



NOVEMBRE 2011

Conservation et utilisation des échantillons tumoraux en cancérologie

ACTUALISATION 2011 DES INDICATIONS ET RECOMMANDATIONS AUX TUMOROTHÈQUES

COLLECTION

Référentiels & Recommandations

INDICATIONS 2011 DE CONSERVATION ET DE
CRYOCONSERVATION À VISÉE SANITAIRE

RECOMMANDATIONS POUR L'ORGANISATION
DES TUMOROTHÈQUES ET LA CONSTITUTION
DE COLLECTIONS D'ÉCHANTILLONS
BIOLOGIQUES À DES FINS DE RECHERCHE
EN CANCÉROLOGIE

DESTINÉ À L'USAGE
DES PROFESSIONNELS DE SANTÉ

CE DOCUMENT S'INSCRIT DANS LA MISE EN ŒUVRE DU PLAN CANCER 2009-2013.

Mesure 20

Soutenir la spécialité d'anatomopathologie

Action 20.2

Accompagner la nécessaire adaptation de l'anatomocytopathologie aux évolutions technologiques et scientifiques

Mesure 1

Renforcer les moyens de la recherche pluridisciplinaire

Ce document doit être cité comme suit : © Conservation et utilisation des échantillons tumoraux en cancérologie – actualisation 2011 des indications et recommandations aux tumorothèques, collection Référentiels et Recommandations, INCa, Boulogne-Billancourt, novembre 2011.

Il peut être reproduit ou diffusé librement pour un usage personnel et non destiné à des fins commerciales ou pour de courtes citations. Pour tout autre usage, il convient de demander l'autorisation auprès de l'INCa en remplissant le formulaire de demande de reproduction disponible sur le site Internet www.e-cancer.fr ou auprès de la direction de la communication de l'INCa à l'adresse suivante : diffusion@institutcancer.fr.

TABLE DES MATIÈRES

PRÉAMBULE	5
INDICATIONS 2011 DE CONSERVATION ET DE CRYOCONSERVATION À VISÉE SANITAIRE	7
CONTEXTE ET ENJEUX	8
MÉTHODE	9
SYNTHÈSE	10
TUMEURS SOLIDES ET LYMPHOMES	11
1. MODALITÉS DE CONSERVATION DES TISSUS EN VUE DE LA RÉALISATION DES EXAMENS MOLÉCULAIRES	11
1.1. IMPACT DES MODALITÉS DE CONSERVATION DES TISSUS SUR LA RÉALISATION DES EXAMENS MOLÉCULAIRES	11
1.2. BONNES PRATIQUES DE RECUEIL, D'ACHEMINEMENT ET DE CONSERVATION DES TISSUS	12
◆ Tissus cryopréservés	12
◆ Tissus fixés et inclus en paraffine.....	13
2. TUMEURS POUR LESQUELLES LA CRYOPRÉSERVATION EST INDISPENSABLE A LA PRISE EN CHARGE DES PATIENTS	13
2.1. SARCOMES	13
2.2. LYMPHOMES	14
2.3. TUMEURS PÉDIATRIQUES	15
3. TUMEURS POUR LESQUELLES LA FIXATION DES TISSUS CONSTITUE UNE ALTERNATIVE À LA CRYOPRÉSERVATION POUR LA RÉALISATION DES EXAMENS MOLÉCULAIRES	16
3.1. TUMEURS CÉRÉBRALES	16
3.2. TUMEURS DIGESTIVES	17
◆ Cancer colorectal	17
◆ Tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST).....	18
◆ Tumeurs de l'estomac	18
◆ Tumeurs du syndrome de Lynch.....	18
3.3. CARCINOMES PULMONAIRES	19
3.4. CANCERS DU SEIN	19
3.5. MÉLANOMES	20

LEUCÉMIES ET AUTRES HÉMOPATHIES (HORS LYMPHOMES)	21
1. MODALITÉS DE CONSERVATION DES CELLULES EN VUE DE LA RÉALISATION DES EXAMENS MOLÉCULAIRES ET CYTOGÉNÉTIQUES	21
1.1. EXAMENS MOLÉCULAIRES	21
1.2. EXAMENS CYTOGÉNÉTIQUES	22
2. INDICATIONS DE CRYOPRÉSERVATION POUR LA RÉALISATION DES EXAMENS MOLÉCULAIRES ET CYTOGÉNÉTIQUES	22
2.1. LEUCÉMIES AIGUËS MYÉLOBLASTIQUES	22
2.2. LEUCÉMIES AIGUËS LYMPHOBLASTIQUES de l'enfant et de l'adulte	23
2.3. LEUCÉMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE et syndromes lymphoprolifératifs B chroniques leucémiques	24
2.4. LEUCÉMIE MYÉLOÏDE CHRONIQUE	24
2.5. SYNDROMES MYÉLOPROLIFÉRATIFS NON LMC (Polyglobulie de Vaquez, Thrombocytémie essentielle, Myélofibrose primitive, SMP atypiques ou mixtes SMP/SMD)	25
2.6. MYÉLOME MULTIPLE	25
2.7. SYNDROMES MYÉLODYSPLASIQUES	26
RECOMMANDATIONS POUR L'ORGANISATION DES TUMOROTHÈQUES ET LA CONSTITUTION DE COLLECTIONS D'ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES À DES FINS DE RECHERCHE EN CANCÉROLOGIE	27
CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA MISSION DE CONTRIBUTION SCIENTIFIQUE DES TUMOROTHÈQUES	28
RECOMMANDATIONS AUX RESPONSABLES D'ÉTABLISSEMENTS ET AUX RESPONSABLES DE TUMOROTHÈQUES	31
ARGUMENTAIRE	32
RECOMMANDATIONS AUX PARTENAIRES D'UN RÉSEAU THÉMATIQUE DE RECHERCHE	39
ARGUMENTAIRE	40
L'INCA ET LA VALORISATION SCIENTIFIQUE DES RESSOURCES BIOLOGIQUES	44
BIBLIOGRAPHIE ET RÉFÉRENTIELS	45
BIBLIOGRAPHIE	46
LISTE DES PRINCIPAUX RÉFÉRENTIELS	48
ANNEXES	49

PRÉAMBULE

La mise à jour 2011 des indications et recommandations de l'Institut National du Cancer a pour objectif d'accompagner les tumorothèques dans l'adaptation et la rationalisation de leurs missions afin d'améliorer les conditions d'accès des patients aux avancées issues de la recherche scientifique.

Les tumorothèques sont des infrastructures organisées pour la cryoconservation d'échantillons tumoraux de patients atteints de cancer, en réponse à des obligations médicales et sanitaires, et à des objectifs scientifiques.

La mission dite sanitaire des tumorothèques est inscrite au sein du dispositif d'autorisation des établissements de santé pour le traitement du cancer. A ce titre, la cryopréservation doit être garantie dans le cas où elle s'avère être un pré-requis à la réalisation des examens moléculaires permettant d'améliorer la prise en charge diagnostique et thérapeutique des patients. En parallèle, la mission scientifique relève d'une démarche stratégique visant à préserver des échantillons biologiques destinés à des programmes de recherche en cancérologie.

Toutefois, la cryoconservation est un acte coûteux pour les établissements et demande un effort d'optimisation et de valorisation. Le stockage d'échantillons biologiques dans les tumorothèques ne peut pas et ne doit pas être systématique. Ainsi, l'actualisation des indications de cryoconservation à visée sanitaire tient compte de l'évolution des techniques d'analyse moléculaire des tumeurs et du développement de nouveaux tests qui sont réalisables sur tissus fixés et inclus en paraffine. Par ailleurs, les enjeux de la recherche scientifique conduisent à privilégier la constitution de collections spécifiques répondant à une stratégie définie au sein des établissements et dans le cadre de réseaux de recherche.

Enfin, la cryopréservation est indissociable de la constitution de bases de données clinico-biologiques caractérisant les échantillons conservés. L'ajustement de l'organisation des tumorothèques doit prendre en compte la centralisation et la gestion de ces informations.

**INDICATIONS 2011 DE CONSERVATION ET DE
CRYOCONSERVATION À VISÉE SANITAIRE**

CONTEXTE ET ENJEUX

En mettant en évidence des altérations génétiques somatiques (translocations, amplifications, délétions, anomalies de méthylation et mutations), la caractérisation moléculaire des tumeurs apporte des informations indispensables pour le diagnostic, la classification, le choix et l'évaluation de la réponse au traitement d'un nombre croissant de cancers. Ces anomalies moléculaires sont identifiées par étude directe de l'ADN et de l'ARN des cellules tumorales.

Depuis 2006, ces examens sont effectués au niveau national par 28 plateformes hospitalières de génétique moléculaire des cancers soutenues par l'INCa et la DGOS. En apportant une information décisive pour le diagnostic ou le choix du traitement du patient, ces tests présentent un impact thérapeutique majeur et doivent être effectués en respectant des conditions rigoureuses d'assurance qualité. En particulier, les modalités de conservation des tissus (cryopréservation ou fixation puis inclusion en paraffine) et des cellules tumorales constituent un facteur déterminant pour la qualité de ces examens moléculaires.

À ce titre, il est essentiel de garantir une équité d'accès à la cryopréservation dans les cas où elle s'avère être un prérequis à la réalisation des examens moléculaires. Dans ce cadre, l'accès à une tumorothèque est inscrit dans le dispositif d'autorisation des établissements de santé pour le traitement du cancer. Le cinquième critère d'agrément pour la pratique de la chirurgie des cancers stipule qu'en cas de besoin pour la prise en charge d'un malade, l'accès à une tumorothèque doit être organisé sur place ou garanti par une convention, selon les recommandations de conservation des prélèvements définies par l'Institut National du Cancer.

Étant donné l'évolution des techniques d'analyse et le développement de nouveaux tests moléculaires mis à la disposition des patients, la mise à jour des indications de cryopréservation à visée sanitaire, publiées par l'INCa en 2006, est devenue nécessaire¹. Ce chapitre, constituant un état des lieux en 2011, a vocation à être mis à jour en fonction de l'avancée des connaissances et de la nécessité d'étudier de nouveaux marqueurs pour la prise en charge des patients.

Il convient de distinguer cette conservation à visée sanitaire, pour la prise en charge individuelle des patients, de l'implication des tumorothèques dans la conservation de ressources biologiques destinées à être mises à la disposition de projets de recherche en cancérologie. Ces collections doivent respecter la charte éthique des tumorothèques². Les prélèvements à visée scientifique font ainsi l'objet d'un consentement/non-opposition des patients et d'un encadrement législatif garantissant la confidentialité et l'anonymisation des données et le droit d'opposition à tout moment des patients.

¹ INCa - Les Tumorothèques hospitalières - Recommandations à l'usage des cliniciens et des chercheurs - Novembre 2006 - Disponible sur : <http://www.e-cancer.fr>

² INCa - Charte éthique des tumorothèques - Réédition 2010 - Disponible sur : <http://www.e-cancer.fr>

MÉTHODE

Le présent chapitre constitue la mise à jour 2011 des indications de cryopréservation à visée sanitaire publiées en 2006 par l'INCa. Il émane du travail d'un groupe mis en place par l'INCa et composé de membres des plateformes hospitalières de génétique moléculaire des cancers et des tumorothèques. Il s'est appuyé sur :

- la liste des tests moléculaires à visée sanitaire effectués par les plateformes de génétique moléculaire des cancers (ANNEXES, tableau 1) ;
- les techniques actuelles utilisées pour la réalisation de ces examens ;
- les données de la littérature scientifique.

La première partie du chapitre est consacrée aux tumeurs solides et aux lymphomes. Elle distingue :

- les tumeurs pour lesquelles la cryopréservation est indispensable à la prise en charge des patients ;
- des tumeurs pour lesquelles la fixation des tissus en formol tamponné constitue une alternative à la cryopréservation pour la réalisation des examens moléculaires.

La seconde partie s'intéresse aux leucémies et autres hémopathies pour lesquelles les examens moléculaires et cytogénétiques sont réalisés sur des prélèvements sanguins et/ou médullaires.

Le document a été soumis à la relecture de pathologistes, biologistes, hématologistes et cytogénéticiens.

Les membres du groupe de travail ont complété et signé une déclaration permettant d'identifier les conflits d'intérêts potentiels. Aucun membre n'a déclaré de conflit d'intérêt majeur.

Groupe de travail	
Dr Ivan BIECHE	Institut Curie, site SAINT CLOUD
Dr Jean-Michel CAYUELA	AP-HP hôpital Saint-Louis, PARIS
Dr Fabienne ESCANDE	CHU de LILLE
Pr Dominique FIGARELLA-BRANGER	AP-HM hôpital de la Timone, MARSEILLE
Pr Paul HOFMAN	CHU de NICE
Dr Agnès NEUVILLE	Institut Bergonié, BORDEAUX
Pr Sophie PREVOT	AP-HP hôpital Antoine Béchère, PARIS
Pr Jean-Christophe SABOURIN	CHU de ROUEN
Dr Valérie UGO	CHU de BREST
Dr Séverine VALMARY-DEGANO	CHU de BESANCON

Coordination INCa	
Julien BLIN	Mission Anatomopathologie et Génétique Direction des Soins et de la Vie des Malades
Frédérique NOWAK	Responsable de la mission Anatomopathologie et Génétique Direction des Soins et de la Vie des Malades

SYNTHÈSE

Tumeurs pour lesquelles la cryopréservation est indispensable à la prise en charge des patients

TUMEURS SOLIDES ET LYMPHOMES

SARCOMES

Toute tumeur des tissus mous profonde (située en dessous de l'aponévrose superficielle) ou mesurant plus de 5 cm de grand axe doit être cryopréservée.

La cryopréservation de ces tumeurs est tout particulièrement indispensable chez les patients jeunes, âgés de moins de 40 ans, qui sont les plus susceptibles d'être porteurs d'anomalies moléculaires spécifiques.

LYMPHOMES

TUMEURS PÉDIATRIQUES

LEUCÉMIES ET AUTRES HÉMOPATHIES (HORS LYMPHOMES)

LEUCÉMIES AIGÜES MYÉLOBLASTIQUES

La cryopréservation des cellules tumorales est indispensable au diagnostic de la maladie et recommandée pendant le suivi du patient ou en situation de rechute.

LEUCÉMIES AIGÜES LYMPHOBLASTIQUES

La cryopréservation des cellules tumorales est indispensable au diagnostic, à la rechute et pendant le suivi de la maladie, aux points d'évaluation de la réponse au traitement.

LEUCÉMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE et syndromes lymphoprolifératifs B chroniques leucémiques

La cryopréservation des cellules tumorales est fortement recommandée au diagnostic de la maladie. En cours de traitement, elle peut être réservée seulement aux patients inclus dans des protocoles thérapeutiques la prévoyant.

LEUCÉMIE MYÉLOÏDE CHRONIQUE

La cryopréservation des cellules du sang et de la moelle est indispensable au diagnostic de la maladie et fortement recommandée pendant le suivi.

SYNDROMES MYÉLOPROLIFÉRATIFS NON LMC

La cryopréservation des cellules du sang (et de la moelle si un myélogramme est réalisé) est fortement recommandée au diagnostic.

MYÉLOME MULTIPLE

La cryopréservation des plasmocytes triés est recommandée en situation diagnostique et à la rechute.

SYNDROMES MYÉLODYSPLASIQUES

La cryopréservation des cellules de la moelle est recommandée au diagnostic de la maladie.

TUMEURS SOLIDES ET LYMPHOMES

1. MODALITÉS DE CONSERVATION DES TISSUS EN VUE DE LA RÉALISATION DES EXAMENS MOLÉCULAIRES

1.1. IMPACT DES MODALITÉS DE CONSERVATION DES TISSUS SUR LA RÉALISATION DES EXAMENS MOLÉCULAIRES

La caractérisation moléculaire des tissus tumoraux implique la mise en œuvre de techniques analysant les acides nucléiques (ADN et/ou ARN) extraits de ces tissus ou de techniques d'hybridation *in situ*.

