



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE PHARMACIE INDUSTRIELLE ET BIOMEDICALE

Soutenu devant le jury interrégional

le 27 juin 2002

par Ingrid LABADIE épouse JAUSIONS

née le 20-02-76

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988

tient lieu de :

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Importance des tumorothèques dans l'évaluation et la mise en œuvre de
nouvelles stratégies diagnostiques et thérapeutiques en cancérologie**

Membres du jury :

Monsieur le Professeur C. VIGNERON

Président du jury

Monsieur le Docteur J-L. MERLIN

Directeur de thèse

Madame le Docteur M. BARBERI-HEYOB

Membre du jury

Monsieur le Professeur B. DESOIZE

Membre du jury

Monsieur le Docteur J. ABECASSIS

Membre du jury

Ph N 2002/203
Double

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I

2002

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE PHARMACIE INDUSTRIELLE ET BIOMEDICALE

Soutenu devant le jury interrégional

le 27 juin 2002

par Ingrid LABADIE épouse JAUSIONS

née le 20-02-76

DB 26454

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988

tient lieu de :



THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Importance des tumorothèques dans l'évaluation et la mise en œuvre de
nouvelles stratégies diagnostiques et thérapeutiques en cancérologie**

Membres du jury :

Monsieur le Professeur C. VIGNERON

Président du jury

Monsieur le Docteur J-L. MERLIN

Directeur de thèse

Madame le Docteur M. BARBERI-HEYOB

Membre du jury

Monsieur le Professeur B. DESOIZE

Membre du jury

Monsieur le Docteur J. ABECASSIS

Membre du jury



Membres du personnel enseignant 2001/2002

Doyen

Chantal FINANCE

Vice Doyen

Anne ROVEL

Président du Conseil de la Pédagogie

Pierre LABRUDE

Responsable de la Commission de la Recherche

Jean-Claude BLOCK

Responsable de la filière officine

Gérald CATAU

Responsable de la filière industrie

Jeffrey ATKINSON

DOYENS HONORAIRES

M. BERNANOSE André

M. VIGNERON Claude

PROFESSEURS HONORAIRES

Mme BESSON Suzanne

Mme GIRARD Thérèse

M. LECTARD Pierre

M. MARTIN Jean-Armand

M. MIRJOLET Marcel

M. PIERFITTE Maurice

PROFESSEURS EMERITES

M. HOFFMAN Maurice

M. LOPPINET Vincent

PROFESSEURS

M.	ASTIER Alain	Pharmacie clinique
M.	ATKINSON Jeffrey	Pharmacologie cardiovasculaire
M	AULAGNER Gilles	Pharmacie clinique
M.	BAGREL Alain	Biochimie
Mme	BATT Anne Marie	Toxicologie
M.	BLOCK Jean Claude	Santé publique
M.	BONALY Roger	Biochimie microbienne
Mme	CAPDEVILLE-ATKINSON	Pharmacologie cardiovasculaire
Mme	FINANCE Chantal	Immunopathologie et organisation animale
Mme	FRIANT-MICHEL Pascale	Mathématiques, physique et audioprothèse
Mle	GALTEAU Marie Madeleine	Biochimie clinique
M.	HENRY Max	Botanique, mycologie
M.	JACQUE Michel	Pharmacologie
M.	LABRUDE Pierre	Physiologie, orthopédie, Maintien à Domicile
M.	LALLOZ Lucien	Chimie organique
M.	LEROY Pierre	Chimie
M.	MAINCENT Philippe	Pharmacie galénique
M.	MARSURA Alain	Chimie thérapeutique
M.	MORTIER François	Pharmacognosie
M.	NICOLAS Alain	Chimie analytique
M.	REGNOUF de VAINS Jean Bernard	Chimie Thérapeutique
Mme	SCHWARTZBROD Janine	Bactériologie, parasitologie
M.	SCHWARTZBROD Louis	Virologie - Immunologie
M.	SIEST Gérard	Biologie et pharmacologie moléculaire
M.	SIMON Jean Michel	Droit officinal, législation pharmaceutique
M.	VIGNERON Claude	Hématologie, physiologie

PROFESSEUR ASSOCIE

Mme GRISON Geneviève

Pratiques officinales

MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie - Virologie
M.	BONNEAUX François	Chimie thérapeutique
M.	CATAU Gérald	Pharmacologie
M.	CHEVIN Jean Claude	Chimie minérale
M.	CHILLON Jean Marc	Pharmacologie
M.	COLLIN Jean François	Santé publique
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie et Conseils vétérinaires
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
M.	DUCOURNEAU Joël	Biophysique, Audioprothèse, Acoustique
Mme	FAIVRE-FIORINA Béatrice	Hématologie
M.	FERRARI Luc	Biochimie
Mle	FONS Françoise	Biologie végétale et Mycologie
M.	GANTZER Christophe	Virologie
M.	GIBAUD Stéphane	Pharmacie Clinique
Mme	HASENFRATZ-SAUDER Marie Paule	Mycologie - Botanique
Mle	HINZELIN Françoise	Mycologie - Botanique
M.	HUMBERT Thierry	Chimie organique
Mle	IMBS Marie Andrée	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
M.	JORAND Frédéric	Santé et Environnement
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie Galénique
Mme	LARTAUD-IDJOUADIENE Isabelle	Pharmacologie
Mme	LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
Mme	LETOT Michèle	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme	LIVERTOUX Marie Hélène	Toxicologie
Mme	MARCHAL-HEUSSLER Emmanuelle	Communication scientifique – Communication et santé
Mme	MARCHAND-ARVIER Monique	Hématologie
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MONAL Jean Louis	Chimie Thérapeutique
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDICAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PICHON Virginie	Biophysique
Mme	POCHON Marie France	Chimie physique générale
Mme	ROVEL Anne	Histologie - Physiologie
M.	VISVIKIS Athanase	Toxicologie
Mme	WELLMAN-ROUSSEAU Maria Monika	Biochimie
Mme	ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

PROFESSEUR AGREGÉ

M. COCHAUD Christophe

Anglais

ASSISTANTS

Mme	BEAUD Mariette
Mme	BERTHE Marie-Catherine
M.	DANGIEN Bernard
Mme	MOREAU Blandine
Mme	PAVIS Annie
M.	TROCKLE Gabriel

Biologie Cellulaire
Biochimie
Mycologie
Pharmacognosie - Phytothérapie
Parasitologie
Pharmacologie

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES
THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDERES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

SERMENT DES APOTHECAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



A mes parents

A mon frère Thibaut

Vous m'avez soutenu, encouragé (et supporté !) au cours de ces longues études. Je vous en remercie infiniment. C'est grâce à l'amour que vous m'avez donné que j'ai réussi ce fichu concours.

Maman, nous serons bientôt réunis en Auvergne.

Papa, je serai toujours ta clopsette.

Thibaut, mon «ornithologue préféré», que le chant des oiseaux auvergnats t'appelle souvent vers ta terre natale.

A Matthieu

Pour tout l'amour que nous partageons chaque jour. Qu'il nous porte et nous transporte sur le chemin de nos rêves...

Ton enthousiasme et ta soif de découverte sont pour moi une source inépuisable de bonheur.

Merci pour ton soutien.

A mes grands-parents

Pour tout l'amour et la joie que vous m'avez donnés et pour la constante bonne humeur qui vous caractérise.

A ma «petite sœur» Delphine

Pour l'amitié qui nous lie depuis l'âge de 3 ans... Que ton mariage soit à ton image : unique !

A tous mes amis

De Clermont, de Grenoble, de Strasbourg et de Nancy, vous saurez vous reconnaître ; pour tous les moments d'émotion et de bonheur que vous m'avez fait vivre.

Je tiens à remercier :

Monsieur le Docteur Jean-Louis Merlin

Tout d'abord, merci pour votre accueil chaleureux et pour toute la confiance que vous m'avez accordée depuis mon arrivée au laboratoire. Je vous remercie aussi d'avoir consacré du temps à ce travail malgré votre emploi du temps bien rempli et d'y avoir apporté des corrections pertinentes. Vous contribuez beaucoup par votre dynamisme et par votre bonne humeur communicative à la bonne ambiance qui règne dans ce laboratoire.

Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

Madame le Docteur Muriel Barberi-Heyob

Merci pour votre gentillesse, votre constante disponibilité et vos précieuses corrections.

Vos qualités d'encadrante sont à la hauteur de vos qualités humaines. Qu'elles soient récompensées par une «hdr» bien méritée !

Veuillez trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance et de toute mon estime.

Monsieur le Professeur Claude Vigneron

Vous me faites l'honneur d'avoir accepté de présider ce jury et de juger ce travail.

Veuillez trouver ici l'expression de ma plus haute considération.

Monsieur le Professeur Bernard Desoize

Monsieur le Docteur Joseph Abecassis

C'est un grand honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail.

Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Edwige

Merci pour tes précieuses corrections, ton aide et pour l'attention constante que tu as porté à ce travail.

Merci de m'avoir donné toute ta confiance et ton amitié.

Tous les membres du laboratoire de recherche en oncologie

Merci à tous de contribuer à la bonne ambiance qui règne dans ce laboratoire.

