



HAUTE AUTORITÉ DE SANTÉ

RECOMMANDATIONS DE BONNE PRATIQUE

**CRYOPRÉSERVATION DE TISSUS, CELLULES
ET LIQUIDES BIOLOGIQUES ISSUS DU SOIN**

ARGUMENTAIRE

Septembre 2009

Les recommandations sont téléchargeables sur
www.has-sante.fr

Haute Autorité de Santé
Service communication
2 avenue du Stade de France - F 93218 Saint-Denis La Plaine CEDEX
Tél. :+33 (0)1 55 93 70 00 - Fax :+33 (0)1 55 93 74 00

Ce document a été validé par le Collège de la Haute Autorité de Santé en septembre 2009
© Haute Autorité de Santé – 2010

Sommaire

| | |
|--|-----------|
| Abréviations | 5 |
| Méthode de travail..... | 6 |
| 1 Méthode Recommandations pour la pratique clinique..... | 6 |
| 1.1 Choix du thème de travail | 6 |
| 1.2 Comité d'organisation | 6 |
| 1.3 Groupe de travail | 6 |
| 1.4 Rédaction de la première version des recommandations | 7 |
| 1.5 Groupe de lecture | 7 |
| 1.6 Version finale des recommandations | 7 |
| 1.7 Validation par le Collège de la HAS | 7 |
| 1.8 Diffusion | 7 |
| 1.9 Travail interne à la HAS | 7 |
| 1.10 Gradation des recommandations | 8 |
| 2 Gestion des conflits d'intérêts | 8 |
| 3 Recherche documentaire..... | 9 |
| 3.1 Sources d'informations | 9 |
| 3.1.1 Bases de données bibliographiques automatisées | 9 |
| 3.1.2 Autres sources | 9 |
| 3.2 Stratégie de recherche | 9 |
| Argumentaire | 13 |
| 1 Introduction | 13 |
| 1.1 Thème et contexte de la demande | 13 |
| 1.2 Limites des recommandations | 13 |
| 1.3 Objectifs des recommandations | 14 |
| 1.4 Professionnels concernés | 14 |
| 2 Recommandations concernant la phase préanalytique d'échantillons biologiques issus du soin | 15 |
| 2.1 Recommandations françaises (tissus, cellules et liquides biologiques) | 15 |
| 2.1.1 Recommandations de la Fédération nationale des centres de lutte contre le cancer (FNCLCC) 15 | |
| 2.1.2 Recommandations de l'Institut national du cancer (INCa) | 17 |
| 2.2 Lignes directrices de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) (tissus, cellules et liquides biologiques) | 17 |
| 2.3 Recommandations américaines (tissus, cellules et liquides biologiques) | 18 |
| 2.3.1 Recommandations de <i>l'International Society for Biological and Environmental Repositories</i> (ISBER) publiées en 2005 et révisées en 2008 | 18 |
| 2.3.2 Recommandations du <i>National Cancer Institute</i> (NCI), du <i>National Institutes of Health</i> , et de l' <i>US Department of Health and Human Services</i> , publiées en 2006 | 19 |
| 2.4 Recommandations européennes sur le recueil et le stockage de tissus | 20 |
| 3 Revues et études concernant la phase préanalytique d'échantillons biologiques issus du soin | 21 |
| 3.1 Influence des conditions de prélèvement | 21 |
| 3.2 Influence de la préparation sur la stabilité de biomarqueurs issus du sang ou produits dérivés | 24 |
| 3.3 Influence de la durée de stockage | 24 |
| 3.4 Influence du mode de stockage et du choix de la température | 25 |
| 3.5 Particularités des étapes préanalytiques pour la conservation de liquides biologiques | 26 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.5.1 | Le plasma | 26 |
| 3.5.2 | L'urine | 27 |
| 3.5.3 | Le liquide céphalo-rachidien | 27 |
| 3.5.4 | Autre liquide biologique | 29 |
| 3.6 | Analyses protéomiques et tissus congelés | 29 |
| 3.7 | Influence de la cryopréservation sur les fonctions et les caractéristiques cellulaires | 29 |
| 3.8 | Mécanismes d'altérations cellulaires au cours de la cryopréservation | 30 |
| 4 | Exemples de biobanques | 32 |
| 5 | Littérature sur la liste des informations minimales communes associées à chaque prélèvement congelé | 33 |
| 6 | Assurance qualité | 35 |
| 7 | Extraction des acides nucléiques | 37 |
| 8 | Aspects juridiques touchant à la cryopréservation de cellules, tissus et liquides biologiques issus du soin | 39 |
| 8.1 | Réglementation s'appliquant à la conservation d'échantillons biologiques humains à de seules fins diagnostiques | 39 |
| 8.1.1 | Dispositions pour les prélèvements pour analyse de biologie médicale | 40 |
| 8.1.2 | Dispositions pour les examens d'anatomie et de cytologie pathologiques | 40 |
| 8.2 | Réglementation s'appliquant à la conservation d'échantillons biologiques humains à des fins thérapeutiques | 41 |
| 8.2.1 | Régime d'autorisation | 41 |
| 8.2.2 | Sécurité sanitaire | 41 |
| 8.2.3 | Règles de bonnes pratiques | 42 |
| 8.2.4 | Personnels, locaux et équipements | 42 |
| 8.3 | Consentement du patient | 43 |
| 8.3.1 | Consentement au prélèvement | 43 |
| 8.3.2 | Consentement en cas de « requalification » d'échantillons déjà conservés | 44 |
| 8.3.3 | Consentement et examen des caractéristiques génétiques | 45 |
| 8.4 | La durée de conservation des échantillons | 47 |
| 8.5 | L'accès des patients ou de leurs ayants droit aux échantillons | 47 |
| | Annexe 1. Caractéristiques méthodologiques des recommandations citées dans ce document | 49 |
| | Annexe 2. Catalogue national de données. INCa, 2006 | 50 |
| | Annexe 3. Performances des techniques d'extraction d'ADN ou d'ARN | 54 |
| | Annexe 4. Critères de validation et adéquation des méthodes d'extraction en fonction du type d'application | 58 |
| | Annexe 5. Équivalences approximatives entre quantité de cellules et quantités d'acides nucléiques | 59 |
| | Annexe 6. Schéma organisationnel récapitulatif des étapes clés de la cryopréservation de tissus, cellules ou liquides biologiques issus du soin | 60 |
| | Références bibliographiques | 61 |
| | Participants | 68 |

Abréviations

| | |
|---------|---|
| ACP | anatomie et cytologie pathologiques |
| CPP | comité de protection des personnes |
| CRP | <i>C-reactive protein</i> |
| CSP | Code de la santé publique |
| DMSO | diméthylsulfoxyde |
| EDTA | <i>ethylenediaminetetra-acetic acid</i> |
| EBV | <i>Epstein-Barr virus</i> |
| LBA | lavage broncho-alvéolaire |
| LCR | liquide céphalo-rachidien |
| OCC | <i>optimal cutting compound</i> |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> |
| PBMC | <i>peripheral blood mononuclear cell</i> |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> |
| PSA | <i>specific antigen of the prostate</i> |
| RT-PCR | <i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i> |
| RT-QPCR | <i>reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction</i> |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> |
| SVF | sérum de veau fœtal |
| SOP | <i>standard operating procedures</i> |

Méthode de travail

1 Méthode Recommandations pour la pratique clinique

Les recommandations professionnelles sont définies comme « des propositions développées selon une méthode explicite pour aider le praticien et le patient à rechercher les soins les plus appropriés dans des circonstances cliniques données ».

La méthode Recommandations pour la pratique clinique (RPC) est l'une des méthodes utilisées par la Haute Autorité de Santé (HAS) pour élaborer des recommandations professionnelles. Elle repose, d'une part, sur l'analyse et la synthèse critiques de la littérature médicale disponible, et, d'autre part, sur l'avis d'un groupe multidisciplinaire de professionnels concernés par le thème des recommandations.

1.1 Choix du thème de travail

Les thèmes de recommandations professionnelles sont choisis par le Collège de la HAS. Ce choix tient compte des priorités de santé publique et des demandes exprimées par les ministres chargés de la santé et de la sécurité sociale. Le Collège de la HAS peut également retenir des thèmes proposés par des sociétés savantes, l'Institut national du cancer, l'Union nationale des caisses d'assurance maladie, l'Union nationale des professionnels de santé, des organisations représentatives des professionnels ou des établissements de santé, des associations agréées d'usagers.

Pour chaque thème retenu, la méthode de travail comprend les étapes suivantes.

1.2 Comité d'organisation

Un comité d'organisation est réuni par la HAS. Il est composé de représentants des sociétés savantes, des associations professionnelles ou d'usagers, et, si besoin, des agences sanitaires et des institutions concernées. Ce comité définit précisément le thème de travail, les questions à traiter, les populations de patients et les professionnels concernés. Il signale les travaux pertinents, notamment les recommandations, existants. Il propose des professionnels susceptibles de participer aux groupes de travail et de lecture. Ultérieurement, il participe au groupe de lecture.

1.3 Groupe de travail

Un groupe de travail multidisciplinaire et multiprofessionnel est constitué par la HAS. Il est composé de professionnels de santé, ayant un mode d'exercice public ou privé, d'origine géographique ou d'écoles de pensée diverses, et, si besoin, d'autres professionnels concernés et de représentants d'associations de patients et d'usagers. Un président est désigné par la HAS pour coordonner le travail du groupe en collaboration avec le chef de projet de la HAS. Un chargé de projet est également désigné par la HAS pour sélectionner, analyser et synthétiser la littérature médicale et scientifique pertinente. Il rédige ensuite l'argumentaire scientifique des recommandations en définissant le niveau de preuve des études retenues. Ce travail est réalisé sous le contrôle du chef de projet de la HAS et du président.

1.4 Rédaction de la première version des recommandations

Une première version des recommandations est rédigée par le groupe de travail à partir de cet argumentaire et des avis exprimés au cours des réunions de travail (habituellement deux réunions). Cette première version des recommandations est soumise à un groupe de lecture.

Particularité liée à l'élaboration de ces recommandations

Les propositions de recommandations concernant « la conservation des liquides biologiques à des fins diagnostiques et thérapeutiques », et « l'extraction d'acides nucléiques à partir d'échantillons cellulaires et tissulaires » ont été rédigées respectivement par le Pr Beaudeau et le Dr Cayuela, membres du groupe de travail, qui ont réuni à cet effet 2 sous-groupes constitués de membres extérieurs au groupe de travail initial (dans le cadre d'une demande du cancéropôle Île-de-France).

Les propositions de recommandations concernant « les points juridiques » ont été rédigées par Mme Callies et M. Dupont.

Le plan reprend celui des recommandations élaborées en 2000 (1).

1.5 Groupe de lecture

Un groupe de lecture est constitué par la HAS selon les mêmes critères que le groupe de travail. Il est consulté par courrier et donne un avis sur le fond et la forme de l'argumentaire et des recommandations, en particulier sur la lisibilité et l'applicabilité de ces dernières. Ce groupe de lecture externe est complété par des relecteurs du comité de validation de la HAS en charge des recommandations professionnelles.

1.6 Version finale des recommandations

Les commentaires du groupe de lecture sont ensuite analysés et discutés par le groupe de travail, qui modifie si besoin l'argumentaire et rédige la version finale des recommandations et leur synthèse, au cours d'une réunion de travail.

La version finale de l'argumentaire et des recommandations et le processus de réalisation sont discutés par le Comité de validation. À sa demande, l'argumentaire et les recommandations peuvent être revus par le groupe de travail. Le comité rend son avis au Collège de la HAS.

1.7 Validation par le Collège de la HAS

Sur proposition du comité de validation, le Collège de la HAS valide le rapport final et autorise sa diffusion.

1.8 Diffusion

La HAS met en ligne sur son site (www.has-sante.fr) l'intégralité de l'argumentaire et les recommandations. Les recommandations peuvent être éditées par la HAS.

1.9 Travail interne à la HAS

Un chef de projet de la HAS assure la conformité et la coordination de l'ensemble du travail suivant les principes méthodologiques de la HAS.

Une recherche documentaire approfondie est effectuée par interrogation systématique des banques de données bibliographiques médicales et scientifiques sur une période adaptée à chaque thème. En fonction du thème traité, elle est complétée, si besoin, par l'interrogation d'autres bases de données spécifiques. Une étape commune à toutes les études consiste à rechercher systématiquement les recommandations pour la pratique clinique, conférences de consensus, articles de décision médicale, revues systématiques, méta-analyses et autres travaux d'évaluation déjà publiés au plan national et international. Tous les sites Internet utiles (agences gouvernementales, sociétés savantes, etc.) sont explorés. Les documents non accessibles par les circuits conventionnels de diffusion de l'information (littérature grise) sont recherchés par tous les moyens disponibles. Par ailleurs, les textes législatifs et réglementaires pouvant avoir un rapport avec le thème sont consultés. Les recherches initiales sont réalisées dès le démarrage du travail et permettent de construire l'argumentaire. Elles sont mises à jour régulièrement jusqu'au terme du projet. L'examen des références citées dans les articles analysés permet de sélectionner des articles non identifiés lors de l'interrogation des différentes sources d'information. Enfin, les membres des groupes de travail et de lecture peuvent transmettre des articles de leur propre fonds bibliographique. Les langues retenues sont le français et l'anglais.

Particularité liée aux thèmes abordés dans ces recommandations

L'actualisation de ces recommandations s'appuie sur les grands axes communs aux différentes recommandations nationales et internationales identifiées dans la littérature depuis 2000, ainsi que sur les revues consacrées aux modes de fonctionnement des biobanques humaines. Étant donné le champ abordé, les études disponibles sont généralement de faible niveau de preuve. Des études ont été retenues et décrites pour illustrer quelques points particuliers. Les tableaux cités en annexe concernant l'extraction des acides nucléiques sont donnés à titre illustratif.

1.10 Gradation des recommandations

En l'absence de données, les recommandations sont fondées sur un accord professionnel au sein du groupe de travail réuni par la HAS, après consultation du groupe de lecture. L'absence de niveau de preuve ne signifie pas que les recommandations ne sont pas pertinentes et utiles. Elle doit en revanche inciter à engager des études complémentaires lorsque cela est possible.

Pour en savoir plus sur la méthode d'élaboration des recommandations pour la pratique clinique, se référer au guide publié par l'Anaes en 1999 : « Les recommandations pour la pratique clinique - Base méthodologique pour leur réalisation en France ». Ce guide est téléchargeable sur le site Internet de la HAS : www.has-sante.fr.

2 Gestion des conflits d'intérêts

Les membres du comité d'organisation et du groupe de travail ont communiqué leurs déclarations d'intérêts à la HAS. Elles ont été analysées et prises en compte en vue d'éviter les conflits d'intérêts.

3 Recherche documentaire

3.1 Sources d'informations

3.1.1 Bases de données bibliographiques automatisées

- Medline (*National Library of Medicine*, États-Unis).

3.1.2 Autres sources

- sites Internet d'organismes publics du domaine de la santé ;
- sites référençant des recommandations et/ou des rapports d'évaluation technologique ;
- sites Internet des sociétés savantes compétentes dans le domaine étudié ;
- bibliographies des articles et documents sélectionnés.

3.2 Stratégie de recherche

La recherche a porté sur les types d'études ou sujets définis lors du comité d'organisation avec le chef de projet. Le tableau ci-dessous (tableau 1) reprend les étapes successives de la recherche dans Medline. Une veille documentaire a par ailleurs été réalisée concernant le sujet des biobanques jusqu'en mars 2009.

Dans le tableau 1, la stratégie d'interrogation précise les termes de recherche utilisés pour chaque sujet ou type d'étude. Les termes de recherche sont soit des termes issus d'un thesaurus (descripteurs du MESH), soit des mots du titre ou du résumé (lorsque le champ de recherche n'est pas précisé, il s'agit du champ descripteur). Ils sont combinés en autant d'étapes que nécessaire à l'aide des opérateurs booléens. Pour chaque sujet la période de recherche est indiquée. Seules les publications en langue française et anglaise ont été recherchées.

Tableau 1. Résultats en termes de nombre de références obtenues par type d'étude ou par sujet, sur une période donnée.

| Type d'étude/Sujet/Termes utilisés | | Période de recherche | Nombre de références |
|---|---|----------------------|----------------------|
| BANQUES DE TISSUS - CRYOCONSERVATION | | | |
| Recommandations/Conférences de consensus | | Janv. 96 Sept. 08 | 157 |
| Étape 1 | (cryoconserv* OU cryopreserv* OU cryostor* OU cryofix* OU cryogenic* OU cryotube* OU cryoprotect*)/titre, résumé OU (cool* OU freez* OU frozen OU cold)/titre OU (freezing OU cryopreservation OU cryoprotective agents) | | |
| OU | | | |
| Étape 2 | (tissue banks OU biological specimen banks OU tissue preservation) OU (biobank* OU biorepositor*)/titre, résumé OU (cell bank* OU cell storage OU cell collection* OU cell repository OU cell repositories)/titre, résumé OU (tissue bank* OU tissue storage OU tissue collection* OU tissue repository OU tissue repositories)/titre, résumé OU (specimen bank* OU specimen storage OU specimen collection* OU specimen repository OU specimen repositories)/titre, résumé | | |

| | | | |
|---|--|----------------------|-----|
| | OU (plasma bank* OU plasma storage OU plasma collection* OU plasma repository OU plasma repositories)/titre, résumé OU (serum bank* OU serum storage OU serum collection* OU serum repository OU serum repositories)/titre, résumé | | |
| ET | | | |
| Étape 3 | (guidelines OU health planning guidelines) OU (recommendation* OU guideline*)/titre OU (practice guideline OU guideline)/type de publication OU (consensus development conferences OU consensus development conferences, NIH) OU (consensus development conference OU consensus development conference, NIH)/type de publication | | |
| Méta-analyses/revues systématiques | | Janv. 96 Sept. 08 | 17 |
| Étape 1 ET Étape 2 | | | |
| ET | | | |
| Étape 4 | meta-analysis OU (metaanalysis OU meta-analysis OU meta analysis)/titre, résumé OU meta-analysis/type de publication OU systematic review/titre, résumé | | |
| Autres revues de la littérature | | Janv. 96 Sept. 08 | 255 |
| Étape 1 ET Étape 2 | | | |
| ET | | | |
| Étape 5 | review/type de publication | | |
| Essais cliniques | | Janv. 96 Sept. 08 | 269 |
| Étape 1 ET Étape 2 | | | |
| ET | | | |
| Étape 6 | random*/titre OU (randomized controlled trials OU random allocation OU double-blind method OU single-blind method OU cross-over studies) OU randomized controlled trial/type de publication | | |
| Études de cohortes | | Janv. 96 Sept. 08 | 87 |
| Étape 1 ET Étape 2 | | | |
| ET | | | |
| Étape 7 | (cohort studies OU follow-up studies OU longitudinal studies) OU (cohort study OU cohort studies)/titre | | |
| Éthique | | Janv. 96 Sept. 08 | 135 |
| Étape 8 | (cryopreservation OU tissue banks OU biological specimen banks OU tissue preservation)/ethics | | |
| Méthodes/Standards | | Janv. 96 Sept. 08 | 148 |
| Étape 9 | (cryopreservation OU tissue banks)/standards | | |
| Gestion des risques | | Janv. 96 Fév. 08 | 47 |
| Étape 1 ET Étape 2 | | | |
| ET | | | |
| Étape 10 | risk management OU risk assessment OU safety management | | |
| Qualité | | Janv. 96 Sept. 08 | 144 |
| Étape 1 ET Étape 2 | | | |
| ET | | | |
| Étape 11 | quality assurance, health care OU quality of health care OU health care quality, access, and evaluation OU health care evaluation mechanisms OU quality indicators, health care OU total quality management OU quality control OU peer review, health care OU medical audit OU | | |

| | | | |
|--|---|----------------------|----|
| | accreditation OU certification | | |
| ACIDES NUCLÉIQUES - CRYOCONSERVATION | | | |
| Recommandations/Conférences de consensus | | Janv. 01 Sept. 08 | 1 |
| Étape 1 | | | |
| ET | | | |
| Étape 12 | nucleic acids OU (DNA OU deoxyribonucleic acid OU RNA OU ribonucleic acid)/titre OU (RNA extraction OU DNA extraction)/titre, résumé OU (sequence analysis, RNA OU sequence analysis, DNA OU nucleic acid hybridization OU nucleic acid amplification techniques OU DNA fingerprinting) | | |
| ET | | | |
| Étape 3 | | | |
| Méta-analyses/Revue systématique Étape 1 ET Étape 12 ET Étape 4 | | Janv. 01 Sept. 08 | 1 |
| Autres revues de la littérature Étape 1 ET Étape 12 ET Étape 5 | | Janv. 01 Sept. 08 | 25 |
| Essais cliniques Étape 1 ET Étape 12 ET Étape 6 | | Janv. 01 Sept. 08 | 55 |
| Études de cohortes Étape 1 ET Étape 12 ET Étape 7 | | Janv. 01 Sept. 08 | 14 |
| Gestion des risques Étape 1 ET Étape 12 ET Étape 10 | | Janv. 01 Sept. 08 | 1 |
| Qualité Étape 1 ET Étape 12 ET Étape 11 | | Janv. 01 Sept. 08 | 70 |
| ACIDES NUCLÉIQUES - BANQUES | | | |
| Recommandations/Conférences de consensus | | Janv. 01 Sept. 08 | 9 |
| Étape 13 | nucleic acids OU (DNA OU deoxyribonucleic acid OU RNA OU ribonucleic acid)/titre ET (tissue banks OU biological specimen banks OU tissue preservation) OU (biobank* OU biorepositor* OU cell bank* OU cell storage OU cell collection* OU cell repository OU cell repositories OU tissue bank* OU tissue storage OU tissue collection* OU tissue repository OU tissue repositories OU specimen bank* OU specimen storage OU specimen collection* OU specimen repository OU specimen repositories)/titre, résumé | | |
| OU | | | |
| Étape 14 | (DNA bank* OU DNA storage OU DNA collection* OU DNA repository OU DNA repositories OU RNA bank* OU RNA storage OU RNA collection* OU RNA repository OU RNA repositories)/titre, résumé | | |
| ET | | | |
| Étape 3 | | | |
| Meta-analyses/Revue systématique (Étape 13 OU Étape 14) ET Étape 4 | | Janv. 01 Sept. 08 | 2 |
| Autres revues de la littérature (Étape 13 OU Étape 14) ET Étape 5 | | Janv. 01 Sept. 08 | 44 |
| Essais cliniques (Étape 13 OU Étape 14) ET Étape 6 | | Janv. 01 Sept. 08 | 45 |

| | | | |
|--|---|----------------------|-----|
| Études de cohortes (Étape 13 OU Étape 14) ET Étape 7 | | Janv. 01 Sept. 08 | 11 |
| Gestion des risques (Étape 13 OU Étape 14) ET Étape 10 | | Janv. 01 Sept. 08 | 3 |
| Qualité (Étape 13 OU Étape 14) ET Étape 11 | | Janv. 01 Sept. 08 | 140 |
| EXTRACTION D'ARN | | | |
| Tous types de documents | | Janv. 96 Sept. 08 | 233 |
| Étape 15 | RNA OU (RNA OU ribonucleic acid)/titre, résumé | | |
| ET | | | |
| Étape 16 | (needle biopsy OU core biopsy OU needle core biopsy OU microbiopsy OU surgical biopsy OU fine needle aspiration)/titre, résumé OU biopsy, fine-needle | | |

Argumentaire

1 Introduction

1.1 Thème et contexte de la demande

Ce document constitue une actualisation des « Recommandations pour la cryopréservation de cellules et tissus tumoraux dans le but de réaliser des analyses moléculaires » (1), élaborées conjointement par la Société française de pathologie, la Société française d'hématologie et la Société française de cancérologie (ces recommandations avaient reçu le label Anaes en 2000).

Ces recommandations concernaient initialement les cellules et tissus tumoraux : leur actualisation les étend à l'ensemble des tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin. Elles viennent compléter les recommandations récentes élaborées par l'Institut national du cancer en 2006 (2) sur les tumorothèques hospitalières, et le document publié en juillet 2008 par l'Association française de normalisation (Afnor) (NF S96-900) qui concerne le système de management d'un centre de ressources biologiques et la qualité des ressources biologiques d'origine humaine et microbienne (3).

L'actualisation porte sur les pratiques de recueil et de préparation des prélèvements (tissus, cellules et liquides biologiques) issus du soin, sur leur acheminement, leur conditionnement et leur conservation à des fins diagnostiques, pronostiques et/ou d'orientations thérapeutiques.