Les examens moléculaires peuvent être effectués soit à partir de tissu fixé en formol tamponné et inclus en paraffine, soit à partir de matériel cryopréservé. La cryopréservation, ou cryoconservation, correspond au maintien de tissus, cellules ou autres échantillons à des températures cryogéniques, de -80°C à -196°C généralement.

La cryopréservation est la pratique de référence pour la conservation des tissus en vue de la réalisation d'analyses de biologie moléculaire car elle garantit un rendement optimal d'extraction des acides nucléiques et une bonne qualité des acides nucléiques ou des protéines.

L'utilisation de tissu fixé et inclus en paraffine constitue une alternative possible à la cryopréservation, sous réserve de respecter des conditions de fixation bien déterminées. La méthode de fixation la plus couramment utilisée et devant être considérée comme un standard est la fixation en formol tamponné suivie d'une inclusion en paraffine. Les autres fixateurs (liquide de Bouin et autres fixateurs contenant de l'acide picrique, fixateurs contenant des dérivés mercuriels) interfèrent fortement avec les analyses moléculaires et ne sont pas recommandés. Il convient ainsi d'éviter de mélanger, dans l'automate d'imprégnation pré-inclusion, les prélèvements fixés en formol tamponné et ceux fixés avec un autre fixateur. Les fixateurs à base d'alcool ou les substituts de formol (type Excell Plus, FineFix ou RCL2, en cours d'évaluation) et l'AFA (alcool/formol/acide acétique) ne sont pas considérés comme des standards³. Ils posent des problèmes de réalisation de certaines analyses (FISH notamment) et de standardisation des analyses au niveau des plateformes hospitalières de génétique moléculaire des cancers.

Les échantillons fixés en formol et inclus en paraffine sont utilisés par les pathologistes en routine clinique pour établir le diagnostic de cancer et sont, de ce fait, disponibles pour tous les patients. L'utilisation de tissu fixé et inclus en paraffine facilite l'analyse morphologique, la détermination exacte de la zone à analyser (lame HES) et la réalisation d'une macrodissection, même si le contrôle morphologique est réalisable sur tissu cryopréservé. Ceci est d'autant plus vrai lorsqu'il s'agit de prélèvements de petite taille (biopsies bronchiques par exemple) pour lesquels il est indispensable de s'assurer de la présence de cellules tumorales et d'en quantifier le nombre afin de pouvoir correctement valider l'analyse moléculaire.

³ INCa - Bonnes pratiques pour la recherche à visée théranostique de mutations somatiques dans les tumeurs solides - Août 2010 - Disponible sur : <http://www.e-cancer.fr>

Contrairement à l'ADN génomique de haut poids moléculaire extrait de tissu cryopréserve, l'ADN extrait à partir de tissu fixé et inclus en paraffine est fragmenté. Son amplification par PCR peut de ce fait s'avérer plus difficile et un pourcentage variable de résultats non interprétables ou de résultats artéfactuels peut être observé en fonction des techniques [DOUGLAS1998, LEWIS2001, SJÖHOLM2005, SRINIVASAN2002]. Certaines techniques sont ainsi difficiles à pratiquer sur tissu fixé et inclus en paraffine et requièrent du matériel cryopréserve car elles nécessitent de l'ADN de bonne qualité :

- techniques nécessitant l'amplification de séquences d'ADN de grande taille, comme par exemple la recherche de clonalité B ou T en cas de suspicion de lymphomes ;
- étude de méthylation de l'ADN.

Les techniques de recherche de mutations ponctuelles et de micro-altérations (séquençage, pyroséquençage, amplification spécifique d'allèle, extension d'amorces, analyse de fragments...) sont quant à elles réalisables à partir d'échantillons fixés en formol et inclus en paraffine et conduisent à un pourcentage acceptable de résultats non interprétables, permettant de ce fait une utilisation en routine clinique [LAMY2011, BEAUFALLER2011].

L'ARN extrait à partir de tissu fixé et inclus en paraffine n'est pas de qualité suffisante pour permettre une utilisation et une exploitation satisfaisantes en routine clinique. La technique de RT-PCR est par conséquent très difficile à pratiquer de manière reproductible et fiable sur ce type de tissu et nécessite du matériel cryopréserve. Elle est malgré tout possible sur ARNs extraits de tissu fixé en formol tamponné et inclus en paraffine si les fragments amplifiés sont inférieurs à 200 bases.

La technique d'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) peut être effectuée sur une grande variété d'échantillons comme les appositions, les coupes de tissus cryopréservés ou les coupes de tissus fixés et inclus en paraffine. Aujourd'hui, la réalisation de cette technique sur coupes de tissus fixés (recherche d'amplifications, de duplications et de délétions géniques, de translocations chromosomiques) permet d'effectuer un contrôle morphologique de l'échantillon analysé tout en assurant une qualité satisfaisante des signaux. Les techniques d'hybridation *in situ* comprennent aussi la CISH (Chromogenic In Situ Hybridization) et la SISH (Silver In Situ Hybridization) réalisables sur les mêmes types de prélèvement.

1.2. BONNES PRATIQUES DE RECUEIL, D'ACHEMINEMENT ET DE CONSERVATION DES TISSUS

Que les prélèvements soient cryopréservés ou fixés, les étapes de prise en charge des prélèvements initiaux doivent respecter des conditions d'assurance qualité rigoureuses.

◆ Tissus cryopréservés

Selon les recommandations de la Haute Autorité de santé, publiées en 2009, la prise en charge des prélèvements doit être effective et minutée dès l'exercice de la pièce opératoire ou la réalisation de la biopsie⁴. Sauf exception, le recueil et l'acheminement avant congélation s'effectuent à

⁴ HAS - Recommandations de bonne pratique - Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin - Septembre 2009 - Disponible sur : <http://www.has-sante.fr>

température ambiante. Le délai de congélation doit être connu et le plus court possible, de préférence inférieur à 30 minutes. Certains petits prélèvements et certaines biopsies peuvent directement être congelés au bloc opératoire, selon des normes et procédures qualité parfaitement établies entre l'équipe chirurgicale et le laboratoire.

Quand le prélèvement est effectué au sein d'une structure ne possédant pas, sur site, une tumorothèque à visée sanitaire et que le délai optimal de congélation ne peut être respecté, l'utilisation de milieux de préservation, permettant de stabiliser les tissus frais en préservant les acides nucléiques et particulièrement l'ARN, peut constituer une alternative. Celle-ci a néanmoins l'inconvénient de ne pas permettre un contrôle facile de la morphologie du prélèvement. Elle est à envisager après discussion avec la plateforme ou le laboratoire réalisant les examens moléculaires. L'utilisation de prélèvements conditionnés sous vide n'est pas encore validée.

Pour les pièces opératoires, le ou les fragments de la pièce destinés à la congélation doivent être sélectionnés par un anatomopathologiste en fonction des renseignements cliniques et des données macroscopiques. Le choix des biopsies destinées à la congélation dépend quant à lui des données macroscopiques recueillies par le médecin préleveur qui, dans tous les cas, s'est assuré qu'un fragment en miroir a bien été fixé en vue d'effectuer le diagnostic anatomopathologique.

◆ Tissus fixés et inclus en paraffine

Les conditions de recueil, d'acheminement et de traitement des tissus destinés à être fixés (formol tamponné en standard) puis inclus en paraffine et sur lesquels des examens moléculaires seront réalisés ont été précisées dans un guide de bonnes pratiques publié par l'INCa en août 2010⁵. En particulier, la prise en charge des prélèvements doit être effective et minutée dès l'exérèse de la pièce opératoire ou la réalisation de la biopsie. La durée de fixation doit être, de préférence, inférieure à 24 heures et, dans la mesure du possible, ne pas excéder 48 heures.

2. TUMEURS POUR LESQUELLES LA CRYOPRÉSERVATION EST INDISPENSABLE A LA PRISE EN CHARGE DES PATIENTS

2.1. SARCOMES

Les sarcomes sont des tumeurs rares et variées qui peuvent toucher les tissus mous, les os et les viscères. Leur diagnostic est établi sur des critères morphologiques, des études complémentaires en immunohistochimie et dans presque la moitié des cas, sur des critères moléculaires. Les anomalies moléculaires recherchées sont de quatre ordres : translocations réciproques, mutations activatrices, mutations inactivatrices et amplifications simples (ANNEXES, tableau 2) [COINDRE2010]. La recherche d'anomalies moléculaires est ainsi indispensable pour établir un diagnostic précis et ce d'autant que les traitements sont de plus en plus adaptés au type histologique de sarcome. De plus, les anomalies moléculaires des sarcomes constituent des cibles potentielles pour les nouveaux traitements. De ce fait, l'inclusion des patients dans les essais cliniques est et sera conditionnée par la présence de l'anomalie génétique somatique [JAIN2010].

⁵ INCa - Bonnes pratiques pour la recherche à visée théranostique de mutations somatiques dans les tumeurs solides - Août 2010 - Disponible sur : <http://www.e-cancer.fr>

Nécessitant des techniques de FISH, de PCR ou de RT-PCR, la recherche des anomalies moléculaires se fait au mieux à partir de tissu tumoral cryopréservé. L'utilisation de tissus fixés en formol et inclus en paraffine reste néanmoins possible avec une sensibilité de l'ordre de 95 % pour les études par RT-PCR (dans la mesure où les amorces choisies amplifient une fraction du transcrit chimérique ne dépassant pas 200 paires de bases), de 93 % pour les études par FISH et de 97 % pour les études par PCR⁶.

Le STIC GENSARC, qui a débuté en 2008, a pour objectif de comparer la FISH ou la RT-PCR sur prélèvements fixés à une méthode de référence effectuée sur prélèvements congelés pour 5 types de sarcomes (gènes de fusion caractéristiques des tumeurs de la famille du sarcome d'Ewing, des synoviosarcomes, des rhabdomyosarcomes, et des DFSP, et amplification des gènes de la région 12q dans les liposarcomes)⁷.

Au final, toute tumeur des tissus mous profonde (située en dessous de l'aponévrose superficielle) ou mesurant plus de 5 cm de grand axe doit être cryopréservée. La cryopréservation de ces tumeurs est tout particulièrement indispensable chez les patients jeunes, âgés de moins de 40 ans qui sont les plus susceptibles d'être porteurs d'anomalies moléculaires spécifiques.

2.2. LYMPHOMES

Les lymphomes malins non hodgkiniens (LNH) représentent un groupe de maladies hétérogènes résultant de la prolifération maligne de cellules lymphoïdes matures, B ou T/NK, à différents stades de différenciation. Cette prolifération peut se faire aux dépens d'un organe lymphoïde (ganglion, rate, moelle osseuse) ou autre (peau, estomac, poumon...). Le diagnostic repose sur l'examen morphologique et immunologique de la biopsie tissulaire réalisée à partir de la lésion responsable des symptômes de la maladie. Lorsque cette analyse ne permet pas de conclure, la cytogénétique et la biologie moléculaire apportent une aide diagnostique.

L'évaluation de la clonalité B/T permet par exemple de distinguer une lymphoprolifération réactionnelle polyclonale d'une lymphoprolifération maligne monoclonale quand l'analyse morphologique et immunohistochimique est difficile à interpréter et ne peut apporter la preuve définitive du lymphome. Le résultat de l'évaluation de la clonalité doit, dans tous les cas, être mis en regard avec les données cliniques, morphologiques et phénotypiques.

Certaines translocations sont par ailleurs hautement spécifiques de différents sous-types de lymphomes et leur recherche fait partie de la démarche diagnostique :

- recherche de la translocation t(11;14)(q13;q32) dans le lymphome du manteau, la détection immunohistochimique de la cycline D1 pouvant constituer une alternative à cette recherche ;
- recherche de la translocation t(2;5) et des autres translocations récurrentes dans le lymphome anaplasique à grandes cellules T/NK, pouvant être remplacée par la détection immunohistochimique de la protéine ALK.

⁶ Source : base de données nationale du Réseau de Référence en Pathologie des Sarcomes des tissus mous et des viscères RRePS

⁷ GENSARC 2008 : Evaluation médico-économique de la détection moléculaire par hybridation in situ en fluorescence (FISH) et par réaction en chaîne à la polymérase (PCR) des translocations et amplifications spécifiques dans les sarcomes

Parmi les autres translocations spécifiques, les translocations t(11;18)(q21;q21), t(1;14)(p22;q32), t(14;18)(q32;q21) et t(3;14)(p13;q32) mises en évidence dans le lymphome du Malt peuvent être citées.

D'autres translocations présentent un grand intérêt diagnostique sans être spécifiques :

- la translocation t(8;14)(q24;q32) et ses variantes t(2;8)(p12;q24) et t(8;22)(q24;q11) dans le lymphome de Burkitt impliquant l'oncogène *cMYC* ;
- la translocation t(14;18)(q32;q21) dans le lymphome folliculaire impliquant *BCL2* ;
- les translocations t(3;14)(q27;q32) ou t(3;?) (q27;?) dans les lymphomes B diffus à grandes cellules.

Si le diagnostic de lymphome de Burkitt repose sur la présence d'une translocation t(8;14)(q24;q32) (*IgH/cMYC*) ou de l'une de ses variantes *IgK/cMYC* ou *IgL/cMYC*, cet examen n'est pas suffisant, tout particulièrement dans les cas difficiles pouvant correspondre à la catégorie provisoire des lymphomes inclassables, intermédiaires entre lymphome de Burkitt et lymphomes B diffus à grandes cellules (WHO 2009). Dans ce contexte, il est impératif de vérifier, sur le caryotype ou par FISH, l'absence de réarrangement surajouté à la translocation t(8;14), en particulier l'absence de la translocation t(14;18) (*IgH/BCL2*) et de réarrangements *BCL6* (3q27).

Certaines translocations sont en outre prédictives de la réponse au traitement, comme la translocation t(11;18)(q21;q21) dans le lymphome de Malt gastrique.

Enfin, certaines de ces anomalies peuvent être recherchées sur prélèvement sanguin dans le cadre du suivi de la maladie résiduelle, comme dans le lymphome folliculaire ou le lymphome du manteau.

Le choix des techniques utilisées (FISH, caryotype, PCR ou RT-PCR) pour la mise en évidence des translocations spécifiques dans les lymphomes dépend en particulier de la nature de l'altération et du nombre de points de cassure. Ainsi, la translocation t(14;18)(q32;q21) peut être mise en évidence par FISH ou par PCR. La translocation t(2;5)(p23;q35) dans le lymphome anaplasique à grandes cellules est généralement mise en évidence par RT-PCR alors que la recherche de la translocation t(8;14) dans le lymphome de Burkitt se fait plus aisément par FISH interphasique sur tissu fixé ou par caryotype sur tissu frais et stérile mis en culture.

Comme il est impossible de prédire, avant l'analyse par le pathologiste, l'anomalie à rechercher ainsi que la technique à mettre en œuvre, la fixation par le formol tamponné, la cryopréservation et/ou la mise en culture sont des standards nécessaires en vue de la réalisation des examens moléculaires et/ou cytogénétiques.

2.3. TUMEURS PÉDIATRIQUES

En France, les tumeurs de l'enfant représentent environ 1 800 cas par an chez le sujet de moins de 18 ans. Ce chiffre inclut les leucémies, les lymphomes, les sarcomes, les tumeurs cérébrales et toutes les tumeurs de blastème.

Compte tenu de la difficulté pour établir un diagnostic de présomption dans la plupart des cas et de la rareté de ces cancers, la cryopréservation est indispensable.

3. TUMEURS POUR LESQUELLES LA FIXATION DES TISSUS CONSTITUE UNE ALTERNATIVE À LA CRYOPRÉSERVATION POUR LA RÉALISATION DES EXAMENS MOLÉCULAIRES

Pour l'ensemble des cancers cités au sein de ce chapitre, les examens moléculaires nécessaires à la prise en charge des patients sont réalisables sur des échantillons fixés et inclus en paraffine en respectant les conditions décrites plus haut.