Monsieur Martel

Je tiens à vous remercier pour votre disponibilité et pour vos travaux de reprographie de qualité irréprochable.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	1
<hr/>	
A. INTERET DE MISE EN PLACE D'UNE TUMOROTHEQUE	2
<hr/>	
I. <u>Nouvelles approches thérapeutiques</u>	2
<hr/>	
I.1. La biothérapie	3
<hr/>	
I.1.1. Les inhibiteurs de transduction du signal	3
<hr/>	
I.1.1.1. Les inhibiteurs des récepteurs à activité tyrosine kinase	3
<hr/>	
I.1.1.1.1. Le trastuzumab HERCEPTIN®	5
<hr/>	
I.1.1.1.2. Le cetuximab	8
<hr/>	
I.1.1.1.3. Le «gefitinib» IRESSA®	9
<hr/>	
I.1.1.1.4. L'imatinib GLIVEC®	10
<hr/>	
I.1.1.2. Les inhibiteurs de farnésyltransférases	11
<hr/>	
I.1.1.3. Inhibiteurs des canaux calciques	11
<hr/>	
I.1.2. Les inhibiteurs de l'angiogénèse	12
<hr/>	
I.1.2.1. Le SU 5416	12
<hr/>	
I.1.2.2. L'atrasentan (ABT-627)	12
<hr/>	
I.1.2.3. Le bevacizumab (RhuMab VEGF)	13
<hr/>	
I.1.2.4. Le TNP-470	13
<hr/>	
I.1.2.5. Le thalidomide	13
<hr/>	
I.1.3. Les agents interférant avec la matrice extracellulaire	14
<hr/>	
I.1.3.1. Les inhibiteurs de métalloprotéinases	14
<hr/>	
I.1.3.2. Les inhibiteurs des récepteurs aux intégrines	14
<hr/>	
I.1.4. Les agents interférant avec le cycle cellulaire	15
<hr/>	
I.1.5. Conclusion sur la biothérapie	15
<hr/>	
I.2. L'immunothérapie	16
<hr/>	
I.2.1. L'immunisation <i>in vivo</i> par les cellules ou lysats cellulaires	16
<hr/>	
I.2.2. L'immunisation <i>in vivo</i> par les antigènes tumoraux	17
<hr/>	
I.2.2.1. Les gangliosides	17
<hr/>	
I.2.2.2. Les peptides et protéines	17
<hr/>	
I.2.3. L'immunisation <i>in vivo</i> par les virus recombinants et les liposomes cationiques	18



I.2.4. L'immunisation des cellules présentatrices autologues traitées <i>in vitro</i>	18
I.2.4.1. Lymphocytes activés associés à l'interleukine 2 (IL-2)	19
I.2.4.2. Tumor Isolated Lymphocysts (TIL)	19
I.2.4.3. Monocytes/macrophages activés	20
I.2.4.4. Cellules dendritiques	20
I.3. Thérapie génique	22
I.3.1. Exemple de stratégie	23
I.3.2. Avancées dans le domaine de la thérapie génique	25
I.3.2.1. La lutte contre l'angiogénèse	25
I.3.2.2. La destruction spécifique des cellules tumorales	25
I.3.2.3. Le gène p53	25
I.3.2.4. La thérapie génique associée	26
I.3.3. Limites de la thérapie génique en cancérologie	27
I.4. La pharmacogénomique	27
I.5. Bilan de l'intérêt de mise en place d'une tumorothèque en cancérologie	29
II. Orientations actuelles de la recherche : nécessité de mettre en place une tumorothèque	31
II.1. Nécessité d'analyser en même temps plusieurs cibles dans le génome : exemple de la protéine P53	32
II.2. Nécessité d'étudier le protéome	34
III. Techniques d'avenir	36
III.1. Les puces à ADN	36
III.1.1. Leur fonctionnement	36
III.1.2. Leurs applications	41
III.1.3. Caractéristiques des puces à ADN	42
III.1.4. Limites de l'utilisation des puces à ADN	43
III.2. L'analyse protéomique	44
III.3. L'analyse du métabolome	52

B. ASPECTS ETHIQUES, JURIDIQUES ET TECHNIQUES	54
<hr/>	
I. Objectifs	54
II. Aspects éthiques et juridiques	55
II.1. Introduction	55
II.2. Statut des échantillons biologiques	56
II.3. Consentements	57
II.4. Propriété des échantillons biologiques	60
II.5. Confidentialité des informations et respect du secret médical	60
II.5.1. Pour l'envoi des données nominatives sur le territoire national	60
II.5.2. Pour l'envoi des données nominatives en dehors du territoire national	63
II.6. Le droit à l'oubli et les purges	63
III. Aspects techniques	64
III.1. Aménagement des locaux	64
III.2. Techniques de conservation	66
III.2.1. Production du froid	66
III.2.2. Stockage des échantillons	67
III.3. Influence du froid sur la conservation d 'échantillons biologiques	67
III.3.1. Congélation de l'eau	68
III.3.2. Congélation de solutions salines	69
III.3.3. Congélation de solutions biologiques complexes	69
III.3.3. Congélation de structures cellulaires	70
<hr/>	
C. SCHEMA DE MISE EN PLACE D'ASSURANCE QUALITE	74
<hr/>	
I. Assurance-qualité	74
I.1. Modélisation interne du système	74
I.2. Logiciel informatique	77
<hr/>	
II. Assurance-sécurité	77
II.1. La formation	77
II.2. Les risques	78

II.3. Prévention des risques	78
II.3.1. Prévenir la surpression	78
II.3.2. Prévenir la brûlure cryogénique	79
II.3.3. Prévenir l'asphyxie	79
III. <u>Rédaction des procédures</u>	80
IV. <u>Points cruciaux à respecter concernant la procédure de congélation</u>	81
<u>des tissus pour l'analyse moléculaire des ARN</u>	
V. <u>Echéancier de mise en place de la biothèque</u>	81
D. CONCLUSION	83

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

- Fiche d'accompagnement des prélèvements
- Liste des abréviations
- Liste des tableaux et figures

INTRODUCTION GENERALE

Malgré l'amélioration des traitements, le cancer reste un problème majeur de santé publique. En 2000, 620 000 personnes en France étaient suivies pour un cancer diagnostiqué 5 ans auparavant [1] et la probabilité de survie à 5 ans après un diagnostic de cancer est de 37 % [2].

Néanmoins, la détection plus précoce des tumeurs et la découverte de nouvelles approches thérapeutiques basées sur l'amélioration de la connaissance en biologie moléculaire permettent de faire diminuer la mortalité, toutes tumeurs confondues, de 0,8 % par an [3].

Afin de poursuivre cette tendance, le Centre Alexis Vautrin situé à Nancy (CAV) a élaboré un projet de mise en place d'une tumorothèque permettant la collection et l'exploitation de prélèvements biologiques à visée d'études diagnostiques et thérapeutiques, notamment en cancérologie sénologique.

Dans une première partie, la présentation non exhaustive des nouvelles stratégies thérapeutiques anticancéreuses récemment élaborées permettra de bien comprendre l'intérêt de mise en place d'une telle structure en cancérologie.

Puis, après avoir étudié les aspects réglementaires à respecter lors de la mise en place d'une tumorothèque, nous proposerons dans une troisième partie un schéma d'assurance – qualité nécessaire au bon fonctionnement d'une telle structure.



A. INTERET D'UNE TUMOROTHEQUE EN CANCEROLOGIE

Une **biothèque** est un lieu de conservation d'échantillons biologiques (sérum, cellules, ADN) qui assure leur préservation en l'état initial, pendant une durée fixe ou illimitée suivant les objectifs [4]. Une **tumorothèque** est un type particulier et restreint de biothèque: elle concerne les tissus cancéreux.

Afin de comprendre l'intérêt de mettre en place une tumorothèque, il est nécessaire d'étudier les nouvelles stratégies thérapeutiques élaborées en cancérologie, les orientations actuelles de la recherche dans ce domaine ainsi que les techniques d'avenir permettant l'exploitation optimale d'une telle collection.

I. Nouvelles approches thérapeutiques

Les moyens thérapeutiques anticancéreux peuvent être schématiquement divisés en deux groupes :

- les traitements dits «locorégionaux», capables de détruire les cellules tumorales en un site localisé de l'organisme : il s'agit de la chirurgie et de la radiothérapie.
- les traitements dits «généraux» capables d'atteindre simultanément les cellules tumorales en différents endroits de l'organisme : il s'agit de la chimiothérapie, de l'hormonothérapie et des biothérapies.

Actuellement, l'utilisation des chimiothérapies est limitée par un certain nombre de facteurs tels que la résistance de la tumeur aux agents anticancéreux ou le degré de toxicité élevé de ces derniers.

La recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques est donc d'une importance majeure.

Durant les vingt dernières années, de nouvelles stratégies de lutte contre le cancer se sont dessinées au fur et à mesure de la montée en puissance des biotechnologies d'abord aux Etats-Unis puis en Europe et au Japon. Elles reposent d'une part, sur l'utilisation des biothérapies et d'autre part, sur les perfectionnements de l'immunothérapie et de la thérapie génique.

I.1. La biothérapie

La biothérapie correspond aux nouvelles classes de médicaments directement ciblés sur l'inhibition d'une voie biochimique impliquée dans les processus de prolifération des cellules (soit inhibition de l'activation d'un récepteur à un facteur de prolifération, soit inhibition d'un mécanisme d'action mis en jeu par la stimulation d'un récepteur).

Ces nouvelles stratégies tentent donc d'inhiber les événements moléculaires responsables de la croissance cellulaire anarchique. Parmi elles, nous allons étudier les inhibiteurs de transduction du signal, les inhibiteurs de l'angiogénèse, les agents interférant avec la matrice extracellulaire et les nouveaux agents interférant avec la progression des cellules dans le cycle cellulaire.

I.1.1. Les inhibiteurs de la transduction du signal

I.1.1.1. Les inhibiteurs des récepteurs à activité tyrosine kinase

La liaison d'un récepteur à activité tyrosine kinase avec un de ses ligands induit la dimérisation et l'autophosphorylation du récepteur entraînant la stimulation de son activité tyrosine kinase. Les sites d'autophosphorylation du récepteur servent à l'association d'un certain nombre de protéines nécessaires à la transmission du signal.

La famille des « Human Epidermal Growth Factor Receptor » (HER) appartenant à cette catégorie de récepteurs est la cible de certains principes actifs qui seront mentionnés au sein de ce paragraphe. Les quatre membres de cette famille présentent des homologies structurales qui sont indiquées dans la figure 1 sous forme de pourcentage.

Dans la figure 2 sont présentés les différents sites d'action des inhibiteurs des récepteurs à activité tyrosine-kinase.

