

CREATION ET STRUCTURATION DE LA TUMOROTHEQUE DE ROUEN

La tumorothèque de Rouen, structure commune au CHU-Hôpitaux de Rouen et au Centre de Lutte contre le Cancer Henri Becquerel, s'est créée et développée autour de deux appels à projet (2001-2002 et 2003-2004) de la Direction de l'Hospitalisation et de l'Organisation des Soins (DHOS). En 2005, un financement supplémentaire, obtenu dans le cadre de l'appel à projet instruit par l'Institut National du Cancer (INCa) et financé par la DHOS, visant à structurer des réseaux à visée sanitaire, a ouvert les portes de la tumorothèque de Rouen aux prélèvements provenant des centres de soins de la région via le **Réseau Haut-Normand d'Accès à la Tumorothèque (RHAT)**. Plusieurs partenaires se sont associés à ce projet (le Réseau Onco-Normand, la Fédération de cancérologie, les Fédérations de pathologie et l'Association des pathologistes de Haute-Normandie) afin de coordonner et faciliter l'implantation du RHAT.

MISSIONS DE LA TUMOROTHEQUE



La tumorothèque hospitalière de Rouen est une banque d'échantillons de tissus tumoraux assortis d'annotations biologiques, anatomopathologiques et cliniques dynamiques. Ces échantillons sont prélevés à partir des pièces anatomiques d'exérèse¹ chirurgicale et conservés à très basse température (-80°C à -196°C). Ce mode de conservation par le froid préserve l'intégrité des principales molécules du tissu vivant (ADN, ARN et protéines) favorisant, ainsi, des tests moléculaires de qualité. Situées à l'interface

entre la recherche et les soins, la tumorothèque hospitalière de Rouen a une double vocation : (1) **sanitaire** afin de caractériser les anomalies moléculaires présentes au niveau de la tumeur d'un patient et ainsi d'en prédire l'évolution (diagnostic et pronostic) et d'adapter la prise en charge thérapeutique, notamment par le biais de nouvelles thérapies ciblées, lorsqu'elles se développent, et (2) **scientifique** afin de pourvoir les programmes de recherche en échantillons tumoraux humains essentiels à une meilleure compréhension et caractérisation des mécanismes biologiques spécifiques de chaque type de tumeurs et *in fine* de développer de nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques. Cette **recherche translationnelle** directement au service du patient (partant du "chevet du malade" pour aller à la "paillasse" du laboratoire et revenir au malade) est réalisée dans le respect de la loi de bioéthique (article 112.11-2, alinéa 2 du Code de Santé Publique) soulignant la nécessité d'information du patient et son absence d'opposition à cette utilisation. Dans le cadre de sa mission de recherche translationnelle, la tumorothèque de Rouen a participé à différentes publications visant à identifier les biomarqueurs prédictifs de la réponse aux anticorps monoclonaux ciblant le

¹ éléments du corps nuisibles ou inutiles

récepteur du facteur de croissance des cellules épithéliales (EGFR) dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques^{2,3,4}.

ORGANISATION ET FONCTIONNEMENT

Situation, locaux et matériel. Implantée au sein du Service de Pathologie du CHU de Rouen, la tumorothèque s'organise autour :



- d'une **salle de cryogénie**, climatisée et à accès sécurisé, équipée de 5 congélateurs à -80°C,
- d'une plateforme de biologie moléculaire (Laboratoire de Génétique Somatique des Tumeurs⁵), comportant : (1) une pièce d'extraction des acides nucléiques, (2) une pièce de PCR, (3) une pièce de manipulation post-PCR et (4) une pièce climatisée équipée par les automates de biologie moléculaire (séquenceur automatique d'ADN, appareil de PCR en temps réel, 5 appareils de PCR). Cette plateforme est utilisée afin de vérifier la qualité des acides nucléiques extraits à partir des échantillons cryopréservés et permet leur exploitation à visée diagnostique et thérapeutique.