3.1. TUMEURS CÉRÉBRALES

Les tumeurs cérébrales primitives sont représentées majoritairement par les gliomes. Selon la classification de l'OMS, actuellement la plus utilisée, les trois principales formes de gliomes - l'astrocytome, l'oligodendrogliome et l'épendymome – sont classées en fonction de leur cellule originelle probable et de leur degré de malignité. Les glioblastomes sont classés dans les tumeurs astrocytaires de grade IV à très forte malignité. Cependant, la classification de l'OMS manque de reproductibilité du fait de difficultés à typer le gliome selon son origine présumptive, astrocytaire ou oligodendrogliale, et son grade. Dans ce contexte, l'identification de marqueurs moléculaires d'intérêts diagnostiques est cruciale. Certains marqueurs ont en outre un intérêt pronostique et/ou prédictif de réponse aux traitements (ANNEXES, tableau 3).

Chez l'adulte, la présence d'une mutation dans les gènes *IDH* (*IDH1* ou *IDH2*) est un marqueur diagnostique des gliomes infiltrants de grade II et III (astrocytaires, oligodendrogliaux ou mixtes) et des glioblastomes secondaires. En effet, une mutation est identifiée dans 60 à plus de 80 % de ces gliomes [KLOOSTERHOF2010]. C'est également un marqueur de bon pronostic mais la présence de mutation ne permet pas de prédire la réponse aux traitements (radiothérapie et/ou chimiothérapie). La mutation R132H, largement majoritaire (correspondant à plus de 90 % des mutations de *IDH1*), peut être détectée par un anticorps spécifique [CAPPER2010]. En cas de négativité, l'étude moléculaire (séquençage direct ou autre technique) de *IDH1* et de *IDH2* doit être effectuée.

D'autre part, la présence d'une codélétion complète 1p19q, par translocation réciproque t(1;19)(q10;p10), est un argument fort en faveur d'un diagnostic d'oligodendrogliome bien qu'elle puisse également être observée dans près de 50 % des gliomes mixtes oligoastrocytaires de grade II ou III. Il s'agit en outre d'un marqueur de bon pronostic chez les patients traités par radiothérapie et/ou chimiothérapie.

Par ailleurs, la méthylation du gène *MGMT* est un facteur prédictif de réponse aux traitements alkylants. Ceci est notamment bien établi chez les patients présentant un glioblastome traités par traitement standard (protocole STUPP). Elle est un marqueur de bon pronostic chez les patients présentant un gliome anaplasique traité par radiothérapie et/ou chimiothérapie [RIEMENSCHNEIDER2010]. Un STIC, actuellement en cours, a pour objectif de valider une technique d'analyse de la méthylation du gène *MGMT* sur prélèvements fixés ou cryopréservés.

Enfin, la présence d'une fusion du gène *BRAF* est un marqueur en faveur du diagnostic d'astrocytome pilocytique, permettant de le distinguer d'un gliome infiltrant, surtout chez l'enfant où les mutations *IDH* sont exceptionnelles.

Les progrès des techniques de biologie moléculaire permettent de mettre en évidence la plupart des altérations énumérées ci-dessus sur du matériel fixé au formol (ou formol Zinc) et enrobé en paraffine [RIEMENSCHNEIDER2010, VONDEIMLING2011].

3.2. TUMEURS DIGESTIVES

◆ Cancer colorectal

Dans un contexte de cancer colorectal métastatique, seuls les patients dont la tumeur ne présente pas de mutations du gène *KRAS* sont susceptibles de bénéficier d'un traitement ciblé par des anticorps monoclonaux anti-récepteurs à l'EGF (*Epidermal Growth Factor Receptor*). Ainsi, l'Agence européenne du médicament (EMA pour *European Medicines Agency*) a autorisé l'utilisation du cetuximab et du panitumumab uniquement pour les patients dont la tumeur porte la forme non mutée du gène *KRAS*, rendant la recherche du statut mutationnel de ce gène indispensable à la prise en charge de ces patients.

La recherche des mutations du gène *KRAS* est effectuée par les 28 plateformes hospitalières de génétique moléculaire des cancers *via* des techniques d'analyse moléculaire essentiellement réalisées sur matériel fixé en formol et inclus en paraffine. Ainsi, en 2010, 16 581 patients atteints d'un cancer colorectal métastatique ont bénéficié de ce test, avec un pourcentage de mutations identifiées de 37,5 % et un pourcentage de résultats non interprétables de 4,1 %. Ces éléments démontrent la faisabilité, à une échelle nationale, de cette analyse moléculaire à visée prédictive à partir d'échantillons fixés en formol et inclus en paraffine.

D'autre part, de nouveaux marqueurs sont en cours de validation et pourraient être amenés à être intégrés prochainement en pratique clinique.

La présence d'une mutation du gène *BRAF*, retrouvée dans 5 à 10 % des tumeurs colorectales, est associée à un pronostic péjoratif et pourrait être également associée à une absence de réponse aux anticorps anti-EGFR. Cependant, le nombre trop limité de patients mutés dans les études cliniques ne permet pas d'établir à ce jour de conclusion sur le caractère prédictif de ce marqueur.

15 % des cancers du côlon sont dits de phénotype MSI (*microsatellite instability*), résultant soit d'une mutation germinale de l'un des gènes du système *MMR* (Syndrome de Lynch), soit d'une hyperméthylation du promoteur du gène *MLH1*, et 85 % sont dits de phénotype MSS (*microsatellite stability*) ou CIN (*chromosomal instability*). Les tumeurs MSI ont un meilleur pronostic que les tumeurs MSS [POPAT2005]. En cas de cancer du côlon de stade II, une chimiothérapie adjuvante à base de 5FU est associée à une diminution de 3,6 % du risque relatif de décès à 5 ans et les recommandations actuelles sont de discuter un tel traitement en cas de tumeur de stade II de haut risque [QUASAR2007]. Le statut MSI est un facteur prédictif de non bénéfice du 5FU en adjuvant [RIBIC2003, SARGENT2010]. Ainsi, en cas de cancer de stade II et de proposition de chimiothérapie adjuvante, une recherche du phénotype MSI/MSS pourrait être réalisée et les patients avec une tumeur MSI ne devraient pas recevoir de 5FU. Ceci pourrait, à très court terme, devenir un standard dans la prise en charge des patients et ainsi induire la recherche de cette instabilité génétique (par un test RER) chez tous les patients atteints d'un cancer colorectal de stade II. Cette recherche est effectuée par une technique d'analyse de fragments réalisable sur matériel fixé.

Pour les tumeurs rectocoliques, les examens moléculaires nécessaires à la prise en charge des patients sont réalisables sur des échantillons fixés en formol tamponné et inclus en paraffine.

◆ Tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST)

Les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) sont des tumeurs conjonctives du tube digestif qui se développent principalement à partir de l'estomac (60 à 70 %) et de l'intestin grêle (20 à 30 %). Les mutations ou microdélétions du gène *KIT*, observées dans 50 à 90 % des cas, sont responsables d'une activation spontanée de la protéine KIT, récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase. Le diagnostic est d'abord établi sur des critères histologiques et *via* la détection de l'expression de KIT et de DOG1 en immunohistochimie. Dans les 5 % de cas où cette expression protéique n'est pas détectée, ainsi que dans quelques cas difficiles, la recherche de mutations de *KIT* ou de *PDGFRA* est nécessaire au diagnostic. Cette recherche est par ailleurs indispensable dans les formes de risque intermédiaire et de haut risque d'évolutivité ainsi que dans les formes métastatiques de GIST afin d'ajuster le traitement par inhibiteurs de tyrosine kinase, la réponse antitumorale étant corrélée à la nature et la présence de certaines mutations.

Pour les tumeurs stromales gastro-intestinales, les examens moléculaires nécessaires à la prise en charge des patients sont réalisables sur des échantillons fixés en formol tamponné et inclus en paraffine.

◆ Tumeurs de l'estomac

L'ajout du trastuzumab au traitement par cisplatine et fluoropyrimidine amène un bénéfice en termes de taux de réponse et de médiane de survie globale chez les patients atteints de cancer gastrique métastatique et dont la tumeur surexprime la protéine HER2. En décembre 2009, le trastuzumab a ainsi reçu une extension de son AMM pour le traitement de ces patients.

La surexpression de la protéine HER2 est mise en évidence en immunohistochimie. En cas de résultat équivoque (2+), elle est confirmée par une amplification du gène *HER2* mesurée par hybridation *in situ* sur tissu fixé en formol et inclus en paraffine.

Pour les tumeurs de l'estomac, les examens moléculaires nécessaires à la prise en charge des patients sont réalisables sur des échantillons fixés en formol tamponné et inclus en paraffine.

◆ Tumeurs du syndrome de Lynch

Le syndrome de Lynch (également appelé syndrome HNPCC), qui se caractérise par l'altération constitutionnelle d'un des gènes *MMR* (*mismatch repair*), prédispose à un risque accru de cancer colorectal et de cancers touchant d'autres organes : l'endomètre, l'intestin grêle et l'urothélium principalement (spectre étroit du syndrome de Lynch).

Les tumeurs développées dans ce cadre étant quasiment toujours de type MSI, la recherche de ce phénotype tumoral est une étape importante dans l'identification des patients candidats à une étude constitutionnelle des gènes *MMR*. En pratique, il est recommandé de réaliser ce pré-criblage somatique pour tous les patients atteints d'un cancer du spectre large avant 60 ans [OLSCHWANG2004]. Cette recherche est effectuée par une technique d'analyse de fragments réalisable sur matériel fixé. Le test MSI est complété par une recherche, en immunohistochimie, de perte d'expression des protéines codées par les gènes *MMR*.

Pour les tumeurs du syndrome de Lynch, les examens moléculaires nécessaires à la prise en charge des patients sont réalisables sur des échantillons fixés en formol tamponné et inclus en paraffine.

Il est possible d'optimiser encore l'orientation des patients vers une consultation d'oncogénétique et l'étude éventuelle des gènes *MMR*. En effet, certains cancers sporadiques présentent également une instabilité des microsatellites due à une hyperméthylation du promoteur du gène *MLH1*. Dans le cas particulier du cancer colorectal, cette méthylation est par ailleurs fréquemment associée à une mutation du gène *BRAF* (70 % des cas) [WANG2003]. Il est donc possible de réaliser de façon complémentaire au test MSI, la recherche d'une hyperméthylation du promoteur du gène *MLH1* et une recherche de mutation *BRAF* : les patients MSI avec absence de mutation *BRAF* et de méthylation *MLH1* sont les plus susceptibles de présenter une mutation constitutive des gènes *MMR* [LOUGHREY2007, DOMINGO2004].

3.3. CARCINOMES PULMONAIRES

Chez les patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules, l'efficacité des traitements ciblés par inhibiteurs de tyrosine kinase anti-EGFR (ITK-EGFR) est clairement corrélée à l'existence d'une mutation activatrice du gène *EGFR*. Ces mutations sont principalement retrouvées au sein des exons 18, 19 et 21, codant le domaine kinase du récepteur de l'EGF. En avril 2009, l'EMEA a ainsi donné une autorisation de mise sur le marché pour le gefitinib réservée aux patients atteints d'une forme avancée ou métastatique de cancer du poumon non à petites cellules et dont la tumeur porte une mutation activatrice de l'*EGFR*.

Le test *EGFR* est effectué par l'ensemble des 28 plateformes hospitalières de génétique moléculaire des cancers *via* des techniques d'analyse moléculaire essentiellement réalisées sur matériel fixé en formol et inclus en paraffine. Ainsi, en 2010, 16 834 patients ont bénéficié de ce test avec un pourcentage de mutations identifiées de 10,5 % et un pourcentage de résultats non interprétables de 8,7 %. Ces éléments démontrent la faisabilité, à une échelle nationale, de cette analyse moléculaire à visée prédictive à partir d'échantillons fixés en formol et inclus en paraffine.

Pour les carcinomes pulmonaires, les examens moléculaires nécessaires à la prise en charge des patients sont réalisables sur des échantillons fixés en formol tamponné et inclus en paraffine.

De par la faible quantité d'ADN généralement disponible, l'émergence de nouveaux biomarqueurs pourrait remettre en cause une réalisation des tests exclusivement sur ADN extraits à partir d'échantillons fixés en formol et inclus en paraffine. Une optimisation des extractions des acides nucléiques à partir des tissus fixés et inclus en paraffine devra par conséquent être menée. La multiplicité des biomarqueurs nécessitera en outre l'élaboration d'arbres décisionnels permettant la hiérarchisation des examens.

3.4. CANCERS DU SEIN

Le trastuzumab est indiqué pour le traitement des patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique et dont la tumeur surexprime la protéine HER2. En 2006, il a ainsi reçu une extension de son AMM pour le traitement adjuvant du cancer du sein avec surexpression tumorale de HER2. Cette surexpression est mise en évidence en immunohistochimie. En cas de résultat équivoque (2+), elle est confirmée par une amplification du gène *HER2* mesurée par hybridation *in situ* sur tissu fixé en formol et inclus en paraffine.

Pour les tumeurs du sein, les examens moléculaires nécessaires à la prise en charge des patients sont réalisables sur des échantillons fixés en formol tamponné et inclus en paraffine.

3.5. MÉLANOMES

La mutation V600E du gène *BRAF* est détectée dans les cellules tumorales de 40 % à 60 % des patients atteints de mélanome. Le vemurafenib, un inhibiteur de *BRAF*, est indiqué pour le traitement des patients atteints de mélanome métastatique et porteurs de cette mutation *BRAF V600E*, après échec d'au moins une ligne de traitement. L'AFSSAPS a ainsi délivré en avril 2011 une ATU de cohorte pour ces patients (*autorisation temporaire d'utilisation*). La recherche de la mutation *BRAF V600E* est effectuée par des techniques de biologie moléculaire essentiellement réalisées sur matériel fixé en formol et inclus en paraffine. De plus, des mutations de *KIT* sont présentes chez des patients atteints de mélanome, à des fréquences variables selon le sous-type tumoral. Des essais cliniques sont en cours pour une extension d'indications de plusieurs inhibiteurs de *KIT* (imatinib, nilotinib, dasatinib et sunitinib) chez ces patients.

Pour les mélanomes, les examens moléculaires nécessaires à la prise en charge des patients sont réalisables sur des échantillons fixés en formol tamponné et inclus en paraffine.

LEUCÉMIES ET AUTRES HÉMOPATHIES (HORS LYMPHOMES)

La caractérisation des altérations génétiques acquises au cours de l'histoire naturelle des hémopathies malignes est devenue un élément fondamental pour la prise en charge thérapeutique des patients⁸. Certaines de ces altérations permettent en effet de préciser le diagnostic et de définir des sous-groupes pronostiques et théranostiques. D'autres constituent des marqueurs tumoraux susceptibles d'être utilisés pour apprécier la qualité de la réponse au traitement lors du suivi de la maladie. Cela implique la mise en œuvre d'un panel d'analyses, cytogénétiques et de biologie moléculaire, réalisées le plus souvent à partir de prélèvements sanguins ou médullaires [MACINTYRE2010].

Etant généralement déterminée par le résultat des analyses cytologiques, microscopiques et immunologiques, la prescription de ces analyses intervient le plus souvent de façon différée et rend nécessaire la conservation des cellules tumorales avant l'initiation du traitement. Les cellules tumorales ainsi conservées pourront être utilisées à tout moment pour réaliser les analyses cytogénétiques ou de biologie moléculaire nécessaires.

Concernant la biologie moléculaire, on assiste à l'émergence de méthodes diagnostiques de certains marqueurs (*JAK2 V617F* et *BCR-ABL*) réalisables sur une partie de l'échantillon primaire (sang total) qui permettent de s'affranchir de l'étape de cryopréservation. Dans une telle situation, il est à noter qu'aucune nouvelle analyse de biologie moléculaire ne pourra être réalisée au cours du processus de prise en charge du patient.