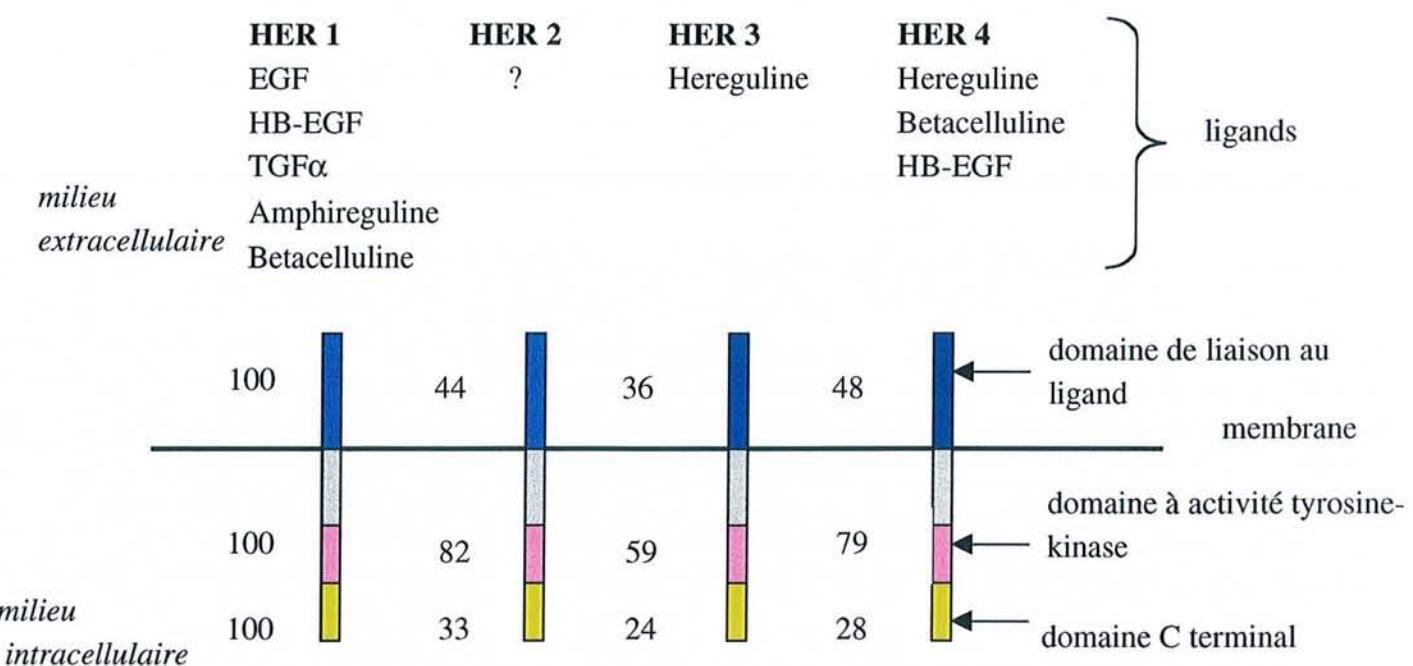


Figure 1 : Représentation schématique de l'homologie structurale et des ligands des quatre membres de la famille des récepteurs HER (schéma adapté d'après Arteaga [5]).

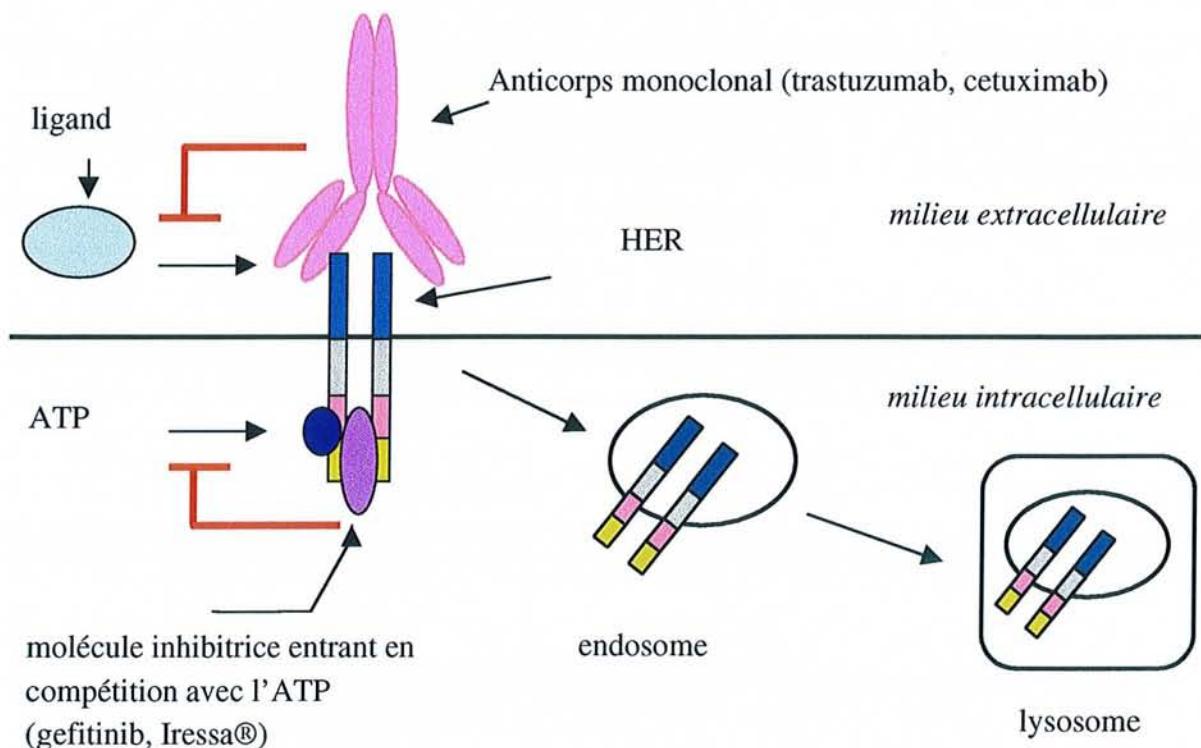


Figure 2 : Représentation schématique du mécanisme d'action des inhibiteurs des récepteurs à activité tyrosine-kinase (schéma adapté d'après Arteaga [5]).

I.1.1.1.1. Le trastuzumab HERCEPTIN®

- Description de la cible d'action du trastuzumab

Le protooncogène *neu* situé sur le chromosome 17 code pour un récepteur transmembranaire HER 2 de 185 kD encore appelé p185 dont le ligand n'a pas été identifié. Le récepteur HER 2 joue un rôle important dans la croissance et dans la différenciation cellulaire normale. Cependant, si ce gène est amplifié de façon anormale, il en résulte une surexpression du récepteur qui est lié au développement de plusieurs types de cancers humains comme les cancers du sein, des ovaires ou de l'estomac. *Slamon et al.* ont montré que 20 à 30 % des patientes atteintes de cancers du sein surexpriment ce récepteur [6].

- Propriétés du trastuzumab

Le trastuzumab est un anticorps monoclonal humanisé de souris se liant sur le récepteur HER 2 dont le mécanisme d'action n'est pas totalement élucidé. Il agirait en diminuant la quantité de protéine HER 2 exprimée à la surface cellulaire, en prévenant la formation d'hétérodimères contenant HER 2, en initiant l'arrêt de la prolifération cellulaire en phase G1, en induisant la formation d'une protéine inhibitrice du cycle cellulaire (p27), en prévenant le clivage du domaine extracellulaire de HER 2 (initiateur de la transduction du signal), en inhibant l'angiogénèse et en induisant l'activation du complément [7].

Les posologies recommandées dans le cancer du sein métastatique sont en administration intraveineuse de 4 mg/kg en dose de charge suivie de doses hebdomadaires de 2 mg/kg [8].

- Indications du trastuzumab

Il est utilisé en première intention en association avec le paclitaxel dans le traitement des patientes atteintes de cancer du sein métastatique dont les tumeurs surexpriment HER 2 et qui ne peuvent recevoir de chimiothérapies par anthracyclines [8]. Il semblerait que les cellules surexprimant HER 2 soient moins sensibles au paclitaxel que les cellules HER 2 normales.

Il est aussi utilisé seul en troisième ligne de chimiothérapie chez des patientes présentant un cancer du sein métastatique dont les tumeurs surexpriment HER 2 et qui ont déjà été prétraitées par au moins deux protocoles de chimiothérapie incluant une anthracycline et un taxane [8].

Le trastuzumab ne peut être utilisé que chez des patients dont la surexpression de HER 2 est notée 3+ par immunohistochimie.

- Effets indésirables du trastuzumab

Il semble assez bien toléré. Les effets indésirables les plus fréquents sont la réaction pseudo-grippale surtout lors de la première perfusion (40 % des cas) et les troubles gastro-intestinaux [8]. Dans 1 à 10 % des cas, divers troubles sont observés notamment cardiaques (diminution de la fraction d'éjection ventriculaire, insuffisance cardiaque) qui imposent une évaluation de la fonction cardiaque avant et pendant le traitement par trastuzumab. Si cette fonction est diminuée, il faut envisager sérieusement l'arrêt du trastuzumab.

- Essais cliniques comportant l'administration du trastuzumab

Trente et un essais cliniques de phase I, II et III sont en cours essentiellement dans le cancer du sein mais également dans les cancers métastatiques du pancréas et de la prostate en échappement hormonal, dans le cancer colorectal, dans l'ostéosarcome récurrent, dans le cancer du tractus urinaire, de l'endomètre, du rein et dans le cancer du poumon non à petites cellules [a].

- Détermination du statut HER 2

La qualité de la détermination du statut de HER 2 est primordial car elle conditionne l'administration ou non du trastuzumab.

Parmi toutes les méthodes de détermination du statut HER 2, deux techniques sont les plus employées :

- une technique d'expression de la protéine par immunohistochimie (ICH) qui correspond à la détection d'antigènes cellulaires ou tissulaires par des anticorps spécifiques marqués, soit par des fluorochromes, soit par une molécule réagissant de façon colorimétrique lors d'une réaction enzymatique.
- une technique d'expression de gène par «Fluorescent In Situ Hybridization» (FISH) qui correspond à la détection par microscopie d'épifluorescence de séquences d'ADN (dénaturées sous forme monobrin) hybridées avec des sondes. Les sondes correspondent à des séquences d'ADN monobrins complémentaires des entités recherchées dans lesquelles sont incorporés des marqueurs fluorescents.

Ross JS et al. ont effectué un travail rétrospectif de comparaison des techniques de détermination du statut HER 2 [9]. Il en ressort que sur les 47 études analysées, six ne trouvent pas de corrélation entre le statut HER 2 et le pronostic de survie.

Cette discordance observée semble résulter de la qualité de conservation du tissu. En effet, parmi ces six études, 4 correspondent à une détection immunohistochimique du statut HER 2 sur du tissu conservé dans de la paraffine. Il apparaît donc d'après cet article, hautement souhaitable de ne pas utiliser de la paraffine pour la conservation des tissus.

Des données intéressantes sont également apportées par les travaux de *Mitchell et al.* [10]. Ils ont comparé les deux techniques d'analyse sur des échantillons de tissu frais. La corrélation entre le statut HER 2 et un mauvais pronostic est variable lors des analyses par immunohistochimie tandis qu'elle est constante avec la technique d'hybridation fluorescente *in situ*.

La variabilité des résultats obtenus avec la technique immunohistochimique semble attribuée à une dégradation de la surface de la protéine HER 2 lors de la fixation de l'échantillon. Par ailleurs, la sûreté et la reproductibilité de cette technique sont limitées par l'interprétation subjective des résultats et par le type d'anticorps utilisés. De plus, cette méthode de dosage par intensité de marquage est seulement semi-quantitative.