Les recommandations actualisées traitent en particulier de :

- la cryopréservation de liquides biologiques issus du soin, prélevés chez des patients vivants. Les liquides biologiques concernés sont essentiellement le sang (sérum et plasma), l'urine, le liquide céphalo-rachidien (LCR) ; ces recommandations peuvent par exemple concerner la conservation des liquides des séreuses (plèvre, péritoine, péricarde), du liquide synovial et articulaire, du liquide gastrique ou duodénal, de la bile, de la salive, de la sueur, des larmes et par extension les liquides de lavage gastrique et bronchique ;
- l'extraction des acides nucléiques à partir de divers échantillons biologiques. La préparation d'un extrait purifié des acides nucléiques à partir de matériel biologique est un processus complexe qui débute au moment du prélèvement. La qualité d'un extrait des acides nucléiques dépend non seulement de la technique d'extraction mise en œuvre, mais aussi de la maîtrise des étapes situées en amont de l'extraction proprement dite et du stockage ;
- certains aspects juridiques, liés à l'accès des patients ou de leurs ayants droit aux échantillons, au consentement du patient en cas de requalification d'échantillons ou d'analyses génétiques.

1.2 Limites des recommandations

Ces recommandations n'abordent pas les questions soulevées par la cryopréservation :

- en transfusion sanguine ;
- en procréation assistée et embryologie ;
- de greffes.

Le champ de la recherche est exclu.

Elles excluent les prélèvements réalisés en *post mortem*.

Ces recommandations n'abordent pas les situations médicales dans lesquelles la cryopréservation d'échantillons d'origine humaine est souhaitable dans l'intérêt du patient.

1.3 Objectifs des recommandations

- préserver la qualité de tout échantillon biologique congelé issu du soin, afin de pouvoir réaliser notamment des analyses moléculaires dans un but diagnostique, pronostique et/ou d'orientation thérapeutique ;
- standardiser, tracer et sécuriser juridiquement les activités préanalytiques (recueil, préparation, conditionnement, congélation, transformation en produits dérivés, etc.) ;
- inciter au respect des droits des patients à court et à long terme.

1.4 Professionnels concernés

Ce document est destiné à l'ensemble des professionnels de santé prélevant ou prenant en charge les échantillons biologiques issus du soin.

2 Recommandations concernant la phase préanalytique d'échantillons biologiques issus du soin

Plusieurs recommandations traitent des différentes étapes de la phase préanalytique (comprenant le recueil, l'acheminement, la préparation, le conditionnement, la conservation et le suivi de la stabilité) de tissus, cellules ou liquides biologiques issus du soin.

Ont été identifiées :

- des recommandations françaises de la Fédération nationale des centres de lutte contre le cancer (FNCLCC) publiées en 2002 (4), et de l'Institut national du cancer (INCa) publiées en 2006 (2) ;
- des lignes directrices de l'Organisation de coopération et de développement économiques, OCDE¹) relatives aux pratiques exemplaires concernant les matériels biologiques humains (conservés au sein de centres de ressources biologiques : CRB), publiées en avril 2007 (5) ;
- des recommandations américaines de l'*International Society for Biological and Environmental Repositories* (ISBER) publiées en 2005 (6) et du *National Cancer Institute* (NCI) publiées en 2006 (7) ;
- des *standard operating procedures* (SOP) européennes développées par l'*European Human Frozen Tumour Tissue Bank* (TuBaFrost) en 2007 (8).

2.1 Recommandations françaises (tissus, cellules et liquides biologiques)

2.1.1 Recommandations de la Fédération nationale des centres de lutte contre le cancer (FNCLCC)

Des « standards, options et recommandations (SOR) » ont été élaborés en 2002 concernant la « bonne pratique de l'acheminement et de la prise en charge initiale d'un prélèvement en anatomie et cytologie pathologiques en cancérologie » (4).

Compte tenu de l'analyse de la littérature et de l'expérience des membres d'un groupe d'experts (méthodologie des SOR) (cf. annexe 1), la FNCLCC a proposé des recommandations fondées essentiellement sur accord d'experts.

Ces recommandations s'appliquent à l'ensemble de l'activité d'anatomie et de cytologie pathologiques (ACP). Elles comprennent les points suivants :

- **Modalités pratiques de l'acheminement des prélèvements**

Préalablement à l'acheminement, il doit exister une bonne qualité de transmission des informations entre les intervenants (standard).

Chaque prélèvement tissulaire ou cytologique doit être étiqueté, qu'il soit adressé dans des pots, sur lames ou épinglé sur un support rigide (standard), et accompagné d'un bon de demande d'examen (papier et/ou informatique) avec des renseignements cliniques (standard).

Tout prélèvement doit être soit congelé, soit fixé dans un délai bref afin d'éviter la lyse cellulaire ou tissulaire qui compromet l'interprétation diagnostique (standard).

¹ Organisation intergouvernementale au sein de laquelle des représentants de 30 pays industrialisés d'Amérique du Nord, d'Europe et de la région Asie-Pacifique ainsi que la Commission européenne se réunissent afin de coordonner et d'harmoniser leurs politiques, d'examiner des questions d'intérêt commun et de coopérer à la résolution de problème internationaux.

Des procédures écrites concernant l'acheminement, le dépôt, l'enregistrement et le mode de fixation des prélèvements existent et doivent être diffusées auprès des services cliniques concernés de même que le matériel nécessaire à l'acheminement (standard).

Le conditionnement doit être adapté à chaque prélèvement et à son mode d'acheminement (standard, accord d'experts).

Le dossier radiologique doit accompagner la demande d'examen pour certains prélèvements (lésions osseuses, images infracliniques du sein...) (standard, accord d'experts).

- **Prélèvements acheminés à l'état frais** (obligatoirement pour tout examen extemporané ; cryopréservation pour tissuthèque ; prélèvement pour cytogénétique ; prélèvement pour microscopie électronique ; ganglion(s) lymphatique(s) (suspicion de maladie hématologique) ; liquide céphalo-rachidien ; lavage broncho-alvéolaire) ;

- ▶ **Standards.** Les prélèvements de liquide céphalo-rachidien (LCR) et les lavages broncho-alvéolaires (LBA) doivent être acheminés sans délai à la structure ACP.

Pour une cryopréservation, culture cellulaire et examen extemporané, les fragments doivent être acheminés à l'état frais.

Les pièces opératoires doivent être adressées dans leur totalité à la même structure d'ACP et à l'état frais chaque fois que possible.

Chaque prélèvement opératoire, biopsique ou cytologique doit faire l'objet d'un repérage topographique. Les pièces opératoires sont orientées dans l'espace.

Les fragments en vue d'une cryopréservation doivent être prélevés par le pathologiste et congelés dans l'azote liquide. Le délai écoulé entre l'exérèse de la pièce et l'obtention des échantillons congelés doit être indiqué.

Les prélèvements congelés, stockés à long terme, sont placés soit dans un congélateur dont la température est inférieure ou égale à - 80°C, soit dans l'azote liquide.

- ▶ **Options.** Les pièces opératoires non soumises à un examen extemporané sont adressées soit à l'état frais, soit fixées dans la structure d'ACP.

Les radiographies des pièces opératoires sont réalisables soit dans la structure d'anatomie et cytologie pathologiques équipée avec moyens de radioprotection, soit dans le service de radiologie.

En cas d'impossibilité de congélation immédiate, on peut avoir recours à un milieu de préservation tissulaire (*RNA later*).

- ▶ **Recommandations.** Les pièces opératoires de grande taille doivent être ouvertes et/ou tranchées avant fixation pour faciliter la bonne pénétration du liquide fixateur (accord d'experts).

Les prélèvements d'hémopathies lymphoïdes, de sarcomes et de tumeurs pédiatriques doivent faire l'objet d'une congélation (accord d'experts).

Pour l'acheminement et la prise en charge des ganglions sentinelles repérés par un traceur radioactif, il est recommandé d'utiliser les mêmes précautions que pour les autres tissus ; les mesures de radioprotection spécifique ne sont pas nécessaires (accord d'experts).

- **Prélèvements acheminés fixés**

Ce point n'est pas développé car il n'entre pas dans le cadre de notre champ.

- **Modalités de réception des prélèvements, d'enregistrement, des mesures d'hygiène et de la traçabilité**

- ▶ **Standards.** La réception et la prise en charge des prélèvements doivent faire l'objet de procédures écrites propres à la structure d'ACP.

Chaque prélèvement est enregistré et porte un numéro qui sert de référence lors de toutes les étapes techniques et d'analyse conduisant au diagnostic, au compte rendu, à la codification et à la cotation.

Un mode d'enregistrement des cas adressés pour consultation et relecture est établi.

Un lieu défini doit exister dans la structure d'ACP pour recevoir et TRAITER les pièces fraîches avec toutes les mesures d'hygiène réglementaires.

Des logiciels informatiques doivent être utilisés afin de permettre l'identification et la traçabilité des prélèvements (accord d'experts).

La notion d'urgence diagnostique est appréciée par le pathologiste. La bonne communication entre cliniciens et pathologistes est la garantie d'une transmission et d'une prise en charge optimales des prélèvements.

► **Recommandations.** Le clinicien est averti du délai nécessaire pour la technique et l'interprétation lors d'une demande d'examen urgent ; des voies d'acheminement et des consignes spéciales sont mises en place pour ce type de prélèvements (accord d'experts).

2.1.2 Recommandations de l'Institut national du cancer (INCa)

Publiées en 2006, des recommandations à l'usage des cliniciens, des chercheurs, des responsables de tumorothèques et de centres de ressources biologiques (CRB) ont traité spécifiquement des « tumorothèques hospitalières » (2). Elles ont abouti :

- à la rédaction d'une Charte éthique pour le recueil, la conservation et l'utilisation des échantillons tumoraux humains dans le cadre de la prise en charge médicale et de la recherche en cancérologie (cf. § 8.3) ;
- à une liste d'indications de cryopréservation de tumeurs afin de constituer des tumorothèques à visée sanitaire ;
- à une liste standard de critères minimaux de description des échantillons constituant le catalogue national de données (cf. chapitre 5 et annexe 2) ayant pour but d'améliorer les conditions d'interopérabilité des tumorothèques mises en réseau informatisé.

2.2 Lignes directrices de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) (tissus, cellules et liquides biologiques)

Ces lignes directrices de l'OCDE (5) ont été élaborées en 2007 par des experts nationaux, des experts invités et des observateurs (pays non membres), réunis au sein d'un groupe d'étude sur les CRB (cf.annexe 1). Elles sont relatives aux pratiques exemplaires concernant tous les CRB, la biosécurité, le domaine des micro-organismes, les matériels biologiques humains et les ressources biologiques animales et végétales, et ont été obtenues par consensus après des entretiens directs, de vastes consultations écrites et une étude pilote testant leur validité et leur exploitabilité.

Parmi les lignes directrices relatives aux pratiques exemplaires concernant les matériels biologiques humains, sont abordés les points suivants :

- la préparation des échantillons : écrire, valider et réexaminer des procédures et des normes de préparation ; utiliser des produits consommables de haute qualité ;
- l'enregistrement de dépôts dans le CRB : définir et adapter les modalités de réception et de manipulation de matériel biologique, identifier de manière unique le matériel biologique en dissociant toutes les informations susceptibles de faire le lien avec un donneur, mettre en place un système de contrôles qualité encadrant le processus de préparation et de conservation des échantillons reçus (cf. encadré 1 sur les procédures de contrôle qualité recommandées ci-dessous) ;
- la conservation : sélectionner une ou plusieurs méthodes de conservations adéquates en s'appuyant sur sa propre expérience ou sur les recommandations du déposant (cf. encadré 2 sur les exemples de méthodes de conservation recommandées pour ADN, pour tissus et cellules isolées ci-dessous), suivre une procédure écrite selon chaque méthode de stockage disponible (valider et consigner les résultats), éviter toute congélation/décongélation inutile, éviter la perte de matériel, réaliser des doubles des échantillons et les stocker dans un endroit distinct en tant que collection de réserve.

Encadré 1. Procédures de contrôle qualité recommandées par l'OCDE, 2007 (5).

| |
|--|
| Contrôles qualité de l'ADN |
| Contrôle de la concentration de l'ADN par lecture de densité optique (DO) à 260 nm Contrôle de la pureté de l'ADN à l'aide du rapport DO260/DO280 Contrôle de l'intégrité de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose |
| Contrôles effectués sur les tissus et les cellules isolées |
| Contrôle de la qualité de fixation et de la composition des échantillons de tissus par des études microscopiques Contrôle des cellules par des études morphologiques et biologiques Contrôle annuel de la qualité des échantillons congelés par extraction et analyse de l'ADN et de l'ARN |

Encadré 2. Exemples de méthodes de conservation recommandées par l'OCDE, 2007 (5).

| |
|--|
| Généralités |
| Choisir le récipient de stockage en fonction des conditions de stockage et de la taille du matériel biologique Choisir des systèmes d'étiquetage et d'impression qui resteront stables dans les conditions du stockage à long terme |
| Conservation de l'ADN |
| Conservation dans un conteneur à 20 °C ou à une température inférieure Lyophilisation |
| Conservation des tissus |
| Enrobage des échantillons dans de la paraffine, conservation à température ambiante (inférieure à 27 °C) Cryoconservation des échantillons, stockage dans des congélateurs à - 80 °C ou dans de l'azote liquide (en phase liquide ou gazeuse) |
| Conservation des cellules isolées |
| Cryoconservation dans de l'azote liquide ou au-dessus du niveau de l'azote liquide ou dans des congélateurs à température ultra basse (~ 150 °C) Cryoconservation dans des conteneurs à - 80°C pour des durées limitées seulement |

2.3 Recommandations américaines (tissus, cellules et liquides biologiques)

2.3.1 Recommandations de *'International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER)* publiées en 2005 et révisées en 2008

Ces recommandations, publiées en 2005 (6) et révisées en 2008 (9), ont été élaborées par l'*International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER)*, dont les membres sont essentiellement d'origine nord-américaine, mais sans recherche systématique ni analyse de la littérature et sans niveau de preuve (la mention *best practice* reflète une expérience collective de ses membres) (cf. annexe 1). Elles reflètent les pratiques concernant les méthodes de conservation à long terme des échantillons biologiques humains à des fins de recherche. Sont concernés : le sang et ses fractions (plasma, sérum, globules rouges), l'urine, la salive, les cheveux, les ongles, le lait maternel, les selles, l'air exhalé, les tissus (issus de la chirurgie, d'autopsie ou de transplant), les lignées cellulaires, les

échantillons liés à la conception, le sang de cordon, la moelle épinière, d'autres fluides biologiques (ascites, liquide pleural, liquide synovial...).

Ces recommandations décrivent les modalités de fonctionnement d'une biobanque en termes d'organisation générale (identification du site, responsable, personnels, programme d'assurance qualité...) et citent également la réglementation américaine applicable à la conservation d'échantillons humains.

Les étapes de prélèvement et de préparation sont spécifiques du type d'échantillon, de nombreux éléments sont communs à ces différents protocoles et certains sont exigibles afin de préserver les macromolécules (protéines, acides nucléiques). Il est recommandé que des études pilotes et de faisabilité (réalisées sur duplicats, en aveugle) valident les protocoles de prélèvement et de préparation des échantillons.

Les principes généraux de prélèvement suivants sont recommandés, mais sans description précise des protocoles spécifiques :

- le délai entre le prélèvement et la congélation doit être le plus bref possible ;
- différentes conditions de stabilité sont à observer (température, anticoagulant, agents stabilisants tels que l'acide éthylène diamine tétracétique [EDTA], stérilité, dégradation enzymatique, adéquation du contenant, aliquotes).

Pour le prélèvement de sang, il faut déterminer la nature du prélèvement recherché : sang coagulé (sérum, culot) ou sang non coagulé (plasma, *buffy coat*, *red blood cells*).

Pour le prélèvement d'urines, il faut déterminer s'il s'agit d'un échantillon des premières urines du matin, isolées (comparativement à un prélèvement de sang), recueillies au hasard ou sur 24 heures.

Pour le prélèvement de tissus, ces recommandations soulignent que :

- en aucun cas les échantillons prélevés à des fins de recherche ne doivent interférer avec le diagnostic du patient ;
- un anatomopathologiste vérifie ce qui peut être conservé à des fins de recherche (pour le sang et les autres fluides biologiques inutiles au diagnostic, une telle vérification n'est pas nécessaire mais leur prélèvement doit suivre un protocole préalablement établi et approuvé) ;
- les contraintes de temps doivent être observées (toute molécule au sein d'un tissu spécifique se dégrade de manière différente, à cause de l'excision vasculaire, de la température à laquelle est maintenu l'échantillon...) ;
- des conditions strictes de stérilité sont à respecter (gants, instruments...) et le prélèvement ne doit pas être déposé sur un matériel absorbant ;
- un bloc de paraffine peut être réalisé si les échantillons réservés à la congélation sont suffisants.

2.3.2 Recommandations du *National Cancer Institute* (NCI), du *National Institutes of Health*, et de l' *US Department of Health and Human Services*, publiées en 2006

Suite à des travaux débutés en 2002 puis présentés lors de deux ateliers de travail organisés par des structures internes au NCI (respectivement l'*Office of Biorepositories Biospecimen Research* et le *Biorepository Coordinating Committee*) (cf. annexe 1), un premier guide de bonnes pratiques a été élaboré sur la constitution de biobanques (rassemblement d'échantillons biologiques et des données qui s'y rapportent) cautionnées par le NCI (7). Ces recommandations ont pour objectif d'homogénéiser et d'améliorer la qualité du matériel biologique et des données utilisées à des fins de recherche.

Elles apportent des principes généraux sur des aspects éthiques et réglementaires propres aux États-Unis et sur des aspects opérationnels et techniques, notamment sur :

- le recueil, la préparation, le stockage (détaillé ci-après), l'accessibilité et la distribution des échantillons ;
- le recueil et la gestion des données cliniques ;
- l'assurance et le contrôle qualité ;
- la prévention des risques de contamination ;
- les bases de données informatisées de la biobanque, leur traitement, leur suivi et ses systèmes de contrôle.

Pour le recueil et la préparation, des recommandations seront élaborées ultérieurement et viseront à donner notamment une nomenclature homogène ; des procédures ; des protocoles pour les différents échantillons, fondés sur l'analyse de la littérature de données (délai depuis l'excision pour les tissus, délai de congélation...) nécessaires à une bonne interprétation des résultats.

Pour le stockage, les principes généraux rappelés sont :

- d'appliquer des protocoles standardisés afin d'assurer leur qualité et d'éviter l'introduction de variations dans les études ;
- de conserver des échantillons stabilisés et d'éviter la congélation/décongélation. Il est recommandé que le choix de la température soit guidé par le type de prélèvement, la durée de stockage, les molécules d'intérêt et la nécessité ou non de préserver la viabilité des cellules. Dans le cas des liquides biologiques comme le sang ou l'urine, il est important de considérer la nécessité de conserver leurs composants séparément dans des conditions optimales. L'étude de Hayes *et al.* (10) rapporte que la cryopréservation du sang total est l'option la plus coût-efficace pour un stockage à grande échelle de cellules viables dans des études épidémiologiques. Pour les tissus, en cas de doute d'une utilisation future, il est recommandé de les conserver dans l'azote liquide. Conformément aux recommandations de l'ISBER en 2005 (6), il est rappelé que le stockage à des températures basses et l'utilisation de cryoprotecteurs comme le diméthylsulfoxyde (DMSO) sont recommandés pour maintenir des cellules viables sur de longues périodes ;
- d'établir les règles de dépôt avant le stockage des échantillons (constitution si possible d'échantillons témoins de congélation) ;
- d'adapter les contenants au but de l'analyse (exempt de contamination xénobiotique, ou de ribonucléase : Rnase) ;
- d'identifier chaque échantillon de manière claire, pérenne, avec un système permettant sa localisation et son inventaire au sein du congélateur ;
- d'enregistrer continuellement les conditions de stockage par un système automatisé et de prévoir un équipement relais, des procédures d'urgence en cas de défaillance.

Ces recommandations sont applicables à l'ensemble des types de prélèvements tels que les tissus frais, congelés ou fixés en paraffine, le sang, le sérum et l'urine, mais il est rappelé que d'autres consignes de manipulation sont à observer conformément aux SOP spécifiques au type de prélèvement et aux molécules analysées dans ce prélèvement (ARN, ADN).

2.4 Recommandations européennes sur le recueil et le stockage de tissus

Les SOP publiées par Mager *et al.* en 2007 (8) sont issues de celles développées par l'*European Human Frozen Tumour Tissue Bank* (TuBaFrost) sur le recueil et le stockage de tumeurs humaines et de tissus normaux, afin de pallier l'hétérogénéité de la qualité des échantillons et des données associées, préjudiciable aux projets de recherche transversaux (cf. méthode d'élaboration dans l'article de Morente *et al.* (11)). Elles détaillent davantage certaines étapes mais soulignent qu'il n'est pas nécessaire de les standardiser toutes. Les

recommandations suivantes sont donc flexibles et sont illustrées par l'*Eramus MC Tissue Bank*.

Pour le recueil des tissus, les SOP générales TuBaFrost détaillent tout particulièrement les étapes en fonction du lieu et de son équipe :

- en salle d'opération : notifier le recueil de tissu par le chirurgien (consentement du patient préalable conformément à la loi du pays) et l'heure de l'excision ; compléter le formulaire concernant la pathologie ; placer l'échantillon en pot stérile et le déposer sur glace ; notifier le nom du technicien responsable du transport et envoyer immédiatement l'échantillon au service d'anatomocytopathologie ;
- au service d'anatomocytopathologie : notifier l'anatomopathologiste et vérifier les données fournies (numéro de pathologie attribué), décrire de façon macroscopique l'échantillon, le disséquer (avec un changement des instruments entre les tissus normaux et tumoraux) et sélectionner des échantillons représentatifs destinés au diagnostic et s'ils sont en nombre suffisant, ceux destinés à la conservation (0,5 mm³ approximativement) ; refroidir l'isopentane (jusqu'à -160 °C) ; coder l'échantillon ; notifier l'heure de congélation (idéalement dans les 30 min après l'excision) ; l'utilisation d'OCT est une autre option possible (d'autres sont proposées).

Les options de stockage recommandées sont soit une conservation dans un réfrigérateur à - 80 °C, soit dans l'azote liquide (phase liquide ou vapeurs). Des duplicats peuvent être stockés à différents endroits. Différents points sont à observer : mise en place d'un système d'alarme (surveillance visuelle, acoustique, centralisée et alarmes repérables à distance, avec appel automatisé), réfrigérateur ou azote liquide de remplacement prévu, enregistrement des données de stockage (informatisées) et mise à jour en fonction des échantillons retirés.

3 Revues et études concernant la phase préanalytique d'échantillons biologiques issus du soin

Différentes revues et études ciblant spécifiquement une ou plusieurs étapes de la phase préanalytique (recueil, acheminement, préparation, conditionnement, conservation et suivi de la stabilité) ont été identifiées pour la cryopréservation de tissus, cellules ou liquides biologiques.

3.1 Influence des conditions de prélèvement

Une revue de Benoit *et al.* publiée en 2003 (12), destinée aux chirurgiens, rappelle les règles élémentaires de bonnes pratiques concernant des prélèvements anatomopathologiques au bloc opératoire, en cancérologie :

- une transmission de la qualité des informations entre intervenants ;
- un acheminement des pièces opératoires entières orientées et à l'état frais aussi souvent que possible ;
- la nécessité d'adresser sans délai à l'état frais des prélèvements destinés à un examen extemporané ou à une technique spécifique imposant un fragment congelé ou une culture cellulaire ;
- l'obligation de placer les prélèvements destinés à être congelés dans un congélateur à - 80 °C ou dans de l'azote liquide ;
- procéder à une fixation, indispensable pour éviter la lyse cellulaire, préférentiellement dans du formol tamponné.

D'autres mises au point (13) et revues (14,15) rapportent notamment l'importance des modalités de prélèvement et du délai de prise en charge des échantillons quant à la préservation d'acides nucléiques.

La mise au point de Plénat *et al.* publiée en 2006 (13) décrit l'impact au niveau protéique et moléculaire du délai de congélation.

Le délai de prise en charge doit être le plus court possible car les profils moléculaires des échantillons obtenus par biopsie peuvent rapidement différer de ceux des échantillons prélevés sur pièces opératoires à cause de l'ischémie qui s'ensuit (entraînant variations du métabolisme intermédiaire notamment énergétique, dénaturation et dégradation de macromolécules, variations de l'expression de différents gènes...). Trente minutes sont suffisantes pour qu'apparaissent les premières fragmentations de l'ADN, des variations des taux d'ARNm ou du contenu protéique cellulaire.

Outre le délai de prise en charge des échantillons, l'intensité des remaniements varie également avec les procédures chirurgicales individuelles, avec la dimension et la vitesse d'extraction de la chaleur de ces échantillons ou encore avec les tissus en fonction de leur richesse en enzymes hydrolytiques. L'anesthésie peut également influencer le profil moléculaire des tissus, en modifiant par exemple l'état de phosphorylation des protéines des cascades d'activation cellulaire.