1. MODALITÉS DE CONSERVATION DES CELLULES EN VUE DE LA RÉALISATION DES EXAMENS MOLÉCULAIRES ET CYTOGÉNÉTIQUES

1.1. EXAMENS MOLÉCULAIRES

Pour la réalisation d'analyses de biologie moléculaire, les recommandations de la HAS, publiées en 2009, précisent que les prélèvements de sang ou de moelle, à partir desquels seront extraits les acides nucléiques nécessaires à la réalisation des examens, doivent être prélevés sur un anticoagulant dont les éventuelles traces résiduelles n'interféreront pas avec les enzymes utilisées en biologie moléculaire. L'anticoagulant recommandé est l'acide éthylène diamine tétracétique (EDTA-K3). L'héparine (héparinate de lithium) doit être évitée du fait de son pouvoir inhibiteur sur les ADN polymérases utilisées pour la PCR.

Par ailleurs, la prise en charge du prélèvement sanguin ou médullaire doit être effective et minutée dès sa réalisation. Le recueil et l'acheminement s'effectuent à température ambiante (température comprise entre 15 et 25°C), avec un transfert le plus rapide possible et, de préférence, n'excédant pas 24 heures.

⁸ Société Française d'Hématologie - Référentiel 2009 - <http://sfh.hematologie.net>

Le mode de conservation retenu doit être adapté aux examens susceptibles d'être pratiqués ultérieurement :

- la congélation en culot sec ou en liquide de lyse est adaptée à l'extraction des acides nucléiques ;
- la congélation de cellules viables en suspension dans une solution cryoprotectrice permet l'utilisation des cellules pour des applications comme la mise en culture cellulaire, l'immunophénotypage et l'extraction des acides nucléiques.

1.2. EXAMENS CYTOGÉNÉTIQUES

Pour la réalisation des analyses cytogénétiques, l'EDTA doit être proscrit et l'héparine est alors recommandée comme anticoagulant. La prise en charge du prélèvement sanguin ou médullaire doit être effective et minutée dès sa réalisation. Le recueil et l'acheminement s'effectuent à température ambiante (température comprise entre 15 et 25°C), avec un transfert le plus rapide possible et, de préférence, n'excédant pas 24 heures.

Les cellules doivent être mises en culture le jour de la réception. Après 24 à 72 heures de culture puis traitement des cellules (blocage en mitose, choc hypotonique puis fixation), une partie de la préparation obtenue est étalée sur lames afin de réaliser les analyses cytogénétiques nécessaires à l'établissement du diagnostic, l'autre partie est aliquotée et cryopréservée à -20°C.

Les lames non utilisées peuvent être conservées pour réaliser d'éventuelles analyses complémentaires ultérieures. Les aliquots cryoconservés permettent, si nécessaire, de relancer une batterie de tests au cours du processus de prise en charge du patient.

2. INDICATIONS DE CRYOPRÉSERVATION POUR LA RÉALISATION DES EXAMENS MOLÉCULAIRES ET CYTOGÉNÉTIQUES

Dans tous les cas, le caractère indispensable de la cryopréservation doit être examiné au regard de la présentation clinique et de la stratégie thérapeutique.

2.1. LEUCÉMIES AIGÜES MYÉLOBLASTIQUES

Les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) sont des proliférations clonales aiguës ou subaiguës, développées à partir des précurseurs hématopoïétiques (blastés) de la lignée myéloïde, érythroïde ou mégacaryocytaire.

La dernière révision de la classification des LAM, proposée par l'Organisation mondiale de la santé, intègre le fait qu'un nombre croissant de ces leucémies peuvent être définies par les anomalies génétiques récurrentes auxquelles elles sont associées [VARDIMAN2009]. D'autre part, il est bien établi que, dans cette maladie, le caryotype constitue le facteur pronostique de la rechute le plus puissant. Plus récemment, des données de génétique moléculaire ont permis de subdiviser le groupe des LAM de caryotype normal en sous-groupes pronostiques. Ainsi, les LAM avec t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16)(p13.1;q22) sont associées à un bon pronostic alors que celles avec

inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2), t(6;9)(p23;q34) ou t(v;11)(v;q23) avec *MLL* réarrangé, -5 ou del(5q), -7, abnl(17p) présentent un pronostic catastrophique [KAYSER2011]. Entre les deux, on trouve un ensemble de LAM dont la grande majorité présente un caryotype normal et dont le pronostic peut être établi par des données de génétique moléculaire : mutations de *C/EBP α* , de *NPM1*, de *FLT3* [DÖHNER2010].

Ces anomalies constituent des éléments pronostiques majeurs et orientent la prise en charge thérapeutique des patients. Elles sont mises en évidence par des analyses cytogénétiques et/ou moléculaires (caryotype, FISH, RT-PCR).

La qualité de la réponse au traitement, appréciée par quantification de la maladie résiduelle, serait un paramètre prédictif du risque de rechute permettant d'ajuster la stratégie thérapeutique en cours de traitement. Les transcrits de fusion, de même que les allèles mutés de certains gènes, constituent les marqueurs moléculaires les plus employés pour la quantification de la maladie résiduelle par PCR quantitative en temps réel.

Dans les LAM, la cryopréservation des cellules tumorales est donc indispensable au diagnostic de la maladie et recommandée pendant le suivi du patient ou en situation de rechute.

2.2. LEUCÉMIES AIGUËS LYMPHOBLASTIQUES DE L'ENFANT ET DE L'ADULTE

Les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) sont caractérisées par une prolifération incontrôlée de cellules immatures de la lignée lymphoïde.

Comme pour les LAM, la dernière révision de la classification des LAL de la lignée B, proposée par l'OMS, intègre un certain nombre d'anomalies chromosomiques / moléculaires comme :

- la t(9;22)(q34;q11) avec fusion *BCR-ABL* ;
- les t(v;11)(v;q23) avec *MLL* remanié ;
- la t(1;19) (q23;p13) avec fusion *E2A-PBX1* ;
- la t(12;21)(p13;q22) avec fusion *TEL-AML1* ;
- la t(5;14)(q31;q32) avec juxtaposition *IL-3-IgH* ;
- les caryotypes hyperdiploïde et hypodiploïde.

Ces anomalies constituent des éléments pronostiques majeurs et orientent la prise en charge thérapeutique des patients. Elles sont mises en évidence par des analyses cytogénétiques et/ou moléculaires (caryotype, FISH, RT-PCR).

En outre, il a été établi que la qualité de la réponse aux phases précoces du traitement, appréciée par quantification de la maladie résiduelle, est un paramètre prédictif du risque de rechute, puissant et indépendant. Les réarrangements des gènes *IG* et *TCR* constituent les marqueurs tumoraux les plus largement utilisés pour la quantification de la maladie résiduelle, par PCR en temps réel spécifique d'allèle. Les transcrits *BCR-ABL* sont également utilisés comme marqueur dans les LAL Ph positives.

Dans les LAL, la cryopréservation des cellules tumorales est donc indispensable au diagnostic, à la rechute et pendant le suivi de la maladie, aux points d'évaluation de la réponse au traitement.

2.3. LEUCÉMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE et syndromes lymphoprolifératifs B chroniques leucémiques

La leucémie lymphoïde chronique est caractérisée par une accumulation anormale dans le sang de lymphocytes de type B, peu différents des cellules normales sur l'aspect cytologique.

L'attitude thérapeutique, allant d'une simple surveillance de la maladie à la prescription d'une chimiothérapie, dépend du stade de la maladie et des facteurs pronostiques identifiés au moment du diagnostic.

Les anomalies cytogénétiques constituent des facteurs pronostiques importants dans la LLC. Ainsi la délétion 13q est considérée de bon pronostic alors que les délétions 11q (gène *ATM*) ou 17p (gène *p53*) sont corrélées à un mauvais pronostic. Ces anomalies chromosomiques sont mises en évidence par des techniques de cytogénétique. Il a également été démontré que la présence d'une mutation ponctuelle au sein du gène *p53*, sans délétion du gène, avait également une valeur pronostique défavorable. Enfin, le statut mutationnel des régions variables réarrangées dans les gènes de chaînes lourdes des immunoglobulines permet de répartir les patients en deux groupes équilibrés d'évolution distincte : les patients mutés ont une faible probabilité de développer une maladie agressive alors que les patients non mutés sont à risque de présenter une pathologie évolutive.

Dans la leucémie lymphoïde chronique et les syndromes lymphoprolifératifs B chroniques leucémiques, la cryopréservation des cellules tumorales est fortement recommandée au diagnostic de la maladie. En cours de traitement, elle peut être réservée seulement aux patients inclus dans des protocoles thérapeutiques la prévoyant.

2.4. LEUCÉMIE MYÉLOÏDE CHRONIQUE

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est caractérisée, dans 95 % des cas, par la translocation t(9;22)(q34;q11), ou chromosome Philadelphie, avec expression de transcrits de fusion *BCR-ABL*. Le traitement standard de ces patients est basé sur l'utilisation d'un inhibiteur de tyrosine kinase (ITK) ciblant directement la protéine de fusion BCR-ABL.

La mise en évidence du transcrit *BCR-ABL* par RT-PCR au moment du diagnostic permet tout d'abord de justifier la prescription d'un ITK spécifique (Imatinib, Nilotinib ou Dasatinib). La quantification de l'expression des transcrits *BCR-ABL* par RT-QPCR permet ensuite d'estimer la qualité de la réponse au traitement. En cas de résistance au traitement, la détection précoce de mutations ponctuelles du domaine tyrosine kinase de la protéine BCR-ABL est indispensable avant toute adaptation thérapeutique [PREUDHOMME2010].

Dans la LMC, la cryopréservation des cellules du sang et de la moelle est indispensable au diagnostic de la maladie et fortement recommandée pendant le suivi.

2.5. SYNDROMES MYÉLOPROLIFÉRATIFS NON LMC (Polyglobulie de Vaquez, Thrombocytémie essentielle, Myélofibrose primitive, SMP atypiques ou mixtes SMP/SMD)

Les syndromes myéloprolifératifs (SMP) se caractérisent par la production non contrôlée, par la moelle osseuse, de cellules matures myéloïdes. Sont regroupées classiquement sous le terme de SMP non LMC les hémopathies malignes chroniques suivantes : thrombocytémie essentielle, polyglobulie de Vaquez, myélofibrose primitive (ou splénomégalie myéloïde). Il existe également des entités rares comme les syndromes impliquant les *loci* des gènes *PDGF α* et *PDGF β* et la région 8p11, les syndromes myéloprolifératifs difficiles à classer et les syndromes mixtes myéloprolifératifs-myélodysplasiques.

La présence de la mutation *JAK2 V617F* est très caractéristique des syndromes myéloprolifératifs : elle est retrouvée dans plus de 95 % des polyglobulies de Vaquez, dans 50 à 70 % des thrombocytémies essentielles et dans environ 50 % des myélofibroses primitives. La présence de cette mutation constitue une information essentielle pour poser le diagnostic et sa recherche a été intégrée au processus diagnostique de ces pathologies dans les nouveaux critères de l'OMS. En pratique clinique, la recherche de la mutation *JAK2 V617F* est réalisée en première intention en cas de suspicion de syndrome myéloprolifératif afin d'éliminer ou de confirmer cette hypothèse.

La recherche d'autres mutations, comme par exemple les mutations de l'exon 12 de *JAK2* ou de *MPL*, est actuellement indiquée pour poser le diagnostic de SMP lorsque la mutation *JAK2 V617F* n'est pas présente, surtout chez des patients jeunes, avant traitement par chimiothérapie. La recherche du transcrit *FIPL1-PDGFR α* est indiqué en cas de suspicion de syndrome hyperéosinophilique.

Dans les syndromes myéloprolifératifs, la cryopréservation des cellules du sang (et de la moelle si un myélogramme est réalisé) est fortement recommandée au diagnostic.

2.6. MYÉLOME MULTIPLE

Le myélome multiple (MM) est une hémopathie maligne caractérisée par une prolifération plasmocytaire monoclonale envahissant la moelle hématopoïétique.

Le pronostic du myélome multiple est mauvais. Il existe cependant des disparités importantes avec des formes peu évolutives et d'autres très agressives. Pour adapter l'attitude thérapeutique, la caractérisation des altérations génétiques de mauvais pronostic acquises par les plasmocytes tumoraux, telles que la t(4;14) ou la del(17p), est indispensable avant traitement et en cas de rechute. Elles sont mises en évidence par FISH et/ou RT-PCR sur plasmocytes triés et non sur moelle totale.

Dans le myélome multiple, la cryopréservation des plasmocytes triés est recommandée en situation diagnostique et à la rechute.

2.7. SYNDROMES MYÉLODYSPLASIQUES

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont des affections clonales des cellules souches hématopoïétiques qui présentent un trouble de différenciation aboutissant à un avortement intramédullaire des précurseurs myéloïdes et à des cytopénies sanguines. Le diagnostic de SMD repose sur des caractéristiques cytologiques mais la recherche d'anomalies cytogénétiques, telles que la monosomie (-5), la monosomie (-7), la trisomie 8, la trisomie 21 ou des délétions partielles du 5q, du 7p, du 20q, sont des facteurs pronostiques puissants de la réponse au traitement. Certaines anomalies moléculaires de découverte récente (mutations de TET2, ASXL1...) pourraient également constituer des facteurs pronostiques.

Dans les syndromes myélodysplasiques, la cryopréservation des cellules de la moelle est recommandée au diagnostic de la maladie.

**RECOMMANDATIONS POUR L'ORGANISATION DES
TUMOROTHÈQUES ET LA CONSTITUTION DE
COLLECTIONS D'ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES À DES
FINS DE RECHERCHE EN CANCÉROLOGIE**

CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA MISSION DE CONTRIBUTION SCIENTIFIQUE DES TUMOROTHÈQUES

L'accès à des échantillons biologiques humains est primordial pour une meilleure compréhension et caractérisation des processus biomoléculaires spécifiques de chaque forme de cancer et se trouve au cœur du processus de recherche translationnelle et des avancées de la R&D biotechnologique et pharmaceutique pour développer de nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques.

Les tumorothèques collectent et conservent aujourd'hui des cellules et tissus tumoraux et/ou non tumoraux provenant de patients atteints de cancers, voire d'individus présentant ou susceptibles de présenter une caractéristique clinique ou biologique constituant un facteur de prédisposition au développement ultérieur de cancers ; la conservation concomitante d'échantillons tumoraux et non tumoraux est essentielle d'une part pour distinguer les caractéristiques propres aux cellules tumorales, d'autre part pour pouvoir identifier les étapes successives d'un processus oncogénique.

La capacité de mise à disposition des échantillons biologiques pour la recherche est aujourd'hui reconnue comme l'une des missions des tumorothèques. Cette mission de contribution scientifique présente des spécificités - en particulier d'ordre réglementaire - qui la distinguent des missions sanitaires et médicales. Elle relève d'une démarche volontaire des établissements de santé qui inscrivent la recherche dans les objectifs stratégiques de leur projet d'établissement.

Depuis 2000, la politique de soutien aux tumorothèques menée par la DGOS, l'INSERM et l'INCa a permis des avancées dans l'organisation des activités à visée scientifique⁹, notamment :

- la diversification des activités de conservation : extraction et conservation de produits dérivés (ADN, ARN, extraits protéiques) ;
- l'organisation de la gestion des données clinico-biologiques associées ;
- l'organisation de l'assurance-qualité ;
- la mise à disposition d'échantillons pour des projets de recherche et des partenariats objectivés par des publications.

En 2011, la capacité des tumorothèques à contribuer à des projets de recherche par la cession d'échantillons biologiques de qualité et annotés s'inscrit dans un contexte de structuration nationale et internationale. En effet, depuis plusieurs années, des institutions et organismes internationaux, tels que BBMRI, P3G, IARC, NCI, s'efforcent de promouvoir la qualité des activités de valorisation scientifique des ressources biologiques et leur organisation multiculturelle internationale [FORTIER2010, VAUGHT2010, YUILLE2008]. Au plan national, les biobanques font l'objet d'une coordination du réseau national des CRB et tumorothèques par l'INSERM, qui coordonne depuis 2011, le projet d'infrastructures distribuées BIOBANQUE, mené en articulation avec le consortium européen d'infrastructure de recherche BBMRI.