L'hybridation *in situ* par fluorescence est la technique la plus fiable mais difficilement utilisable en routine.

Une alternative serait peut-être la technique radioimmunohistochimique (rICH) de détection de HER 2 qui utilise des anticorps radiomarqués à l' ^{125}I qui combine les avantages d'être quantitative, très spécifique et applicable en routine.

I.1.1.1.2. Le cetuximab

Le gène *c-erb B1* situé sur le chromosome 7 code pour un récepteur transmembranaire HER1 dont les ligands sont le facteur de croissance «Epidermal Growth Factor» (EGF), le Transforming Growth Factor alpha (TGF α), l'amphireguline, l/heparin-binding EGF (HB-EGF), la betacelluline et l'epireguline. Ces molécules en se liant au domaine extracellulaire de HER1 induisent la dimérisation et l'autophosphorylation de ce dernier sur les résidus tyrosine de son domaine intracellulaire. Cette autophosphorylation provoque la transduction de signaux qui induisent la prolifération cellulaire. Des séquences amplifiées du gène *c-erb B1* sont observées dans 60 à 80 % des gliomes malins [11] et dans 51 % des carcinomes de l'hypopharynx [12].

Une approche thérapeutique utilise la cible de l'EGF : il s'agit de l'anticorps monoclonal cetuximab ou IMC-C225 qui est dirigé contre le domaine extracellulaire du récepteur à l'EGF. Il a une affinité pour ce récepteur plus forte que les ligands naturels du récepteur (EGF et TGF α) [13]. Il bloque l'activation du récepteur à l'EGF en empêchant la fixation du ligand. Il semblerait prometteur dans les tumeurs ORL avancées (stades III-IV) en association avec la radiothérapie (étude clinique de phase III). En effet, 13 patients sur les 15 traités sont en rémission complète à l'issue du traitement sans majoration de la toxicité cutanée [14].

Il est également étudié dans des études cliniques de phase II en association avec le carboplatine et le paclitaxel dans les cancers du poumon non à petites cellules [15].

Il semble assez bien toléré ; les principaux effets indésirables observés sont l'asthénie, la fièvre, des nausées et de l'acné.

I.1.1.1.3. Le «gefitinib» IRESSA®

(La dénomination commune internationale (DCI) est en cours de validation, c'est pourquoi elle figure entre guillemets).

Cette molécule est un inhibiteur compétitif de l'ATP qui bloque l'activation du récepteur tyrosine-kinase HER 1 en inhibant sa phosphorylation [16]. Dans les études cliniques de phase II des cancers avancés du poumon non à petites cellules, le taux de réponse complète est d'environ 18 % [17]. Elle est actuellement en étude clinique de phase III dans cette indication en association avec la chimiothérapie et la radiothérapie.

Elle est sous autorisation temporaire d'utilisation nominative chez les patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules inopérables ne pouvant bénéficier d'un traitement par chimiothérapie.

Elle est également à l'étude dans le cancer colorectal métastatique, dans le cancer de la prostate hormonorésistant, dans le cancer de l'endomètre, de la tête et du cou, du péritoine, du rein, du tractus urinaire et dans le glioblastome [a].

Sa bonne tolérance et son administration orale en font un médicament de choix pour l'investigation de multiples approches thérapeutiques.

I.1.1.1.4. L'imatinib GLIVEC®

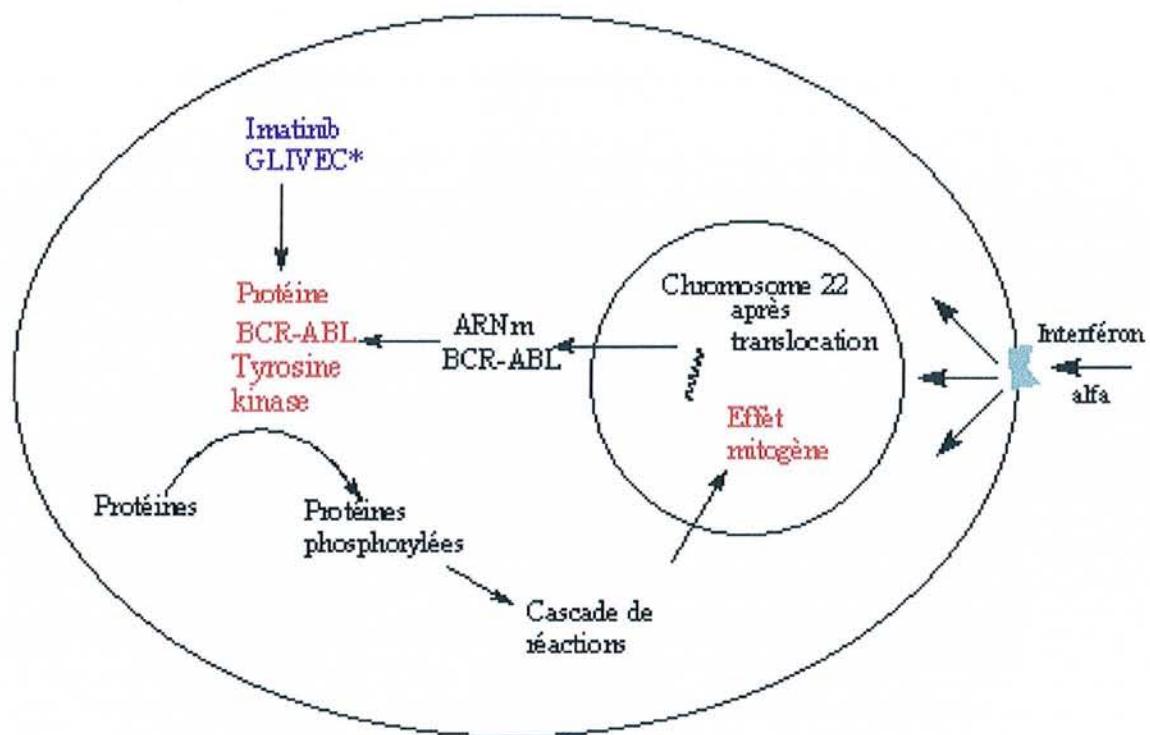


Figure 3 : Représentation schématique d'un des sites d'action de l'imatinib.

L'imatinib inhibite la protéine tyrosine kinase BCR-ABL au niveau cellulaire qui est synthétisée par les patients atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC) chromosome Philadelphie (bcr-abl) positif (figure 3). Ce produit est donc indiqué chez l'adulte dans le traitement des LMC chromosome philadelphie (bcr-abl) positif en phase chronique après échec du traitement par l'interféron alpha, ou en phase accélérée ou en crise blastique.

L'efficacité de l'imatinib est basée sur les taux de réponse hématologiques et cytogénétiques globales ; il n'existe pas actuellement d'étude clinique contrôlée démontrant un bénéfice clinique ou une prolongation de la durée de vie [18].

L'imatinib a également été évalué dans les tumeurs stromales du tube digestif, une forme de cancer rare résistant à toute chimiothérapie et radiothérapie qui implique une autre tyrosine-kinase oncogène, c-kit. Dans une étude clinique, 59 % des 148 malades traités sont entrés en

rémission partielle et s'y sont maintenus pendant 4 mois et demi [19]. Même si le recul est encore limité, ces résultats sont encourageants dans cette pathologie où la survie n'excède pas un à deux ans.

I.1.1.2. Inhibiteurs de farnésyltransférases

La protéine sous-membranaire ras est un maillon important de la transduction du signal mitogène vers le noyau de la cellule.

La farnésyl transférase est une enzyme responsable de la prénylation de la protéine ras [20]. Cette étape est nécessaire pour l'ancrage de la protéine ras à la face interne de la membrane cytoplasmique ce qui provoque l'activation de cette protéine. Dans un tiers des tumeurs humaines, une mutation activatrice de la protéine ras est observée ce qui explique l'intérêt de la découverte des inhibiteurs de la farnésyl transférase qui sont en étude clinique de phase II. Les résultats cliniques en monothérapie sont décevants mais il reste à évaluer l'association aux agents cytotoxiques classiques.

I.1.1.3. Inhibiteurs des canaux calciques

Le calcium régule des fonctions cellulaires importantes comme la prolifération, l'invasion et la différenciation cellulaire. Le carboxyamido-triazole (CAI) agit en bloquant les canaux calciques non voltage dépendant ce qui empêche la transduction des signaux calcium dépendant et entraîne une inhibition de l'angiogénèse tumorale. Il est actuellement en étude clinique de phase III dans les cancers du poumon à petites cellules de stade III-IV [21,22], en étude clinique de phase II dans les cancers du rein de stade IV et en étude clinique de phase I en association avec le paclitaxel dans le lymphome ou les cancers réfractaires [a].

I.1.2. Inhibiteurs de l'angiogénèse

L'angiogénèse est un phénomène complexe qui fait intervenir les cellules endothéliales, des facteurs solubles pro- et antiangiogéniques, et la matrice extracellulaire. Le développement des tumeurs nécessite la sécrétion par les cellules cancéreuses de médiateurs solubles, facteurs angiogéniques tumoraux qui activent la formation de nouveaux vaisseaux. Ces vaisseaux sont nécessaires au développement de la tumeur en approvisionnant cette dernière en nutriments et en oxygène.

I.1.2.1. Le SU 5416

Cette molécule inhibe l'autophosphorylation du récepteur au «Vascular Endothelial Growth Factor» (VEGF) de type 2 et aurait une action similaire sur le récepteur «stem cell factor» (SCF) qui est exprimé chez 60 à 80 % des patients porteurs de leucémies myéloïdes aiguës [23].

Elle est capable d'induire l'inhibition de la vascularisation et de la croissance tumorale aussi bien dans les tumeurs solides que dans les hémopathies malignes [24]. Des taux élevés de VEGF cellulaires et circulants sont observés dans les hémopathies malignes et sont inversement corrélés au pronostic. Chez une patiente en rechute de leucémie myéloïde aiguë, on a observé une rémission stable de la maladie d'au moins 4 mois après un traitement de 12 semaines par SU 5416 [25].

I.1.2.2. L' atrasentan (ABT-627)

Des résultats ont été obtenus dans le cancer de la prostate avec la molécule ABT-627 (un antagoniste du récepteur de l'endotheline I), facteur paracrine impliqué dans la prolifération cellulaire. Dans les études de phase II, l'atrasentan ralentissait la progression du cancer de la

prostate en retardant le développement des métastases osseuses [26]. Des études de phase III sont en cours dans cette indication [a].