Cette mise au point rapporte également les multiples mécanismes de détérioration des échantillons tissulaires suite à la congélation (cristallisation et phénomènes osmotiques, lyophilisation de surface, auto-oxydation, altérations de mécanisme enzymatique) ainsi que les difficultés éventuelles liées à l'emploi de liquides cryoprotecteurs et de milieu d'enrobage. Les auteurs rapportent l'étude de Turbett et Sellner (16) qui a montré que les composants de l'OCT peuvent interférer avec des techniques moléculaires.

La revue non systématique de la littérature de Henny publiée en 2003 (14) aborde différents aspects logistiques d'une biothèque : collecte d'échantillons biologiques, processus d'identification, équipement (congélateurs et/ou azote liquide), techniques de stockage, système de gestion de l'information, programme d'assurance qualité, aspects financiers, problèmes éthiques et légaux.

Elle mentionne notamment des particularités propres à la conservation de liquides biologiques et à la préservation des acides nucléiques des échantillons : pour un prélèvement sanguin, le choix de l'anticoagulant (EDTA K₃, citrate de Na, héparinate de lithium...) est fonction de l'analyte à mesurer ; le *buffy coat* (ou couche leuco-plaquettaire) est largement utilisé pour les analyses de génétique moléculaire, moyen simple et peu onéreux pour obtenir de l'ADN de bonne qualité et permettant une extraction d'ADN au fur et à mesure des besoins. L'ADN peut aussi être conservé après extraction des leucocytes. La congélation de sang total y est déconseillée en raison de l'hémolyse le rendant impropre à la plupart des usages habituels, mais sa conservation sur papier buvard est recommandée pour certaines analyses biochimiques et surtout de génétique moléculaire.

Pour le traitement « préanalytique » de l'échantillon (toutes les étapes depuis le prélèvement jusqu'à la conservation), il est précisé que les conditions de conservation, de centrifugation (vitesse, température) seront à adapter en fonction de chaque facteur à mesurer. Pour la génétique moléculaire, le sang sera recueilli de préférence sur EDTA K₃ en vue de l'extraction d'ADN, d'héparinate de lithium pour l'ARN, ou sur papier buvard.

Elle présente également des tableaux récapitulatifs intéressants sur la stabilité dans le temps selon la méthode de conservation (...), sur les caractéristiques comparées d'une conservation électrique *versus* azote liquide et sur la typologie du contenant. Pour l'aliquotage des liquides biologiques, il est recommandé de conserver de préférence des

volumes variables de liquides biologiques, par exemple de 100 µl à 5 ml au moins, sans « volume mort » trop important en adaptant le contenant.

La revue de Srinivasan *et al.* publiée en 2002 (15) rappelle que la phase préanalytique doit prendre en compte les différents éléments suivants (communs que ce soit à la conservation par le froid ou à la fixation en bloc de paraffine) :

- la nature des échantillons : les auteurs classent en quatre types les échantillons biologiques :
 - ▶ tissu en provenance d'une petite biopsie ou d'une ponction à l'aiguille chirurgicale,
 - ▶ échantillon cellulaire incluant des cellules aspirées à l'aiguille fine ou à partir des liquides biologiques,
 - ▶ sang, plasma et sérum,
 - ▶ pièce d'autopsie.
- les modalités d'acquisitions : les auteurs précisent l'importance de la nature de l'anesthésique utilisé. Dans la mesure du possible les échantillons doivent être congelés dans la salle d'opération. D'après leur expérience, cela est rarement possible pour la plupart des tissus. Il s'agit donc de développer un protocole optimal selon les étapes suivantes :
 - ▶ coopération entre le chirurgien, l'anesthésiste et l'anatomopathologiste pour connaître précisément le temps chirurgical de résection,
 - ▶ le type d'anesthésique pouvant influencer le contenu du tissu en particulier la phosphorylation. Il en est de même de la durée de l'anoxie des tissus concernés,
 - ▶ si des échantillons sont prélevés à des temps différents, l'intervalle doit être le plus court possible,
 - ▶ d'autres facteurs comme le changement du pH, du lieu et du stress environnemental peuvent influencer sur la qualité des gènes ;
- le traitement des tissus : un pathologiste a trois options de conservation que sont la congélation, la conservation fraîche ou la stabilisation par fixateurs.

En ce qui concerne la congélation, les tissus doivent être préservés directement par une congélation à - 80 °C, si possible dans l'azote liquide. Les tissus congelés doivent être homogènes pour une extraction de l'ADN, de l'ARN ou des protéines (changements moléculaires causés par les brûlures d'une congélation rapide). Il est rappelé que l'ISBER (cf. mise à jour ci-dessus) recommande une température de - 132 °C, permettant une conservation à long terme avec un minimum de dégradation enzymatique (9).

Les auteurs insistent sur le temps de prétraitement des tissus qui doit être inférieur à 10 minutes d'anoxie, en particulier pour les tissus, avec un haut niveau de RNase et de protéase (comme le pancréas, la peau ou la vésicule biliaire) (15). Les auteurs signalent également que toute procédure chirurgicale incluant des sections ou des découpes en petites pièces doit être réalisée immédiatement pour prévenir les dégradations enzymatiques, mitochondriales ou la diminution de l'index mitotique. La perte de 30 % à 50 % des nombres de mitoses a été rapportée pour des délais de fixation allant de 2 à 6 heures. Cette chute de l'index mitotique a été impliquée comme source d'erreur dans la classification de cancers du poumon.

En ce qui concerne les conditions de stockage, les auteurs signalent que l'activité des glucokinases et des phosphofruktokinases chute à des températures de stockage de - 80 °C alors que les activités des enzymes mitochondriales, des iso-enzymes et de la xanthinoxilase augmentent à cette même température, probablement à cause de la désintégration des tissus causée par le refroidissement.

Les auteurs recommandent la réalisation d'études comparatives entre la fixation par le froid ou d'autres types de fixations. Étant donné que des altérations peuvent survenir dans l'expression des gènes pendant et/ou après résections de tissus, il est donc nécessaire de connaître les performances de chacune des techniques de conservation.

Enfin, une étude de Wang *et al.* publiée en 2006 (17) a comparé la congélation rapide (en azote liquide), la fixation à l'éthanol et la technique RNAlater (Ambion) quant à la

préservation de l'ARN à partir de tissu cervical, dont l'analyse est essentielle au diagnostic du cancer de l'utérus. Elle permet de conclure qu'une congélation rapide impose des contraintes logistiques (azote liquide, OCT, glace au moment du prélèvement, stockage à - 80 °C), mais garantit, par une préparation simple en aval, l'obtention d'un ARN de bonne qualité, préférable aux deux autres méthodes testées.

Au final, le délai de prise en charge est un élément majeur à minimiser et à prendre en compte dans l'analyse des résultats. Une bonne traçabilité des informations relatives à l'échantillon et à cette prise en charge est essentielle (fiche de transmission).

3.2 Influence de la préparation sur la stabilité de biomarqueurs issus du sang ou produits dérivés

Trois études (10,18,19) citées à titre d'exemples peuvent illustrer l'influence de la préparation sur la stabilité de biomarqueurs issus du sang ou de produits dérivés.

L'étude de Hayes *et al.* publiée en 2002 (10) compare différents paramètres immunologiques à partir d'échantillons de sang conservés plus ou moins longtemps dans le temps (31 mois au maximum), sous forme de sang entier ou de lymphocytes préalablement séparés. La cryopréservation a été réalisée à - 90 °C à partir de prélèvements citratés plus DMSO (10 % en concentration finale). Il n'y a pas de différence de viabilité observée entre les échantillons congelés (avec un minimum de 72 % sur 89 sujets testés), les cellules T issues de sang entier congelé sont stimulables (prolifération en réponse à une phase solide CD3/CD28 plus IL-2) après 31 mois de stockage et une transformation des cellules B par le virus Epstein-Barr (EBV) reste efficace (> 90 %) après 20 mois de stockage. Les auteurs soulignent que les avantages d'une conservation de sang entier sont la disponibilité de DNA total par extraction directe et la réduction des coûts.

L'étude de Pieters *et al.* publiée en 2002 (18) évalue les effets de la congélation, de la lyophilisation et de la durée de stockage (4 mois maximum), sur le réseau de fibrine d'échantillons plasmatiques. La lyophilisation entraîne moins d'effets indésirables sur les caractéristiques du réseau de fibrine comparativement à la congélation seule, mais le stockage à - 80 °C des deux formes (lyophilisat et lyophilisat reconstitué) conduit à une altération de l'échantillon durant les phases de réhydratation et de décongélation.

L'étude de Hellstern *et al.* publiée en 2001 (19) évalue la qualité de plasma produit par plasmaphérèse modérée et congélation progressive *versus* la qualité de plasma produit par plasmaphérèse intensive et congélation rapide (en moins d'1 heure à - 30 °C) (sur 75 échantillons de chaque). La première combinaison conduit à des taux faibles de facteur V et VIII, alors que la seconde conduit à une différence significative quant au dosage d'IgG (7,1 *versus* 8,6 g/l, $p < 0,0001$). Il manque une évaluation croisée de ces combinaisons afin de distinguer ce qui est imputable à la plasmaphérèse et à la vitesse de congélation.

Au final, les différents protocoles de préparation sont à optimiser préalablement en fonction de la nature de l'échantillon et de l'analyte à préserver.

3.3 Influence de la durée de stockage

Trois études récentes (20-22) citées à titre d'exemples illustrent l'évaluation de l'influence de la durée de stockage sur la stabilité de protéines.

L'étude de Jenab *et al.* publiée en 2005 (20) a pour objectif de déterminer la dégradation de la vitamine C dans des échantillons plasmatiques congelés sans stabilisant (type EDTA,

acide perchlorique, dithiothreitol : DTT ou acide métaphosphorique) pendant une période de 7 à 11 ans à -196 °C. Les résultats fondés sur une analyse de 144 échantillons montrent que la vitamine C peut être mesurée de façon satisfaisante dans des échantillons congelés sur une longue période sans qu'aucun agent stabilisant n'ait été ajouté.

L'étude rétrospective de Ulmert *et al.* publiée en 2006 (21) a pour objectif d'évaluer la stabilité à long terme (plus de 20 ans) des taux d'antigènes spécifiques prostatiques (PSA) libres, totaux ou complexés, dans des échantillons sériques et plasmatiques congelés à -20 °C. L'étude compare des échantillons issus d'une cohorte suédoise (22 439 échantillons prélevés entre 1974 et 1986) appariés selon l'âge des patients, à des échantillons contemporains congelés de 1 056 personnes. L'étude montre que les concentrations de PSA totaux mesurés et de PSA complexés déduits sont stables dans le plasma et le sérum stockés à -20 °C sur une longue période. Une plus grande variabilité, plutôt qu'une diminution systématique, peut expliquer les différences observées dans l'analyse des mesures de PSA libres sur les échantillons stockés depuis plus de 20 ans.

L'étude de Ishikawa *et al.* publiée en 2007 (22) a comparé les taux de *C-reactive protein* (CRP) de 99 échantillons sériques issus de la cohorte JMS, avant (à la *baseline*) et après décongélation des mêmes échantillons stockés pendant 13,8 ans à -80 °C. Les valeurs obtenues après décongélation sont significativement plus élevées (0,59 mg/ml *versus* 0,25 mg/ml avant congélation, avec $p < 0,0001$). Ces valeurs montrent une forte corrélation avant/après stockage (coefficient de corrélation de Pearson $r = 0,92$). Les limites de ces résultats sont : la sélection initiale des échantillons selon leur valeur de CRP à la *baseline*, le biais de la congélation/décongélation sur l'échantillon longuement stocké, et une éventuelle évaporation non vérifiée (par mesure du potassium, sodium ou chlorure).

3.4 Influence du mode de stockage et du choix de la température

Deux études, citées pour exemple, montrent ici que le mode de stockage et le choix de la température sont des paramètres importants à prendre en compte.

La publication de Luc *et al.* de 2003 (23) expose les problèmes rencontrés lors de la constitution et l'utilisation d'une biobanque. Au-delà des démarches administratives et de la recherche d'une sécurité optimale qui conduit à augmenter les coûts, valider la stabilité des marqueurs selon la durée et les conditions de conservation des échantillons reste le problème spécifique des études de cohortes avec mesures de biomarqueurs. Les auteurs comparent notamment le stockage d'échantillons plasmatiques par tube ou par paillettes : aucune différence n'a été décelée lors de l'utilisation de l'un ou de l'autre pour les paramètres testés. Le stockage par paillettes permet un gain de place et une utilisation seulement du volume nécessaire sans décongélation globale, mais l'homogénéité du plasma contenu dans la paillette est à vérifier.

L'étude russe de Svedentsov *et al.* publiée en 2006 (24) a évalué la résistance de lymphocytes T et B humains à différentes températures de congélation (-20 °C, -40 °C et -80°C). Cette résistance est exprimée par comparaison du taux de chaque population cellulaire avant et après congélation. À partir de sang entier, les échantillons ont été congelés avec des solutions cryoprotectrices différentes selon la température, dont le composant majeur était l'hexaméthylène bis-tétraoxyéthyl urée (sans justification). La durée de congélation est courte (24 h). Les résultats montrent que plus la température est basse, plus la résistance des lymphocytes B est importante alors que celle des lymphocytes T est plus faible.

Au final, les conditions de conservation (temps et température) sont très variables selon les échantillons et analytes à préserver. Elles doivent faire l'objet d'une validation préalable.

3.5 Particularités des étapes préanalytiques pour la conservation de liquides biologiques

3.5.1 Le plasma

Des recommandations concernant les étapes préanalytiques en protéomique clinique, et plus particulièrement le prélèvement et la conservation du plasma, ont été élaborées par l'INCa en 2007 (25). Aucune analyse de la littérature ni référence bibliographique ne sont mentionnées. Elles détaillent des choix techniques et des modes opératoires et sont destinées à favoriser une homogénéisation des étapes de recueil, de conditionnement et de stockage.

Pour le prélèvement, il est recommandé dans ce texte d'utiliser un tube EDTA, de s'assurer de l'absence d'hémolyse, de conserver le tube en position verticale à 4 °C et de remplir la fiche de suivi (cf. annexe 2) afin de pouvoir informatiser l'ensemble des données correspondant à l'échantillon. Au laboratoire, celle-ci est vérifiée et le temps entre le prélèvement et le traitement calculé, sachant que le délai maximum entre le prélèvement et la congélation doit être de 4 heures.

Le traitement consiste en 2 centrifugations successives (10 min à 1 200 g à 20 °C). Le plasma est ensuite aliquoté par 500 µl (tube « mère ») en paillettes ou cryotubes appropriés. La conservation optimale recommandée pour assurer une bonne stabilité est la conservation en azote liquide en système clos. La conservation à - 80 °C peut être envisagée pour des études à court terme. Ces recommandations précisent que la congélation en paillettes permet à la fois de s'assurer d'une absence totale d'échange entre l'air et l'échantillon, et de plus celles-ci peuvent être stockées à - 196 °C. Plusieurs travaux (non cités) ont montré une dérive des échantillons à - 80 °C. Au-delà de 18 mois, la question se pose de savoir si c'est dû à la température ou au conditionnement (en général faible volume d'échantillon dans un tube de grand volume). La comparaison entre les deux conditions est en cours d'étude. La paillette permet l'identification par code barre et l'anonymisation du prélèvement tout en gardant le lien avec le dossier clinique.

Pour le stockage, les cryotubes des échantillons seront directement placés à - 80 °C. Les paillettes sont incubées en vapeur d'azote dans les 3 heures qui suivent les prélèvements. En cas de décongélation pour utilisation (dans la demi-heure) et aliquotage secondaire en tubes « fils », ceux-ci ne seront conservés que pour une période inférieure à 24 mois et seront préférentiellement utilisés pour l'étape d'identification des biomarqueurs. Après décongélation, les échantillons doivent rester à 4 °C en attendant d'être traités afin d'éviter toute dégradation post-conservation.

Deux études (26,27) ont également évalué l'influence du mode de prélèvement.

Dans le cadre d'un projet touchant à la protéomique humaine, une étude multicentrique internationale publiée par Omenn *et al.* en 2005 (26), réunissant 35 laboratoires, a permis d'évaluer la stabilité des prélèvements sériques et la concentration de protéines, de comparer différentes techniques et conditions pré-analytiques, et plus particulièrement les modalités de prélèvement (EDTA, héparine ou citrate). Sur ce point, les résultats conduisent les auteurs à recommander le recours à l'EDTA ou le citrate.

L'étude publiée par Nilsson *et al.* en 2005 (27) décrit la stabilité de biofacteurs de la fibrinolyse et de l'inflammation (protéine C-réactive, CRP) dosés dans du sérum ou du plasma prélevé dans différentes conditions (EDTA, citraté, citraté acidifié) conservés à - 70 °C pendant une longue période (8 à 11 ans). Les auteurs concluent à l'intérêt d'un prélèvement réalisé sur plasma citraté acidifié par rapport au sérum ou au plasma recueilli sur EDTA ou citraté non acidifié.

3.5.2 L'urine

Des recommandations concernant les étapes préanalytiques en protéomique clinique et plus particulièrement le prélèvement et la conservation de l'urine ont été élaborées par l'INCa en 2007 (25). Aucune analyse de la littérature ni référence bibliographique ne sont mentionnées. Elles détaillent des choix techniques et des modes opératoires et sont destinées à améliorer la standardisation des étapes de recueil, de conditionnement et de stockage, mais soulignent que plusieurs points concernant la phase préanalytique des échantillons urinaires restent en discussion et que des études en cours devraient permettre de proposer des protocoles optimisés. Dans tous les cas, ces étapes doivent faire l'objet d'une saisie.

Pour les conditions de prélèvement, les échantillons analysés peuvent correspondre à une miction isolée, aléatoire dans la journée ou aux urines recueillies sur 24 heures. Le contenant doit être stérile mais des études sont en cours pour déterminer s'il convient d'exiger, comme pour d'autres biofluides, des contenants inertes en polypropylène. La température à laquelle l'échantillon doit être conservé en attendant reste en discussion : température ambiante ou

0 °C sur glace fondante, en présence ou non d'inhibiteur de protéases (sauf spécificité de certains protocoles d'étude). L'information doit être portée sur la feuille de suivi (cf. annexe 2). Au laboratoire, celle-ci est vérifiée ; un contrôle simple à la bandelette urinaire est réalisé (recherche de leucocyturie, hématurie, protéinurie, glycosurie) et le temps entre le prélèvement et le traitement calculé, sachant que le délai maximum entre le prélèvement et la congélation doit être de 4 heures. Un aliquot doit être prélevé pour mesure de la protéinurie et la créatininurie, qui pourra être utilisé pour normaliser la dilution des urines. Un autre aliquot est prélevé pour cytologie urinaire par cytopspin.

Le traitement consiste en 2 centrifugations successives (10 min à 1 000 g à température ambiante ou à 4 °C, puis 10 min à 14 000-20 000 g à température ambiante ou à 4 °C). Le premier culot peut être conservé afin de garder la possibilité d'étude ultérieure, par exemple, de l'ADN par technique PCR. Le surnageant est aliquoté par 5 ml en tube de polypropylène.

Pour le stockage, la congélation est immédiate à - 80 °C. Les volumes utiles en protéomique urinaire rendent la congélation et le stockage en azote liquide peu pratiques. Il faut éviter toute conservation temporaire à - 20 °C. Si elle est néanmoins inévitable, l'indiquer sur la feuille de suivi avec sa durée. Des études doivent déterminer la durée maximale d'utilisation des échantillons d'urines conservés à - 80 °C.

Une décongélation dans la glace pendant 15 minutes est conseillée. Après avoir vortexé et centrifugé (5 min à 1 000 g) l'échantillon, il est possible de l'utiliser, puis d'aliquoter dans des tubes secondaires le volume restant.

3.5.3 Le liquide céphalo-rachidien

Deux recommandations et une revue ont été identifiées concernant les étapes de recueil et de préparation du liquide céphalo-rachidien (LCR).

Des SOP allemandes publiées par Lewczuk *et al.* en 2006 (28) ont été établies à partir des pratiques en vigueur dans le laboratoire de référence situé à Erlangen en Allemagne. Elles ont été validées en interne dans leur département et soumises à l'évaluation critique de leur réseau. Elles ont été diffusées aux 14 centres universitaires participant à la constitution de la biobanque de fluides du corps humain regroupant LCR, sérum, plasma et sang entier de patients atteints de démence. La constitution de cette biobanque répond au besoin urgent d'identifier des biomarqueurs nécessaires au diagnostic précoce et différentiel de la démence. Cet article présente l'organisation et la structure de la biobanque, en ciblant les protocoles de préparation des échantillons.

Pour le recueil des LCR, ils rappellent l'importance de la composition du plastique des tubes : les auteurs rapportent une de leurs études précédentes (29) montrant que le polystyrène réduit la concentration de certains biomarqueurs tels que les A β peptides. Ils recommandent donc l'utilisation de tubes en polypropylène (volume de 1,4 ml) et plus particulièrement d'un système d'échantillonnage et de stockage en plaques (« *Matrix box* »). Ce procédé de stockage permet une localisation précise, un accès par type d'échantillons et par patient. Les SOP proposées permettent une préparation et une congélation des échantillons de LCR en moins de 30 minutes après leur prélèvement. Elles suivent les étapes suivantes : chez un patient assis (si possible une imagerie cérébrale aura été réalisée au préalable afin d'exclure toute pression intracrânienne), recueillir le LCR en tube de polypropylène à température ambiante, centrifuger (15 min, 1 600 g), aliquoter le surnageant en *Matrix box* (250 μ l x 16 puits) et congeler à - 80 °C immédiatement.

Des recommandations concernant les étapes préanalytiques en protéomique clinique, et plus particulièrement le prélèvement et la conservation du LCR, ont été élaborées par l'INCa en 2007 (25). Aucune analyse de la littérature ni référence bibliographique ne sont mentionnées. Elles détaillent des choix techniques et des modes opératoires et sont destinées à améliorer la standardisation des conditions de prélèvement, de conservation et de stockage.

Pour les conditions de prélèvement, le volume nécessaire aux explorations cliniques (biochimique, bactériocytologique...) est prélevé dans les tubes adéquats (en fonction des pratiques cliniques locales) et au moins 3 ml prélevé de l'aiguille (type Whitacre) directement en tube en polypropylène. Le prélèvement est gardé à 4 °C et transporté au laboratoire sur glace dans les meilleurs délais. Toutes les informations préanalytiques liées à ces étapes sont à reporter sur la feuille de suivi du prélèvement qui sera vérifiée à l'arrivée au laboratoire. Ces recommandations soulignent qu'il est généralement déconseillé d'utiliser pour l'analyse du LCR les 4 premières gouttes provenant de la ponction lombaire, afin de minimiser la contamination sérique du LCR. En tout état de cause, il ne faut pas utiliser ces gouttes pour l'analyse protéomique. Le temps maximum entre prélèvement et traitement au laboratoire doit être de 4 heures. Un aliquot de LCR permettra de mesurer la protéinorachie et la cytologie.

Le traitement consiste en 2 centrifugations successives (10 min à 1 000 g à 4 °C, puis 10 min à 14 000-20 000 g à 4 °C). L'aspect du LCR après la première centrifugation est à noter. Le surnageant est aliquoté par 500 μ l en tube de polypropylène.

Pour le stockage, la conservation est immédiate à - 80 °C. Il est recommandé d'éviter toute conservation temporaire à - 20 °C (l'indiquer sur la feuille de suivi avec sa durée si elle est inévitable).

Une décongélation dans la glace pendant 15 minutes est conseillée. Après une centrifugation de 5 minutes à 1 000 g, il est possible d'utiliser le LCR, puis d'aliquoter dans des tubes secondaires le volume restant.

La revue de la littérature de Yuan et Desiderio publiée en 2005 (30) décrit les différentes méthodes utilisées pour l'analyse protéomique des LCR humains (électrophorèse bidimensionnelle en phase liquide, spectrométrie de masse...). Seule la partie touchant à la préparation de l'échantillon entre dans le champ de notre argumentaire. Le LCR contient une forte concentration en sels et une faible concentration en protéines. Parmi les méthodes de dessalage existantes (ultrafiltration, dialyse, précipitation de protéines et colonne Bio-Spin), l'utilisation d'une colonne Bio-Spin permet d'obtenir un bon rendement protéique et améliore la résolution du gel d'électrophorèse (91 % à 99 %).

Enfin l'étude de Kaiser *et al.* publiée en 2007 (31) a évalué l'influence d'une congélation différée jusqu'à 24 heures du LCR (n = 12) quant à la concentration de biomarqueurs dont le dosage est nécessaire au diagnostic différentiel de la maladie d'Alzheimer, comparativement

à une congélation immédiate à - 80 °C. Les résultats montrent que seul le dosage de la protéine bêta-amyloïde nécessite une congélation immédiate (concentration significativement augmentée à 24 h, $p < 0,05$), les autres marqueurs (protéines phospho tau et tau totales) restent stables dans un délai de 2 à 24 heures à température ambiante. Ces résultats soulignent l'importance de procédures standardisées quant au délai de congélation dans l'analyse des LCR.