⁹ INCa, **Rapports d'activités des tumorothèques**, 2008 et 2009

L'INCa préconise aux tumorothèques de poursuivre l'évolution de leur organisation dans une logique de constitution de collections à des fins de recherche en cancérologie, une collection étant définie comme un ensemble d'échantillons ou de matériel biologiques réunis en fonction de caractéristiques communes à des fins de recherche, d'éducation, de valorisation industrielle (définition selon la norme qualité NF S96-900).

La priorité de constitution de collections engage les tumorothèques à une optimisation de leur organisation à la fois au niveau local et dans le cadre de réseaux multicentriques.

- Au niveau local, la constitution sélective de collections au sein des tumorothèques a pour objectif d'améliorer leur qualité, leur sécurité et leur traçabilité, de faciliter leur stockage et d'accroître leur valorisation scientifique. Les tumorothèques devront rationaliser leurs activités afin de répondre à des enjeux organisationnels, financiers et scientifiques.
 - ✓ Au plan organisationnel, la capacité de contribution d'une tumorothèque à la constitution de collections de ressources biologiques est conditionnée à un effort de gouvernance des activités médicales et scientifiques d'un établissement de santé visant à optimiser la valorisation scientifique des échantillons conservés [FULLERTON2010, WATSON2009]. La gouvernance locale devra prendre en compte l'ensemble des acteurs impliqués dans la constitution et la gestion des collections, coordonnés par le responsable de la tumorothèque.
 - ✓ Au plan financier la cryoconservation d'échantillons biologiques représente un coût important¹⁰ pour les établissements qui ont un intérêt évident à établir des priorités dans la gestion de cette activité.
 - ✓ Au plan scientifique, l'enjeu réside dans la capacité de valorisation des équipes locales, par leur participation à des projets de recherche de haut niveau, menés soit *in situ*, soit en partenariat avec un réseau d'équipes nationales ou internationales.
- Une organisation multicentrique est rendue nécessaire dès lors que les projets de recherche impliquent l'accès à de larges collections d'échantillons qualifiés et annotés. En effet les besoins pour des projets de recherche sont de plus en plus variés et exigeants, en qualité, en nombre d'échantillons et de données associées, mais aussi en termes de critères d'inclusion plus stricts (selon la spécificité d'une population ou de la forme de cancer étudiée [BARNES2008]). Seules des collections de large envergure, constituées sur un mode multicentrique permettent de répondre à l'ensemble des critères requis et d'atteindre une puissance statistique probante dans les études génomiques et épidémiologiques.

¹⁰ INCa - Étude des coûts de fonctionnement et recommandations pour la mise à disposition de ressources biologiques à des fins de recherche - Mars 2010 - <http://www.e-cancer.fr>

Les recommandations 2011 proposées par l'INCa s'appliquent ainsi à l'organisation locale des tumorothèques et à leur structuration en réseaux.

- L'optimisation de l'organisation des tumorothèques en vue de la constitution de collections fait appel à des principes de gouvernance, de démarche qualité, d'état des lieux actualisé et d'accessibilité des ressources.
- La structuration en réseau des tumorothèques en vue de la constitution de collections multicentriques fait appel à des principes de gouvernance, d'harmonisation de procédures et de mise en commun de bases de données et des informations.

In fine, l'objectif des recommandations de l'INCa est de permettre à tous les acteurs contribuant à la constitution de collections à des fins scientifiques et aux chercheurs de renforcer leurs capacités communes, afin de répondre aux besoins et aux défis de la recherche en cancérologie.

RECOMMANDATIONS AUX RESPONSABLES D'ÉTABLISSEMENTS ET AUX RESPONSABLES DE TUMOROTHÈQUES

1. La tumorothèque doit être identifiée par la direction d'établissement comme une infrastructure autonome disposant de moyens propres, d'un responsable et d'une organisation garantissant la pérennité et la qualité de ses activités.
2. La direction de l'établissement doit définir une gouvernance pour l'organisation de la constitution de collections de ressources biologiques à des fins de recherche, en cohérence avec le projet médical et les orientations scientifiques de l'établissement.
3. La tumorothèque doit appliquer une démarche qualité compatible avec les référentiels nationaux et dans une perspective d'harmonisation avec des référentiels internationaux.
4. La tumorothèque doit établir un état des lieux de son activité de contribution scientifique, et l'actualiser au moins annuellement, afin d'estimer sa capacité de réponse aux besoins des chercheurs en termes de ressources biologiques, et d'optimiser en qualité, en coûts et en capacité la constitution de collection selon les orientations stratégiques et les priorités de l'établissement.
5. La tumorothèque doit rendre accessible les ressources biologiques aux équipes de recherche externes à l'établissement, et contribuer à la constitution de collections multicentriques de grande taille dans le cadre de réseaux thématiques.

ARGUMENTAIRE

- 1. La tumorothèque doit être identifiée par la direction d'établissement comme une infrastructure autonome disposant de moyens propres, d'un responsable et d'une organisation garantissant la pérennité et la qualité de ses activités.**

La direction de l'établissement doit clairement identifier auprès de l'ensemble des professionnels de santé et de ses partenaires scientifiques la tumorothèque comme l'unique interlocuteur habilité à organiser les flux et la conservation des échantillons biologiques d'origine humaine utilisés à des fins de recherche.

La tumorothèque doit être identifiée comme une unité fonctionnelle disposant de moyens propres (humains, financiers, équipements et locaux), avec l'obligation pour cette infrastructure d'organiser ses activités en interface avec les services cliniques et les plateaux techniques hospitaliers et de recherche. L'organisation et la définition des tâches concernent notamment les relations de la tumorothèque avec les services cliniques, les laboratoires d'anatomopathologie et de biologie, les plateformes d'analyses génomiques, protéomiques, ainsi qu'avec les structures en charge de la collecte, de la validation, de la conservation des données cliniques et biologiques.

Le responsable de la tumorothèque, par délégation de la direction d'établissement, assure le management des moyens attribués au fonctionnement de la tumorothèque, notamment en termes de ressources humaines (effectif et compétences), et de locaux et d'équipements. Il est par ailleurs responsable de la mise en œuvre et de l'organisation d'une démarche d'assurance qualité (qualité et traçabilité des échantillons et des données associées), de la mise en œuvre des procédures internes et des accords ou conventions établis avec les collaborateurs et/ou partenaires extérieurs, et de la mise en œuvre et de l'implémentation des systèmes d'information pour la gestion des données associées (système d'information sécurisé, permettant l'interopérabilité avec d'autres bases, en interface avec des équipes de recherche partenaires d'un réseau national, européen ou international).

- 2. La direction de l'établissement doit définir une gouvernance pour l'organisation de la constitution de collections de ressources biologiques à des fins de recherche, en cohérence avec le projet médical et les orientations scientifiques de l'établissement.**

Compte tenu des implications organisationnelles, financières et scientifiques engendrées par la constitution de collection, une tumorothèque ne peut prétendre aménager son activité de contribution scientifique dans l'objectif de répondre à tout type de demande de ressources biologiques.

Afin d'optimiser la conservation et la mise à disposition d'échantillons à des fins de recherche, il faut donc aujourd'hui abandonner progressivement la collecte et la conservation systématique des échantillons biologiques obtenus des patients pris en charge par un établissement de santé, au profit de la constitution de collections ciblées, en cohérence avec le projet médical et les orientations scientifiques de l'établissement.

Si la capacité de recrutement en patients d'un centre hospitalier reste un facteur important pour décider de la constitution de collections, ce critère ne doit pas être seul à être pris en compte. D'autres éléments susceptibles de contribuer à la définition des priorités doivent également être pris en considération. La disponibilité de compétences et d'expertises locales, tant médicales que de recherche est un élément majeur de décision. De façon corrélative, les moyens financiers et en

ressources humaines que l'établissement de santé peut obtenir et consacrer aux différents services et unités impliqués auront un impact sur la décision de priorisation des activités de valorisation scientifique des ressources biologiques.

Les directions d'établissements de santé qui hébergent des tumorothèques doivent définir une gouvernance pour la constitution de collections de ressources biologiques à des fins scientifiques.

La gouvernance s'entend comme l'ensemble des processus de décision, d'organisation et de contrôle de l'activité, dans le respect des réglementations, lois et institutions.

La gouvernance implique la direction de l'établissement, un comité scientifique représentatif des différents acteurs médicaux et de recherche du site, et le responsable de la tumorothèque qui coordonne la mise en œuvre des priorités définies par le comité scientifique.

Le comité scientifique détermine les priorités de constitution de collections pour des contributions à des projets de recherche. En fonction des capacités techniques et logistiques de l'établissement (capacité de recrutement de patients, capacité en ressources biologiques, capacité de traitement et d'analyse des plateformes techniques), le comité scientifique recommande à la direction d'établissement une stratégie de contribution de recherche à un niveau de partenariat et/ou de compétitivité national ou international.

Il détermine des objectifs de collections en réponse à des besoins de projets de recherche, pour les équipes locales ou en partenariat avec des équipes de recherche externes. Ces objectifs doivent être planifiés et évalués à échéances déterminées, et au moins une fois par an repositionnés au regard, d'une part de la stratégie d'établissement et d'autre part des évolutions extérieures ayant une répercussion significative sur la constitution de collection (évolutions cognitives ou techniques, évolutions des pratiques thérapeutiques, évolution des moyens alloués à l'établissement...).

3. La tumorothèque doit appliquer une démarche qualité compatible avec les référentiels nationaux et dans une perspective d'harmonisation avec des référentiels internationaux.

La démarche qualité suppose l'établissement et l'application d'un ensemble de procédures permettant d'assurer la qualité et la reproductibilité des activités de constitution de collection et de recueil des données clinico-biologiques.

Les procédures sont élaborées par l'ensemble des acteurs concernés et le respect de leur application doit être suivi par le responsable de la tumorothèque. Elles définissent notamment :

- l'organisation relative à l'information des patients et à sa « non-opposition » ou à son « consentement » ;
- l'organisation et les protocoles relatifs à l'ensemble des étapes pré-analytiques ;
- les conditions de recueil et de gestion des données clinico-biologiques.

Il appartient à la direction de l'établissement et à l'équipe gérant la tumorothèque de déterminer dans quelle mesure elle souhaite s'engager dans une démarche de recherche de certification ou d'accréditation isolée ou globale au sein de l'institution et en conséquence de choisir le référentiel ou la norme applicables à ses activités.

Les procédures relatives à l'information des patients et à leur « non-opposition » ou leur « consentement » pour l'utilisation à des fins de recherche des échantillons biologiques et des données cliniques associées doivent être conformes à l'ensemble des législations applicables¹¹. Elles doivent dans certains cas prendre en compte des exigences supplémentaires à celles imposées par les autorités nationales, telles que celles que peuvent exprimer des partenaires¹² [WATSON2010].

Les procédures relatives aux traitements préanalytiques des ressources biologiques doivent être établies dans un objectif de standardisation, de traçabilité et de sécurité, afin d'assurer la qualité et la robustesse des analyses qui seront pratiquées dans le cadre d'un projet de recherche [BALASUBRAMANIAN2010]. Elles déterminent entre autres :

- les conditions de collecte des tissus, cellules et autres ressources biologiques d'origine humaine ;
- les critères qualité minimum à la réception des spécimens prélevés ;
- les éléments nécessaires à la caractérisation anatomopathologique et biologique ;
- les protocoles de préparation de produits dérivés ;
- les contrôles et critères qualités associés ;
- les conditions de préservation et de stockage des échantillons,

La mise en œuvre et l'implémentation des systèmes d'information et des procédures de recueil et de gestion des données associées doivent être réalisées avec la participation des professionnels de l'établissement, spécifiquement en charge des systèmes d'information et de la gestion de données. Un point clé de la constitution de collections est le recueil, l'actualisation et la transmission de données clinico-biologiques associées aux ressources biologiques. Cette activité, qui pose des questions éthiques complexes, nécessite des référentiels et procédures spécifiques permettant d'assurer la sécurité, la qualité et l'exploitation des données centralisées. Elle fait appel à des qualifications professionnelles et expertises des systèmes d'informations et de la gestion de données qui doivent être impliquées dans la construction, le contrôle et la maintenance des bases de données et des réseaux d'interopérabilité.

Les procédures de gestion des systèmes d'informations et des données définissent notamment :

- les conditions de recueil, de mise à jour et de contrôle qualité des données ;
- les flux et les conditions de transfert de données ;
- les droits d'accès aux données, localement et dans les bases de données communes à différents partenaires.

¹¹ Les textes de référence sont consultables sur le site Internet de l'INCa (<http://www.e-cancer.fr>)

¹² INCa - Charte éthique des tumorothèques - Réédition 2010 - <http://www.e-cancer.fr>

4. La tumorothèque doit établir un « état des lieux » de son activité de contribution scientifique, et l'actualiser au moins annuellement, afin d'estimer sa capacité de réponse aux besoins des chercheurs en termes de ressources biologiques, et d'optimiser en qualité, en coûts et en capacité la constitution de collection selon les orientations stratégiques et les priorités de l'établissement.

L'aptitude de la tumorothèque à réaliser un « état des lieux » de son activité de contribution scientifique et de sa capacité de réponse aux besoins des chercheurs, doit permettre d'éclairer le comité scientifique pour ses décisions relatives à la constitution de collections et à l'orientation des choix stratégiques en termes de priorité de projets de recherche. Cet état des lieux facilitera l'établissement d'un rapport d'activités et préparera la tumorothèque à une éventuelle évaluation par les tutelles.

L'état des lieux doit comprendre 1) le recensement des ressources biologiques disponibles et exploitables à des fins de recherche, 2) l'estimation de la capacité de collecte selon l'activité du centre et les pratiques cliniques, 3) la connaissance des exigences techniques, en termes de qualité et de quantité de ressources biologiques, des différentes méthodes d'analyses utilisées en recherche.

Le recensement peut être réalisé à partir d'un catalogue de ressources biologiques, caractérisées selon les données standards du référentiel national de l'INCa¹³ et assorties de données spécifiques pour chaque pathologie. Les ressources biologiques disponibles peuvent ainsi être classifiées selon différents critères pour faciliter la lecture des exploitations possibles dans des projets de recherche. Le recensement peut comprendre des échantillons conservés par des méthodes alternatives à la cryopréservation, tels que les tissus fixés en formol tamponné et inclus en paraffine, et qualifiés pour un projet de recherche.

La capacité de collecte de ressources biologiques d'un centre est importante pour évaluer la faisabilité d'un projet de recherche, selon la taille de la collection à constituer et en vue d'obtenir des résultats significatifs. La capacité doit être évaluée d'une part selon le nombre de patients traités et recrutés dans le centre hospitalier, et d'autre part selon le type de prélèvements réalisés dans le cadre des pratiques cliniques.

La connaissance des pratiques cliniques, qui conditionnent les types de prélèvements réalisés dans le cadre des soins permet :

- d'estimer les quantités de ressources biologiques éventuellement exploitables à des fins d'analyses scientifiques, selon le type de prélèvement (pièce opératoire, biopsie chirurgicale, ponction et biopsie de petite taille, liquide, cytoponction) ;
- d'identifier les risques de biais de collecte de prélèvements selon leur « accessibilité » et l'intérêt qu'ils représentent en termes de quantité. Par exemple, selon la classification clinique d'un patient, le prélèvement pourra être soit une pièce opératoire, soit une petite biopsie. La quantité de ressources biologiques exploitable sera *a priori* plus importante à partir de la pièce opératoire, mais la population prélevée par biopsie ne doit pas être exclue de futures investigations scientifiques sous peine de biais dans l'exploitation et l'interprétation des données produites.