I.1.2.3. Le bevacizumab (RhuMab VEGF)

Cet anticorps monoclonal liant le VEGF circulant est en essai dans des études de phase II dans le mélanome, dans les cancers colorectaux, du sein, de la prostate et en étude de phase III en association avec le paclitaxel chez des patientes présentant un cancer du sein récurrent ou métastatique [a].

I.1.2.4. Le TNP-470

Le mécanisme d'action de ce composé est encore mal connu. Il se lie de façon covalente à une métalloprotéase, la Méthionine Aminopeptidase de type 2 (MetAP2) impliquée dans le catabolisme des polypeptides. De nombreux travaux tentent d'expliquer comment l'action sur la MetAP2, protéine ubiquitaire peut induire une inhibition spécifique de prolifération des cellules endothéliales [27].

Une étude de phase I est en cours dans le sarcome de Kaposi chez des patients atteints de SIDA [a].

I.1.2.5. Le thalidomide

Le thalidomide inhibe l'angiogénèse en inhibant la sécrétion du bFGF et en supprimant la sécrétion du «tumoral necrosis factor alpha» (TNF α) et de l'interféron γ , molécules qui augmentent l'expression d'une protéine nommée intégrine, cette dernière jouant un rôle crucial dans la formation des nouveaux vaisseaux [28].

Des études de phase II ont montré un taux de réponse partielle de 40 % dans les sarcomes de Kaposi [29], une stabilité ou une amélioration de la qualité de vie dans des glioblastomes chez

les patients où la maladie ne progresse pas (47 % des patients) [30] et une réduction de la masse tumorale dans le myélome [31]. Cette molécule est actuellement sous autorisation temporaire d'utilisation de cohorte pour le traitement des myélomes multiples réfractaires et / ou en rechute après au moins une ligne thérapeutique ayant comporté des alkylants lorsque aucune alternative thérapeutique n'existe.

I.1.3. Les agents interférant avec la matrice extracellulaire

I.1.3.1. Les inhibiteurs de métalloprotéinases

Les métalloprotéinases sont des enzymes protéolytiques capables de dégrader la matrice extracellulaire et de permettre ainsi la dissémination des cellules tumorales. Leur inhibition s'effectue par l'intermédiaire de leur liaison à des molécules spécifiques, les Tissue Inhibitors of MetalloProteinases (TIMPS). Dans le cancer avancé du pancréas, une étude de phase II incluant 113 patients traités par marimastat a montré que 73 % des patients avait répondu au traitement. Le principal effet indésirable est l'arthralgie observée chez 29 % des patients [32].

I.1.3.2. Les inhibiteurs des récepteurs aux intégrines

Les intégrines sont des molécules d'adhérence localisées au niveau de la matrice extracellulaire qui en se liant avec leur récepteur présent à la surface des cellules endothéliales stimulent leur prolifération. La vitaxine est un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur aVb3 des intégrines. Dans les léiomyosarcomes, aucune réponse objective ni stabilisation de la maladie n'a été observée chez 1es 15 patients traités par cette molécule [33].

I.1.4. Les agents interférant avec le cycle cellulaire

Les kinases dépendantes des cyclines (CDK) régulent la phosphorylation de molécules protéiques, les cyclines qui permettent la progression des cellules dans le cycle cellulaire. Dans les cellules tumorales, il existe une dérégulation des kinases; les cellules tumorales échappent alors à l'apoptose en dépit des lésions de leur ADN.

- L'UNC-01 est une nouvelle molécule capable d'inhiber les CDK, dotée d'un effet antitumoral dans des modèles de xénogreffes de tumeurs mammaires et rénales [34].
- Le flavopiridol/ HMR-1275 est également un inhibiteur de CDK capable *in vitro* de potentialiser l'apoptose induite par le paclitaxel. Il est en cours d'essai clinique de phase II dans les cancers gastriques, rénaux, du colon, dans les leucémies et en phase I dans le cancer de la prostate [35].

I.1.5. Conclusion sur la biothérapie

Les principaux principes actifs biothérapeutiques ont été énoncés dans la partie précédente cependant, la liste des nouvelles molécules présentée ici n'est pas exhaustive.

Ces nouvelles molécules présentent un intérêt thérapeutique non négligeable mais, l'utilisation de ces molécules est indissociable des traitements conventionnels que sont la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie.

En effet, le faible taux de réponse des patients aux biothérapies constitue un problème préoccupant. On peut supposer que ces médicaments sont inefficaces quand ils sont dirigés vers des tumeurs de grand volume à un stade avancé mais sont en revanche très utiles pour prévenir une rechute d'une maladie préalablement réduite par la chimiothérapie classique.

Il serait sûrement judicieux d'imaginer des critères intermédiaires de jugement qui permettraient de prédire l'efficacité de ces nouveaux traitements.

I.2. L'immunothérapie

Elle a débuté en 1957 par la découverte des interférons (INTRONA®, ROFERON®) dont l'effet anti-tumoral reste encore imprécis : ils déclenchaient une séquence complexe de réactions intracellulaires et notamment l'induction de certaines enzymes, processus responsable de la suppression de la prolifération cellulaire et des activités immunomodulatrices. Puis en 1976 a été découverte l'interleukine 2 (ALDESLEUKINE®) qui active la prolifération et la croissance des lymphocytes T cytotoxiques (Tc) et augmente la cytotoxicité des monocytes. Les taux de réponse sont médiocres de l'ordre de 11 à 17 % dans les mélanomes [36] et de 10 % dans les cancers du rein [37] au prix d'une toxicité considérable.

Les approches actuelles s'orientent vers une immunothérapie plus spécifique de type vaccinale. La transformation d'une cellule normale en cellule tumorale maligne s'accompagne de l'expression de néo-antigènes. Le concept d'immunothérapie repose sur le fait que le système immun est capable de reconnaître ces néoantigènes et d'éliminer les cellules cancéreuses. Différentes stratégies d'immunisation sont envisagées et sont présentées ci-dessous.

I.2.1. L'immunisation *in vivo* par les cellules ou les lysats cellulaires

Dans ce cas, l'immunisation fait appel à des cellules tumorales irradiées, à des cellules en culture ou à des antigènes partiellement purifiés provenant des surnageants de cultures cellulaires.

Le Melaccine® est un vaccin à base de deux lysats cellulaires de mélanome commercialisé aux USA qui a montré en étude de phase III une amélioration de la qualité de vie des patients atteints de mélanome avancé métastatique comparativement à la chimiothérapie classique [38].

I.2.2. L'immunisation *in vivo* par les antigènes tumoraux

I.2.2.1. Les gangliosides

Les gangliosides sont des mucolipides du groupe des glycosphingoïdes. Les GM sont des monogangliosides, ce sont les plus immunogéniques, fortement exprimés dans les cellules du mélanome.

Le ganglioside GM 2 induit des réponses d'anticorps dans 10 % des cas lorsqu'il est injecté seul et dans près de 85 % des cas lorsqu'il est administré avec du Bacille Calmette Guerin (BCG) après pré-traitement par cyclophosphamide chez des patients atteints de mélanome mais les résultats cliniques ne sont pas statistiquement significatifs [39].

I.2.2.2. Les peptides et protéines

Au cours de ces dernières années, on a identifié plusieurs gènes qui codent pour des antigènes reconnus sur un mélanome par un clone Tc autologue. Le premier découvert se nommait MAGE-1. Ces antigènes sont fragmentés en petits peptides par le protéasome cytosolique. Ces peptides migrent dans le réticulum endoplasmique où ils vont se lier à des molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité ; les complexes ainsi formés migrent à la surface de la cellule où ils sont reconnus par le récepteur du lymphocyte Tc.

La vaccinothérapie antitumorale des patients impose une double vérification :

- s'assurer de la présence de l'antigène candidat au niveau de la tumeur du patient à vacciner grâce à une technique d'amplification génique par «Polymerase Chain Reaction» (PCR) à partir d'un échantillon tumoral frais ou congelé.
- s'assurer du phénotype du patient à vacciner par typage HLA à partir du sang du malade pour être sûr que l'antigène vaccin sera présenté aux lymphocytes Tc par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). En effet à titre d'exemple

concernant le gène MAGE-1, son expression n'est présente que dans 35 % des mélanomes.

L'administration de CancerVax, vaccin à base de plusieurs antigènes communs à différents types de tumeurs entraîne l'augmentation d'anticorps antitumoraux et, a été corrélé à une augmentation de la survie dans le mélanome et dans le cancer colorectal [40,41].

Le Theratope, vaccin à base d'antigène de mucine MUC1 (antigène commun à de nombreuses tumeurs) a montré un bénéfice de survie dans les cancers du sein métastatiques et dans les cancers coliques en étude de phase II et fait actuellement l'objet d'études de phase III [42].

I.2.3. L'immunisation *in vivo* par les virus recombinants et les liposomes cationiques

Une autre stratégie vaccinale serait une immunisation *in vivo* par des macrophages ou des cellules dendritiques transfectées avec des liposomes cationiques ou des virus recombinants défectifs (rétrovirus, adénovirus), porteurs de la séquence codant le peptide antigénique. Des essais ont été réalisés sur des cellules dendritiques transfectées, soit par des liposomes cationiques, soit par des adénovirus recombinants, porteurs du gène de la mucine MUC1. La mucine est un antigène exprimé dans les cancers du sein, du pancréas et des ovaires. *In vitro*, la stimulation spécifique des lymphocytes Tc par la mucine semble être similaire dans les deux techniques [43].

I.2.4. L'immunisation des cellules présentatrices autologues traitées *in vitro*

Elle consiste à manipuler en dehors de l'organisme (*ex vivo*) les cellules du système immunitaire et à réinjecter ces cellules aux patients afin de stimuler la réponse immunitaire. Plusieurs types de cellules immunitaires manipulées *ex vivo* ont été testées chez l'Homme

parmi lesquelles les lymphocytes activés, les lymphocytes isolés à partir de tumeurs (TIL), les monocytes/macrophages activés et plus récemment les cellules dendritiques.

I.2.4.1. Lymphocytes activés associés à l'interleukine 2 (IL-2)

Les données les plus encourageantes ont été observées pour le mélanome. En effet, la chimiothérapie ayant préalablement échoué chez six patients, ils ont reçu $7 \text{ à } 16.10^9$ lymphocytes activés associés à l'IL-2 et ont tous répondu au traitement (quatre réponses partielles, une réponse complète et une stabilisation de la maladie) [44]. Néanmoins, les résultats ne sont que partiellement convaincants car ces résultats n'ont pas été confirmés par d'autres études incluant un nombre de patients plus important. De plus, l'IL-2 à forte dose nécessaire pour stimuler les lymphocytes activés est très toxique.