3.5.4 Autre liquide biologique

Une étude de Maier *et al.* en 2006 (32) a évalué les effets de la congélation sur la détermination quantitative d'une cytokine (TGF- β 2) dans l'humeur aqueuse, et a testé différentes conditions d'analyse : le délai du dosage (immédiatement ou dans les 3 h suivant le prélèvement) avec ou sans activation acide, après congélation. Les résultats montrent qu'une congélation à - 80 °C (de 1 à 222 jours) diminue considérablement (jusqu'à un facteur 4,4) le taux mesuré de cytokine.

3.6 Analyses protéomiques et tissus congelés

La revue de la littérature d'Ericsson *et al.* publiée en 2006 (33) souligne les possibilités et les limites d'analyse des protéines à partir de tissus cryopréservés. Le délai entre l'excision d'un tissu et sa congélation peut significativement altérer le protéome : dès que le tissu est coupé de la circulation, il existe une dégradation artéfactuelle des métabolites (en quelques secondes voire quelques minutes) et des macromolécules (en quelques minutes voire quelques heures). La protéolyse a une cinétique spécifique à chaque tissu. Les auteurs recommandent que les tissus destinés à des analyses protéomiques soient congelés le plus vite possible en azote liquide à -196 °C ou en isopentane refroidi sur glace à - 78 °C. Ils rapportent des travaux (34) où une bonne stabilité des marqueurs protéiques (issus du sang) était observée jusqu'à 59 mois à - 70 °C, mais ils encouragent à ce que d'autres études soient menées afin de garantir une bonne conservation sur le long terme. Ils rapportent également une étude *Surface-enhanced laser desorption/ionization* SELDI-TOF (appartenant à la *Human Proteome Organisation : HUPO Plasma Proteome Project*) (35), où les extraits protéiques de sang conservés pendant 2 mois, que ce soit à - 20 °C, - 80 °C ou en azote liquide, étaient indifféremment de bonne qualité.

3.7 Influence de la cryopréservation sur les fonctions et les caractéristiques cellulaires

Une revue et deux études (36-38) ont décrit et évalué la variabilité des fonctions et des caractéristiques de certaines cellules suite à leur congélation.

La revue de la littérature de Li publiée en 2007 (37) décrit la méthode d'isolation d'hépatocytes (2 digestions successives à la collagénase) et leur cryopréservation. Ils sont conservés en azote liquide (température inférieure à - 150 °C) en utilisant du DMSO : plus de 90 % des hépatocytes cryopréservés restent viables sur une longue période (années) tout en gardant une bonne activité enzymatique nécessaire aux métabolismes des médicaments (isoforme P450, UDP-dépendante glucuronosyl transférase et sulfotransférase, glutathion S-transférase). Selon l'expérience de l'auteur, le succès d'une bonne cryopréservation tient en une isolation des hépatocytes sans dommage causé à la membrane plasmique.

Les travaux de Owen *et al.* publiés en 2007 (36) montrent que la cryopréservation à long terme (300 jours en phase vapeur d'azote liquide à - 135 °C) de cellules mononucléées de sang périphérique (*peripheral blood mononuclear cell* : PBMC) conduit à une diminution des réponses de cellules T CD4+ et biaise l'expression des marqueurs phénotypiques des cellules T. Les PBMC ont été congelés à une concentration de 5 à 10 millions de cellules par

ml, avec 10 % de DMSO, 65 % de *fetal bovine serum* (FBS) et 25 % de *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI), en aliquotes d'1 ml. Ces expériences ont été dupliquées dans un laboratoire indépendant et les résultats ont été confirmés.

Le champ de l'étude de Rust *et al.* en 2006 (38) concerne les traitements par greffes osseuses autologues ou allogéniques. L'objectif est de déterminer si une méthode simple de cryopréservation (10 % de DMSO en sérum de veau fœtal (SVF), en azote liquide pendant 7 jours) a un effet sur la différenciation ostéogénique ou sur la croissance de cellules progénitrices d'ostéoblastes (*origin binding protein cells* : OBPC), isolées à partir de moelle osseuse humaine. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les cellules congelées et les cellules témoins quant à la différenciation ostéoblastique (évaluée par la production de protéines ostéoblastiques après stimulation et de protéines ostéogéniques). La cryopréservation n'affecte pas non plus leur capacité proliférative (après 5 jours de culture).

Au final, la cryopréservation affecte différemment les caractéristiques cellulaires selon leur type et les modalités de conservation.

3.8 Mécanismes d'altérations cellulaires au cours de la cryopréservation

La recherche et l'analyse de la littérature ont permis de mettre en évidence de nombreuses revues en cryobiologie (39-44). Celles de Meryman (39) et de Gao et Critser (40) sont les plus complètes et les plus informatives.

L'objectif de la revue de Meryman (39) est de dégager les principaux principes fondamentaux de la congélation de cellules, de l'addition et de l'élimination des agents cryoprotecteurs. L'auteur distingue les 4 stratégies de cryopréservation suivantes et en détaille les avantages et les inconvénients :

- la congélation « contrôlée », qui doit être optimisée au vue des nombreuses variables entrant en jeu (perméabilité membranaire et tolérance à la déshydratation en fonction du type de cellule ; viscosité, toxicité et concentration de l'agent cryoprotecteur tel que le DMSO...) ; pour un stockage à long terme, il est recommandé d'utiliser dans ce cas l'azote liquide ;
- la congélation au moyen de polymères, qui met en jeu moins de variables, ce qui la rend plus applicable (notamment par une concentration faible d'agent cryoprotecteur) ; un stockage à - 80 °C est habituellement recommandé mais sur du long terme l'azote liquide est préférable ;
- la congélation ultrarapide, qui ne nécessite pas d'agents cryoprotecteurs mais doit se limiter à une faible suspension cellulaire ;
- la congélation « à l'équilibre », qui est la plus utilisée en routine grâce à l'utilisation de glycérol (non toxique, cliniquement acceptable et utilisé à une faible concentration) ; simple et sans effets indésirables sur la viabilité cellulaire, elle permet une congélation pendant de nombreuses années à - 80 °C.

La revue de cryobiologie publiée par Gao et Critser (40) rapporte les facteurs et les mécanismes d'altération cellulaire observée aux températures intermédiaires (entre - 15 et - 60 °C), zone que les cellules traversent 2 fois, lors de la congélation elle-même puis lors de la décongélation. Elle aborde également les mesures préventives de cette altération comme la vitrification (avec une vitesse de congélation supérieure à 10 millions de degrés par seconde) ou le refroidissement lent par le biais de cryoprotecteurs. Toute congélation/décongélation comporte les étapes majeures dans l'ordre suivant :

- ajouter un agent cryoprotecteur aux cellules ou aux tissus ;
- refroidir les cellules ou les tissus à une température basse (- 196 °C qui est la température de l'azote liquide à la pression de 1 atm : atmosphère) à laquelle les cellules seront stockées ;

- réchauffer les cellules et les tissus ;
- enlever les cryoprotecteurs.

Durant les refroidissements lents, la préservation cellulaire est possible en recourant à des cryoprotecteurs comme le glycérol (ou encore le DMSO, l'éthylène glycol, le méthanol, le propylène glycol, le diméthyl acétamide). D'autres types de cryoprotecteurs composés de solutés non perméables comme les sucres ou les molécules du groupement moléculaire peuvent également être utilisés.

La revue de la littérature de Scott *et al.* (41) présente un état des lieux de la conservation des globules rouges (froid, congélation, lyophilisation) à des fins thérapeutiques. Elle aborde l'historique, les pratiques actuelles et les technologies émergentes de la conservation des cellules sanguines rouges : stockage dans le froid, cryopréservation, lyophilisation. Cette revue détaille :

- les mécanismes d'altérations causées par la congélation ;
- les cryoprotecteurs perméables au travers de la membrane plasmique (glycérol et DMSO) et non perméables (sucres, polymères, polyvinyl pyrrolidone, polyéthylène oxide...);
- la lyophilisation.

En tenant compte des différents paramètres précités, les auteurs concluent que la conservation des globules rouges doit s'orienter sur des méthodes s'accommodant d'impératifs économiques en termes de stockage et de distribution, intégrés aux pratiques courantes de constitution de banques de sang.

La revue de la littérature de Wang (42) rapporte les effets et les mécanismes d'action de protéines cryoprotectrices (*antifreeze proteins*) (AFP) qui peuvent inhiber la formation de glace, stabiliser la membrane plasmique et améliorer le taux de survie des globules rouges par exemple, mais qui peuvent également avoir des effets toxiques. Cela dépend de la combinaison précise d'un certain nombre de facteurs : le protocole spécifique de cryopréservation, la concentration en AFP, la composition et la concentration des cryoprotecteurs et les caractéristiques physiologiques des cellules.

La revue de la littérature de Pegg (43) aborde différents aspects de la cryopréservation : les altérations cellulaires causées par la glace (dont le rôle est majeur au niveau extracellulaire pour la congélation des tissus), les effets osmotiques et toxiques de la concentration des cryoprotecteurs, ainsi que les modélisations mathématiques permettant d'optimiser la cryopréservation de cellules et de tissus. L'auteur conclut que la vitrification est une perspective intéressante vers laquelle s'orientent les systèmes encore réfractaires à la cryopréservation.

La revue de la littérature de Bakhach *et al.* (44) touche essentiellement au domaine des greffes mais elle rappelle les principes fondamentaux de la cryobiologie, en mettant l'accent sur les phénomènes de transfert de liquide entre compartiments intraextracellulaires et sur le processus de formation de cristaux de glace au cours du refroidissement. Elle souligne la difficulté qui est d'adapter les techniques de cryopréservation à un tissu composite où chaque tissu possède sa propre réactivité et résistance aux phénomènes de congélation. Les différents processus physicochimiques et leurs conséquences sur les tissus biologiques au cours de la cryopréservation sont évoqués en fonction des différentes substances cryoprotectrices actuelles qui sont :

- les cryoprotecteurs diffusibles ou à action intracellulaire : de faible poids moléculaire inférieur à 400, ils traversent la membrane cellulaire ; les plus utilisés sont le DMSO, le glycérol et le 1,2 propanediol ;

- les cryoprotecteurs non diffusibles ou à action extracellulaire : de fort poids moléculaire, ils ne traversent pas la membrane cellulaire ; il en existe plusieurs comme la polyvinylpyrrolidone, l'hydroxyéthyle starch et certains sucres.

Cette revue rapporte également les résultats de différents travaux expérimentaux sur la cryopréservation de structures tissulaires composites comme la peau, les vaisseaux, l'os, le cartilage, le périoste, le tissu nerveux, la cornée et différents organes pleins, dont les protocoles n'entrent pas dans le champ de cet argumentaire.

Au final, la décongélation est une phase pendant laquelle les cellules subissent autant d'altérations que pendant la phase de congélation elle-même. Il est indispensable d'observer un protocole ayant évalué notamment la concentration en protéines cryoprotectrices nécessaires afin de minimiser les altérations cellulaires.

4 Exemples de biobanques

La constitution de deux biobanques, l'une danoise (45), l'autre autrichienne (46), est citée à titre d'exemple.

Depuis 1982, le Danemark a constitué une biobanque en stockant systématiquement les prélèvements résiduels de sang de nouveaux-nés effectués sur support adsorbant (*dried blood spot samples*) à - 20 °C (45). Ce mode de conservation permet de diagnostiquer des maladies génétiques par tests biochimiques ou de génétique moléculaire. Cette démarche ne fait pas consensus au niveau international. Depuis 1993, une législation spécifique encadre la gestion de cette biobanque. Ses objectifs sont de permettre :

- le dépistage de certaines maladies et leur traitement (répétition possible des tests ; mise en place d'une démarche qualité ; amélioration des tests) ;
- le diagnostic d'autres maladies durant l'enfance ;
- la réalisation de projets de recherche (études rétrospectives épidémiologiques à partir de l'analyse de marqueurs moléculaires ou d'allèles).

Dans le cadre du programme autrichien sur le génome, une biobanque (46) a été constituée à partir du recueil de tissus pathologiques et normaux correspondants, représentatifs de la fréquence naturelle de survenue de ces pathologies au sein d'une population de plus de 700 000 patients. Depuis 2003, les tissus recueillis ont ciblé les principaux cancers (côlon, poumon, foie) ainsi que les hépatopathies métaboliques et les organes atteints de syndrome métabolique. Elle réunit des échantillons sanguins, et essentiellement des tissus inclus en paraffine (plus de 3 millions) et des échantillons congelés (plus de 30 000). Il est intéressant de noter la répartition par organe (estomac, gros intestin et peau sont les plus nombreux) et par maladie (maladie inflammatoire, hyperplasie, adénome) calculée sur les tissus inclus en paraffine. Ces échantillons ont été préservés à visée diagnostique suite à un acte chirurgical (la congélation a été réalisée en 10 à 20 min), et récemment la biobanque a étendu le recueil des prélèvements congelés à partir de pièce opératoire sans visée diagnostique. Parallèlement différentes informations concernant le patient ont été documentées par le biais de questionnaire (antécédents, style de vie...).

Cet article décrit également l'organisation générale de cette biobanque (techniques de vérification de la qualité des échantillons conservés ; plates-formes d'analyse ; gestion et sécurité des données informatisées ; aspects éthiques, réglementaires et sociaux), mais sans application pour cet argumentaire, les échantillons étant essentiellement des tissus inclus en paraffine.

5 Littérature sur la liste des informations minimales communes associées à chaque prélèvement congelé

Ce chapitre se fonde essentiellement sur l'analyse et la synthèse des publications suivantes :

- les lignes directrices de l'OCDE édictées en 2007 (5) ; qui ne concernent pas les prélèvements issus du soin ;
- le catalogue national des données rassemblant les critères minimaux de description des échantillons cryopréservés, élaboré par l'Institut national du cancer (INCa) en 2006 (2) ;
- la banque d'items à recueillir pour tracer la phase pré-analytique des échantillons sur lesquels sont réalisées des analyses de biologie médicale (constitution de biothèque incluse) élaborée par la Direction générale de la santé et la Commission nationale de contrôle des analyses de biologie médicale (47).

Les lignes directrices de l'OCDE relatives aux pratiques exemplaires concernant les matériels biologiques humains (5) ont été élaborées par des experts nationaux, des experts invités et des observateurs (pays non membres), réunis au sein d'un groupe d'étude sur les CRB (cf. annexe 1). Elles fournissent un ensemble minimal de données (EMD) et un ensemble de données recommandées (EDR) pour l'ADN (cf. tableau 2) et pour les tissus et cellules isolées (cf. tableau 3). Elles concernent tous les CRB, la biosécurité, le domaine des micro-organismes, les matériels biologiques humains et les ressources biologiques animales et végétales, et ont été obtenues par consensus après des entretiens directs, de vastes consultations écrites et une étude pilote testant leur validité et leur exploitabilité.

Elles traitent tout particulièrement de la gestion documentaire et informatique touchant notamment au type de données, à la sécurité des données et à la publication sur Internet du catalogue du matériel biologique humain accessible.

Tableau 2. Ensemble minimal de données (EMD) et ensemble de données recommandées (EDR) pour l'ADN d'après l'OCDE, 2007 (5)

| EMD (les données non suivies d'un astérisque doivent être communiquées à l'utilisateur) | EDR |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> - Identification du déposant * - Numéro d'identification de la famille * - Numéro d'identification du donneur * - Numéro d'identification du matériel biologique - Consentement/approbation du comité d'éthique (O/N) - Sexe et âge du donneur - Pathologie familiale avec numéro OMIM¹ - État du matériel biologique (par exemple, affecté, non affecté, indication du diagnostic suspecté) - Date, année et mois de la collecte du matériel - Nature du matériel biologique humain dont l'ADN a été extrait (par exemple, affecté, non affecté) - Conditions de conservation ou de stockage - Quantité de matériel biologique <p>Pour l'ADN : concentration en µg/µl et nombre de µl</p> | <ul style="list-style-type: none"> - Consentement - Arbre généalogique - Disponibilité d'échantillons prélevés sur des parents - Forme sous laquelle le matériel est distribué - Délai de livraison maximal (en fonction de la nature du matériel biologique) - Caryotype - Nombre de familles et de sujets disponibles pour une maladie spécifique - Informations détaillées sur le traitement/la médication - Informations sur l'issue de la maladie - Données cliniques associées (par exemple, paramètres de laboratoire, données d'imagerie, données moléculaires) - Informations sur le style de vie - Informations sur les antécédents familiaux - Empreinte génétique ou autre méthode d'authentification - Niveau de danger |

¹. OMIMTM (*Online Mendelian Inheritance in Man*TM) : base de données contenant un catalogue des gènes et des désordres génétiques humains

Tableau 3. Ensemble minimal de données (EMD) et ensemble de données recommandées (EDR) pour les tissus et cellules isolées d'après l'OCDE, 2007 (5)

| EMD (les données non suivies d'un astérisque doivent être communiquées à l'utilisateur) | EDR |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> - Identification du déposant * - Numéro d'identification du donneur * - Numéro d'identification du matériel biologique - Consentement/approbation du comité d'éthique - Sexe et âge du donneur - Diagnostic de la maladie - État du matériel biologique (par exemple, affecté, non affecté, indication du diagnostic suspecté, mention du stade de la tumeur) - Origine du matériel biologique (organe et tissu) - Date, année et mois de la collecte du matériel biologique - Niveau de danger - Nature du matériel biologique humain (par exemple, tissu, lame, cellules, culot) - Documents sur la méthode de traitement (par exemple, conservation chimique) - Conditions de conservation ou de stockage (azote liquide, - 80 °C, température ambiante) | <ul style="list-style-type: none"> - Consentement - Diagnostic détaillé - Matériel biologique apparenté (ADN, biopsie) - Quantité ou concentration disponible - Caractéristiques de l'échantillon (par exemple, composition de l'échantillon, contenu, cellules tumorales) - Délai de congélation - Forme sous laquelle le matériel est distribué - Délai de livraison maximal (selon la nature du matériel biologique) - Informations sur le traitement/la médication - Informations sur l'issue de la maladie - Données cliniques associées (par exemple, paramètres de laboratoire, données d'imagerie, données moléculaires) - Informations sur le style de vie - Informations sur les antécédents familiaux - Empreinte génétique ou autre méthode d'authentification |

Le document de travail « Banque d'items de la phase pré-analytique » de la Direction générale de la santé et de la Commission nationale de contrôle des analyses de biologie médicale (47) rapporte de façon exhaustive les items à recueillir pour assurer et tracer la phase préanalytique, nécessaires à la réalisation d'analyses de biologie médicale (dont la constitution de biothèque), notamment en ce qui concerne :

- le patient (statut physiologique, facteurs environnementaux, traitements en cours ou passés, préparation du patient) ;
- le prélèvement (lieu, modalités, préleveur, techniques) ;
- l'échantillon (sang, urine, selles, LCR, autres liquides biologiques, cellules, tissus et organes, autres) ;
- le transport des échantillons (identification des opérateurs, transmission interlaboratoire, enregistrements, moyens de transport) ;
- la réception des échantillons au laboratoire (identification des opérateurs, dates et horaires, délais de transmission requis, urgence, utilisation).

Il rappelle que la norme ISO 8402 (48) définit la traçabilité comme « l'aptitude à retrouver l'historique, l'utilisation ou la localisation d'une entité au moyen d'identifications enregistrées ».

Le groupe de travail intercancéro-pôles (sur « les conditions d'interopérabilité des tumorothèques ») mis en place par l'INCa en 2006 a complété la liste issue du travail du groupe lui-même mis en place par la Direction de l'hospitalisation et de l'organisation des soins (DHOS) (sur le « Projet de mise en réseau informatisé des banques hospitalières de cellules et tissus tumoraux cryopréservés »). Une liste d'informations, une quarantaine au total, a été retenue. Ces informations correspondent à des critères minimaux de description des échantillons cryopréservés, qui constituent la base d'un catalogue national informatisé (2).

Les renseignements notifiés sont décrits en annexe 2. Ils concernent le site de la tumorothèque, le patient, la maladie, le prélèvement et le type d'échantillon conservé. La majorité de ces items sont transposables à la constitution de toute biobanque.

Particularité liée au recueil d'information concernant le prélèvement de liquide céphalo-rachidien :

- l'étude de You *et al.* (49) décrit l'impact d'une contamination du LCR par du sang lors de la réalisation du prélèvement sur les analyses protéomiques. L'analyse du prélèvement contaminé montre une altération importante du profil des protéines du LCR, gênant l'identification de potentiels biomarqueurs. L'identification de différentes protéines (hémoglobine, catalase, peroxyredoxine et anhydrase carbonique) témoigne de cette contamination sanguine. Il est donc indispensable de documenter ce type d'information pour une interprétation correcte des résultats.

6 Assurance qualité

Ce chapitre n'a pas fait l'objet d'une recherche systématique de la littérature ni d'une évaluation mais il a pour but de donner les éléments pouvant aider à la mise en place d'une démarche qualité.

En annexe 6, un schéma organisationnel récapitule les étapes clés de la cryopréservation de tissus, cellules ou liquides biologiques issus du soin.

Ont été identifiés et retenus :

- le document élaboré par l'Afnor (NF S96-900) publié en juillet 2008 concernant le système de management d'un CRB et la qualité des ressources biologiques d'origine humaine et microbienne (3).

Il a été élaboré en s'appuyant sur les documents déjà existants et en particulier, la norme internationale ISO 9001 de 2000 (50) et les lignes directrices de l'OCDE (cf. ci-après) (5). Ce document s'applique aux organismes qui ont pour missions principales de conserver et de mettre à disposition, dans le respect de la législation en vigueur, des collections de ressources biologiques humaines et/ou microbiennes en particulier à des fins de recherche, d'éducation et de valorisation industrielle. Il s'inscrit sans en détailler le contenu, dans le cadre juridique et éthique en vigueur, au cœur de l'activité des infrastructures.

Ce document fournit des prescriptions générales pour un système de management de la qualité (contrôles qualité de la ressource biologique, traçabilité, réception, préparation, conservation, transports, mise à disposition et système d'information) dont l'objectif est de permettre la bonne gestion d'un CRB dans le cadre d'une démarche qualité. Son ambition est de faciliter la conservation et les échanges de matériels biologiques de qualité.

Les ressources biologiques d'origine humaine peuvent être issues d'activités de diagnostic. Les collections à usage thérapeutique ne sont pas concernées par ce document ;

- les lignes directrices de l'OCDE relatives aux pratiques exemplaires concernant les matériels biologiques humains (conservés au sein de CRB) édictées en avril 2007 (5) par des experts nationaux, des experts invités et des observateurs (pays non membres), réunis au sein d'un groupe d'étude sur les CRB (cf. annexe 1). Des lignes directrices relatives aux pratiques exemplaires concernant tous les CRB, la biosécurité, le domaine des micro-organismes, les matériels biologiques humains et les ressources biologiques animales et végétales, ont été obtenues par consensus après des entretiens directs, de vastes consultations écrites et une étude pilote testant leur validité et leur exploitabilité.

Parmi les lignes directrices relatives aux pratiques exemplaires concernant les matériels biologiques humains, sont abordés l'audit qualité et l'examen de la qualité : audits internes et externes, organisés à intervalles réguliers et dûment documentés. L'examen de la qualité doit être intégré à l'acquisition, au traitement, à la réalisation de tests, au stockage et à la fourniture du matériel (cf. *supra* procédures de contrôle qualité recommandées pour ADN, pour tissus et cellules isolées).