¹³ Le référentiel national des données standards caractérisant les prélèvements peut être consulté sur le site Internet de l'INCa : <http://www.e-cancer.fr/recherche/les-ressources-biologiques/la-tumorothèque-virtuelle-nationale>

La connaissance des exigences techniques des différentes méthodes d'analyse (notamment de leurs propriétés de sensibilité et de robustesse) permet de définir des critères qualitatifs et quantitatifs des ressources biologiques et/ou produits dérivés. L'état des lieux doit donc permettre de connaître l'adéquation entre les caractéristiques des échantillons conservés et leur exploitation dans les différents types de projets de recherche en cours ou en construction. De ce point de vue, la cryoconservation reste la pratique de référence pour permettre l'exploitation des tissus en biologie moléculaire. Néanmoins, l'évolution des technologies permet de plus en plus l'utilisation de blocs de tissus fixés et inclus en paraffine, ces éléments doivent être pris en compte dans l'état des lieux des ressources biologiques. Plus couramment accessibles, les blocs de tissus en paraffine sont des archives potentiellement valorisables dans la constitution d'une large collection [DONADIO2011, GOSWAMI2010] et dans des études rétrospectives [ESPINOSA2009, OBYRNE2011].

Le terme de « **qualité** » des ressources biologiques peut s'appliquer à l'intégrité des tissus et des cellules conservées qui découle de la méthode de prélèvement et de conservation ou bien à la qualité des produits dérivés qui conditionnera la reproductibilité des analyses pratiquées dans le cadre du projet de recherche. Les exigences de qualité des ressources biologiques ne seront pas les mêmes en fonction des analyses réalisées dans le cadre d'un projet de recherche. Par exemple, des études de génotypage ou de séquençage, réalisées sur des ADN génomiques, nécessiteront des conditions moins drastiques de recueil et de conservation des échantillons que des études protéomiques ou métabolomiques.

La **quantité** de ressources biologiques est déterminante pour définir la faisabilité d'un projet de recherche. Une quantité importante de tumeur peut permettre la réalisation d'un projet comportant un panel important d'analyses biomoléculaires ou une analyse nécessitant une grande quantité de matériel (séquençage de génome complet). La quantité de matériel est donc à estimer selon le type de prélèvement, corrélé aux quantités nécessaires pour les différents types d'analyses, sans omettre les rendements de préparation et de contrôle qualité pré-analytiques.

5. La tumorothèque doit rendre accessible les ressources biologiques aux équipes de recherche externes à l'établissement et contribuer à la constitution de collections multicentriques de grande taille dans le cadre de réseaux thématiques.

La conservation dans les tumorothèques de ressources biologiques qualifiées pour la recherche a pour objectif essentiel la mise à disposition des échantillons pour des projets scientifiques.

Compte tenu des avancées cognitives (mécanismes biomoléculaires, nombre de biomarqueurs), et des avancées technologiques (capacités d'analyses « omiques » à très grand débit), les besoins pour des projets de recherche sont de plus en plus variés et exigeants, en termes de critères d'inclusion, de qualité, de nombre d'échantillons et de données associées.

Afin d'optimiser la valorisation scientifique de ses ressources biologiques, une tumorothèque doit donc promouvoir les collections qualifiées pour la recherche et les expertises scientifiques de l'établissement dont elle dépend. Une organisation en réseau thématique et la contribution à la constitution de collections multicentriques sont aujourd'hui le meilleur moyen de réaliser la valorisation scientifique des ressources biologiques. Une telle organisation suppose un engagement des tumorothèques à adhérer à des règles de fonctionnement en réseau et à rendre accessibles des ressources biologiques de qualité pour les projets de recherche.

La mise à disposition de collections à des partenaires multiples dans le cadre de projets scientifiques en adéquation avec la politique scientifique de l'établissement est de plus un élément important pour évaluer la qualité des échantillons, des collections et de la tumorothèque en tant qu'infrastructure de recherche.

La structuration de réseaux thématiques doit prendre la forme d'un partenariat qui définit une organisation spécifique, avec notamment la mise en place d'une gouvernance propre au réseau, l'harmonisation des procédures et l'établissement de procédures communes, la définition de référentiels de données spécifiques de la (ou des) pathologie(s) concernée(s) par la thématique, l'affichage du catalogue de ressources biologiques disponibles pour la conduite de projets de recherche.

RECOMMANDATIONS AUX PARTENAIRES D'UN RÉSEAU THÉMATIQUE DE RECHERCHE

1. Les partenaires d'un réseau thématique de recherche doivent établir une gouvernance permettant d'optimiser leur organisation à des fins scientifiques.
2. Les partenaires d'un réseau doivent harmoniser leurs procédures locales et établir des procédures communes afin de permettre la mise en commun des échantillons biologiques et des données associées dans les projets de recherche.
3. Les partenaires doivent établir un référentiel d'annotations standards minimales à associer aux ressources biologiques. Ce référentiel comprendra les données minimales du référentiel national de l'INCa complétées par des données spécifiques de la pathologie, définies par le réseau de recherche.
4. Les partenaires doivent élaborer, afficher et implémenter un catalogue commun de ressources biologiques afin d'offrir une visibilité exhaustive du potentiel de ressources biologiques partagées et de faciliter la mise à disposition d'échantillons pour des projets de recherche.

ARGUMENTAIRE

1. Les partenaires d'un réseau thématique de recherche doivent établir une gouvernance permettant d'optimiser leur organisation à des fins scientifiques.

La constitution d'un réseau sera définie pour une pathologie ou un groupe de pathologies et reposera sur la synergie entre les expertises et les capacités logistiques et techniques apportées par chacun des partenaires.

La motivation scientifique commune pour la constitution de collections multicentriques est d'atteindre des tailles suffisantes pour monter et réaliser des projets de qualité, capables de répondre à des questions scientifiques complexes et multifactorielles.

Cette motivation commune doit se concrétiser par une organisation multisites et multidisciplinaire qui, à partir d'un état des lieux des pratiques cliniques et des connaissances scientifiques, définit et met en œuvre une stratégie de recherche et de production scientifique.

Les tumorothèques des centres partenaires jouent un rôle crucial dans l'organisation multicentrique, notamment en termes de coordination logistique et d'harmonisation des procédures. Elles sont garantes de la qualité des ressources biologiques collectées, conservées et mises à disposition pour les projets.

L'organisation du réseau s'appuie sur une gouvernance qui pilote et coordonne les activités scientifiques, logistiques et administratives. Il est recommandé que le fonctionnement d'un réseau soit encadré par une Charte de référence commune. La gouvernance comportera *a minima* un comité de pilotage organisationnel et scientifique, animé par un coordonnateur scientifique.

Le comité de pilotage est représentatif de l'ensemble des disciplines et expertises membres du réseau. Son rôle est de déterminer des priorités de recherche et de suivre la réalisation des projets scientifiques menés dans le cadre du réseau. Les orientations stratégiques du réseau sont définies à partir d'un état des lieux des pratiques cliniques et des connaissances scientifiques et en fonction des capacités techniques et logistiques du réseau (capacité commune de recrutement de patients, capacité commune en ressources biologiques, capacité commune de traitement et d'analyse des plateformes techniques). Le comité de pilotage fixe les objectifs de constitution de collection d'échantillons et de recueil de données cliniques, biologiques et épidémiologiques associées. Il veille à la cohérence des conditions partenariales par projet.

Le coordonnateur scientifique est responsable de l'animation scientifique entre les membres du réseau qu'il représente auprès des institutions et partenaires extérieurs. Le coordonnateur est responsable de la mise en application de l'ensemble des procédures définies dans la charte de fonctionnement du réseau.

Le coordonnateur et le comité de pilotage devront identifier des responsables, en particulier pour coordonner la gestion de données (récupération, centralisation et exploitation communes des données clinico-biologiques), et pour coordonner les étapes de sélection, de caractérisation et de préparation des ressources biologiques.

2. Les partenaires d'un réseau doivent harmoniser leurs procédures locales et établir des procédures communes afin de permettre la mise en commun des échantillons biologiques et des données associées dans les projets de recherche.

L'harmonisation des procédures et l'établissement de procédures communes sont un préalable indispensable à une organisation en réseau et devraient être progressivement inscrites dans la Charte de fonctionnement du réseau. Cette étape doit faire l'objet d'un projet en tant que tel, avec la participation des différents groupes experts concernés représentant les centres partenaires, et coordonnée sous la responsabilité d'une personne désignée par le comité scientifique et le coordonnateur scientifique.

Les procédures concernent principalement l'information des patients, les étapes techniques pré-analytiques de préparation des échantillons biologiques (recueil, conditionnement, congélation, stockage, transformation en produits dérivés, etc.) et la gestion des systèmes d'informations et des données.

L'ensemble de ces procédures doit être compatible avec les référentiels nationaux et en perspective d'harmonisations avec des référentiels internationaux [MOORE2011, MOORE2009] .

Les procédures relatives à l'information des patients et à sa « non-opposition » ou à son « consentement » de l'utilisation à des fins de recherche des échantillons biologiques et des données cliniques associées doivent être conformes à l'ensemble des législations applicables. Dans le cadre de projets multicentriques, elles doivent de plus être appliquées avec une cohérence d'ensemble, et adaptées au degré d'information requis par la confidentialité des données exploitées pour chaque projet et pour le respect du droit des personnes. Les partenaires doivent par ailleurs veiller à la compatibilité des procédures et des documents dans l'éventualité d'un partenariat international.

Les procédures relatives aux traitements pré-analytiques des ressources biologiques doivent être établies dans un objectif de standardisation, de traçabilité et de sécurité afin d'assurer la qualité et la robustesse des analyses qui seront pratiquées dans le cadre d'un projet de recherche. Elles déterminent entre autres :

- les conditions de collecte des tissus, cellules et fluides d'origine humaine ;
- les critères qualité minimum à la réception des spécimens prélevés ;
- les éléments nécessaires à la caractérisation anatomopathologique et biologique ;
- les protocoles de préparation de produits dérivés ;
- les contrôles et critères qualités associés ;
- les conditions de préservation et de stockage des échantillons.

La mise en œuvre et le développement des systèmes d'information et des procédures de gestion des données clinico-biologiques communes doivent être réalisés avec la participation des responsables des systèmes d'informations et des data managers de chaque centre pour assurer la qualité des flux et la sécurité des données. La gestion des données clinico-biologiques associées aux ressources biologiques est un élément essentiel à la conduite de projets multicentriques. Outre la mise en œuvre des procédures locales par chaque centre, le réseau de partenaires doit établir ses propres procédures qui définissent :

- les conditions de centralisation, de mise à jour et de contrôle des données communes ;
- les flux et les conditions de transfert de données ;
- la gestion de la base de données commune (droits d'accès, droits d'implémentation ou de lecture, droits d'exploitation des données).

3. Les partenaires doivent établir un référentiel d'annotations standards minimales à associer aux ressources biologiques. Ce référentiel comprendra les données minimales du référentiel national de l'INCa complétées par des données spécifiques de la pathologie, définies par le réseau de recherche.

Afin d'une part d'optimiser l'organisation du recueil des données et d'autre part d'assurer l'exploitation des données recueillies, les partenaires doivent utiliser le référentiel national de l'INCa pour les annotations minimums associées aux ressources biologiques des collections constituées.

Le Référentiel national de l'INCa, comporte **une liste minimum de données** caractérisant les prélèvements tumoraux et non tumoraux selon les catégories suivantes :

- site de la tumorotheque et coordonnées du responsable ;
- caractéristiques du patient : statut vital, données cliniques et sociodémographiques ;
- maladie : CIM10, paramètres histo-pathologiques ;
- prélèvement : type, code organe, type lésionnel ;
- caractéristiques des échantillons : mode de préparation et de conservation, qualité, quantité ;
- disponibilité d'échantillons complémentaires (fluides biologiques, acides nucléiques).

En complément des données du référentiel de l'INCa, des données spécifiques de la pathologie seront définies en concertation avec les partenaires du réseau thématique de recherche pour être systématiquement associées aux échantillons biologiques.

L'utilisation de ces données permettra, d'une part leur centralisation dans une base de données commune et l'établissement d'un catalogue de ressources biologiques et d'autre part l'exploitation scientifique des données recueillies dans les différents centres partenaires.

4. Les partenaires doivent élaborer, afficher et implémenter un catalogue commun de ressources biologiques afin d'offrir une visibilité exhaustive du potentiel de ressources biologiques partagé et de faciliter la mise à disposition d'échantillons pour des projets de recherche.

Le catalogue de ressources biologiques est un outil informatique qui consiste à regrouper, dans une base de données commune, les informations décrivant et caractérisant les échantillons, disponibles et exploitables, selon le référentiel de données. Les échantillons sont, selon l'organisation logistique adoptée par le réseau, soient conservés dans chacun des centres partenaires, soit rassemblés dans un centre dédié.

Cet outil doit permettre :

- au comité de pilotage d'établir une stratégie de valorisation scientifique des ressources biologiques ;
- aux chercheurs, notamment mais pas exclusivement membres du réseau, d'identifier et de localiser des ressources biologiques qualifiées pour la conduite de leurs programmes de recherche.

Les tumorothèques alimentent la base de données selon les modalités définies par le réseau, avec les données des prélèvements dont elles ont la responsabilité et qu'elles s'engagent à mettre à disposition de programmes de recherche. Un certain nombre d'exigences doivent être respectées pour que les échantillons soient inscrits dans la base de données. Les partenaires doivent notamment s'engager à :

- collecter, stocker et transférer les échantillons inscrits dans la Base de données, dans le respect de la charte éthique des tumorothèques (droits des patients et relations partenariales) ;
- utiliser le Référentiel national de données de l'INCa comme socle commun d'informations définissant chaque prélèvement ;
- garantir l'exploitabilité des échantillons inscrits à des fins de recherche, en termes de quantité, de qualité et d'information et consentement du patient ;
- informer sur le risque infectieux associé aux échantillons (lorsqu'il est connu) ;
- réaliser la mise à jour des informations décrivant les échantillons.

Le cas échéant, les partenaires pourront s'adosser aux outils existants et développés en ce sens. Quel que soit l'outil d'affichage du catalogue, celui-ci devra comprendre une rubrique présentant le réseau, son organisation, les partenaires et en particulier ses orientations scientifiques afin de promouvoir les partenariats.

L'INCA ET LA VALORISATION SCIENTIFIQUE DES RESSOURCES BIOLOGIQUES

En appui à ses recommandations pour l'organisation de la constitution de collections d'échantillons biologiques à des fins de recherche, l'INCa poursuit et renforce ses actions d'accompagnement, d'incitation et de promotion.

- L'INCa poursuit son engagement dans le soutien à l'action des tumorothèques en procédant à leur évaluation au moyen d'un rapport d'activités annuel, et par des actions d'expertises et de recommandations d'optimisation de leur contribution à la recherche.
- L'INCa poursuit et affine son soutien aux tumorothèques avec la dotation MERRI de la DGOS. La répartition des financements récurrents MERRI sera actualisée périodiquement, sur la base du rapport annuel d'activité des tumorothèques qui intègre des critères d'évaluation de leur activité de contribution scientifique, au plan local et dans le cadre de réseaux thématiques.
- L'INCa soutient la structuration de réseaux thématiques de recherche par le financement d'un appel à projets pour la constitution de bases clinico-biologiques multicentriques à visée nationale en cancérologie. Cet appel à projet articule la constitution de collections de ressources biologiques et leur association avec la constitution de bases de données clinico-biologiques et de données épidémiologiques.
- L'INCa a développé une base de données permettant d'importer et d'afficher sur son site Internet les données standardisées relatives aux prélèvements tumoraux et non tumoraux collectés dans les tumorothèques à des fins de recherche. Cet outil, intitulé Tumorothèque Virtuelle Nationale (TVN), a vocation à promouvoir la visibilité et l'accessibilité des principales collections nationales constituées dans le cadre de réseaux et consortiums thématiques et de programmes de recherche nationaux ou internationaux. Les réseaux thématiques peuvent s'appuyer sur cet outil national, pour procéder à l'affichage et à la promotion de leur catalogue de ressources biologiques.
- Les actions de valorisation des ressources biologiques de l'INCa seront menées en articulation avec l'ITMO Cancer et selon les *Orientations stratégiques de recherche contre le cancer INCa-AVIESAN*. La stratégie commune soutient, parmi ses actions prioritaires, la mobilisation des meilleures équipes de recherche pour la constitution de collections dans le cadre de réseaux nationaux travaillant sur les principales tumeurs responsables de plus de 70 % des cas incidents de cancer.
- En cohérence avec la stratégie AVIESAN, l'INCa est partenaire, membre du Comité de pilotage et représenté au Conseil scientifique du projet d'infrastructures distribuées BIOBANQUES porté par l'INSERM dans le cadre des Investissements d'avenir. Les objectifs majeurs de BIOBANQUES sont de structurer et de mutualiser les moyens et les compétences, de faciliter l'accès des chercheurs aux ressources biologiques et aux bases de données associées, d'accroître les capacités de recherche et d'accélérer la production de résultats valides. L'INCa contribuera à la construction et au développement de l'infrastructure nationale BIOBANQUES financée dans le cadre des Investissements d'Avenir.