I.2.4.2. Tumoral Isolated Lymphocysts (TIL)

Les lymphocytes isolés à partir de tumeur (TIL) possèdent à leur surface des récepteurs à l'IL-2 qui facilitent leur multiplication *in vitro* en présence de l'interleukine. Rosenberg *et al.* ont montré que 34 % des patients atteints de mélanomes métastatiques traités par l'association TIL autologues/IL-2 présentaient une réponse clinique partielle ou totale alors que 17 % des patients répondaient à un traitement par interleukine seule [45].

Une autre étude met en évidence un taux de réponse plus important chez un groupe traité par TIL, IL-2 et IFN- α comparativement à un groupe recevant uniquement des cytokines [46].

Un certain nombre de facteurs (l'origine tumorale, le temps de culture *ex vivo* des lymphocytes autologues) sont impliqués dans le pourcentage de réponse clinique et sont étudiés afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique.

I.2.4.3. Monocytes/macrophages activés

Les monocytes/macrophages activés présentent la caractéristique unique d'exprimer à leur surface une très grande quantité de récepteurs de haute affinité pour les anticorps. Ce sont des cellules impliquées dans la cytotoxicité anticorps dépendante. Une étude de phase II est en cours dans le carcinome de l'ovaire impliquant 6 injections en intrapéritonéal d'un milliard de macrophages activés armés d'un anticorps anti-HER 2/neu. Des études de phase II montrent des résultats encourageants. Ainsi, sur 15 patients atteints de cancer rénal traités par injection intraveineuse de monocytes/macrophages activés, 8 patients ont vu leur maladie se stabiliser et un a répondu partiellement au traitement. Dans le cancer colorectal, 3 stabilisations ont été observées sur 14 patients traités. L'injection locale est actuellement privilégiée par rapport à l'injection systémique [47].

D'autres équipes s'attachent à stimuler chez les macrophages leur fonction présentatrice d'antigènes en cultivant *ex vivo* des cellules en cours de différenciation en présence d'antigènes tumoraux spécifiques ou de cellules tumorales tuées. Ces cellules sont capables de générer une réponse immune spécifiquement dirigée contre la tumeur de l'hôte [48,49].

Des études expérimentales *in vitro* portent sur des essais de transfection des macrophages avec des gènes codant pour des effecteurs immunitaires susceptibles d'amplifier l'activité anti-tumorale, la sécrétion de cytokines et la réponse immune de ces cellules. D'autres études portent sur l'introduction de fragments d'ADN codant pour des antigènes tumoraux qui augmenteraient la fonction présentatrice d'antigènes des cellules dérivées des monocytes et qui stimuleraient donc la réponse immune antitumorale spécifique [50,51].

I.2.4.4. Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques appartiennent à une classe de cellules hématopoïétiques présentes aussi bien dans les tissus lymphoïdes que non lymphoïdes. Bien que d'origine

hématopoïétique, les cellules dendritiques migrent rapidement vers les tissus et ne sont présentes dans le sang qu'à un taux très faible.

Les cellules dendritiques possèdent des capacités uniques d'internalisation, de digestion et de présentation de l'antigène. Elles sont capables de stimuler la production de lymphocytes T et jouent de ce fait un rôle important dans la réponse immune. Les premiers résultats des études cliniques de phase I-II réalisées sur différents types de tumeurs suggèrent l'induction d'une immunité cellulaire spécifique de la tumeur.

Des travaux ont montré qu'il était possible de charger *in vitro* des cellules dendritiques avec différents antigènes tumoraux, avec de l'ADN, de l'ARN, des lysats ou des corps apoptotiques isolés de cellules tumorales, ou encore avec des protéines ou des peptides antigéniques tumoraux provenant de la tumeur. Après manipulation *ex vivo*, les cellules sont réinjectées par voie intraveineuse ou par voie sous-cutanée afin de stimuler ou d'augmenter la réponse immune spécifique de l'hôte vis-à-vis des motifs antigéniques localisés à la surface des cellules tumorales. Les cellules dendritiques chargées avec les antigènes tumoraux génèrent la production de lymphocytes Tc reconnaissant spécifiquement des cellules cibles exprimant l'antigène tumoral à leur surface.

Les premiers essais cliniques ont été réalisés sur le mélanome et le cancer de la prostate. Au cours d'une étude de phase II, *Murphy et al.* ont évalué l'efficacité et la tolérance de six injections de cellules dendritiques chargées de peptides PSM-P1 et PSM-P2 dérivés du «Prostate Specific Membrane Antigen» (PSMA) chez 33 patients porteurs de carcinomes avancés de la prostate. Chez 27 % des patients, le «Prostate Specific Antigen» (PSA) a diminué de 50 % et la survie est significativement augmentée pour des patients résistant au traitement hormonal [52,53,54]. Des résultats encourageants ont également été observés chez des patients atteints de mélanome et de carcinome rénal métastatique. Des études sur un plus grand nombre de patients cancéreux doivent être mises en place afin de démontrer l'efficacité clinique du traitement et d'évaluer son impact sur la survie des patients.

I.3. Thérapie génique

« La thérapie génique est l'insertion délibérée de matériel génétique dans l'organisme d'un patient pour corriger un défaut précis à l'origine d'une pathologie, que ce soit à titre curatif ou préventif ».

Le principe de cette thérapie est, soit d'introduire un gène médicament faisant défaut à l'intérieur de la cellule cible afin de corriger une maladie génétique, soit d'inhiber ou de stimuler la synthèse d'une protéine donnée.

Il existe trois types de stratégies en thérapie génique :

- La thérapie *ex vivo* consiste à prélever sur le patient les cellules cibles, à les modifier génétiquement avec le vecteur viral porteur du gène thérapeutique et à les réintroduire chez le patient. Cette technique est utilisée pour les cellules sanguines qui sont faciles à prélever et à réintroduire.
- La thérapie *in situ* consiste à placer directement au sein du tissu cible le vecteur de transfert.
- La thérapie *in vivo* consiste à injecter le vecteur portant le gène thérapeutique directement dans la circulation sanguine ; ce dernier est censé atteindre spécifiquement les cellules cibles.

La thérapie génique est un système qui comprend un « gène médicament », un vecteur pour le transporter et une cellule cible où le gène puisse s'exprimer.

Les vecteurs utilisés en thérapie génique antitumorale sont des vecteurs viraux (réetrovirus, adénovirus) ou synthétiques (lipides, peptides, polymères cationiques).

I.3.1. Exemple de stratégie : Ciblage thérapeutique grâce à un gène antisens de la protéine HER 2, intégré dans une séquence d'ADN nommée «Iron Responsive Element» (IRE) régulatrice de la traduction de certains gènes, l'ensemble étant couplé au gène codant pour la protéine pro-apoptotique bax [55].

Cette approche est en cours d'étude *in vitro* sur des lignées humaines de cellules cancéreuses du sein surexprimant HER 2, transfectées par un plasmide.

Elle consiste à faire exprimer dans les cellules tumorales un gène codant pour la protéine pro-apoptotique bax qui conduira à la mort cellulaire. Pour cela, on va utiliser un régulateur IRE qui inhibera l'expression du gène dans les cellules normales et activera l'expression de ce gène dans les cellules tumorales. La séquence IRE est un élément non-codant qui peut inhiber la traduction de ce gène en se liant aux protéines «Iron Regulatory Proteins» (IRP).

- Pour inhiber l'expression du gène codant pour la protéine bax dans les cellules normales, il faut que le complexe IRE-IRP se forme. En revanche, dans les cellules tumorales, il faut éviter la constitution de ce complexe en agissant sur sa structure tridimensionnelle. Il faut provoquer la formation d'un hybride (ADN antisens de la protéine HER 2 –ARNm de HER 2) qui empêchera la fixation des IRP sur l'IRE. Un ADN antisens est une séquence complémentaire de l'ARNm.

Pour que cet hybride puisse se former, il faut que les séquences antisens de HER 2 soient incorporées dans les séquences IRE : les séquences obtenues se nomment AS-IRE. Les AS-IRE ont la même fonctionnalité que les IRE ; elles peuvent se lier aux IRP et inhiber la traduction des gènes auxquels elles sont associées.

- Les cellules tumorales surexprimant HER 2 ont une quantité d'ARNm de HER 2 de 15 à 100 fois supérieure à celle des cellules normales par conséquent, les ARNm de HER 2 vont pouvoir se fixer sur les séquences antisens HER 2. L'hybride ainsi formé empêche la formation du complexe IRE-IRP. Ainsi, il n'y a plus d'inhibition de la traduction de la protéine bax, celle-ci pouvant être synthétisée et conduire à la mort cellulaire.

- Dans les cellules normales, il y a formation du complexe IRP-IRE ce qui entraîne une inhibition de la traduction du gène thérapeutique (figure 4).

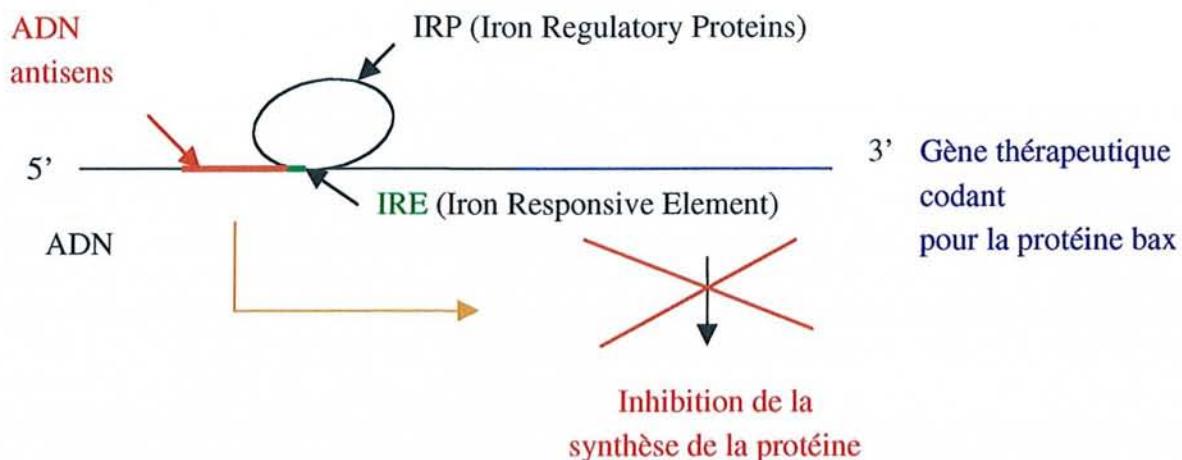


Figure 4 : Représentation schématique de l'effet du gène antisens de la protéine HER 2, intégré dans une séquence d'ADN nommée «Iron Responsive Element» sur le gène codant pour la protéine bax dans les cellules normales.