Un précédent rapport de l'OCDE portant sur les « Prescriptions relatives au fonctionnement des centres de ressources biologiques » fournit les règles générales de certification des CRB, les mécanismes de certification des CRB et les critères généraux applicables aux CRB (51,52) ;

- un référentiel de certification des plates-formes de ressources biologiques (guide pour remplir la grille d'auto-évaluation), élaboré par l'Assistance publique des hôpitaux de Paris (AP-HP) en 2006 (53) qui est constitué d'une liste précieuse de questions visant à guider le remplissage d'une grille d'auto-évaluation dans le cadre de la mise en place d'une démarche qualité. Il vise à la certification des plates-formes de ressources biologiques. Certaines questions renvoient à des exigences de la norme ISO 9001 de 2000. Ce guide comporte de nombreux points en relation avec le champ de cet argumentaire :
 - ▶ l'information et le consentement (documents réglementaires),
 - ▶ l'acheminement des prélèvements (conditions de transport),
 - ▶ la réception du prélèvement et le contrôle de sa conformité,
 - ▶ l'enregistrement des données associées,
 - ▶ la préparation de l'échantillon (tissus, cellules, sérums, plasma et produits dérivés),
 - ▶ la conservation de l'échantillon et la traçabilité des conditions de conservation : les locaux de stockage (description, accès, maintenance et dépannage des installations de sécurité) ; les équipements (fonctionnement, maintenance et dépannage des équipements),
 - ▶ l'informatique (procédures, environnement, sauvegardes, maintenance, exploitation),
 - ▶ la mise à disposition et la valorisation des échantillons ;

- un document élaboré par l'Agence de la biomédecine en 2004 sur le « Système de management de la qualité d'une banque de tissus » (54) qui constitue un manuel à remplir en pratique pour la mise en œuvre d'un système d'assurance qualité d'une banque de tissus ;
- concernant plus particulièrement la conservation de tissus, les « *Standard operating procedures for the collection of fresh frozen tissue samples* » élaborées en 2007 (8) qui recommandent la mise en place d'une démarche qualité ciblant les points suivants :
 - dans la première année d'élaboration de la biobanque, un institut doit vérifier la qualité de 2 % des échantillons, puis de 1 % annuellement ; cette vérification ciblera les données, l'équipement et les coupes congelées,
 - un anatomopathologiste confirmera le diagnostic et la représentativité de l'échantillon sur coupes congelées,
 - de l'ARN sera extrait et sa qualité et sa concentration seront vérifiées sur gel d'agarose (ou par bioanalyseur),
 - l'exactitude des données enregistrées sera vérifiée, ainsi que l'identification, l'inventaire et la localisation physique des échantillons ; la vérification portera également sur les contenants, leur durabilité dans le temps ;
- en 2005, une évaluation portant sur le réseau des biobanques suédoises (biobanques de tissus, d'échantillons réunis à des fins de recherches sur le cancer, de cohortes épidémiologiques, de microbiologie) (55) réalisée selon une liste de critères touchant à des aspects généraux, éthiques, méthodologiques, de sécurité, de confidentialité et d'accès. Une biobanque est définie comme « le dépôt à long terme d'échantillons biologiques issus d'une population humaine identifiable, son contenu est approprié, tant en qualité qu'en quantité, à des analyses biomédicales, que ce soit dans le champ d'études épidémiologiques, de recherches cliniques ou à des fins individuelles ». Sur la base des résultats de cette évaluation, des recommandations générales d'organisation des biobanques ont été proposées (sans autre analyse de la littérature) ;
- le site du *College of American Pathologists* qui met à disposition un catalogue d'outils de gestion de la qualité des pratiques des laboratoires, permettant la mise en œuvre d'un réel audit interne, avec des commentaires qui guident l'utilisateur dans l'amélioration des pratiques
www.cap.org/apps/docs/proficiency_testing/qmt_catalog/2008_qmt_catalog.pdf.

7 Extraction des acides nucléiques

Ce chapitre n'a pas fait l'objet d'une recherche systématique de la littérature ni d'une évaluation mais il a pour but de donner les références clés sur ce thème.

Les recommandations proposées font l'objet d'un consensus et sont tirées des recommandations, manuels de référence en laboratoire et protocoles techniques identifiés suivants (liste non exhaustive) :

- la publication de Hughes *et al.* en 2006 (56) rapporte les recommandations en matière de prélèvement, qualité et contrôle des ARN et les méthodes de la PCR quantitative en temps réel. Elles sont issues de la réunion de consensus sur la quantification des transcrits BCR-ABL dans la leucémie myéloïde chronique, qui s'est tenue à Bethesda en octobre 2005 ;

- les SOP européennes publiées par Schmitt *et al.* en 2007 sous l'égide de l'*European Organisation for Research and Treatment of Cancer* (EORTC) (57) (la méthode d'élaboration n'est pas explicitée) décrivent la désagrégation d'un tissu tumoral dans son état congelé et l'extraction permettant une évaluation quantitative des marqueurs associés au tissu tumoral (ADN, ARNm ou protéines), que ce soit à visée pronostique ou thérapeutique (choix du traitement ou identification de la réponse au traitement) ;
- le manuel de laboratoire de Spector *et al.* publié en 1997 (58) regroupe les protocoles pratiques et les techniques de référence à l'usage des chercheurs, dans le domaine de la biologie cellulaire ;
- le manuel de laboratoire de Dieffenbach et Dveksler publié en 1995 (59) propose un inventaire de méthodes dans le champ de la PCR. Il contient notamment des recommandations pour l'organisation d'un laboratoire de PCR et la préparation des échantillons pour la PCR ;
- le manuel de laboratoire de référence dans le domaine de la biologie moléculaire de Sambrook *et al.* publié en 1989 (60) propose notamment les protocoles de base pour l'extraction des acides nucléiques ;
- le manuel publié par Birren en 1999 (61) est une référence pour les techniques de base de l'analyse génomique. Il contient notamment des recommandations relatives au stockage des acides nucléiques ;
- la revue de Wilson publiée en 1997 (62) établit la liste des inhibiteurs d'amplification par PCR et discute les méthodes pour atténuer leurs effets, dans le domaine de la microbiologie clinique, alimentaire ou environnementale ;
- la revue de Bastard *et al.* publiée en 2002 (63) fait le point sur les méthodes d'extraction des ARN totaux et poly(A), sur les conditions de conservation des ARN extraits, et sur les méthodes de contrôle de la qualité et de la concentration des ARN ;
- la publication de Kwok et Higuchi en 1989 (64) est la référence sur les dispositions permettant de garantir la maîtrise des produits de PCR dans un laboratoire d'analyse ;
- l'étude de Beillard *et al.* publiée en 2003 (65) et réalisée sous l'égide du *Europe against cancer program* illustre le recours à la *quantitative reverse-transcriptase PCR* (RQ-PCR) pour la définition des gènes de contrôle les plus appropriés, afin de quantifier la maladie résiduelle chez les patients traités pour une leucémie ;
- quatre études de faisabilité ou d'efficacité (66-69) évaluent un système de recueil du sang et de la moelle osseuse permettant l'obtention d'ARN stables (*PAXgene RNA*) par comparaison aux méthodes standard ;
- l'étude d'Imbeaud *et al.* publiée en 2005 (70) est une évaluation comparative des indicateurs de qualité électrophorétiques disponibles pour mesurer la qualité des extraits d'ARN ;
- les publications de Chomczynski et Sacchi en 1987 et 2006 (71,72) reprennent la méthode d'extraction des ARN totaux au phénol acide.

8 Aspects juridiques touchant à la cryopréservation de cellules, tissus et liquides biologiques issus du soin

La conservation de tissus, cellules et autres dérivés issus du corps humain est réalisée au sein de « banques biologiques » (biothèques, sérothèques, banques de tissus, tumorothèques, etc.), voire dans des « plate-formes » et « centres de ressources biologiques ». Effectuée le plus souvent en milieu hospitalier ou dans des instituts de recherche publics, elle peut aussi faire intervenir des opérateurs privés spécialisés dans ces activités.

Le développement de la génomique, des biotechnologies et des sciences de la vie repose en grande partie sur la conservation d'échantillons humains, et de la constitution organisée et pérenne de banques biologiques.

La conservation de ce « matériel biologique », puis son utilisation, longtemps dépourvues de cadre juridique clair, sont à présent strictement encadrées, depuis les lois de bioéthique du 29 juillet 1994 (73) et du 6 août 2004 (74), par des textes légaux et réglementaires, eux-mêmes fondés pour partie sur différentes dispositions du droit communautaire. La loi affirme avec force une série de principes et prévoit pour les faire respecter de lourdes sanctions pénales. Par son caractère impératif, elle impose aujourd'hui une grande rigueur dans la gestion de cette activité. Elle traduit des préoccupations majeures de sécurité sanitaire et d'éthique.

Les règles et principes rappelés dans ce chapitre sont tirés du « Vademecum juridique pour un gestionnaire de banque biologique » élaboré par l'Assistance publique des hôpitaux de Paris en 2007 (75).

Les recommandations émises portent sur des points de réflexion soulevés par la réglementation à propos du consentement du patient en cas de changement de finalité de l'utilisation des échantillons déjà conservés ou en cas d'examen des caractéristiques génétiques. Elles abordent également l'accès des patients ou de leurs ayants droit à des échantillons.

8.1 Réglementation s'appliquant à la conservation d'échantillons biologiques humains à de seules fins diagnostiques

La conservation d'échantillons biologiques humains à des fins diagnostiques est une nécessité dans de nombreux domaines de l'activité médicale. Au-delà du temps nécessaire à la réalisation des examens biologiques, il est essentiel, dans certains cas, de pouvoir vérifier *a posteriori* la validité de ces résultats d'examens ou de procéder à de nouvelles investigations.

Cette conservation, le plus souvent très limitée dans le temps, ne requiert pas de formalités d'autorisation ou de déclaration spécifiques. Les prélèvements ainsi effectués font en effet partie intégrante des activités de diagnostic et de soins, qui doivent, elles, faire l'objet d'une autorisation dans le cadre de la planification sanitaire (art. L. 6122-1 et suivants du Code de la santé publique [CSP]).

L'absence de nécessité d'autorisation pour la conservation des échantillons dans ce cadre ne vaut cependant que si les échantillons :

- ne sont utilisés que pour ce seul usage diagnostique ;
- ne feront jamais l'objet de recherches ou de cession, à titre gratuit ou à titre onéreux ;
- et seront logiquement détruits dès qu'ils ne présenteront plus d'intérêt diagnostique, et notamment en cas de décès du patient.

Différentes dispositions s'appliquent en fonction des prélèvements analysés.

8.1.1 Dispositions pour les prélèvements pour analyse de biologie médicale

Le guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale (GBEA, arrêté ministériel du 26 novembre 1999), qui figure en annexe de l'arrêté du 26 novembre 1999 (76), modifié par l'arrêté du 26 avril 2002 (77), comprend des dispositions sur la conservation des échantillons biologiques (« échantillons obtenus par recueil ou acte de prélèvement et sur lesquels vont être effectuées une ou plusieurs analyses de biologie médicale ») et le cas échéant des échantillons de calibrage et de contrôle. Il prévoit notamment que :

- les conditions de conservation doivent être conformes aux règles de sécurité et d'hygiène en vigueur pour éviter toute contamination du personnel ou toute pollution ;
- après exécution des analyses, les échantillons peuvent être conservés pour permettre une comparaison ou une vérification ultérieure. Cette conservation est obligatoire pour certains examens (annexe C du GBEA, voir ci-dessous). À défaut, le GBEA prévoit que « la durée de conservation pour chaque cas particulier doit, si elle n'est pas réglementée, être fixée par le biologiste et inscrite sur les procédures opératoires » ;
- les conditions d'identification, de fermeture des récipients et de température de conservation doivent être rigoureusement observées pour éviter tout risque d'erreur, de modification qualitative et/ou quantitative et de contamination.

La conservation de ces échantillons biologiques ne donne lieu aux formalités d'autorisation ou de déclaration que lorsqu'en sus de la visée diagnostique, elle est effectuée pour des raisons thérapeutiques ou scientifiques.

8.1.2 Dispositions pour les examens d'anatomie et de cytologie pathologiques

Cet argumentaire traite des lames et blocs congelés dans le cadre des travaux d'anatomie pathologique (issus de pièces opératoires ou de biopsie prélevées sur des patients vivants). Ces échantillons ne sont mentionnés par le Code de la santé publique (CSP) que pour l'exercice de cette spécialité au sein des laboratoires privés d'analyses de biologie médicale : l'article R. 6211-44 prévoit que les médecins concernés, d'exercice privé, doivent conserver « pendant dix ans les blocs d'inclusion et documents microscopiques histopathologiques et les documents microscopiques cytopathologiques leur ayant permis d'établir un diagnostic, que celui-ci ait ou non fait apparaître une pathologie ».

Dans les établissements publics de santé ou privés participant au service public hospitalier, à défaut de dispositions spécifiques, il avait parfois été considéré que ces échantillons constituent des informations médicales dans le sens de la loi n° 2002-303 du 4 mars 2002 relative aux droits des malades et à la qualité du système de santé (78), à savoir des informations concernant la santé des patients, détenues par l'établissement de santé, « formalisées », contribuant à l'élaboration et au suivi du diagnostic et du traitement ou d'une action de prévention (art. L. 1111-7, CSP). Une décision de la juridiction administrative (cour administrative d'appel de Paris, AP-HP c/C., 13 février 2008, n°06PA02800), jugeant que le matériel biologique détenu sous forme de lame ou de bloc d'anatomie biologique ne constitue pas une « information formalisée », a récemment mis en cause ce statut d'informations médicales :

- ouvrant le droit aux patients concernés, ou le cas échéant à leurs ayants droit, d'en obtenir communication (cf. § 8.5) ;
- donnant lieu à une obligation de conservation d'en principe 20 ans.

Ces échantillons constituent un matériel biologique permettant la constitution ultérieure d'informations formalisées et non des informations à proprement parler.

De même que pour les analyses à visée diagnostique de biologie médicale, la conservation et l'utilisation de ces lames et blocs congelés ne donnent lieu aux formalités d'autorisation ou de déclaration que lorsqu'elles sont effectuées à des fins de recherche.

8.2 Réglementation s'appliquant à la conservation d'échantillons biologiques humains à des fins thérapeutiques

Les fins thérapeutiques autologues ou allogéniques abordées dans ce paragraphe concernent l'implantation sur l'homme de tissus, dérivés de tissus et cellules (champ des greffes et de la thérapie cellulaire).

8.2.1 Régime d'autorisation

La loi prévoit que les organismes qui souhaitent conserver des tissus, des dérivés de tissus, ou des préparations de thérapie cellulaire à des fins thérapeutiques autologues (sur la personne dont sont issus les éléments prélevés) ou allogéniques (sur une autre personne), doivent y avoir été préalablement autorisés (art. L.1243-2, CSP).

La loi n° 2004-800 du 6 août 2004 relative à la bio éthique ne précise pas la nature de ces établissements et organismes, et contrairement à la situation antérieure, ces activités peuvent être mises en œuvre aussi bien par des établissements à but non lucratif qu'à but lucratif (74).

Cette autorisation, valable pendant 5 ans, relève de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps), après avis de l'Agence de la biomédecine. Toute modification des éléments figurant dans l'autorisation initiale doit faire l'objet d'une nouvelle autorisation (art. L. 1243-2, CSP). La délivrance de cette autorisation est subordonnée à des conditions techniques, sanitaires ou médicales et en tant que de besoin, financières, ainsi qu'à des conditions propres à garantir un fonctionnement conforme aux principes généraux applicables en matière de don et d'utilisation des éléments et produits du corps humain (consentement préalable du donneur, absence de publicité, gratuité, etc.) (art. L. 1243-7, CSP). L'Afssaps est tenue de mettre à jour la liste des autorisations délivrées, donc des banques, et d'assurer, notamment par voie d'inspections, le respect en la matière des dispositions légales (art. L. 1243-2, CSP). Au 31 décembre 2005, 36 banques étaient en activité en France, implantées sur 44 sites distincts (79).

L'obligation d'autorisation concerne la conservation, mais également la préparation, la distribution et la cession des tissus, dérivés et cellules concernés (art. L. 1243-2, CSP).

En pratique, seuls peuvent être prélevés dans ce cadre, sur une personne vivante, les tissus figurant sur une liste prévue à cet effet par le CSP : le foie et les reins, la peau, l'os, les tissus mous de l'appareil locomoteur, la cornée, les valves cardiaques, les artères et les veines (art. L. 1241-1, CSP) ; arrêté du 2 août 2005 fixant la liste des organes pour lesquels le prélèvement sur une personne décédée présentant un arrêt cardiaque et respiratoire persistant est autorisé (80) ; arrêté du 2 août 2005 fixant la liste des tissus et des cellules pour lesquels le prélèvement sur une personne décédée présentant un arrêt cardiaque et respiratoire persistant est autorisé (81), mais cette disposition ne concerne pas les tissus prélevés dans le cadre d'une recherche biomédicale.

8.2.2 Sécurité sanitaire

Différents textes viennent préciser les obligations de sécurité sanitaire applicables aux éléments de corps humain conservés en vue d'une implantation sur l'homme.

De manière générale, l'article L. 1211-6 du CSP prévoit ainsi que « les éléments et produits du corps humain ne peuvent être utilisés à des fins thérapeutiques si le risque mesurable en l'état des connaissances scientifiques et médicales couru par le receveur potentiel est supérieur à l'avantage escompté pour celui-ci. Le prélèvement d'éléments et la collecte de produits du corps humain à des fins thérapeutiques, ainsi que les activités ayant les mêmes fins, (...) relatives à ces éléments et produits, sont soumis aux règles de sécurité sanitaire en vigueur, concernant notamment les tests de dépistage des maladies transmissibles. »

Les procédés de préparation et de conservation des tissus et de leurs dérivés utilisés à des fins thérapeutiques et les préparations de thérapie cellulaire doivent également faire l'objet d'une autorisation de l'Afssaps, faisant suite à une évaluation préalable de leurs procédés de préparation et de conservation ainsi que de leurs indications thérapeutiques (art. L. 1243-5, CSP).

Le décret n° 2005-1618 du 21 décembre 2005 relatif aux règles de sécurité sanitaire portant sur le prélèvement et l'utilisation des éléments et produits du corps humain (82) a également intégré dans le CSP une série de dispositions réglementaires en ce domaine (cf. art. R. 1211-12 à R. 1211-21, CSP), transposant en droit français la directive européenne 2004/23/CE du Parlement européen et du Conseil du 31 mars 2004 relative à l'établissement de normes de qualité et de sécurité pour le don, l'obtention, le contrôle, la transformation, la conservation, le stockage et la distribution des tissus et cellules humains (83).

8.2.3 Règles de bonnes pratiques

La loi prévoit (art. L. 1245-6, CSP) que les « règles de bonnes pratiques qui s'appliquent au prélèvement, à la préparation, à la conservation, au transport et à l'utilisation des tissus, des cellules et des préparations de thérapie cellulaire ainsi que des produits du corps humain utilisés à des fins thérapeutiques » sont définies par décision de l'Afssaps après avis de l'Agence de la biomédecine, puis sont approuvées par arrêté du ministre chargé de la santé.

Des règles de bonnes pratiques ont été progressivement établies, notamment :

- l'arrêté du 1^{er} avril 1997 portant homologation des règles de bonnes pratiques relatives au prélèvement des tissus et au recueil des résidus opératoires issus du corps humain utilisés à des fins thérapeutiques (84) ;
- l'arrêté du 29 décembre 1998 portant homologation des règles de bonnes pratiques relatives à la conservation, à la transformation et au transport des tissus d'origine humaine utilisés à des fins thérapeutiques (85).

8.2.4 Personnels, locaux et équipements

Les établissements de santé ou organismes demandeurs doivent disposer de personnel compétent en nombre suffisant (art. R. 1243-8, CSP). Ils doivent également disposer de locaux permettant de garantir la qualité et la sécurité sanitaire des tissus ou de leurs dérivés, conformément aux règles de bonnes pratiques prévues par l'article L. 1251-2 et par l'arrêté du 29 décembre 1998 portant homologation des règles de bonnes pratiques relatives à la conservation, à la transformation et au transport des tissus d'origine humaine utilisés à des fins thérapeutiques (85), et notamment :

- de locaux situés dans un même lieu permettant d'établir des circuits de préparation des tissus ou de leurs dérivés respectant la succession des opérations à effectuer et les différents niveaux de sécurité requis selon la nature de l'opération ;
- une zone de préparation à atmosphère contrôlée lorsque la manipulation des tissus ou de leurs dérivés oblige à ouvrir l'emballage ou à rompre le système clos ;
- de locaux comportant des zones réservées exclusivement à la conservation des tissus ou de leurs dérivés et, le cas échéant, d'autres éléments d'origine humaine utilisés à but thérapeutique, et respectant les conditions de sécurité requises (art. R. 1243-11, CSP).

Des zones spécifiques doivent par ailleurs permettre de conserver séparément, d'une part, les tissus, leurs dérivés ou les cellules qui ne doivent pas être distribués et, d'autre part, ceux prêts à être distribués. Dans le cas contraire, l'établissement sollicitant l'autorisation doit prévoir la mise en place de procédures garantissant le respect des règles d'hygiène, ainsi que des circuits séparés selon la finalité de ces activités (art. R. 1243-12, CSP).

La qualité et la sécurité sanitaire des tissus, de leurs dérivés ou des cellules doivent s'appuyer sur l'utilisation de matériels adaptés et en particulier d'un équipement informatique permettant d'assurer la traçabilité de ces produits, conformément aux règles de bonnes pratiques. Enfin, le matériel de conservation doit être muni d'alarmes lorsque le mode de

conservation l'exige pour des raisons de qualité et de sécurité. Ces alarmes de température ou de niveau doivent être installées sur place et reportées à un poste de surveillance en continu (art. R. 1243-13, CSP).

Seuls les tissus ou leurs dérivés reconnus conformes à la réglementation sanitaire en vigueur par le responsable médico-technique de l'établissement ou de l'organisme autorisé peuvent être distribués. Ils doivent être accompagnés des documents de traçabilité prévus par cette réglementation (art. R. 1243-19, CSP).

8.3 Consentement du patient

8.3.1 Consentement au prélèvement

La nécessité d'obtenir le consentement de la personne à des prélèvements sur son corps est un principe général de la loi.

L'obtention du consentement de la personne à des prélèvements sur son corps repose sur deux dispositions principales de la loi :

- il ne peut être porté atteinte à l'intégrité du corps humain qu'en cas de nécessité médicale pour la personne ou, à titre exceptionnel, dans l'intérêt thérapeutique d'autrui (art. 16-3, C. civil) ;
- un prélèvement d'éléments du corps humain ou la collecte de produits humains sur une personne ne peut être pratiqué sans le consentement préalable de celle-ci et ce consentement est révocable à tout moment (art. L. 1211-2, CSP).

Les modalités du consentement au prélèvement, qui doit, sauf dans quelques cas d'exception, être recueilli par écrit, sont précisées par différents textes :

- pour les prélèvements d'organes, de tissus ou de cellules et la collecte de produits du corps humain en vue d'un don, par les articles L. 1231-1, L. 1232-1 et L. 1241-1 du CSP : le consentement doit être explicite ou peut être présumé, selon le cas. Sont concernés aussi bien les prélèvements effectués à visée thérapeutique que ceux qui sont effectués pour une visée scientifique (par exemple, pour la constitution directe d'une collection) (art. L. 1241-1, CSP). S'agissant des tissus, seuls peuvent être prélevés dans un but thérapeutique les tissus figurant sur une liste prévue à cet effet (cf. *supra*, art. L. 1241-1, CSP) ;
- pour les prélèvements de tissus ou de cellules ou la collecte de produits du corps humain effectués :
 - en vue de la réalisation ou du contrôle de dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*,
 - en vue du contrôle de qualité d'analyses de biologie médicale,
 - dans le cadre d'expertises et de contrôles techniques réalisés par l'Afssaps sur les tissus, cellules et produits du corps humain,
 - la loi prévoit que le donneur doit avoir été « dûment informé de l'objet du prélèvement ou de la collecte et de leurs conséquences et des risques qui y sont attachés » et que le consentement doit être donné par écrit (art. L. 1241-1, CSP).

Dans tous ces cas, le consentement au prélèvement, pour pouvoir être donné de façon libre et éclairée, doit, sauf impossibilité, avoir fait suite à une information précise de la personne sur les finalités du prélèvement.

La conservation de l'échantillon prélevé nécessite logiquement un consentement spécifique, distinct de celui donné pour l'acte de prélèvement. Ainsi, soit la personne donne simultanément un consentement sur l'acte de prélèvement et sur la conservation de l'échantillon, soit deux consentements sont sollicités, le cas échéant à deux moments différents.

Aucun paiement, quelle qu'en soit la forme, ne peut être alloué à celui qui se prête au prélèvement d'éléments de son corps ou à la collecte de ses produits (art. L. 1221-4, CSP).

8.3.2 Consentement en cas de « requalification » d'échantillons déjà conservés

Des dispositions spécifiques encadrent la réutilisation ou la « requalification » d'échantillons biologiques déjà prélevés.

Celle-ci peut concerner aussi bien une réutilisation pour le diagnostic que pour la recherche. Sur ce point, la «Charte éthique pour le recueil, la conservation et l'utilisation des échantillons tumoraux humains dans le cadre de la prise en charge médicale et de la recherche en cancérologie » élaborée par l'INCa en 2006 (86) précise que « les échantillons prélevés dans le cadre du soin et conservés dans les tumorothèques doivent pouvoir bénéficier aux programmes de recherche (...) » étant précisé qu'« il est de bonne pratique médicale de conserver, au-delà de son utilisation à des fins de recherche, dans l'intérêt potentiel du patient, tant que ce patient est en vie et chaque fois que possible, un fragment de la tumeur initialement prélevée au cas où une nouvelle thérapeutique ciblée serait découverte ».

Le Conseil de l'Europe avait affirmé en 1997 (87) que « les professionnels de soins de santé habilités à mener leurs propres recherches médicales devraient pouvoir utiliser les données médicales qu'ils détiennent pour autant que la personne concernée ait été informée de cette faculté et n'y soit pas opposée » et que « lorsqu'une partie du corps humain a été prélevée au cours d'une intervention, elle ne peut être conservée et utilisée dans un but autre que celui pour lequel elle a été prélevée que conformément aux procédures de consentement et d'information appropriées ».