BIBLIOGRAPHIE ET RÉFÉRENTIELS

BIBLIOGRAPHIE

- **[BALASUBRAMANIAN2010]** Balasubramanian R, Muller L, Kugler K, Hackl W, Pleyer L, Dehmer M et al. The impact of storage effects in biobanks on biomarker discovery in systems biology studies. *Biomarkers* 2010;15(8):677-83.
- **[BARNES2008]** Barnes RO, Parisien M, Murphy LC, Watson PH. Influence of evolution in tumor biobanking on the interpretation of translational research. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17(12):3344-50.
- **[BEAUFALLER2011]** Beau-Faller M, Degeorges A, Rolland E, Mounawar M, Antoine M, Poulot V et al. Cross-Validation Study for Epidermal Growth Factor Receptor and KRAS Mutation Detection in 74 Blinded Non-small Cell Lung Carcinoma Samples: A Total of 5550 Exons Sequenced by 15 Molecular French Laboratories (Evaluation of the EGFR Mutation Status for the Administration of EGFR-TKIs in Non-Small Lung Carcinoma [ERMETIC] Project-Part 1). *J Thorac Oncol* 2011.
- **[CAPPER2010]** Capper D, Weissert S, Balss J, Habel A, Meyer J, Jager D et al. Characterization of R132H mutation-specific IDH1 antibody binding in brain tumors. *Brain Pathol* 2010;20(1):245-54.
- **[COINDRE2010]** Coindre JM. Molecular biology of soft-tissue sarcomas. *Bull Cancer* 2010;97(11):1337-45.
- **[DOHNER2010]** Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz MA, Sierra J, Tallman MS, Löwenberg B, Bloomfield CD; European LeukemiaNet. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010;115(3):453-74.
- **[DOMINGO2004]** Domingo E, Laiho P, Ollikainen M, Pinto M, Wang L, French AJ et al. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet* 2004;41(9):664-8.
- **[DONADIO2011]** Donadio E, Giusti L, Cetani F, Da VY, Ciregia F, Giannaccini G et al. Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues in the proteomic analysis of parathyroid glands. *Proteome Sci* 2011;9(1):29.
- **[DOUGLAS1998]** Douglas MP, Rogers SO. DNA damage caused by common cytological fixatives. *Mutat Res* 1998;401(1-2):77-88.
- **[ESPINOSA2009]** Espinosa E, Sanchez-Navarro I, Gamez-Pozo A, Marin AP, Hardisson D, Madero R et al. Comparison of prognostic gene profiles using qRT-PCR in paraffin samples: a retrospective study in patients with early breast cancer. *PLoS One* 2009;4(6):e5911.
- **[FORTIER2010]** Fortier I, Burton PR, Robson PJ, Ferretti V, Little J, L'Heureux F et al. Quality, quantity and harmony: the DataSHaPER approach to integrating data across bioclinical studies. *Int J Epidemiol* 2010;39(5):1383-93.
- **[FULLERTON2010]** Fullerton SM, Anderson NR, Guzauskas G, Freeman D, Fryer-Edwards K. Meeting the governance challenges of next-generation biorepository research. *Sci Transl Med* 2010;2(15):15cm3.
- **[GOSWAMI2010]** Goswami RS, Waldron L, Machado J, Cervigne NK, Xu W, Reis PP et al. Optimization and analysis of a quantitative real-time PCR-based technique to determine microRNA expression in formalin-fixed paraffin-embedded samples. *BMC Biotechnol* 2010;10:47.
- **[JAIN2010]** Jain S, Xu R, Prieto VG, Lee P. Molecular classification of soft tissue sarcomas and its clinical applications. *Int J Clin Exp Pathol* 2010 Apr 23;3(4):416-28.
- **[KAYSER2011]** Kayser S, Döhner K, Krauter J, Köhne CH, Horst HA, Held G, von Lilienfeld-Toal M, Wilhelm S, Kündgen A, Götze K, Rummel M, Nachbaur D, Schlegelberger B, Göhring G, Späth D, Morlok C, Zucknick M, Ganser A, Döhner H, Schlenk RF; German-Austrian AMLSG. The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed AML. *Blood* 2011;117(7):2137-45.
- **[KLOOSTERHOF2010]** Kloosterhof NK, Bralten LB, Dubbink HJ, French PJ, van den Bent MJ. Isocitrate dehydrogenase-1 mutations: a fundamentally new understanding of diffuse glioma? *Lancet Oncol* 2011;12(1):83-91.
- **[LAMY2011]** Lamy A, Blanchard F, Le Pessot F, Sesboüé R, Di Fiore F, Bossut J, Fiant E, Frébourg T, Sabourin JC. Metastatic colorectal cancer KRAS genotyping in routine practice: results and pitfalls. *Mod Pathol* 2011.
- **[LEWIS2001]** Lewis F, Maughan NJ, Smith V, Hillan K, Quirke P. Unlocking the archive--gene expression in paraffin-embedded tissue. *J Pathol* 2001;195(1):66-71.
- **[LOUGHREY2007]** Loughrey MB, Waring PM, Tan A, Trivett M, Kovalenko S, Beshay V et al. Incorporation of somatic BRAF mutation testing into an algorithm for the investigation of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Fam Cancer* 2007;6(3):301-10.
- **[MACINTYRE2010]** Macintyre E. Les guides de juste prescription du Réseau de biologie innovatrice en onco-hématologie (RuBIH), programme STIC 2004-9. *Hématologie* 2010;16:81-101.
- **[MOORE2011]** Moore HM, Compton CC, Alper J, Vaught JB. International approaches to advancing biospecimen science. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;20(5):729-32.
- **[MOORE2009]** Moore HM, Compton CC, Lim MD, Vaught J, Christiansen KN, Alper J. 2009 Biospecimen research network symposium:

advancing cancer research through biospecimen science. *Cancer Res* 2009;69(17):6770-2.

- **[OBYRNE2011]** O'Byrne KJ, Gatzemeier U, Bondarenko I, Barrios C, Eschbach C, Martens UM et al. Molecular biomarkers in non-small-cell lung cancer: a retrospective analysis of data from the phase 3 FLEX study. *Lancet Oncol* 2011;12(8):795-805.
- **[OLSCHWANG2004]** Olschwang S, Bonaiti C, Feingold J, Frébourg T, Grandjouan S, Lasset C, Laurent-Puig P, Lecuru F, Millat B, Sobol H, Thomas G, Eisinger F. Identification et prise en charge du syndrome HNPCC, prédisposition héréditaire aux cancers du côlon, du rectum et de l'utérus. *Bull Canc* 2004;91(4):303-15.
- **[POPAT2005]** Popat S, Hubner R, Houlston RS, et al. Systematic review of microsatellite instability and colorectal prognosis. *J Clin Oncol* 2005;23:609-18.
- **[PREUDHOMME2010]** Preudhomme C, Cayuela JM, Chomel JC, Corm S, Hayette S, Mahon FX, Nicolini FE, Réa D, Roche-Lestienne C, Guilhot F. Recommandations du groupe FI-LMC pour la prise en charge des patients présentant des mutations du domaine tyrosine kinase de BCR-ABL dans les hémopathies malignes à chromosome Philadelphie. *Hématologie* 2010;16 (1) : 65-79
- **[QUASAR2007]** Quasar Collaborative Group. Adjuvant versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet* 2007;370:2020-9.
- **[RIBIC2003]** Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003;349:247-57.
- **[RIEMENSCHNEIDER2010]** Riemenschneider MJ, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G. Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathol* 2010;120(5):567-84.
- **[SARGENT2010]** Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:3219-26.
- **[SJOHOLM2005]** Sjöholm MI, Hoffmann G, Lindgren S, Dillner J, Carlson J. Comparison of archival plasma and formalin-fixed paraffin-embedded tissue for genotyping in hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(1):251-5.
- **[SRINIVASAN2002]** 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.
- **[VARDIMAN2009]** Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009;114(5):937-51.
- **[VAUGHT2010]** Vaught JB, Caboux E, Hainaut P. International efforts to develop biospecimen best practices. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19(4):912-5.
- **[VONDEIMLING2011]** von Deimling A, Korshunov A, Hartmann C. The next generation of glioma biomarkers: MGMT methylation, BRAF fusions and IDH1 mutations. *Brain Pathol* 2011;21(1):74-87.
- **[WANG2003]** Wang L, Cunningham JM, Winters JL, Guenther JC, French AJ, Boardman LA et al. BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair. *Cancer Res* 2003;63(17):5209-12.
- **[WATSON2009]** Watson PH, Wilson-McManus JE, Barnes RO, Giesz SC, Png A, Hegele RG et al. Evolutionary concepts in biobanking - the BC BioLibrary. *J Transl Med* 2009;7:95.
- **[WATSON2010]** Watson RW, Kay EW, Smith D. Integrating biobanks: addressing the practical and ethical issues to deliver a valuable tool for cancer research. *Nat Rev Cancer* 2010;10(9):646-51.
- **[YUILLE2008]** Yuille M, van Ommen GJ, Brechot C, Cambon-Thomsen A, Dagher G, Landegren U et al. Biobanking for Europe. *Brief Bioinform* 2008;9(1):14-24.

LISTE DES PRINCIPAUX RÉFÉRENTIELS

- INCa - Les Tumorothèques hospitalières - Recommandations à l'usage des cliniciens et des chercheurs - Novembre 2006 - <http://www.e-cancer.fr>
- INCa - Charte éthique des tumorothèques - Réédition 2010 - <http://www.e-cancer.fr>
- INCa - Bonnes pratiques pour la recherche à visée théranostique de mutations somatiques dans les tumeurs solides - Août 2010 - <http://www.e-cancer.fr>
- HAS - Recommandations de bonne pratique - Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin - Septembre 2009 - <http://www.has-sante.fr>
- Société Française d'Hématologie - Référentiel 2009 - <http://sfh.hematologie.net>
- INCa - Étude des coûts de fonctionnement et recommandations pour la mise à disposition de ressources biologiques à des fins de recherche - Mars 2010 - <http://www.e-cancer.fr>
- NORME NF S 96-900, Système de management d'un CRB et qualité des ressources biologiques d'origine humaine et microbienne
- IARC, Common Minimum Technical Standards and Protocols for BRCs dedicated to Cancer, 2007
- IARC, Technical standards and protocols for diseases oriented biobanks, 2009
- NCI, Best Practices, 2007
- OECD, Guidelines on Human Biobanks and Genetic Research Databases, 2009
- OECD, Best Practice Guidelines for BRCs, 2007
- ISBER, Best Practices for Repositories, 2008

ANNEXES

TABEAU 1 Liste des marqueurs moléculaires recherchés par les plateformes hospitalières de génétique moléculaire des cancers

ONCO-HEMATOLOGIE	
Leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL)	
Diagnostic	Transcrits de fusion : BCR-ABL, MLL-AF4, E2A-PBX1, TEL-AML1, SIL-TAL1, CALM-AF10, NUP214-ABL1 Sur-expression : TLX1, TLX3 Mutations : NOTCH1 Réarrangements : Ig/TCR Evaluations pan-génomiques
Suivi de la maladie	BCR-ABL, Ig/TCR
Leucémies myéloïdes aiguës (LAM)	
Diagnostic	Transcrits de fusion : PML-RARA, AML1-ETO, CBFb-MYH11, MLL-X, Sur-expression : WT1, EVI1 Mutations : FLT3, NPM1, C/EBPa, WT1, AML1, TET2, IDH1, IDH2, NRAS, KRAS, cKIT, TP53 Evaluations pan-génomiques
Suivi de la maladie	PML-RARA, AML1-ETO, CBFb-MYH11, mutations NPM1
Syndromes myélodysplasiques (SMD)	
Diagnostic	JAK2, TET2, c-CBL, AML1, ASXL1, FLT3, NPM1 ; NRAS, KRAS, TP53, hTERT
Leucémies myéloïdes chroniques (LMC)	
Diagnostic	BCR-ABL
Suivi de la maladie	BCR-ABL, Mutations ABL1
Syndromes myéloprolifératifs non LMC (polyglobulie primitive, thrombocytémie essentielle, myélofibrose primitive et SMP atypique ou SMP/SMD)	
Diagnostic	Mutations : JAK2 V617F, JAK2 Exon 12, MPL Transcrits de fusion : BCR-ABL
Suivi de la maladie	JAK2 V617F
Leucémies lymphoïdes chroniques (LLC)	
Diagnostic	Mutations : IgVH, p53
Myélomes et autres syndromes lymphoprolifératifs	
Diagnostic	Sur-expression : Cycline D1 Réarrangements : IgH-MMSET
Lymphomes	
Diagnostic	Clonalité Ig/TCR Sur-expression : Cycline D1 Translocations : BCL2-JH, BCL1-JH, ALK, BCL6, cMYC, MLT1, BCL10
Suivi de la maladie	BCL2-JH, BCL1-JH

TUMEURS SOLIDES	
Sarcomes	
Diagnostic	Translocations diverses / Mutations / Amplification MDM2/CDK4
Tumeurs cérébrales	
Gliomes	Codélétion 1p19q / Mutations IDH1 et IDH2
Glioblastomes	Méthylation de MGMT
Tumeurs digestives	
Tumeurs du syndrome Lynch	Test MSI / Mutations BRAF / Méthylation MLH1
Cancer colorectal	Mutations KRAS / Mutations BRAF / Test MSI
Tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST)	Mutations KIT / Mutations PDGFRA
Tumeurs de l'estomac	Amplification HER2
Cancers du poumon non à petites cellules	
Diagnostic	Mutations EGFR
Cancers du sein	
Diagnostic	Amplification HER2
Mélanomes	
Diagnostic	Mutations BRAF / Mutations KIT

TABLEAU 2 Anomalies moléculaires retrouvées dans les sarcomes selon le type histologique

Histologie	Translocation	Gènes impliqués
Ewing/PNET	t(11;22)(q24;q12)	EWSR1-FLI1
	t(21;22)(q22;q12)	EWSR1-ERG
	t(7;22)(p22;q12)	EWSR1-ETV1
	t(17;22)(q12;q12)	EWSR1-ETV4 (E1AF)
	t(2;22)(q33;q12)	EWSR1-FEV
	t(1;22)(p36;q12)	EWSR1-ZSG
	t(16;21)(p11;q22)	FUS-ERG
Synoviosarcome	t(X;18)(p11;q11)	SS18(SYT)-SSX1 SS18(SYT)-SSX2 SS18(SYT)-SSX4
Liposarcome myxoïde	t(12;16)(q13;p11)	TLS(FUS)-DDIT3(CHOP)
	t(12;22)(q13;q12)	EWSR1-DDIT3(CHOP)
Rhabdomyosarcome alvéolaire	t(2;13)(q35;q14)	PAX3-FOXO1A(FHKR)
	t(1;13)(p36;q14)	PAX7-FOXO1A(FHKR)
Sarcome à cellules claires	t(12;22)(q13;q12)	ATF1-EWSR1
	t(2;22)(q32;q12)	EWSR1-CREB1
Chondrosarcome myxoïde extrasquelettique	t(9;22)(q22;q12)	EWSR1-TEC(NR4A3/CHN/TEC)
	t(9;17)(q22;q11)	TAF2N(RBP56)-TEC/CHN
	t(9;15)(q22;q21)	TCF12-TEC(CHN)
Tumeur desmoplastique à petites cellules rondes	t(11;22)(p13;q12)	WT1-EWSR1
Sarcome fibromyxoïde de bas grade	t(7;16)(q32-34;p11)	TLS(FUS)-CREB3L2
	t(11;16)(p11;p11)	TLS(FUS)-CREB3L1
Fibrosarcome épithélioïde sclérosant	t(7;16)(q32-34;p11)	TLS(FUS)-CREB3L2
Dermatofibrosarcome de Darier et Ferrand	t(17;22)(q22;q13)	COL1A1-PDGFB
Sarcome alvéolaire des parties molles	t(X;17)(p11.2;q25)	ASPL-TFE3
Fibrosarcome infantile	t(12;15)(p13;q25)	ETV6(TEL)-NTRK3(TRKC)
Tumeur myofibroblastique inflammatoire	t(2;19)(p23;p13.1)	TPM4-ALK
	t(1;2)(q22-23;p23)	TPM3-ALK
	t(2;17)(p23;q23)	CLTC-ALK
	t(2;11)(p23;p15.5)	CARS-ALK
	t(2;2)(p23;q13)	RANBP2-ALK
Histiocytome fibreux angiomatoïde	t(2;22)(q34;q12)	EWSR1-CREB1
	t(12;22)(q13;q12)	EWSR1-ATF1
Lipoblastome	t(8;8)(q12;q24)	PLAG1-HAS2
	t(8;7)(q12;q22)	PLAG1-COL1A
Histologie	Mutation activatrice	Gènes impliqués
Tumeur desmoïde		Beta-caténine
Histologie	Mutation inactivatrice	Gènes impliqués
Tumeur rhabdoïde		SMARCB1 (hSNF5/INI1)
Histologie	Amplification	Gènes impliqués
Liposarcome bien/dé-différencié		MDM2/CDK4
Sarcome intimal		MDM2/CDK4

TABEAU 3 Biomarqueurs d'intérêts diagnostiques, pronostiques et prédictifs de la réponse aux traitements dans les gliomes. Principales techniques et type de matériel nécessaire.