- Dans les cellules tumorales surexprimant HER 2, il n'y a pas de formation du complexe IRP-IRE-AS ce qui entraîne la traduction du gène thérapeutique (figure 5).

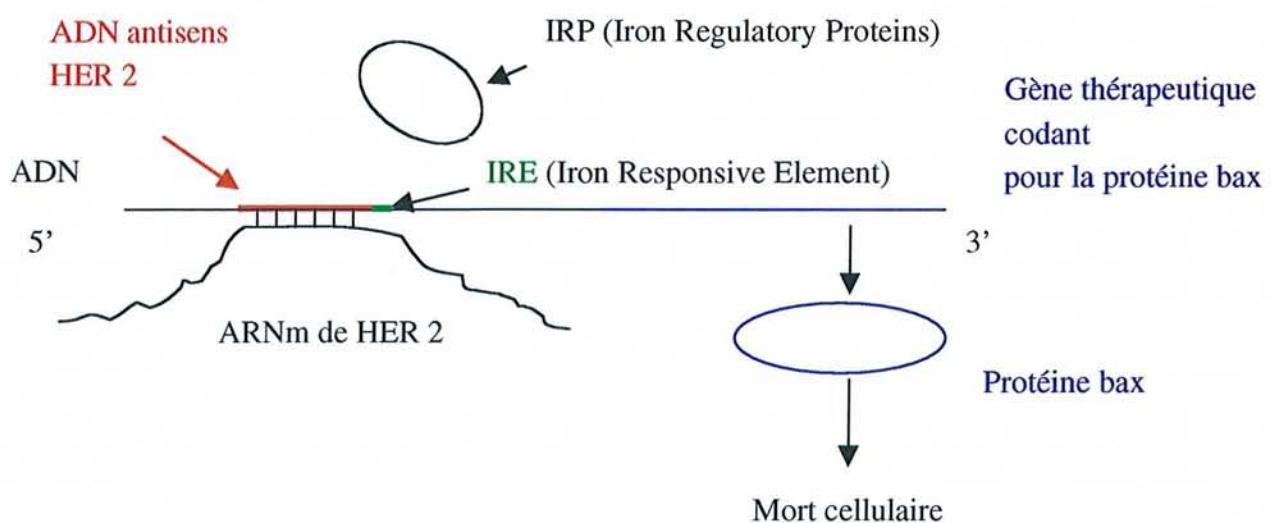


Figure 5 : Représentation schématique de l'effet du gène antisens de la protéine HER 2, intégré dans une séquence d'ADN nommée «Iron Responsive Element» sur le gène codant pour la protéine bax dans les cellules tumorales.

I.3.2. Avancées dans le domaine de la thérapie génique

I.3.2.1. La lutte contre l'angiogénèse

Les gènes qui codent pour les protéines inhibitrices de l'angiogénèse (angiotstatine et endostatine) sont introduits dans un rétrovirus puis transfectés dans des cellules souches de moelle osseuse cultivées *in vitro* qui sont ensuite transplantées dans l'organisme [56].

I.3.2.2. La destruction spécifique de cellules tumorales

Les cellules «vero» provenant de reins de singes ont la capacité d'exprimer le gène «médicament» avant d'être détruites rapidement d'où leur intérêt pour produire l'interleukine 2 au niveau des tumeurs sans risque d'affecter les cellules saines par expression trop durable du gène. Dans une étude de phase II incluant 28 patients atteints de mélanome, 50 % des patients ont vu leur maladie se stabiliser grâce à l'expression du gène de l'interleukine 2 [57].

I.3.2.3. Le gène p53

Plusieurs essais cliniques utilisent un vecteur adénoviral pour l'administration du gène suppresseur de tumeur p53. Il s'agit de l'adénovirus Ad5CMVp53 qui est en cours d'évaluation pour le traitement de différents types de cancers. Ainsi, dans un essai clinique de phase I incluant 24 patients atteints de cancer du poumon, 16 patients ont montré une stabilisation de la maladie et 11 sur 24 ont présenté des signes d'apoptose au niveau des tumeurs [58].

I.3.2.4. La thérapie génique associée

Cette approche thérapeutique semble très intéressante. C'est la combinaison de la thérapie génique et d'un traitement médical ou chirurgical classique. On peut citer quelques exemples :

- Lors des greffes de moelle osseuse, on est amené à injecter au patient des lymphocytes du donneur de moelle ce qui présente l'inconvénient d'exposer le patient à un risque de maladie de greffon contre l'hôte qui peut être très grave. L'une des parades possible est de prélever des lymphocytes du donneur et d'y transférer un gène-suicide (la thymidine kinase du virus de l'herpès (TK), comme dans le cas des tumeurs cancéreuses) avant de les injecter au patient greffé. La TK du virus de l'herpès est une enzyme qui en phosphorylant le ganciclovir (antiviral) entraîne la mort cellulaire. Si ces lymphocytes entraînent effectivement une réaction sévère du greffon contre l'hôte, on peut administrer à ce dernier le ganciclovir. Les lymphocytes modifiés, rendus sensibles à cette substance seront détruits. Huit patients atteints de lymphomes induits par le virus d'Epstein-Barr (EBV) ont été traités avec ces lymphocytes. Trois ont développé une réaction du greffon contre l'hôte qui a été contrôlée par l'adjonction de ganciclovir qui a éliminé les cellules transduites [59].
- La thérapie génique peut également protéger les patients des effets négatifs de la chimiothérapie anticancéreuse. Une des limitations de la chimiothérapie est l'excessive toxicité des molécules utilisées laquelle s'exerce notamment vis-à-vis des cellules sanguines et conduit à une immunodépression sévère. Des stratégies de thérapie génique proposées reposent sur le transfert chez le malade de gènes protecteurs dans les cellules souches hématopoïétiques (comme par exemple le gène de la «multidrug resistance» (mdr)). Dans ce type de méthodes, le transfert de gène est d'abord entrepris sur des cultures de cellules de moelle osseuse du malade (*ex vivo*) et les cellules modifiées sont ensuite réinjectées au patient. Celui-ci peut alors recevoir sans risque une chimiothérapie intensive [60].

I.3.3. Limites de la thérapie génique en cancérologie

L'efficacité des vecteurs est limitée par des problèmes de spécificité de la cible, d'intégration du génome viral dans le noyau cellulaire et d'immunogénicité. Actuellement, l'évolution de la thérapie génique repose sur le développement des systèmes de transfert de gènes qui doivent être sûrs, efficaces, capables d'exercer leur fonction dans des cellules qui ne se divisent pas et d'assurer l'expression du gène thérapeutique.

I.4. La pharmacogénomique

Elle correspond à l'étude des mécanismes génétiques liés aux variations individuelles lors de la réponse aux xénobiotiques et particulièrement, aux médicaments. La pharmacogénomique comprend la pharmacogénétique (étude des modifications des réponses pharmacologiques liés à l'hérédité) et l'identification des variations génomiques responsables des différentes réponses de l'organisme. Lorsque les liens entre un ou plusieurs gènes, leur traduction sous la forme d'une enzyme ou d'un récepteur et leurs conséquences cliniques auront été établis, l'analyse du génome permettra d'éviter le recours à des dosages et à des tests biologiques parfois imprécis et toujours indirects. Afin d'effectuer ces liens, cette discipline a besoin de matériel génétique de qualité qui nécessite la mise en place de structures comme les tumorothèques permettant de garantir une intégrité optimale des échantillons.

Les applications de la pharmacogénomique sont les suivantes :

- Maîtriser la toxicité des traitements
- . A titre d'exemple nous pouvons citer le cas d'un test de dépistage qui a été mis au point aux Etats-Unis pour détecter une infime anomalie génétique qui responsable de la production d'une enzyme, la thiopurine méthyltransférase (TPMT), freine le métabolisme de deux médicaments : l'azathioprine et le 6-mercaptopurine. Les patients atteints de cette variation génétique peuvent être empoisonnés par ces médicaments. Or, les médicaments de la famille

des thiopurines permettent d'atteindre un taux de rémission de 80 % dans le cas de leucémies lymphoblastiques. La solution est donc de faire passer un test génétique aux patients susceptibles d'être traités et d'administrer aux porteurs de cette variation génétique des doses inférieures aux doses standards [61].

. De même, nous pouvons citer l'exemple du gène de la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) (première enzyme du catabolisme du 5 fluoro-uracile) qui est partiellement déficiente chez environ 3 % des individus [62]. Une mutation au niveau du gène de cette enzyme semble à l'origine de cette diminution d'activité [63]. L'adaptation individuelle de doses peut-être utilisée pour permettre tout en restant dans l'intervalle des doses efficaces de 5 FU le traitement des patients déficients en DPD [64].

- Déterminer le profil transcriptomique de résistance à certains médicaments

Los et al. tentent de déterminer le profil d'expression des ARN messagers de lignées cellulaires ovariennes sensibles ou résistantes au cisplatine. Il semble que l'analyse des transcrits impliqués dans les voies de signalisation menant à la mort cellulaire soit plus informative que l'analyse des transcrits impliqués directement dans les mécanismes de résistance au cisplatine [65].

- La recherche de médicaments

Le recours à la pharmacogénomique permettra d'inclure dans les études cliniques des personnes présentant la plus grande variabilité de réponses à un traitement et de réduire ainsi la taille de l'échantillon représentatif. L'estimation précoce de l'efficacité et de l'innocuité d'un médicament est un élément important de réduction de la durée et des coûts de la recherche médicale. Actuellement, sur dix molécules testées en phase I des essais cliniques, une seule sera mise sur le marché. La pharmacogénomique peut améliorer cette situation en démontrant que certains médicaments candidats, s'ils sont inutiles ou dangereux pour certains patients, peuvent être utilisés pour d'autres. En effet, en fonction des polymorphismes

génétiques des patients, certains médicaments peuvent avoir des applications insoupçonnées. La pharmacogénomique permettra de prescrire les médicaments appropriés aux malades porteurs de la mutation génétique responsable de la sensibilité accrue des cellules tumorales au traitement et d'éviter leur administration à des patients ne présentant pas cette altération génétique, cette absence de mutation les rendant réfractaires au traitement.