La loi n° 2004-800 du 6 août 2004 relative à la bio éthique a simplifié dans cette perspective les formalités de recueil du consentement pour la conservation d'éléments biologiques humains à finalité scientifique, lorsqu'ils ont été antérieurement prélevés dans un autre but, puis réutilisés ou « requalifiés » pour des recherches : un consentement écrit n'est pas alors nécessaire et la non-opposition du patient suffit (74).

Plus précisément, elle a prévu que lorsque des éléments biologiques humains ont été prélevés ou collectés pour une finalité donnée (pour laquelle le consentement de la personne a été recueilli dans les formes requises, de façon orale ou écrite), leur conservation et leur utilisation « seconde » à une autre fin médicale ou scientifique est possible si les deux conditions suivantes sont simultanément réunies (art. L. 1211-2, CSP) :

- la personne doit avoir été dûment informée au préalable de cette utilisation ;
- elle ne doit pas avoir exprimé son opposition à cette utilisation.

Ces dispositions s'appliquent notamment, entre autres prélèvements, à ceux qui concernent les « résidus opératoires », à savoir les tissus, cellules et produits du corps humain prélevés à l'occasion d'une intervention chirurgicale pratiquée dans l'intérêt de la personne opérée (art. L. 1235-2 et L. 1245-2, CSP) ; arrêté du 1^{er} avril 1997 portant homologation des règles de bonnes pratiques relatives au prélèvement des tissus et au recueil des résidus opératoires issus du corps humain utilisés à des fins thérapeutiques (84).

La procédure de vérification de l'absence d'opposition doit être décrite par écrit. Elle doit être mentionnée dans le dossier de déclaration de la collection ; arrêté du 16 août 2007 fixant le modèle de dossier accompagnant les déclarations et les demandes d'autorisation de conservation et de préparation à des fins scientifiques d'éléments du corps humain (88).

Il n'est pas nécessaire que l'information soit délivrée à plusieurs reprises si plusieurs études successives sont réalisées dans un même champ de la recherche ou pour la même pathologie (par exemple en cancérologie), et en somme lorsque le patient a été informé avec une précision suffisante de la finalité médicale générale ou de la typologie des recherches programmées.

L'échantillon peut être réutilisé sans que la non-opposition de la personne soit établie :

- en cas d'impossibilité de retrouver le patient (il en est ainsi par exemple pour des échantillons prélevés sur un patient vivant lors du prélèvement, mais décédé au moment ou est envisagée leur utilisation, ou bien lorsque le patient est manifestement perdu de vue) ;
- si un comité de protection des personnes (CPP), qui sera d'ailleurs nécessairement sollicité si la collection constituée dans une finalité scientifique donnée doit être utilisée à des recherches relevant d'un autre champ (« en cas d'utilisation d'éléments et de produits du corps humain à des fins scientifiques relevant d'un changement substantiel de finalité par rapport au consentement initialement donné », art. L. 1123-7, CSP), juge que cette nouvelle information du patient n'est pas nécessaire.

L'absence d'opposition ne vaut cependant que si le patient est bien informé de la nouvelle finalité possible de la conservation et de la nouvelle utilisation possible des éléments biologiques prélevés.

L'information délivrée au patient doit être suffisamment précise pour qu'il puisse s'opposer à toute recherche ou à certaines recherches en raison de leur finalité. L'absence d'opposition à des recherches devant être effectuées dans un champ donné de la recherche ne signifie pas un accord général étendu à des recherches dans d'autres champs.

Le texte ne prévoit pas le degré de précision de l'information qui doit être donnée. En particulier, le texte ne prévoit pas si le titre de la recherche doit être donné ou si une formulation plus large convient.

Un document d'information du patient et de vérification de l'absence d'opposition à l'utilisation des échantillons tumoraux à une fin de recherche scientifique est donné pour exemple en annexe de la «Charte éthique pour le recueil, la conservation et l'utilisation des échantillons tumoraux humains dans le cadre de la prise en charge médicale et de la recherche en cancérologie », élaborée par l'INCa en 2006 (86).

8.3.3 Consentement et examen des caractéristiques génétiques

La constitution de collections, parfois de grandes dimensions, par des organismes de recherche, de grandes entreprises pharmaceutiques, des États, en vue de recherches en génétique est en grande partie à l'origine de la législation sur la conservation d'échantillons humains : un encadrement strict de la conservation d'échantillons et de données personnelles a été jugé nécessaire en raison de son caractère potentiellement discriminatoire et dangereux pour la vie privée, en cas d'usage contestable par les pouvoirs publics, des sociétés d'assurance...

Pour autant, la constitution de collections d'ADN est essentielle dans l'évolution progressive – à côté d'une médecine diagnostique symptomatique – d'une médecine prévisionnelle, prédictive et asymptomatique, s'appuyant sur des profils individuels de réaction aux médicaments et adaptant les thérapeutiques aux caractéristiques génétiques des patients : l'enjeu est la mise au point de traitements plus adaptés et moins toxiques (89).

Lorsqu'un prélèvement est effectué en vue d'un « examen des caractéristiques génétiques de la personne », le Code civil prévoit un consentement strictement formalisé. Le patient doit donner un consentement « exprès », c'est-à-dire écrit, et il doit être dûment informé, préalablement, de la nature et de la finalité de l'utilisation des échantillons (art. 16-10, C. c.). Le même article du Code civil prévoit que le document de consentement écrit doit mentionner la finalité de l'examen. Par ailleurs, il précise que le consentement donné est révocable sans forme et à tout moment.

Cette forme écrite de l'expression du consentement s'applique de façon impérative. L'article 226-25 du Code pénal prévoit que « le fait de procéder à l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins autres que médicales ou scientifiques, ou à des fins

médicales ou de recherche scientifique, sans avoir recueilli préalablement son consentement dans les conditions prévues par l'article 16-10 du Code civil, est puni d'un an d'emprisonnement et de 15 000 euros d'amende ».

Ainsi, aucune réutilisation, pour des fins d'examen génétique, d'échantillons prélevés dans le cadre des soins n'est admise sans le consentement écrit de l'intéressé. Il est donc nécessaire de revenir vers le patient pour obtenir son consentement écrit si cela n'a pas été fait lors du prélèvement réalisé à l'occasion des soins. Le décès du patient entraîne l'impossibilité de procéder à l'examen des caractéristiques génétiques de l'échantillon prélevé sur lui, s'il n'y a pas consenti par écrit.

Les textes préparatoires de la loi de bioéthique du 6 août 2004 (74) définissent l'examen des caractéristiques génétiques de la personne comme « les analyses de biologie médicale portant sur les chromosomes et les gènes d'une personne », soit toute recherche d'anomalies chromosomiques de forme ou de nombre, toute recherche de mutations responsables d'une maladie et plus généralement, les analyses donnant des informations sur le patrimoine génétique d'une personne (90).

La question de l'étendue de l'obligation de recueil du consentement exprès et de son application ou non à la génétique « non constitutionnelle » fait l'objet de discussions, en vue d'une clarification législative.

Pour l'examen des caractéristiques génétiques à des fins médicales, le CSP apporte une série de précisions (art. R. 1131-1 CSP.) : une liste d'examens est énoncée par l'arrêté du 11 décembre 2000 fixant la liste des équipements des laboratoires d'analyses de biologie médicale nécessaires à la réalisation des examens des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales, mais ce n'est pas le cas des examens à visée scientifique (91).

Sur ce point, à partir d'une définition proposée par l'Académie nationale de médecine, l'INCa a élaboré une «Charte éthique pour le recueil, la conservation et l'utilisation des échantillons tumoraux humains dans le cadre de la prise en charge médicale et de la recherche en cancérologie » (86) qui distingue d'une part les « caractéristiques génétiques constitutionnelles de la personne » ou « génome constitutionnel » et d'autre part « l'examen de l'ADN des prélèvements tumoraux qui peut permettre de détecter une « carte d'identité » de la tumeur, indispensable pour décider d'un traitement et établir un diagnostic » (un document d'information et de consentement du patient à l'utilisation des échantillons tumoraux à une fin de recherche scientifique, avec examen des caractéristiques génétiques constitutionnelles, est donné pour exemple en annexe de la Charte éthique). Une telle distinction pourrait ouvrir, le cas échéant et en cas d'évolution en ce sens de la réglementation, la possibilité de procéder à des examens des caractéristiques génétiques d'échantillons prélevés après s'être assuré de la seule non-opposition du patient, sans recourir forcément à un consentement écrit.

Mais cette possibilité paraît à ce jour exclue, contrairement à ce qu'une lecture du seul article L. 1211-2 du CSP pourrait laisser entendre, en raison des dispositions du Code pénal venant sanctionner un recueil du consentement contrevenant aux modalités (écrites) prévues par le Code civil.

Cette absence de définition pour le cas des examens à visée de recherche pose un problème majeur car l'absence de définition restrictive du cadre de l'examen des caractéristiques génétiques empêche de mener des recherches sur des collections d'échantillons issues de personnes décédées ou perdues de vue.

Or, actuellement l'étude de mutations sporadiques de cellules tumorales qui ne seront pas retrouvées dans l'ensemble du patrimoine génétique de l'individu est soumise à ces règles. La réflexion doit porter sur la protection de la personne par rapport à des données génétiques identifiantes, données qui comportent des spécificités (92).

L'ADN porte des données génétiques qui peuvent être stigmatisantes et discriminantes (appartenance raciale, profil de pathologie...), révélatrices d'une identité familiale, et enfin, identifiantes par la séquence des gènes et leur organisation. L'ADN tumoral porte des données génétiques directement stigmatisantes, car elles peuvent discriminer un pronostic positif ou négatif. Mais cela est autant stigmatisant qu'un autre élément du dossier médical. D'un point de vue formel, cette donnée génétique de la tumeur n'est pas plus stigmatisante qu'un élément lié à une pathologie hors données génétiques et si cette donnée ne permet pas d'identifier la personne, son examen ne devrait pas être soumis au formalisme de l'article 16-10 du Code civil.

8.4 La durée de conservation des échantillons

La durée de conservation des éléments biologiques humains n'est prévue expressément à ce jour par aucun texte, en dehors des cas de l'assistance médicale à la procréation, de la recherche sur l'embryon et les cellules embryonnaires, de la fœtopathologie et pour certains examens visés par l'annexe C du GBEA ou relevant de l'anatomie et de la cytologie pathologiques.

En dehors de ces cas, les modalités de cette conservation sont distinctes selon qu'elle est effectuée à des fins diagnostiques et thérapeutiques ou à des fins scientifiques. S'agissant de la conservation effectuée à des fins diagnostiques et thérapeutiques, deux situations doivent également être distinguées :

- soit il s'agit d'une conservation visant à connaître ultérieurement l'efficacité d'un traitement (cas notamment des tumorothèques). L'échantillon sera en principe conservé jusqu'à ce que l'intérêt thérapeutique de la conservation de l'échantillon pour la personne ait manifestement disparu (un intérêt scientifique peut toutefois alors justifier la poursuite de sa conservation) ;
- soit il s'agit d'une conservation visant à utiliser ultérieurement les échantillons dans le cadre des soins (greffe, thérapie cellulaire). La légitimité de cette conservation s'achève dès lors que prend fin la perspective de l'usage pour la personne ou pour autrui des échantillons qui a justifié la conservation.

Dans les deux cas, il reviendra *a priori* au comité médico-technique de la banque constituée par l'établissement ou l'organisme de se prononcer sur l'intérêt médical du maintien de la conservation.

L'élimination des échantillons doit s'effectuer selon les dispositions applicables aux déchets de soins hospitaliers. Doivent être distingués :

- les déchets d'activités de soins qui doivent être incinérés ;
- les pièces anatomiques qui donnent lieu à crémation (incinération dans un crématorium).

8.5 L'accès des patients ou de leurs ayants droit aux échantillons

La question sous-jacente est celle de savoir si les échantillons biologiques prélevés dans le cadre de soins font partie de ce qu'on appelle communément le dossier médical du patient. Cela revient en pratique à savoir si les établissements détenteurs d'échantillons biologiques humains doivent répondre aux demandes d'accès aux échantillons adressées par les personnes ou leurs ayants droit.

Actuellement, l'article L. 1111-7 alinéa 1 du CSP prévoit que « toute personne a accès à l'ensemble des informations concernant sa santé détenues par des professionnels et établissements de santé, qui sont formalisées et ont contribué à l'élaboration et au suivi du diagnostic et du traitement ou d'une action de prévention, ou ont fait l'objet d'échanges écrits entre professionnels de santé, notamment des résultats d'examen, comptes rendus de consultation, d'intervention, d'exploration ou d'hospitalisation, des protocoles et prescriptions thérapeutiques mis en œuvre, feuilles de surveillance, correspondances entre professionnels

de santé, à l'exception des informations mentionnant qu'elles ont été recueillies auprès de tiers n'intervenant pas dans la prise en charge thérapeutique ou concernant un tel tiers ». Cet article ne vise pas les échantillons biologiques quelle que soit la forme sous laquelle ils sont conservés.

À défaut de certitudes en la matière, le CSP prévoit qu'un dossier médical est constitué pour chaque patient hospitalisé dans un établissement de santé et qu'il contient « *a minima* » (la liste prévue par le texte n'est pas limitative, art. R. 1112-2, CSP) un certain nombre d'informations formalisées : les lames et blocs pourraient être considérés comme en faisant partie, au même titre que des clichés d'imagerie médicale, cela en dépit de leur consistance matérielle spécifique et même si leur archivage est généralement effectué hors du cadre d'un dossier matériellement unifié dans des locaux spécifiques. En conséquence, ces éléments du dossier médical relèveraient des dispositions ordinaires sur la durée de conservation des dossiers médicaux.

Comme cela a été indiqué ci-dessus (cf. § 8.1.2. Dispositions pour les examens d'anatomie et de cytologie pathologiques), la juridiction administrative (cour administrative d'appel de Paris, AP-HP c/C., 13 février 2008, n° 06PA02800) ne considère pas les échantillons biologiques humains comme éléments du dossier médical.

Les recommandations émises par l'Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé (Anaes) en juin 2003 sur le « Dossier du patient : amélioration de la qualité de la tenue et du contenu. Réglementation et recommandations » (93) n'évoquent pas spécifiquement les lames et les blocs d'anatomie pathologique, mais apportent quelques précisions sur les modalités possibles d'un tri des dossiers. Il est indiqué notamment que « le dossier du patient doit être trié avant son archivage ; il ne doit contenir que les documents nécessaires et utiles au suivi ultérieur du patient et ceux que la réglementation impose de conserver ». Or les échantillons sont source d'informations concernant la santé de la personne sur laquelle ils ont été prélevés.

Annexe 1. Caractéristiques méthodologiques des recommandations citées dans ce document

| Auteur, pays, année, référence | Titre Méthode | Recherche systématique de la littérature | Niveau de preuve | Groupe d'experts pluridisciplinaire | Relecture Validation externe |
|---|---|--|---|--|---|
| Fédération nationale des centres de lutte contre le cancer (FNCLCC), 2002 (4) France | Standards, options et recommandations 2002. Bonne pratique de l'acheminement et de la prise en charge initiale d'un prélèvement en anatomie et cytologie pathologiques en cancérologie | oui | Standards (unanimité), options (majorité) et recommandations (hiérarchisation en fonction du niveau de preuve (a)) | Uniquement dans le groupe de lecture | oui |
| Institut national du cancer (INCa), 2006 (2) France | Les tumorothèques hospitalières. Recommandations à l'usage des cliniciens et des chercheurs | non | non | oui | oui |
| National Cancer Institute (NCI) / National Institutes of Health (NIH) / US Department of Health and Human Services, 2006 (7) États-Unis | <i>First-generation guidelines for NCI-supported biorepositories</i> | NP | non | NP | oui |
| International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER), 2005 (6) États-Unis | <i>Best practices for repositories I: collection, storage, and retrieval of human biological materials for research</i> | non | non | NP | NP |
| Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), 2007 (5) | Lignes directrices de l'OCDE relatives aux pratiques exemplaires concernant les centres de ressources biologiques | non | Consensus d'experts nationaux, d'experts invités et d'observateurs | NP | Entretiens directs, vastes consultations écrites et phase pilote testant la validité et l'exploitabilité des lignes directrices élaborées |
| Mager et al., 2007 (8) États-Unis | <i>Standard operating procedure for the collection of fresh frozen tissue samples</i> | non | non | NP | oui |
| Department of Health, 2001 (94) Royaume-Uni | <i>A code of practice for tissue banks : providing tissues of human origin for therapeutic purposes</i> | oui | non | NP | oui |
| British Association for Tissue Banking (BATB), 2002 (95) Royaume-Uni | <i>General standards for tissue banking</i> | NP | non | NP | oui |
| Lewczuk et al., 2006 (28) Allemagne | <i>The German Competence Net Dementias : standard operating procedures for the neurochemical dementia diagnostics</i> | non | non | NP | oui |

- (a) **niveau A** : il existe une (des) méta analyse(s) « de bonne qualité » ou plusieurs essais randomisés « de bonne qualité » dont les résultats sont cohérents
niveau B : il existe des preuves « de qualité correcte » : essais randomisés (B1) ou études prospectives ou rétrospectives (B2). Les résultats de ces études sont cohérents dans l'ensemble
niveau C : les études disponibles sont critiquables d'un point de vue méthodologique ou leurs résultats ne sont pas cohérents dans l'ensemble
niveau D : il n'existe pas de données ou seulement des séries de cas
accord d'experts : il n'existe pas de données pour la méthode concernée mais l'ensemble des experts est unanime
(NB : pour plus de détails, cf. *Méthodologie de développement des SOR*) (96-98)
NP : non précisé

Annexe 2. Catalogue national de données. INCa, 2006

Source : Institut national du cancer. Les tumorothèques hospitalières. Recommandations à l'usage des cliniciens et des chercheurs, 2006 (2)

RENSEIGNEMENTS SUR LE SITE TUMOROTHÉQUE

1 - Identifiant du SITE

Il s'agit par exemple du N°FINESS de l'établissement.

Champ obligatoire

Contrôle effectué sur la validité du numéro

Remarque : cet identifiant, rajouté par la FNCLCC, ne figurait pas dans le catalogue proposé par la DHOS.

Il est différent de l'identifiant du centre de stockage et correspond au lieu de prise en charge du patient, autrement dit, au lieu où le dossier médical est consultable.

Il peut néanmoins être identique à l'identifiant du centre de stockage.

Il serait intéressant de le maintenir si on imagine une base commune à plusieurs établissements utilisant un même logiciel, ne gérant pas un identifiant patient unique, avec donc la possibilité de numéros tumorothèque identiques dans plusieurs établissements.

RENSEIGNEMENTS SUR LE PATIENT

2 - Identifiant du patient

Il s'agit d'un code anonyme défini pour chaque patient par l'établissement. Ce codage doit être réversible afin de permettre en cas de besoin de remonter au dossier du patient. Ultérieurement utilisation du système national d'encodage sur la base d'un algorithme produisant un code établi à partir des données nominatives et de la date de naissance.

Champ obligatoire

Aucun contrôle effectué

3 - Date de naissance du patient

Cette date est à transmettre au format « aaaammjj »

Champ obligatoire

Contrôle effectué sur une comparaison avec la date du jour. Si la date de

naissance est supérieure, la fiche est rejetée

Remarque : pour éviter l'identification du patient par sa date de naissance, celle-ci ne doit pas apparaître dans le résultat de la requête. Elle n'est pas consultable.

4 - Sexe du patient

4 valeurs sont acceptées : M ou 1, F ou 2. Le 1 et 2 seront transformés en M ou F lors de l'intégration.

Champ obligatoire

Contrôle effectué sur ces 4 valeurs possibles. En cas de différence, la fiche est rejetée

5 - État du patient

3 valeurs sont acceptées : V (pour vivant), D (pour décédé) ou I pour inconnu.

Champ obligatoire

Contrôle effectué sur ces 3 valeurs possibles. En cas de différence, la fiche est

rejetée

6 - Date de l'État

Il s'agit de la date de dernière nouvelle. Cette date est à transmettre au format

« aaaammjj »

Champ obligatoire si patient vivant ou décédé. Sinon coder « 00000000 »

Contrôle effectué sur une comparaison avec la date du jour et la date du prélèvement. Si la date de l'état est supérieure à la date de naissance ou inférieure à la date de prélèvement, la fiche est rejetée.

RENSEIGNEMENTS SUR LA MALADIE

7 - Diagnostic principal

Il s'agit d'un code CIM10 du siège initial de la tumeur.

Si inconnu, coder XXX.XX ou X (le système transformera le X en XXX.XX)

Champ obligatoire

Si le code n'est pas dans la table des codes CIM10 ou si il est différent de X ou

XXX.XX, la fiche est rejetée.

Remarque : il paraît indispensable de tendre vers l'utilisation de la version la plus actuelle des classifications.

8 - Date du diagnostic

La date du diagnostic principal est à transmettre au format « aaaammjj »

Champ obligatoire mais si inconnu, coder « 00000000 »

Contrôle effectué sur une comparaison avec la date du jour. Si la date de diagnostic est supérieure, la fiche est rejetée.

9 - Stade TNM au diagnostic (cTNM)

9a - Version du TNM utilisé

Un chiffre : 4, 5 ou 6.

Champ obligatoire mais si inconnu, coder 'X'

En l'état actuel, pas de contrôle de validité.

9b - Taille de la tumeur : T du cTNM

Sur 3 caractères maximum.

Champ obligatoire mais si inconnu, coder 'X'

En l'état actuel, pas de contrôle de validité.

9c - Envahissement ganglionnaire : N du cTNM

Sur 3 caractères maximum.

Champ obligatoire mais si inconnu, coder 'X'

En l'état actuel, pas de contrôle de validité.

9d - Extension métastatique : M du cTNM

Sur 1 caractère maximum.

Champ obligatoire mais si inconnu, coder 'X'

En l'état actuel, pas de contrôle de validité.

RENSEIGNEMENTS SUR LE PRÉLÈVEMENT

10 - Centre de stockage

Il s'agit par exemple du n°FINESS du centre de stockage quand il existe.

Champ obligatoire. Si le centre de stockage n'a pas de code FINESS, le centre indiquera un code interne.

Pas de contrôle effectué.

11 - Identifiant du prélèvement

Il s'agit d'un code interne à la TMT qui peut être le numéro d'enregistrement dans le SGL hospitalier. Ce codage doit permettre au site TMT, sans doute possible, l'identification du prélèvement.

Champ obligatoire

Aucun contrôle effectué

12 - Date du prélèvement

Il s'agit de la date du prélèvement au format « aaaammjj »

Champ obligatoire mais si inconnu, coder « 00000000 »

Contrôle effectué sur une comparaison avec la date du jour. Si la date de prélèvement est supérieure, la fiche est rejetée.

13 - Type du prélèvement

3 types de prélèvement sont proposés dans la liste initiale et codés :

- B pour biopsie
- O pour pièce opératoire
- P pour ponction
- L pour liquide
- C pour cytoponction

Cette liste pourra, en cas de besoin, être complétée.

Champ obligatoire

Contrôle effectué sur les valeurs possibles. En cas de différence, la fiche est rejetée

14 - Organe prélevé

Il s'agit du code organe.

14a - Classification utilisée

2 possibilités : A pour ADICAP et C+chiffre pour CIM-O + version

Champ obligatoire

Pas de contrôle effectué actuellement.

Remarque : il paraît souhaitable de tendre vers l'utilisation des dernières versions des classifications.

14b - Code organe

3^e et 4^e digit du code ADICAP Dictionnaire D3

4 caractères du code CIM-O version 3.

Prévoir la possibilité d'insérer les digits 11 et 12 (ou XX).

Champ obligatoire

En l'état actuel, pas de contrôle de validité.

Remarque : des tables de transcodage ADICAP/CIM-O nationales sont en cours d'élaboration et seraient disponibles dans un délai de 6 mois (Pr JJ VOIGT, chargé de mission pour l'INCa).

15 - Type lésionnel histopathologique

Il s'agit du code lésion.

Digits 5 à 10 du code ADICAP dictionnaire D5 et D7

6 caractères du code CIM-O (le 6^e correspond au grade ou peut être remplacé par X)

Champ obligatoire

En l'état actuel, pas de contrôle de validité.

16 - Type d'événement

6 types d'événement par rapport à l'évolution de la maladie sont proposés dans la liste initiale et codés :

- 1 : tumeur primitive
- 2 : récurrence
- 3 : métastase
- 4 : transformation
- 5 : rémission
- 9 : inconnu

Cette liste pourra, en cas de besoin, être complétée.

Champ facultatif.

Contrôle effectué sur ces 6 valeurs possibles ou sur champ vide. En cas de différence, la fiche est rejetée

17 - Stade pTNM

17a - Version du pTNM utilisé

Un chiffre : 4, 5 ou 6.

Champ obligatoire mais si inconnu, coder 'X'

En l'état actuel, pas de contrôle de validité.

17b - Taille de la tumeur : T du pTNM

Sur 3 caractères maximum.