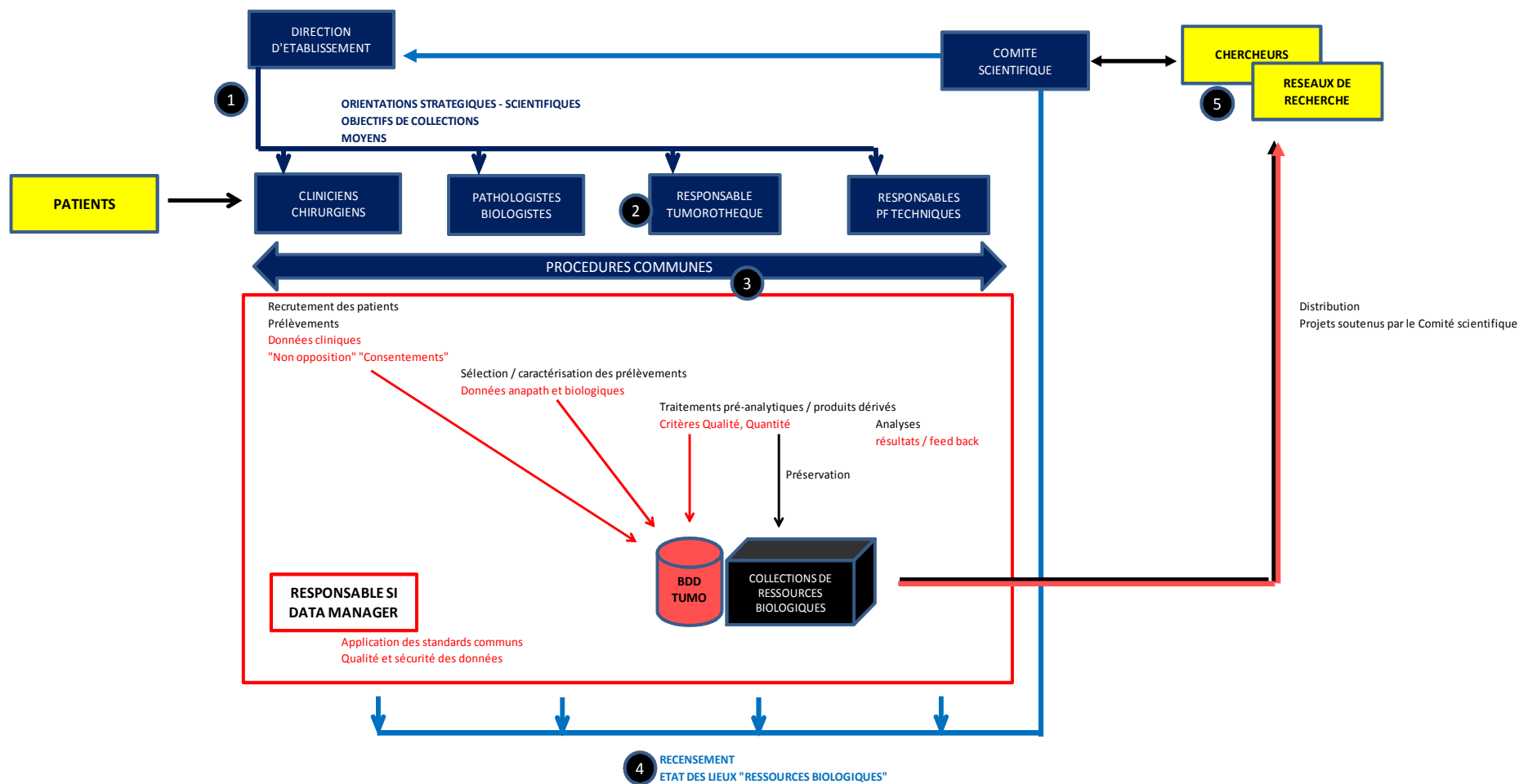
Marqueur moléculaire	Signification clinique	Principales techniques	Matériel
Méthylation du promoteur de <i>MGMT</i>	Prédictive de réponse aux alkylants dans le groupe des glioblastomes Associée à une survie prolongée pour les gliomes anaplasiques traités par radiothérapie et/ou chimiothérapie	Pyroséquencage MS-PCR qMS-PCR COBRA MS-MLPA ² MS-HRM, MethylLight	Cryopréservation ou FFPE ¹
Codéletion 1p19q	Marqueur diagnostique des oligodendrogliomes et des gliomes à composante oligodendrogliale Associée à un meilleur pronostic chez les patients traités par radiothérapie et/ou chimiothérapie	LOH ³ FISH CGH MLPA	Cryopréservation ou FFPE
Mutation de <i>IDH1</i> et <i>IDH2</i>	Marqueur diagnostique des gliomes infiltrants de grade II, III et des GBM secondaires de l'adulte Marqueur de bon pronostic dans ces mêmes groupes	Séquencage direct Immunohistochimie (R132H)	Cryopréservation ou FFPE
Duplication/fusion de <i>BRAF</i>	Marqueur diagnostique de l'astrocytome pilocytique	FISH RT-PCR	Cryopréservation ou FFPE Cryopréservation

¹ FFPE : fixation formol et enrobage paraffine

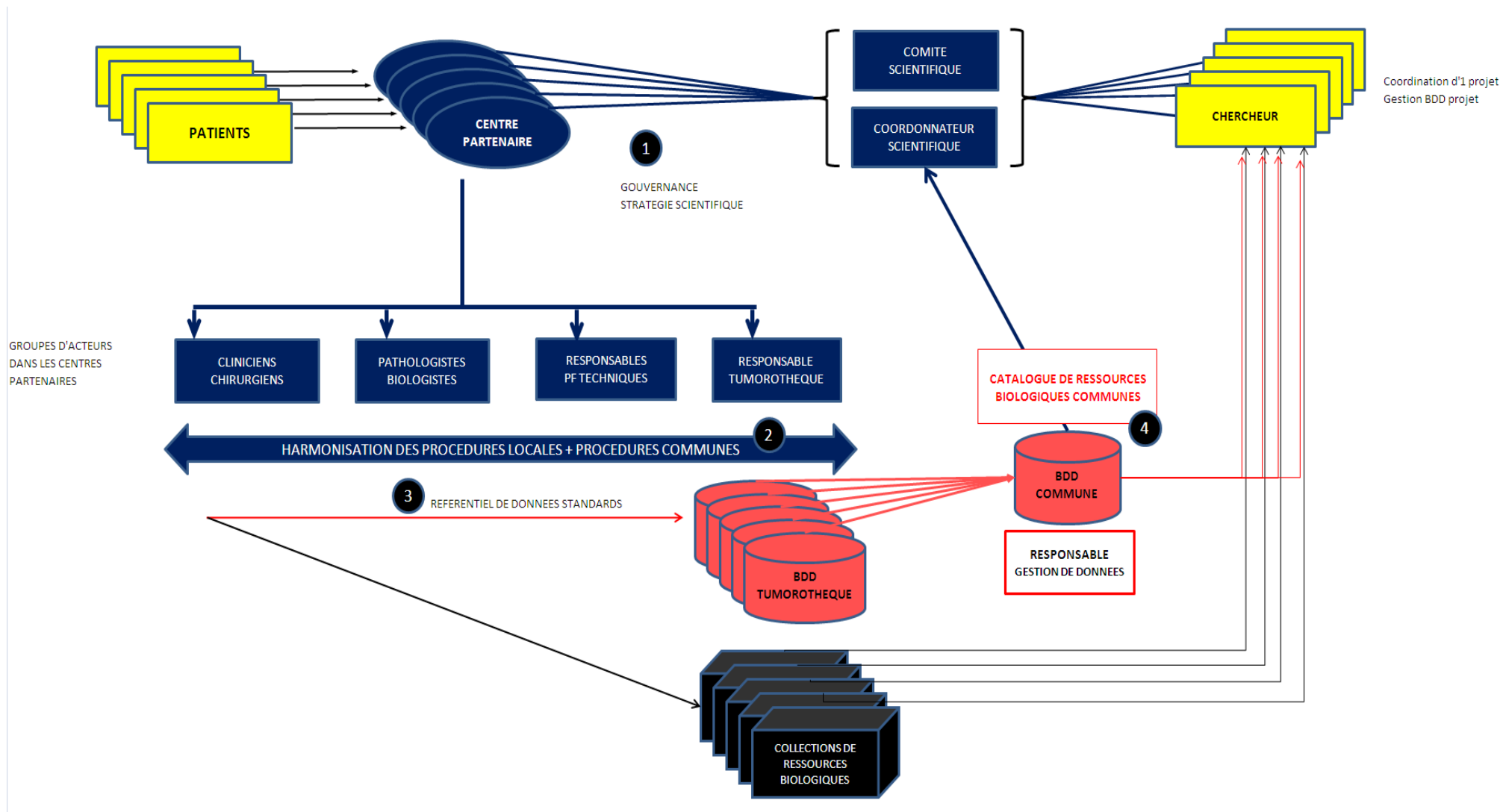
² Seule technique ne nécessitant pas une phase préalable de bisulfitation de l'ADN

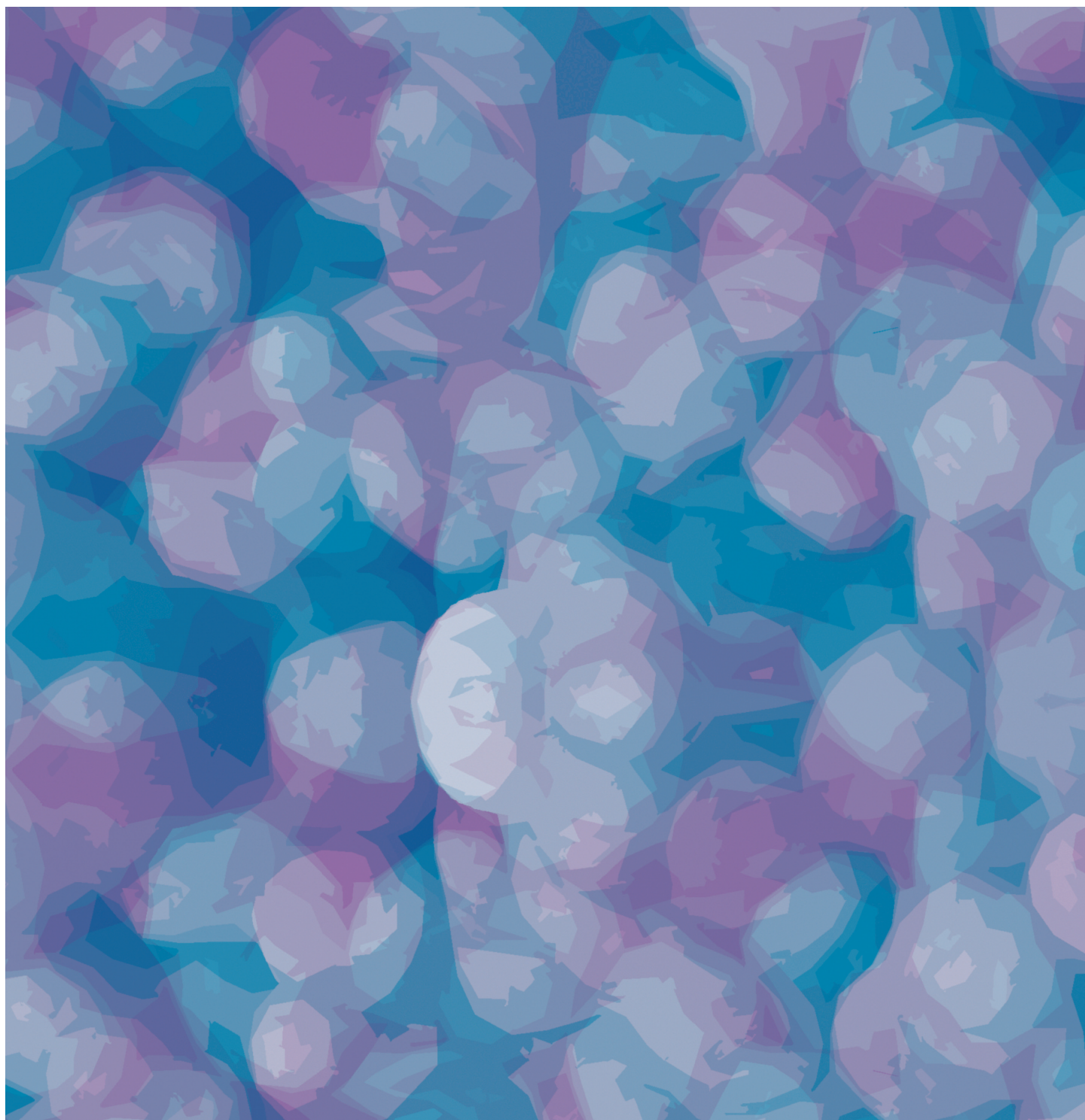
³ Nécessite en parallèle un prélèvement sanguin du patient

TABEAU 4 Schéma de recommandations aux responsables d'établissements de santé et aux responsables de tumorothèques pour la constitution de collections de ressources biologiques



TABEAU 5 Schéma de recommandations aux partenaires d'un réseau thématique pour la constitution de collections de ressources biologiques





Édité par l'Institut National du Cancer
Conception/Réalisation : Institut National du Cancer
Tous droits réservés – Siren : 185 512 777
Impression : LA GALIOTE PRENANT
Illustrations : DR

DÉPOT LÉGAL NOVEMBRE 2011

Pour plus d'informations
www.e-cancer.fr

Toutes les informations
sur le Plan cancer 2009-2013
www.plan-cancer.gouv.fr

Institut National du Cancer
52, avenue André Morizet
92100 Boulogne-Billancourt
France

Tel. +33 (1) 41 10 50 00
Fax +33 (1) 41 10 50 20
diffusion@institutcancer.fr

RECOCRYOTUM11