Une structure pluridisciplinaire. Différents corps de métier unissent leurs compétences au sein de la tumorothèque de Rouen, afin de cryopréserver des prélèvements de qualité et parfaitement annotés : (1) les pathologistes sélectionnent et échantillonnent des zones représentatives de la tumeur, (2) un ingénieur hospitalier et 2 techniciens (affiliés au CHU et au CRLCC) compétents en biologie moléculaire veillent à ce que la congélation et la conservation des échantillons se passe dans des conditions de "stérilité" nécessaire au maintien de l'intégrité des acides nucléiques (ADN et ARN), (3) une secrétaire enregistre les prélèvements dans le système de gestion informatique de la tumorothèque et (4) un attaché de recherche clinique en lien avec les cliniciens et chirurgiens ayant pris en charge le patient annoté les prélèvements et collecte les formulaires de non opposition d'utilisation du prélèvement à des fins scientifiques.

² Oden-Gangloff A, Di Fiore F, Bibeau F, Lamy A, Bougeard G, Charbonnier F, Blanchard F, Tougeron D, Ychou M, Boissière F, Le Pessot F, Sabourin JC, Tuech JJ, Michel P, Frebourg T. TP53 mutations predict disease control in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab-based chemotherapy. *Br J Cancer*. 2009 Apr 21;100(8):1330-5.

³ Bibeau F, Lopez-Crapez E, Di Fiore F, Thezenas S, Ychou M, Blanchard F, Lamy A, Penault-Llorca F, Frébourg T, Michel P, Sabourin JC, Boissière-Michot F. Impact of Fc γ RIIa-Fc γ RIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. *J Clin Oncol*. 2009 Mar 1;27(7):1122-9. Epub 2009 Jan 21.

⁴ Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, Le Pessot F, Lamy A, Galais MP, Bastit L, Killian A, Sesboûé R, Tuech JJ, Queuniet AM, Paillet B, Sabourin JC, Michot F, Michel P, Frebourg T. Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. *Br J Cancer*. 2007 Apr 23;96(8):1166-9. Epub 2007 Mar 20.

⁵ Le laboratoire de génétique somatique des tumeurs du CHU de Rouen constitue avec le laboratoire de génétique oncologique du CRLCC Henri Becquerel la plateforme d'Oncologie Moléculaire de Haute-Normandie labellisée par l'INCa en 2006.

Différents comités structurent la collecte, la conservation et la rétrocession des prélèvements.

- Le comité de coordination. Il est constitué par un représentant de chaque discipline pour chaque établissement (administratifs, pathologistes, cliniciens, biologistes moléculaires) et définit les grandes orientations de la tumorotheque (règlement intérieur, intégration d'une nouvelle collection, sortie de prélèvements sur avis du comité de gestion de la collection impliquée ...) lors de réunions annuelles.
- Les comités de gestion des collections. Les prélèvements cryopréservés sont affiliés à des collections⁶ par pathologie d'organes ou de fonctions (par exemple, la collection tumeurs du système digestif regroupe les tumeurs de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin, colorectales, hépatiques et du pancréas). Chaque collection est gérée par un comité constitué de pathologistes, cliniciens et chirurgiens impliqués dans la discipline : c'est au niveau de ce comité que sont décidées les sorties des échantillons à des fins scientifiques.
- Le Comité Technique. Constitué par le personnel technique et le pathologiste responsable de la tumorotheque, il met en œuvre les mesures nécessaires pour assurer la qualité des étapes de la cryopréservation des échantillons.

Circuit des prélèvements.