Champ obligatoire mais si inconnu, coder 'X'

En l'état actuel, pas de contrôle de validité.

17c - Envahissement ganglionnaire : N du pTNM

Sur 3 caractères maximum.

Champ Obligatoire mais si inconnu, coder 'X'

En l'état actuel, pas de contrôle de validité.

TYPE D'ÉCHANTILLON BIOLOGIQUE CONSERVÉ

18 - Tissu et/ou cellules tumorales

Les échantillons cryopréservés correspondent à la tumeur : O/N

Champ obligatoire. Si vide, le système intègre un N

Contrôle effectué sur valeur O, N ou vide. En cas de différence, la fiche est rejetée.

Si oui

19 - Mode de conservation

19a - Mode de conservation

4 modes de conservation sont proposés dans la liste initiale et codés :

- 1 : congélation à - 20°
- 2 : congélation à - 80°
- 3 : congélation à - 140° et moins
- 4 : azote liquide

Cette liste pourra, en cas de besoin, être complétée.

Champ obligatoire si 18 à oui, vide sinon

Contrôle effectué sur ces 4 valeurs possibles ou sur champ vide. En cas de différence, la fiche est rejetée.

19b - Type d'échantillon

2 types d'échantillon sont proposés dans la liste initiale et codés :

- T : tissu
- C : cellules

Cette liste pourra, en cas de besoin, être complétée.

Champ obligatoire si 18 à oui, vide sinon

Contrôle effectué sur ces 2 valeurs possibles ou sur champ vide. En cas de différence, la fiche est rejetée.

19c mode de préparation

3 modes de préparation sont proposés dans la liste initiale et codés :

- 1 : DMSO
- 2 : culot
- 9 : autre

Cette liste pourra, en cas de besoin, être complétée.

Champ obligatoire si 18 à oui, vide sinon

Contrôle effectué sur ces 3 valeurs possibles ou sur champ vide. En cas de différence, la fiche est rejetée.

20 - Délai de congélation

3 modes de réponse sont proposés dans la liste initiale et codés :

- 1 : jusqu'à 30 min
- 2 : plus de 30 min
- 9 : inconnu

Champ obligatoire si 18 à oui, vide sinon

Contrôle effectué sur ces 3 valeurs possibles ou sur champ vide. En cas de différence, la fiche est rejetée.

21 - Contrôle sur tissus

6 contrôles sont proposés dans la liste initiale et codés :

- 1 : coupe
- 2 : bloc de paraffine miroir
- 3 : empreinte
- 4 : CMF
- 5 : Contrôle sortie
- 9 : inconnu

Champ Obligatoire si 18 à oui, vide sinon

Contrôle effectué sur ces 6 valeurs possibles ou sur champs vide. En cas de différence, la fiche est rejetée.

22 - Quantité et unité

22a - Quantité

Il s'agit de la quantité en chiffre.

Champ obligatoire si 18 à oui, vide sinon

En l'état actuel, pas de contrôle de validité.

22b - Unité utilisée

Il s'agit de l'unité utilisée en clair.

À l'avenir, une liste d'unités pourra être proposée.

Champ obligatoire si 18 à oui, vide sinon

En l'état actuel, pas de contrôle de validité.

23 - Pourcentage de cellules tumorales

Saisir un chiffre de 0 à 100 (sans le signe %)

Champ obligatoire si 18 à oui, vide sinon

Contrôle effectué sur valeur comprise entre 0 et 100 ou sur champ vide. En cas de différence, la fiche est rejetée.

24 - ADN dérivé

Saisir N ou une valeur sans unité. L'unité par défaut est le µg.

Champ obligatoire si 18 à oui, vide sinon

En l'état actuel, pas de contrôle de validité.

25 - ARN dérivé

Saisir N ou une valeur sans unité. L'unité par défaut est le µg.

Champ obligatoire si 18 à oui, vide sinon

En l'état actuel, pas de contrôle de validité.

26 - Protéines dérivées

Saisir N ou une valeur sans unité. L'unité par défaut est le µg.

Champ obligatoire si 18 à oui, vide sinon

En l'état actuel, pas de contrôle de validité.

27 - Tissu et/ou cellules non tumorales

Les échantillons cryopréservés correspondent au(x) tissu/cellules non tumorales : O/N.

Champ obligatoire. Si vide, le système intègre un N

Contrôle effectué sur valeur O, N ou vide. En cas de différence, la fiche est rejetée.

Si oui

28 - Mode de conservation

28a - Mode conservation

4 modes de conservation sont proposés dans la liste initiale et codés :

- 1 : congélation à - 20°
- 2 : congélation à - 80°
- 3 : congélation à - 140° et moins
- 4 : azote liquide

Cette liste pourra, en cas de besoin, être complétée.

Champ obligatoire si 27 à oui, vide sinon

Contrôle effectué sur ces 4 valeurs possibles ou sur champ vide. En cas de différence, la fiche est rejetée.

28b - Type d'échantillon

2 types d'échantillon sont proposés dans la liste initiale et codés :

- T : tissu
- C : cellules

Cette liste pourra, en cas de besoin, être complétée.

Champ obligatoire si 27 à oui, vide sinon

Contrôle effectué sur ces 2 valeurs possibles ou sur champ vide. En cas de différence, la fiche est rejetée.

28c - Mode de préparation

3 modes de préparation sont proposés dans la liste initiale et codés :

- 1 : DMSO
- 2 : culot
- 9 : autre

Cette liste pourra, en cas de besoin, être complétée.

Champ obligatoire si 27 à oui, vide sinon

Contrôle effectué sur ces 3 valeurs possibles ou sur champ vide. En cas de différence, la fiche est rejetée.

29 - Délai de congélation

3 modes de réponse sont proposés dans la liste initiale et codés :

- 1 : jusqu'à 30 min
- 2 : plus de 30 min
- 9 : inconnu

Champ obligatoire si 27 à oui, vide sinon

Contrôle effectué sur ces 3 valeurs possibles ou sur champ vide. En cas de différence, la fiche est rejetée.

30 - contrôle sur tissus

6 contrôles sont proposés dans la liste initiale et codés :

- 1 : coupe
- 2 : bloc de paraffine miroir
- 3 : empreinte
- 4 : CMF
- 5 : Contrôle sortie
- 9 : inconnu

Champ obligatoire si 27 à oui, vide sinon

Contrôle effectué sur ces 6 valeurs possibles ou sur champ vide. En cas de différence, la fiche est rejetée.

31 - Quantité et unité

31a - Quantité

Il s'agit de la quantité en chiffre

Champ obligatoire si 27 à oui, vide sinon

En l'état actuel, pas de contrôle de validité.

31b - Unité utilisée

Il s'agit de l'unité utilisée en clair.

À l'avenir, une liste d'unités pourra être proposée.

Champ obligatoire si 27 à oui, vide sinon

En l'état actuel, pas de contrôle de validité.

32 - ADN dérivé

Saisir N ou une valeur sans unité. L'unité par défaut est le µg.

Champ obligatoire si 27 à oui, vide sinon

En l'état actuel, pas de contrôle de validité.

33 - ARN dérivé

Saisir N ou une valeur sans unité. L'unité par défaut est le µg

Champ obligatoire si 27 à oui, vide sinon

En l'état actuel, pas de contrôle de validité.

34 - Protéines dérivées

Saisir N ou une valeur sans unité. L'unité par défaut est le µg.

Champ obligatoire si 27 à oui, vide sinon

En l'état actuel, pas de contrôle de validité.

35 - Ressources biologiques associées

35a - Sérum

Saisir N ou une valeur sans unité. L'unité par défaut est le ml.

Champ obligatoire

En l'état actuel, pas de contrôle de validité.

35b - Plasma

Saisir N ou une valeur sans unité. L'unité par défaut est le ml.

Champ obligatoire

En l'état actuel, pas de contrôle de validité.

35c - Liquides

Saisir N ou une valeur sans unité. L'unité par défaut est le ml.

Saisir la localisation, la nature tumorale ou non

35d - ADN constitutionnel

RENSEIGNEMENTS COMPLÉMENTAIRES

36 - CR anatomopathologique standardisé requêteable

Saisir O ou N.

Champ facultatif.

Pas de contrôle effectué.

37 - Données cliniques disponibles dans une base

Saisir O ou N.

Champ obligatoire

Pas de contrôle effectué.

38 - inclusion dans un protocole thérapeutique

38a - O/N

Saisir O ou N.

Champ facultatif.

Pas de contrôle effectué.

38b - Nom du protocole

Libellé en clair : 255 caractères maximum.

Champ facultatif.

Pas de contrôle effectué.

39 - Caryotype

39a - O/N

Saisir O ou N.

Champ facultatif.

Pas de contrôle effectué.

39b - Anomalies éventuelles

Libellé en clair : 255 caractères maximum.

Champ Facultatif.

Pas de contrôle effectué.

40 - Anomalies génomiques

40a - O/N

Saisir O ou N.

Champ facultatif.

Pas de contrôle effectué.

40b - Anomalies éventuelles

Libellé en clair : 255 caractères maximum.

Champ facultatif.

Pas de contrôle effectué.

41 - Image de la tumeur : coupe histologique miroir HES

Champ facultatif.

Pas de contrôle effectué.

42 - Contrôle qualité biologie moléculaire

Saisir O ou N.

Champ facultatif.

Pas de contrôle effectué.

43 - Inclusion de la tumeur dans un protocole de recherche

a- Saisir O ou N.

b- Si OUI, résultat du (ou des) protocole(s)

Champ facultatif.

Pas de contrôle effectué.

44 - Champs spécifique du type de cancer (ex. : tabagisme, héréditaire)

Texte libre

Champ facultatif.

Pas de contrôle effectué

Annexe 3. Performances des techniques d'extraction d'ADN ou d'ARN

| EXTRACTION D'ADN | | | |
|--------------------------------------|--|---|---|
| Extraction au phénol/chloroforme | | | |
| Type de matériel | Qualité acides nucléiques | Commentaires techniques | Particularités en fonction du matériel de départ |
| Tissus et cellules congelés | ADN de haut poids moléculaire → technique de référence pour <i>Southern-blot</i> | | Tissus congelés <u>Lymphomes B/T, Hodgkin, mélanome :</u> Quantité usuelle utilisée : 10-80 mg Rendement ≈ 4 µg/mg tissu |
| | MAIS <u>Contamination ARN</u> → <u>Risque de contamination phénolique</u> → → Purification secondaire parfois nécessaire pour Q-PCR | Utilisation de RNase possible Utilisation de <i>Phase Lock Gel</i> et/ou réalisation de 2 extractions successives au chloroforme pour limiter les problèmes de contamination par le phénol | <u>Tumeur côlon, ovaire, sein :</u> Quantité usuelle utilisée : 10-80 mg Rendement ≈ 2 µg/mg tissu <u>Tissu normal côlon :</u> Quantité usuelle utilisée : 50-100 mg Rendement ≈ 1 µg/mg tissu Cellules congelées <u>Leucémies, lymphomes :</u> (Cellules en DMSO ou culots secs) Quantité usuelle utilisée : 30,10 ⁶ cellules Rendement ≈ 4 µg/10 ⁶ cellules (60 %) |
| Perchlorate/chloroforme | | | |
| Sang total | ADN de haut poids moléculaire | Optimiser la procédure donnée en mélangeant à la pipette dès que possible et en prolongeant le temps d'incubation pour la lyse des globules blancs (30 min à 1 h à 37 °C) | Quantité sang total = 10 ml Quantité ADN obtenue = 200 µg (à 0,35 µg/µl) |
| | ADN utilisable pour PCR en point final ADN utilisable pour génotypage Autres applications en évaluation | | |
| Cellules mononuclées (Ficoll) | Utilisation possible pour <i>Southern-blot</i> , PCR quantitative | Les globules rouges, contaminant éventuellement l'anneau cellulaire après Ficoll, doivent être lysés préalablement à l'extraction | Rendement ≈ 40 % |

| EXTRACTION D'ADN | | | |
|-------------------------------------|--|---|--|
| Purification sur colonnes de silice | | | |
| Type de matériel | Qualité acides nucléiques | Commentaires techniques | Particularités en fonction du matériel de départ |
| Tissus et cellules congelés | ADN utilisable pour PCR quantitative Rendement et qualité de l'ADN peu adaptés pour une utilisation en <i>Southern-blot</i> | Rendement plus faible que l'extraction phénol/chloroforme Rendement tissu-dépendant Traitement par la RNase facultatif | Tissus congelés <u>Tumeur côlon, ovaire, sein :</u> Quantité usuelle utilisée (kit mini) : 10-25 mg Rendement \approx 0,3 à 1 μ g/mg tissu <u>Tissu normal côlon :</u> Quantité usuelle utilisée (kit mini) : 10-20 mg Rendement \approx 0,4 μ g/mg tissu Cellules congelées <u>Leucémies, lymphomes :</u> Quantité usuelle utilisée (kit mini) : 5,10 ⁶ cellules Rendement \approx 3 μ g/10 ⁶ cellules (40 %) |
| Sang total (*) | | | Quantité usuelle utilisée (kit midi) : 600 à 800 μ l Quantité moyenne obtenue \approx 30 μ g |
| Tissus fixés | ADN dégradé La dégradation de l'ADN dépend de la durée et du type de fixation Rendement et qualité de l'ADN peu adaptés pour une utilisation en <i>Southern-blot</i> | La fixation au formol neutre est préférable à la fixation à l'AFA (alcool éthylique – formol – acide acétique) Extraction sur tissus fixés possible sans déparaffinage | <u>Côlon (tumeur et tissu normal) :</u> Quantité usuelle utilisée (kit midi) : 1 coupe de 1 cm ² à 50 μ m Quantité moyenne obtenue \approx 20 à 40 μ g (T) 10 à 30 μ g (N) |

(*) Sujet sain : 4 G/L < GB < 10 G/L

| EXTRACTION D'ARN | | | |
|---|---|--|---|
| Extraction au phénol acide (Trizol de Invitrogen ou équivalent) | | | |
| Type de matériel | Qualité acides nucléiques | Commentaires techniques | Particularités en fonction du matériel de départ |
| <p>Tissus et cellules congelés</p> <p>(cellules en DMSO et culots secs)</p> | <p>Pour la plupart des types de tissu, qualité d'ARN satisfaisante pour hybridation sur puce à ADN ou RTQ-PCR</p> <p>Possibilité de purification secondaire sur colonne de silice</p> | <p>Utilisation possible de <i>Phase Lock Gel</i> pour limiter les problèmes de contamination par le phénol</p> <p>Rendement plus faible sur tissus fibreux</p> <p>Contamination par de l'ADN génomique fréquente</p> | <p>Tissus congelés</p> <p><u>Lymphomes B/T :</u> Quantité usuelle utilisée : 2-20 mg Rendement ≈ 3-5 µg/mg tissu</p> <p><u>Tumeur prostate, foie, mélanome :</u> Quantité usuelle utilisée : 20-100 mg Rendement ≈ 2-4 µg/mg tissu</p> <p><u>Tissu normal (côlon) :</u> Quantité usuelle utilisée : 20-100 mg Rendement ≈ 0,5-1,5 µg/mg tissu</p> <p>Cellules congelées</p> <p><u>Leucémies, lymphomes :</u> Quantité usuelle utilisée : 5-10,10⁶ cellules Rendement ≈ 0,5 à 1 µg par 10⁶ de cellules</p> |
| Méthode combinée utilisant l'extraction au phénol acide puis une purification des ARN sur colonne de silice | | | |
| <p>Tissus congelés</p> | <p>Qualité satisfaisante pour hybridation sur puces à ADN</p> | <p>Utilisation possible de tubes avec gels séparateurs de phases inclus</p> | <p><u>Tumeurs sein, ovaire, foie :</u> Quantité usuelle utilisée (kit mini) : 10 - 100 mg Rendement ≈ 1 à 2,5 µg/mg tissu</p> |

| EXTRACTION D'ARN | | | |
|------------------------------------|--|---|--|
| Colonnes de silice | | | |
| Type de matériel | Qualité acides nucléiques | Commentaires techniques | Particularités en fonction du matériel de départ |
| Tissus et cellules congelés | Qualité convenable pour hybridation sur puces à ADN et RTQ-PCR | Rendement inconstant, très dépendant de la quantité de matériel | <p>Tissus congelés <u>Tumeurs sein, ovaire :</u> Quantité usuelle utilisée (kit mini) : 10-30 mg Rendement ≈ 0,5 à 1 µg/mg tissu</p> <p><u>Hépatoblastome</u> Quantité usuelle utilisée : 10-30 mg Rendement : 0,8 µg/mg tissu</p> <p><u>Néphroblastome</u> Quantité usuelle utilisée : 10-30 mg Rendement : 0,9 µg/mg tissu</p> <p>Cellules congelées Quantité usuelle utilisée : 5-10,10⁶ cellules <u>Leucémies, lymphomes et lymphocytes du sang périphérique :</u> Rendement ≈ 0,6 µg/M</p> |

PCR : *Polymerase chain reaction* ; RTQ-PCR : *Reverse Transcriptase Quantitative PCR* ; DMSO : diméthylsulfoxyde ; Q-PCR : *Quantitative PCR* ; RNase : ribonucléase

Annexe 4. Critères de validation et adéquation des méthodes d'extraction en fonction du type d'application

| ADN | | | | |
|---|--|---|-----------------------------|-----------------------------------|
| Type d'utilisation | Critères de validation | Méthode phénol chloroforme | Colonnes de silice | |
| <i>Southern-blot</i> | - Sur gel d'agarose 0,8 % : ADN de haut poids moléculaire (≥ 20 kb) et absence de « smear » - Rapport 260/280 > 1,6 | ++ | - | |
| PCR en point final | - Rapport 260/280 > 1,6 - Pour l'ADN extrait à partir de tissus fixés, la taille des fragments amplifiables peut être testée (*) | ++ | ++ | |
| PCR en temps réel | - Rapport 260/280 > 1,6 - QPCR d'un gène domestique | + Risque d'inhibition liée à une contamination phénolique | ++ | |
| Hybridation sur puces (CGH array) | - Sur gel d'agarose 0,8 % : ADN de haut poids moléculaire (≥ 20 kb) - Rapport 260/280 > 1,6 | ++ | ++ | |
| Hybridation sur puces (SNP) | - Sur gel d'agarose 0,8 % : ADN de haut poids moléculaire (≥ 20 kb) et absence de « smear » - Rapport 260/280 > 1,6 | ++ | Non testé | |
| ARN | | | | |
| Type d'utilisation | Critères de validation | Méthode phénol acide | Colonnes de silice | Phénol acide + colonnes de silice |
| <i>Northern-blot</i> | - Sur gel d'agarose : présence de deux bandes correspondant aux ARN 18s et 28s avec la bande 28s 2 fois plus intense que la bande 18s - Rapport 260/280 > 1,8 | ++ | +/- Solution trop diluée | ++ |
| RT-PCR en point final | - RT-PCR gène domestique - Rapport 260/280 > 1,8 | ++ | ++ | ++ |
| RT-PCR en temps réel | - RT-PCR en temps réel d'un ou plusieurs gènes domestiques - Rapport 260/280 > 1,8 | ++ | ++ | ++ |
| Hybridation sur puces à ADN (transcriptome) | - Profil électrophorétique de bonne qualité - Rapport 28s/18s > 1,5 - Intérêt du RIN (seuil à définir) | ++ Risque d'inhibition liée à une contamination phénolique | ++ | ++ |

Légendes : ++ recommandé ; + possible ; +/- peu recommandé ; - déconseillé ; CGH : *Comparative Genomic Hybridation* ; PCR : *Polymerase chain reaction* ; RT-PCR : *Reverse Transcriptase PCR* ; Q-PCR : *Quantitative PCR* ; RTQ-PCR : *Reverse Transcriptase Quantitative PCR* ; RIN : *RNA Integrity Number*.

(*) d'après van Dongen *et al.*, 2003 (99) ; SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*

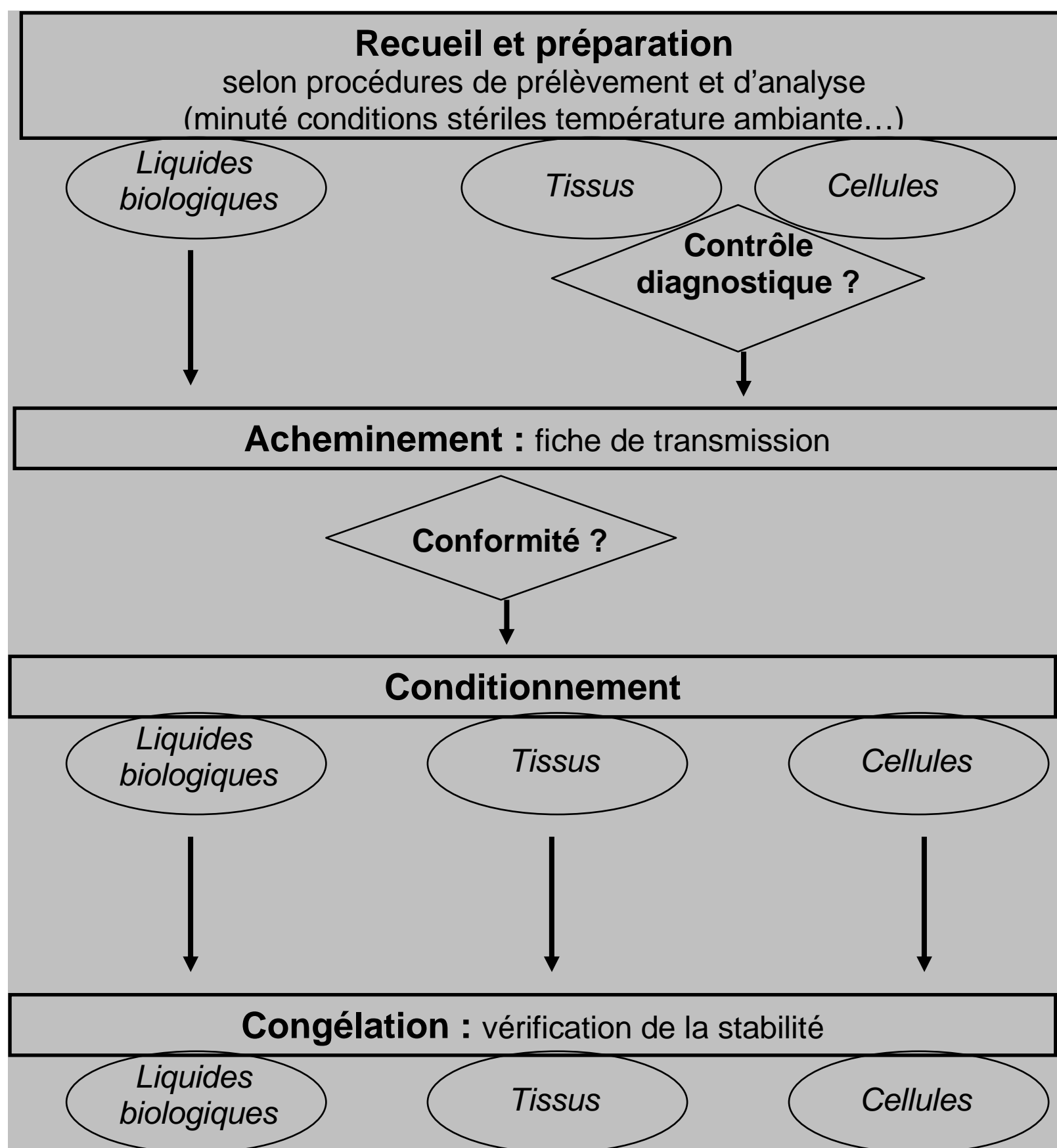
Annexe 5. Équivalences approximatives entre quantité de cellules et quantités d'acides nucléiques

Un million de cellules diploïdes humaines contient 6,7 µg d'ADN et une quantité variable d'ARN, comprise entre 0,5 à 20 µg, selon les types cellulaires.

Un mg de tissu correspond à un bloc de tissu d'environ 1 mm³ ou à une quantité de cellules allant de 10⁵ à 10⁶, selon le type cellulaire principal du tissu. Un mg de tissu contient donc 0,7 à 7 µg d'ADN. La quantité d'ARN attendue est très variable d'un tissu à l'autre.

Pour un échantillon assimilable à un bloc de 1 cm² de section, 10 coupes à 50 µm correspondent environ à 50 mg de tissu.

