gene expression because of warm ischemia time of radical prostatectomy specimens. *Am. J. Pathol.*, 2002, 161, 1743-1748.
- HUGO Ethics Committee. Statement on DNA sampling: control and access. 2002. <http://www.hugo-international.org/hugo/sampling/html>
- Medical research council of Canada, Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. Social Sciences and Humanities Research Council of Canada. Tri Council Policy Statement. Ethical Conduct for Research Involving Human Subjects. 1998, revised 2000. <http://www.nserc.ca/programs/ethics/English/policy.html/content>
- Medical Research Council. Human Tissue and Biological Samples of Use in Research. Medical Research Council, London. 2001. <http://www.mrc.ac.uk>
- National Bioethics Advisory Commission. Research Involving Human Biological Materials: Ethical Issues and Policy Guidance. Rockville, Maryland. vol. 1, 1999. <http://www.gorgetown.edu/research/ncbi/nbac/>
- Oosterhuis J. W., Coebergh J. W. & van Veen E. B., Tumour banks: well-guarded treasures in the interest of patients. *Nature Reviews (cancer)*, 2003, 3, 72-79.
- Recommandations pour la cryopréservation de cellules et tissus tumoraux dans le but de réaliser des analyses moléculaires. ANAES label juillet 2000. <http://www.anaes.fr>
- Sobel M. E., New challenges for biomedical research utilizing human biological material. *J. Mol. Diag.*, 2000, 2, 1-4.
- The NCI-Cooperative Human Tissue Network (CHTN) requires compliance with the US DHHS policy for the protection of human subjects for use of tissue from the listed repositories. <http://ohrp.osophs.dhhs.gov/humansubjects/guidance/45cfr46.htm>
- National Cancer Institute, National Institute of Health. Recommended policies for uses of human tissue in research, education and quality control. Pathologists consensus statement. Bethesda, MD 1997.