Les tumeurs opérées au CHU et au CRLCC de Rouen sont immédiatement acheminées au laboratoire d'anatomie pathologique correspondant ; l'échantillonnage y est effectué par un pathologiste dans le respect de l'analyse anatomo-pathologique. Des prélèvements sont ainsi effectués en zones tumorales et si possible saines (ce tissu servira de référence pour certaines analyses moléculaires) et conditionnés en azote

liquide. Des prélèvements miroirs (adjacents) sont fixés et inclus en paraffine ; le pathologiste pourra ainsi effectuer un contrôle morphologique (% de cellules tumorales, % de nécrose...etc.) d'une zone représentative de celle cryopréservée. Les échantillons tumoraux sont ensuite transférés dans des congélateurs -80°C où ils sont conservés jusqu'à leur rétrocession. Alternativement, les prélèvements suffisamment petits (par exemple les biopsies de l'œsophage et de l'estomac) où ne pouvant être acheminé immédiatement (prélèvements provenant des établissements de soins de la région) sont conditionnés par le clinicien préleveur en RNeasy Lysis Buffer, milieu permettant de préserver l'intégrité des acides nucléiques à température ambiante. Un prélèvement miroir conditionné en formol est également réalisé. L'ensemble est acheminé à la tumorotheque dans la journée : le prélèvement en RNeasy Lysis Buffer y est maintenu à 4°C dans l'attente du résultat de l'examen histologique du prélèvement miroir puis congelé. Les prélèvements collectés dans le cadre du RHAT sont acheminés par un transporteur agréé.

⁶ Différentes collections sont conservées à la tumorotheque de Rouen : tissus urologiques, tissus du système digestifs, tissus pulmonaires, pleuraux et bronchiques, tissus mammaires, tumeurs gynécologiques, tumeurs ORL, tissus cérébraux, tumeurs osseuses et des tissus mous, tumeurs hématologiques, tissus surrénaux.

Sécurité du système. Plusieurs niveaux de surveillance existent afin de maintenir la chaîne du froid : (1) chaque congélateur est muni d'un enregistreur de température permettant un contrôle quotidien, (2) chaque congélateur est relié au système de sécurité du CHU afin de contrôler toute variation anormale de températures et (3) un congélateur de secours est maintenu vide afin de recevoir les échantillons lors de la défaillance des autres congélateurs. De plus, l'accès à la salle de cryogénie est sécurisé : l'entrée y est contrôlée par un système de badges magnétiques nominatifs permettant d'assurer une traçabilité.

Système d'annotations des échantillons. Le système de gestion informatisée des échantillons comprend l'utilisation parallèle : (1) du logiciel de gestion de laboratoire du service de pathologie du CHU de Rouen pour le recueil des données administratives, anatomo-pathologiques et cliniques, (2) d'un module associé à ce logiciel pour la gestion des emplacements, des entrées et sorties des congélateurs (un code à 4 caractères spécifiques localise chaque échantillon) et (3) de fiches complémentaires permettant de renseigner les données minimales du catalogue national de l'INCa⁷. Un accès via le réseau hospitalier aux données cliniques des patients correspondants est également possible. Ce système d'annotations évolue actuellement : un logiciel commun de gestion des prélèvements et de leurs données associées est en cours d'installation au sein du Cancéropôle Nord-Ouest. Ce logiciel est hébergé à Lille et chacune des tumorothèques (Rouen, Amiens, Lille, Lens et Caen) y possède un espace de stockage. C'est à partir de ce dernier que se feront les exports vers la tumorothèque virtuelle régionale (TVR). La TVR est une interface qui recensera les échantillons tumoraux disponibles au sein du Cancéropôle Nord Ouest sous forme de champs requêtables reprenant les données minimales du catalogue national de l'INCa. Cette interface accessible au grand public permettra de faciliter les contacts entre les tumorothèques du Cancéropôle Nord-Ouest, dépositaires des échantillons tumoraux et les équipes de recherche au service de projets scientifiques.