Annexe 6. Schéma organisationnel récapitulatif des étapes clés de la cryopréservation de tissus, cellules ou liquides biologiques issus du soin



Références bibliographiques

1. Société française de pathologie, Société française d'hématologie, Société française de cancérologie. Recommandations pour la cryopréservation de cellules et tissus tumoraux dans le but de réaliser des analyses moléculaires. Paris: Anaes; 2000.
2. Institut national du cancer. Les tumorothèques hospitalières. Recommandations à l'usage des cliniciens et des chercheurs. 2006. <http://www.e-cancer.fr/v1/index.php?option=com_fichiers&Itemid=590&lang=1&vers=1> [consulté le 14-2-2008].
3. Association française de normalisation. NF S96-900 Qualité des centres de ressources biologiques (CRB). Système de management d'un CRB et qualité des ressources biologiques d'origine humaine et microbienne. Saint-Denis La Plaine: Afnor; 2008.
4. Fédération nationale des centres de lutte contre le cancer. Standards, options et recommandations 2002. Bonne pratique de l'acheminement et de la prise en charge initiale d'un prélèvement en anatomie et cytologie pathologiques en cancérologie (rapport intégral). Paris: FNCLCC; 2002.
5. Organisation de coopération et de développement économiques. Lignes directrices de l'OCDE relatives aux pratiques exemplaires concernant les centres de ressources biologiques 2007. <[http://www.oecd.org/olis/2007doc.nsf/ENGREFCORPLOOK/NT00000E5E/\\$FILE/JT03225045.PDF](http://www.oecd.org/olis/2007doc.nsf/ENGREFCORPLOOK/NT00000E5E/$FILE/JT03225045.PDF)> [consulté le 14-2-2008].
6. International Society for Biological and Environmental Repositories. Best practices for repositories I: collection, storage, and retrieval of human biological materials for research. *Cell Preserv Technol* 2005;3(1):5-48.
7. National Cancer Institute. First-generation guidelines for NCI-supported biorepositories. Rockville: NCI; 2006.
8. Mager SR, Oomen MHA, Morente MM, Ratcliffe C, Knox K, Kerr DJ, et al. Standard operating procedures for the collection of fresh frozen tissue samples. *Eur J Cancer* 2007;43(5):828-34.
9. International Society for Biological and Environmental Repositories. 2008 best practices for repositories. Collection, storage, retrieval and distribution of biological materials for research 2007. <<http://www.isber.org/Pubs/BestPractices2008.pdf>> [consulté le 14-4-2008].
10. Hayes RB, Smith CO, Huang WY, Read Y, Kopp WC. Whole blood cryopreservation in epidemiological studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11(11):1496-8.
11. Morente MM, Mager R, Alonso S, Pezzella F, Spatz A, Knox K, et al. TuBaFrost 2: standardising tissue collection and quality control procedures for a European virtual frozen tissue bank network. *Eur J Cancer* 2006;42(16):2684-91.
12. Benoit L, Favoulet P, Collin F, Arnould L, Fraise J, Cuisenier J. Prélèvements anatomopathologiques en cancérologie : règles de bonnes pratiques au bloc opératoire. *Ann Chir* 2003;128(9):637-41.
13. Plénat F, Montagne K, Weinbreck N, Corby S, Champigneulle J, Antunes L, et al. Les conséquences moléculaires de la fixation et de l'inclusion : exemple des acides nucléiques et des protéines. *Ann Pathol* 2006;26(1):8-21.
14. Henny J. Constitution d'un centre de ressources biologiques. Aspects pratiques. *Rev Épidémiol Santé Publique* 2003;51(Cah 2):127-36.
15. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* 2002;161(6):1961-71.

16. Turbett GR, Sellner LN. The use of optimal cutting temperature compound can inhibit amplification by polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* 1997;6(5):298-303.
17. Wang SS, Sherman ME, Rader JS, Carreon J, Schiffman M, Baker CC. Cervical tissue collection methods for RNA preservation: comparison of snap-frozen, ethanol-fixed, and RNAlater-fixation. *Diagn Mol Pathol* 2006;15(3):144-8.
18. Pieters M, Jerling JC, Weisel JW. Effect of freeze-drying, freezing and frozen storage of blood plasma on fibrin network characteristics. *Thromb Res* 2002;107(5):263-9.
19. Hellstern P, Bach J, Haubelt H, Hitzler WE, Mathis S, Vogt A. The impact of the intensity of serial automated plasmapheresis and the speed of deep-freezing on the quality of plasma. *Transfusion* 2001;41(12):1601-5.
20. Jenab M, Bingham S, Ferrari P, Friesen MD, al-Delaimy WK, Luben R, et al. Long-term cryoconservation and stability of vitamin C in serum samples of the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(7):1837-40.
21. Ulmert D, Becker C, Nilsson JÅ, Piironen T, Björk T, Hugosson J, et al. Reproducibility and accuracy of measurements of free and total prostate-specific antigen in serum vs plasma after long-term storage at -20 °C. *Clin Chem* 2006;52(2):235-9.
22. Ishikawa S, Kayaba K, Gotoh T, Nakamura Y, Kario K, Ito Y, et al. Comparison of C-reactive protein levels between serum and plasma samples on long-term frozen storage after a 13.8 year interval: the JMS Cohort Study. *J Epidemiol* 2007;17(4):120-4.
23. Luc G, Ferrières J, Evans A, Amouyel P, Arveiler D, Cambien F, et al. Banques de matériel biologique dans l'étude de cohorte prospective PRIME. *Rev Épidémiol Sante Publique* 2003;51(1 Pt 2):159-66.
24. Svedentsov EP, Tumanova TV, Shcheglova OO, Devet'yarova ON. Lymphocyte resistance to cold anabiosis of different degree. *Bull Exp Biol Med* 2006;142(2):179-81.
25. Institut national du cancer. Recommandations pré-analytiques en protéomique clinique. Plasma. Prélèvement et conservation. 2007. <http://www.e-cancer.fr/Ressources-biologiques/Documentation-institutionnelle/Documents-travail-INCa/op_com_fichiers-it_807-la_1-ve_1.html> [consulté le 28-5-2009].
26. Omenn GS, States DJ, Adamski M, Blackwell TW, Menon R, Hermjakob H, et al. Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. *Proteomics* 2005;5(13):3226-45.
27. Nilsson TK, Boman K, Jansson JH, Thøgersen AM, Berggren M, Broberg A, et al. Comparison of soluble thrombomodulin, von Willebrand factor, tPA/PAI-1 complex, and high-sensitivity CRP concentrations in serum, EDTA plasma, citrated plasma, and acidified citrated plasma (Stabilyte™) stored at -70 °C for 8-11 years. *Thromb Res* 2005;116(3):249-54.
28. Lewczuk P, Kornhuber J, Wiltfang J. The German Competence Net Dementias: standard operating procedures for the neurochemical dementia diagnostics. *J Neural Transm* 2006;113(8):1075-80.
29. Lewczuk P, Beck G, Esselmann H, Bruckmoser R, Zimmermann R, Fiszer M, et al. Effect of sample collection tubes on cerebrospinal fluid concentrations of tau proteins and amyloid β peptides [letter]. *Clin Chem* 2006;52(2):332-4.
30. Yuan X, Desiderio DM. Proteomics analysis of human cerebrospinal fluid. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005;815(1-2):179-89.

31. Kaiser E, Schönknecht P, Thomann PA, Hunt A, Schröder J. Influence of delayed CSF storage on concentrations of phospho-tau protein (181), total tau protein and beta-amyloid (1-42). *Neurosci Lett* 2007;417(2):193-5.
32. Maier P, Broszinski A, Heizmann U, Boehringer D, Reinhard T. Determination of active TGF- β_2 in aqueous humor prior to and following cryopreservation. *Mol Vis* 2006;12:1477-82.
33. Ericsson C, Franzén B, Nistér M. Frozen tissue biobanks. Tissue handling, cryopreservation, extraction, and use for proteomic analysis. *Acta Oncol* 2006;45(6):643-61.
34. Lewis MR, Callas PW, Jenny NS, Tracy RP. Longitudinal stability of coagulation, fibrinolysis, and inflammation factors in stored plasma samples. *Thromb Haemost* 2001;86(6):1495-500.
35. Rai AJ, Gelfand CA, Haywood BC, Warunek DJ, Yi J, Schuchard MD, et al. HUPO Plasma Proteome Project specimen collection and handling: towards the standardization of parameters for plasma proteome samples. *Proteomics* 2005;5(13):3262-77.
36. Owen RE, Sinclair E, Emu B, Heitman JW, Hirschhorn DF, Epling CL, et al. Loss of T cell responses following long-term cryopreservation. *J Immunol Methods* 2007;326(1-2):93-115.
37. Li AP. Human hepatocytes: isolation, cryopreservation and applications in drug development. *Chem Biol Interact* 2007;168(1):16-29.
38. Rust PA, Tingerides C, Cannon SR, Briggs TWR, Blunn GW. Characterisation of cryopreserved cells freshly isolated from human bone marrow. *Cryo Letters* 2006;27(1):17-28.
39. Meryman HT. Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion* 2007;47(5):935-45.
40. Gao D, Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J* 2000;41(4):187-96.
41. Scott KL, Lecak J, Acker JP. Biopreservation of red blood cells: past, present, and future. *Transfus Med Rev* 2005;19(2):127-42.
42. Wang JH. A comprehensive evaluation of the effects and mechanisms of antifreeze proteins during low-temperature preservation. *Cryobiology* 2000;41(1):1-9.
43. Pegg DE. The history and principles of cryopreservation. *Semin Reprod Med* 2002;20(1):5-13.
44. Bakhach J, Casoli V, Guimberteau JC. La cryopréservation de tissus composites : principe, revue de la littérature et expérience de l'équipe bordelaise. *Ann Chir Plast Esthet* 2007;52(5):531-47.
45. Nørgaard-Pedersen B, Simonsen H. Biological specimen banks in neonatal screening. *Acta Paediatr Suppl* 1999;88(432):106-9.
46. Asslaber M, Abuja PM, Stark K, Eder J, Gottweis H, Trauner M, et al. The Genome Austria Tissue Bank (GATiB). *Pathobiology* 2007;74(4):251-8.
47. Commission du contrôle de qualité des analyses de biologie médicale, Direction générale de la santé. Banque d'items de la phase pré-analytique. Document de travail. 2004.
<<http://www.sante.gouv.fr/htm/dossiers/biologie/bio3.pdf>> [consulté le 21-2-2008].
48. Organisation internationale de normalisation. ISO 8402. Management de la

qualité et assurance de la qualité. Vocabulaire. Genève: ISO; 1994.

49. You JS, Gelfanova V, Knierman MD, Witzmann FA, Wang M, Hale JE. The impact of blood contamination on the proteome of cerebrospinal fluid. *Proteomics* 2005;5(1):290-6.

50. Association française de normalisation. NF EN ISO 9001. Systèmes de management de la qualité. Exigences. Saint-Denis La Plaine: Afnor; 2000.

51. Organisation de coopération et de développement économiques. Prescriptions relatives au fonctionnement des centres de ressources biologiques (CRB). Partie 1 : prescriptions générales applicables à tous les CRB 2004.

<<http://www.oecd.org/dataoecd/60/45/23547784.pdf>> [consulté le 9-9-2009].

52. Organisation de coopération et de développement économiques. Prescriptions relatives au fonctionnement des centres de ressources biologiques (CRB). Critères de certification et de qualité applicables aux CRB. 2004.

<<http://www.oecd.org/dataoecd/60/43/23547759.pdf>> [consulté le 9-9-2009].

53. Assistance publique - hôpitaux de Paris. Référentiel de certification des plates-formes de ressources biologiques. Guide pour remplir la grille d'autoévaluation. Paris: AP-HP; 2006.

54. Agence de la biomédecine. Système de management de la qualité d'une banque de tissus. Saint-Denis La Plaine: Agence de la biomédecine; 2004.

55. The Swedish National Biobank Program. International evaluation of swedish biobanks. March 18, 2005.

<<http://www.biobanks.se/documents/Evaluation%20of%20Swedish%20biobanks%20Final.pdf>> [consulté le 21-7-2006].

56. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Kaeda J, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* 2006;108(1):28-37.

57. Schmitt M, Mengele K, Schueren E, Sweep FCGJ, Foekens JA, Brünner N, et al. European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Pathobiology Group standard operating procedures for the preparation of human tumour tissue extracts suited for the quantitative analysis of tissue-associated biomarkers. *Eur J Cancer* 2007;43(5):835-44.

58. Spector DL, Goldman RD, Leinwand LA. *Cells: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.

59. Dieffenbach CW, Dveksler GS. *PCR primer: a laboratory manual*. Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1995.

60. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

61. Birren BW. *Genome analysis: a laboratory manual*. Vol 4. Mapping genomes. Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1999.

62. Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* 1997;63(10):3741-51.

63. Bastard JP, Chambert S, Ceppa F, Coude M, Grapez E, Loric S, et al. Les méthodes d'extraction et de purification des ARN. *Ann Biol Clin* 2002;60(5):513-23.

64. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989;339(6221):237-8.

65. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VHJ, Bi W, Dee R, van der Schoot E, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RTQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia* 2003;17(12):2474-86.
66. Müller MC, Merx K, Weißer A, Kreil S, Lahaye T, Hehlmann R, et al. Improvement of molecular monitoring of residual disease in leukemias by bedside RNA stabilization. *Leukemia* 2002;16(12):2395-9.
67. Kågedal B, Lindqvist M, Farnebäck M, Lenner L, Peterson C. Failure of the PAXgene™ Blood RNA System to maintain mRNA stability in whole blood. *Clin Chem Lab Med* 2005;43(11):1190-2.
68. Thörn I, Olsson-Strömberg U, Ohlsen C, Jonsson AM, Klangby U, Simonsson B, et al. The impact of RNA stabilization on minimal residual disease assessment in chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2005;90(11):1471-6.
69. Yamamoto T, Sekiyama A, Sekiguchi H, Yoshida T, Miyagi Y. Examination of stability of bone marrow blood RNA in the PAXgene tube. *Lab Hematol* 2006;12(3):143-7.
70. Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, et al. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res* 2005;33(6):e56.
71. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162(1):156-9.
72. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 2006;1(2):581-5.
73. Loi n° 94-653 du 29 juillet 1994 relative au respect du corps humain. *Journal officiel* 1994;30 juillet:11056-68.
74. Loi n° 2004-800 du 6 août 2004 relative à la bioéthique. *Journal officiel* 2004;7 août.
75. Dupont M. Recueillir, conserver et utiliser des échantillons biologiques humains à l'hôpital. Paris: Assistance Publique-Hôpitaux de Paris; Doin; 2008.
76. Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale. *Journal officiel* 1999;11 décembre: 18441-52.
77. Arrêté du 26 avril 2002 modifiant l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale. *Journal officiel* 2002;4 mai:8375-82.
78. Loi n° 2002-303 du 4 mars 2002 relative aux droits des malades et à la qualité du système de santé. *Journal officiel* 2002;5 mars:4118-59.
79. Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. Banques de tissus d'origine humaine autorisées aux activités de préparation, conservation, distribution et cession autorisées aux activités d'importation/exportation. 2005. <http://www.afssaps.fr/var/afssaps_site/storage/original/application/507ec1a14dddea56a47d385313936ab8.pdf> [consulté le 15-10-2009].
80. Arrêté du 2 août 2005 fixant la liste des organes pour lesquels le prélèvement sur une personne décédée présentant un arrêt cardiaque et respiratoire persistant est autorisé. *Journal officiel* 2005;6 août.
81. Arrêté du 2 août 2005 fixant la liste des tissus et des cellules pour lesquels le prélèvement sur une personne décédée présentant un arrêt cardiaque et respiratoire persistant est autorisé. *Journal officiel* 2005;6 août.

82. Décret n° 2005-1618 du 21 décembre 2005 relatif aux règles de sécurité sanitaire portant sur le prélèvement et l'utilisation des éléments et produits du corps humain et modifiant le Code de la santé publique. Journal officiel 2005;23 décembre.

83. Directive 2004/23/CE du Parlement européen et du Conseil du 31 mars 2004 relative à l'établissement de normes de qualité et de sécurité pour le don, l'obtention, le contrôle, la transformation, la conservation, le stockage et la distribution des tissus et cellules humains. Journal officiel de l'Union européenne 2004;L 102:48-58.

84. Arrêté du 1^{er} avril 1997 portant homologation des règles de bonnes pratiques relatives au prélèvement des tissus et au recueil des résidus opératoires issus du corps humain utilisés à des fins thérapeutiques. Journal officiel 1997;6 avril:5275.

85. Arrêté du 29 décembre 1998 portant homologation des règles de bonnes pratiques relatives à la conservation, à la transformation et au transport des tissus d'origine humaine utilisés à des fins thérapeutiques. Journal officiel 1998;8 janvier:389-99.

86. Institut national du cancer. Charte éthique pour le recueil, la conservation et l'utilisation des échantillons tumoraux humains dans le cadre de la prise en charge médicale et de la recherche en cancérologie. Recommandations à l'usage du praticien, du chercheur, et des responsables de tumorothèques et de centres de ressources biologiques 2006.
<<http://www.canceropole-gso.org/upload/stockfile/commun/documents/charteethiquetumorotheque06.pdf>> [consulté le 18-8-2009].

87. Conseil de l'Europe. Recommandation N°R (97) 5 du Comité des ministres aux États membres relative à la protection des données médicales. 1997.
<[http://www.coe.int/t/f/affaires_juridiques/coop%E9ration_juridique/protection_des_donn%E9es/documents/instruments_juridiques_internationaux/EM_Rec\(97\)5_FR.pdf](http://www.coe.int/t/f/affaires_juridiques/coop%E9ration_juridique/protection_des_donn%E9es/documents/instruments_juridiques_internationaux/EM_Rec(97)5_FR.pdf)> [consulté le 14-4-2008].

88. Arrêté du 16 août 2007 fixant le modèle de dossier accompagnant les déclarations et les demandes d'autorisation de conservation et de préparation à des fins scientifiques d'éléments du corps humain. Journal officiel 2007;18 août.

89. Comité consultatif national d'éthique pour les sciences de la vie et de la santé. Avis n° 77. Problèmes éthiques posés par les collections de matériel biologique et les données d'information associées : "biobanques" "biothèques" 2003.
<<http://www.ccne-ethique.fr/docs/fr/avis077.pdf>> [consulté le 8-8-2006].

90. Ministère de la Santé. Projet de loi relatif à la bioéthique. [Dossier de presse] 2001.
<http://www.sante.gouv.fr/htm/actu/bioethiq/34_010620.htm#2> [consulté le 28-5-2009].

91. Arrêté du 11 décembre 2000 fixant la liste des équipements des laboratoires d'analyses de biologie médicale nécessaires à la réalisation des examens des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales. Journal Officiel 2000;16 décembre: 20028-9.

92. Organisation des Nations unies pour l'éducation, la science et la culture. Déclaration internationale sur les données génétiques humaines adoptée à l'unanimité et par acclamation le 16 octobre 2003 par la 32^e session de la Conférence générale de l'Unesco. 2003.
<<http://unesdoc.unesco.org/images/0013/001331/133171f.pdf#page=49>> [consulté le 14-4-2008].

93. Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé. Dossier du patient : amélioration de la qualité de la tenue et du contenu. Réglementation et recommandations. Saint-Denis La Plaine: Anaes; 2003.

94. Department of Health. A code of practice for tissue banks: providing tissues of human origin for therapeutic purposes. London: DOH; 2001.

95. British Association for Tissue Banking. General standards for tissue banking. London: BATB; 2002.

96. Fervers B, Bonichon F, Demard F, Heron JF, Mathoulin S, Philip T, et al. Méthodologie de développement des standards, options et recommandations diagnostiques et thérapeutiques en cancérologie. Bull Cancer 1995;82(10):761-7.

97. Fervers B, Hardy J, Blanc-Vincent MP, Theobald S, Bataillard A, Farsi F, et al. SOR: project methodology. Br J Cancer 2001;84(Sup pl 2):8-16.

98. Fervers B, Burgers JS, Haugh MC, Latreille J, Mlika-Cabanne N, Paquet L, et al. Adaptation of clinical guidelines: literature review and proposition for a framework and procedure. Int J Qual Health Care 2006;18(3):167-76.

99. van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. Leukemia 2003;17(12):2257-317.

Participants

Groupe de travail

Pr Anne Janin, anatomopathologiste, Paris - présidente du groupe de travail ;

M. Frédéric De Bels, adjoint au chef de service, service des bonnes pratiques professionnelles, HAS, Saint-Denis La Plaine ;

Dr Joëlle Favre-Bonté, chef de projet, service des bonnes pratiques professionnelles, HAS, Saint-Denis La Plaine ;

Mme Karine Petitprez, chef de projet, service des bonnes pratiques professionnelles, HAS, Saint-Denis La Plaine

Pr Jean-Louis Beaudeau, biologiste, Paris

Pr Paulette Bioulac-Sage,
anatomopathologiste, Bordeaux

Pr Jacques Bonnetterre, Professeur de
cancérologie, Lille

M. Pascal Boucher, chef de projets ressources
biologiques, INCa, Boulogne-Billancourt

M. Serge Braun, directeur scientifique à
l'Association française de lutte contre les
myopathies, Évry

Mme Ingrid Callies, conseiller pour l'éthique de
la recherche, Paris

Dr Jean-Michel Cayuela, biologiste
hématologue, Paris

Dr Emmanuel Chaubourt, chef de projet à
l'Association française de lutte contre les
myopathies, Évry

Pr Jean-Michel Coindre, pathologiste,
Bordeaux

Dr Bernard Dazey, responsable thérapie
cellulaire et banque de tissus, Établissement
français du sang, Bordeaux

M. Marc Dupont, directeur d'hôpital –
Directions des affaires juridiques, Paris

Dr Charles Duyckaerts, anatomopathologiste,
Paris

Dr Arnaud de Guerra, chef de projet de
recherche à l'Agence de la biomédecine,
Saint-Denis

Dr Dominique Leroux, professeur de génétique
médicale – responsable du laboratoire
d'hématologie cellulaire et médiculaire,
Grenoble

Pr Gérard Luc, endocrinologue, Lille

Dr Elizabeth Luporsi, oncologue, Vandœuvre-
lès-Nancy

Mme Karine Martinière, pharmacienne,
Afssaps, Saint-Denis

M. Gérard Parmentier, , Pontoise

Pr François Plenat, anatomopathologiste,
Vandœuvre-lès-Nancy

Mme Emmanuelle Rial-Sebag, juriste, Toulouse

Dr Xavier Sastre-Garau, pathologiste, Paris

Pr François Sigaux, hématologue, Paris

Sous-groupe « conservation des liquides biologiques à des fins diagnostiques et thérapeutiques »

Mme Françoise Amesland, immunologiste,
Paris

Pr Jean-Louis Beaudeau, biologiste, Paris

Dr Joëlle Benessiano, biologiste, Paris

Dr Katell Peoc'h, biologiste, Paris

Dr Annie Sulahian, immunologiste, Paris

Dr Alain Wargnier, médecin
microbiologiste, Paris

Sous-groupe « extraction d'acides nucléiques à partir d'échantillons cellulaires et tissulaires »

M. Michel Barrois, ingénieur biologiste, Villejuif
Dr Kheïra Beldjord, hématologue, Paris
Dr Joëlle Benessiano, biologiste, Paris
M. Julien Blin, ingénieur, Paris
Dr Jean-Michel Cayuela, biologiste hématologue, Paris
Mme Virginie Fataccioli, ingénieur, Créteil
Mme Daniela Geromin, ingénieur de recherche, Paris

Mme Ingrid Lebigot, ingénieur, Paris
Dr. Christophe Leboeuf, ingénieur, Paris
Pr Karen Leroy, biologiste, Créteil
Mme Stéphanie Meyer, technicienne de recherche clinique, tumorothèque, Paris
M. Louis-François Plassa, cadre administratif pôle biologie pathologie, Paris
M. Thomas Robert, ingénieur d'étude, Villejuif

Sous-groupe « points juridiques »

Mme Ingrid Callies, conseiller pour l'éthique de la recherche, Paris
M. Marc Dupont, directeur d'hôpital – Directions des affaires juridiques, Paris
Mme Emmanuelle Rial-Sebag, juriste, Toulouse

Groupe de lecture

Dr Jean-Pierre Aboulker, épidémiologiste, Villejuif
Pr Christian Chabannon, oncologue médical, Marseille
Dr Liliane Demange, médecin oncologue radiothérapeute et oncogénéticien, Reims
Pr Thierry Fest, hématologue cellulaire, Rennes
Pr Jean-François Flejou, pathologiste, Paris
Dr Yves Guillard, chirurgien oncologue, Nantes
Dr Michel Guiu, médecin pathologiste, Perpignan
Dr Patrick Hamsany, directeur qualité, responsable biothèque, Bordeaux
Pr Jean-Jacques Hauw, anatomopathologiste - neurologie, Paris

M. Gilbert Mongaillard, ingénieur, responsable technique de la biotèque transfusionnelle, Dijon
Dr Agnès Neuville, pathologiste, Strasbourg
Mlle Magali Peter, chargée de coordination tumorothèque régionale, Toulouse
Pr Martine Raphael, hématologue, Le Kremlin-Bicêtre
Dr Christophe Sattonnet, anatomopathologiste, Cagnes-sur-mer
Dr Si Nafa Si Ahmed, hépatologue, Lyon
Pr Jean-Jacques Voigt, médecin pathologiste, Toulouse
Pr Marianne Ziol, pathologiste, Bondy