Démarche qualité. La tumorothèque de Rouen est engagée dans un processus de démarche qualité. Ainsi, l'homogénéisation des pratiques de cryopréservation, de conservation, d'annotations et de rétrocessions des échantillons est assurée par le suivi de procédures et modes opératoires rédigés sous forme de GBEA et intégrés au système informatique de gestion documentaire du CHU de Rouen. De plus, la qualité du circuit des prélèvements est contrôlée chaque trimestre : les ARNm sont extraits à partir d'un échantillon d'un prélèvement de chaque collection et leur qualité est évaluée par dosage au spectrophotomètre, électrophorèse et RT-PCR. Enfin, les échantillons cryopréservés sont annotés pour différents critères de qualité tels que les délais de congélation, l'obtention du consentement (pré-requis à la rétrocession à visée de recherche) et la réalisation du contrôle histologique miroir.

⁷ Les items du catalogue national de l'INCa sont disponibles à l'adresse suivante : http://www.e-cancer.fr/component/docman/doc_download/5370-referentiel-national-de-donnees-caracterisant-les-prelevements-tumoraux-a-des-fins-de-recherche

RESSOURCES BIOLOGIQUES DISPONIBLES A LA TUMOROTHEQUE DE ROUEN

Depuis sa création et jusqu'au 31 Décembre 2010, plus de **10 000 échantillons tumoraux** ont pu être cryopréservés. Leur répartition par collection est illustrée par la figure 1.

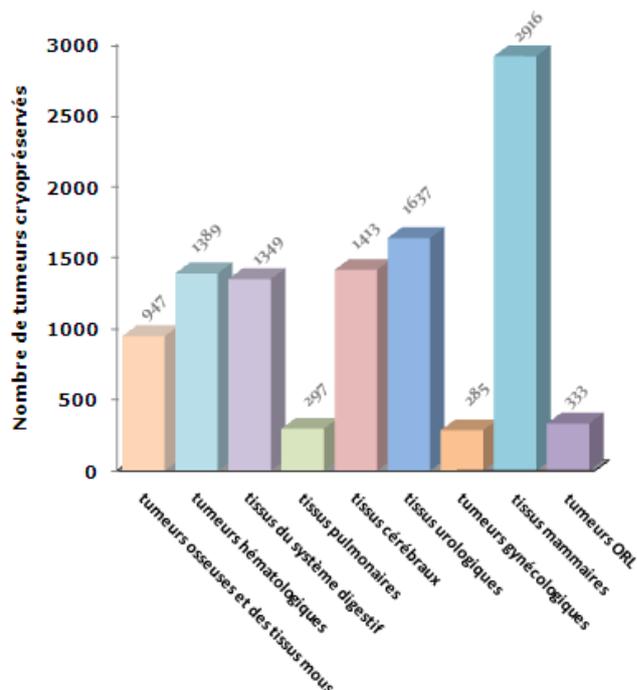


Figure 1 : Répartition du nombre de tumeurs cryopréservées par collection.

Le RHAT réalise la collecte à visée sanitaire des prélèvements de tumeurs rares (lymphomes, myélomes, sarcomes, tumeurs pédiatriques et tumeurs cérébrales) depuis mai 2006. Cette collecte s'est étendue aux prélèvements de tumeurs pulmonaires et de tumeurs colorectales survenant chez des patients âgés de moins de 60 ans en mai 2007 conformément aux recommandations de l'INCa. La collecte de prélèvements via le RHAT a ainsi permis de cryopréservier **604 échantillons tumoraux** (chiffre arrêté au 31/12/2010).

POUR NOUS CONTACTER

Tumorothèque de Rouen Haute-Normandie

CHU de Rouen

Pavillon Jacques Delarue

1 rue de Germont

76 031 Rouen Cedex

tel : 02.32.88.88.16

secretariat.tumorotheque@chu-rouen.fr

Responsable

Pr Jean-Christophe Sabourin

jean-christophe.sabourin@chu-rouen.fr

Ingénieur

Dr Aude Lamy (phD)

aude.lamy@chu-rouen.fr

ARC et coordinatrice du RHAT

Madame Christèle Moulin

christèle.moulin@chu-rouen.fr