I.5. Bilan de l'intérêt de mise en place d'une tumorothèque en cancérologie

Les diverses stratégies thérapeutiques précédemment décrites mettent clairement en évidence l'intérêt de mise en place d'une tumorothèque à travers différents aspects :

- En matière de recherche fondamentale, la tumorothèque permettra de dresser une véritable carte d'identité des tumeurs et d'améliorer ainsi la précision diagnostique par la découverte de nouvelles sous-classes.
- Elle devrait permettre également de définir les populations de patients pour lesquelles un traitement par biothérapie est possible. A titre d'exemple, on peut citer la détermination préalable avant traitement par HERCEPTIN® du statut HER 2 des patientes atteintes de cancer du sein métastatique.
- Par ailleurs, elle permettra la validation de certaines stratégies thérapeutiques par la mise en place d'études cliniques nécessitant l'analyse des tumeurs.
- Elle pourrait avoir une application dans l'immunothérapie *in vivo* utilisant des peptides nécessitant de s'assurer par la technique de PCR sur tumeur fraîche ou congelée de la présence de l'antigène candidat au niveau de la tumeur du patient à vacciner.

- Dans le domaine de la pharmacogénomique, elle améliorera le ciblage thérapeutique en permettant la détermination de profils des transcrits de résistance des tumeurs à certains médicaments, conduisant à administrer aux patients les traitements susceptibles d'être les plus actifs.

Les traitements anticancéreux de demain prendront en compte d'une part la constitution génétique de l'individu mais également celle de la tumeur aboutissant ainsi à un véritable traitement sur mesure. Ils tendent à être moins toxiques en ciblant leur action de façon plus spécifique sur les cellules tumorales. Ces nouvelles voies thérapeutiques en association avec d'autres méthodes plus traditionnelles ne pourront que s'imposer dans l'avenir comme les solutions « sur mesure » adaptées aux différents types de cancer rencontrés. La caractérisation des tumeurs et la recherche de marqueurs prédictifs et pronostics de réponse aux traitements représente donc un axe de recherche important dans la lutte contre le cancer.

II. Orientations actuelles de la recherche : Nécessité de mettre en place une tumorothèque

La classification actuelle des tumeurs repose essentiellement sur des observations cliniques (taille de la tumeur, envahissement ganglionnaire, présence de métastases) et histologiques (origine tissulaire, type, grade histopronostic qui évalue conjointement la taille des noyaux, l'activité de prolifération et de différenciation tissulaires). Or, à stade et à traitement identique, l'évolution du cancer d'un même type peut varier de quelques mois à quelques dizaines d'années. Le cancer a une origine polygénique et multifactorielle qui confère à chaque tumeur un potentiel évolutif propre qu'il est difficile d'appréhender par les systèmes de classification existants.

Ce manque de précision diagnostique est une des raisons majeures de l'échec des thérapeutiques actuelles. Ainsi, la mise en place d'une tumorothèque permettrait de se repositionner par rapport aux orientations actuelles de la recherche :

1. en améliorant la précision du diagnostic par la caractérisation détaillée des altérations moléculaires présentes dans le cancer ;
2. en améliorant l'adaptation du traitement aux patients par la recherche de marqueurs prédictifs et pronostics de réponse à certains traitements en fonction des caractérisations génotypiques de l'individu.

Chez l'Homme, le nombre de gènes est estimé à 30000. Pour comprendre les mécanismes régulateurs de la transcription de certains gènes, il est indispensable d'analyser simultanément plusieurs cibles dans le génome. Dans le paragraphe suivant, nous allons illustrer cette nécessité par l'étude de la protéine P53.

II.1. Nécessité d'analyser en même temps plusieurs cibles dans le génome : exemple de la protéine P53

L'étude du gène ou de la protéine P53 permet d'obtenir des renseignements complémentaires sur le pronostic et la sensibilité au traitement de certaines tumeurs. La protéine P53 est une phosphoprotéine nucléaire de 53 kD qui est capable de lier l'ADN et d'agir sur la transcription de certains gènes. Le gène de la protéine P53 est situé sur le bras court du chromosome 17 et comporte 11 exons. Les mutations les plus fréquentes se produisent sur les exons 5 et 8. Parmi ces nombreuses propriétés, cette protéine a le pouvoir de bloquer la cellule en phase G1 pour qu'elle puisse réparer les éventuelles lésions de son ADN avant la réplication. Si les lésions de l'ADN sont irréparables, elle peut également diriger la cellule vers la mort par apoptose. La protéine P53 est un facteur de transcription qui agit directement ou non sur l'expression de nombreux gènes (figure 6). De plus, elle interagit avec de nombreuses protéines cellulaires ou virales. Lorsqu'il se produit des mutations ou des délétions sur le gène p53, la protéine est soit absente soit anormale, ses deux fonctions n'étant alors plus effectives.

L'inactivation de la protéine P53 est impliquée dans l'apparition des tumeurs et dans la résistance de ces tumeurs aux traitements. Mieux cerner les mécanismes liés à l'apoptose et les phénomènes de résistance à certains agents anticancéreux est d'une importance majeure pour comprendre la progression des tumeurs et définir de nouveaux modèles pour la thérapie antitumorale.

Or l'étude de P53 avec les techniques actuelles de biologie moléculaire est limitée par l'analyse d'un trop petit nombre de cibles. La complexité des effets de P53 nécessite l'utilisation de techniques comme celle des puces à ADN permettant d'analyser simultanément une multitude de cibles et donc de comprendre beaucoup plus rapidement les implications de cette protéine dans les mécanismes d'apoptose et de résistance à certains agents anticancéreux.

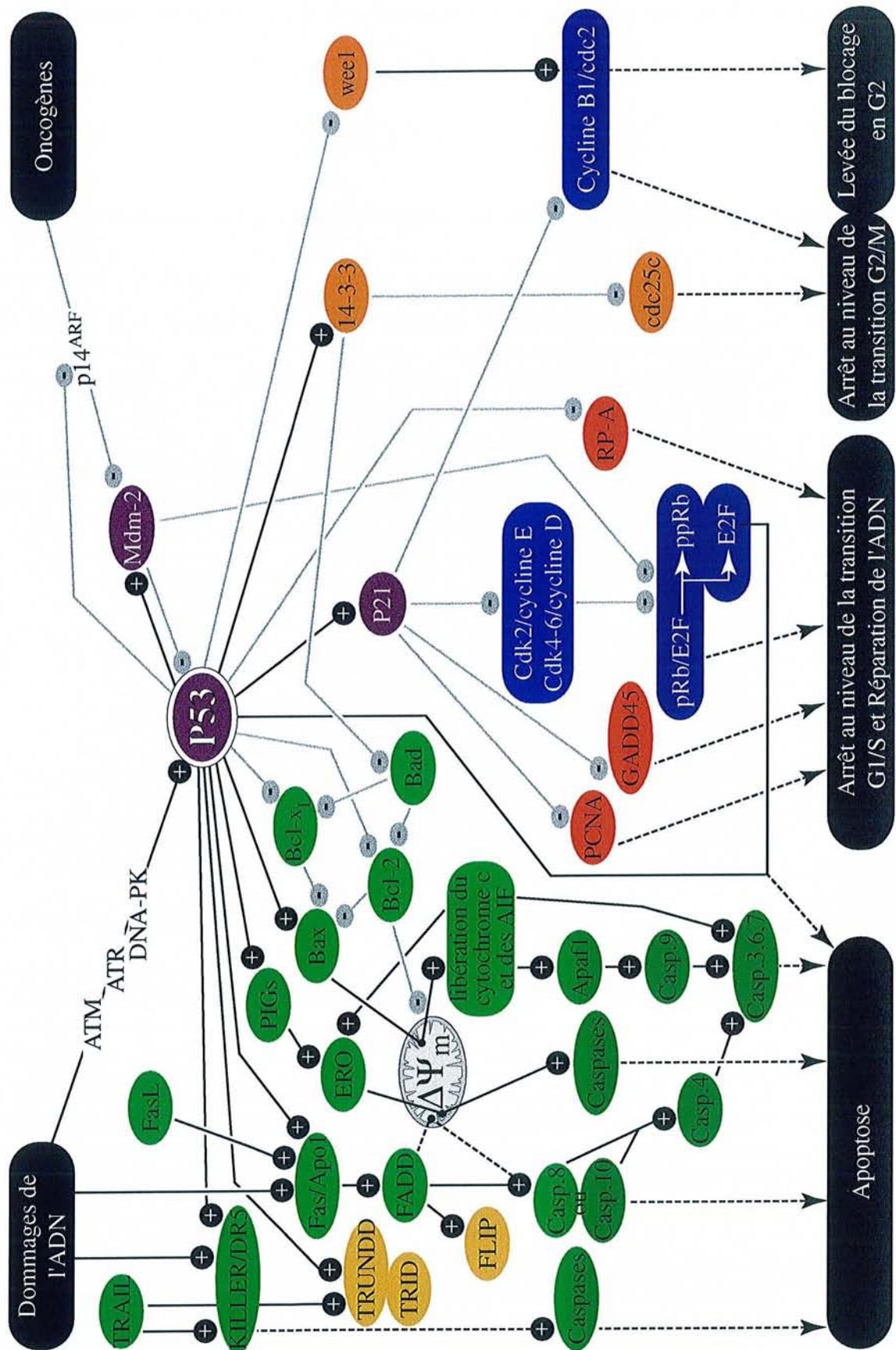


Figure 6 : Voies d'induction contrôlées par P 53 [66].

II.2. Nécessité d'étudier le protéome

La seule connaissance de la séquence d'ADN du génome ou de la transcription de ces gènes en ARNm ne permet pas de rendre compte de la complexité du fonctionnement cellulaire et de ses dérèglements pathologiques. Les gènes ont pour fonction essentielle de fournir via les ARNm les informations nécessaires à la synthèse des protéines qui assurent la quasi-totalité des réactions métaboliques de synthèse, d'organisation et de dégradation des constituants cellulaires en situation physiologique ou pathologique.

Etapes modifiant la structure native des acides nucléiques

Les entités biologiques relatives au génome sont soumises à la dynamique fonctionnelle dans laquelle elles sont impliquées si bien qu'en fonction de ce qu'on analyse (gène, transcrit, protéine, activité enzymatique) on peut obtenir des résultats discordants. Différentes étapes viennent modifier l'ARN messager dès l'initiation de sa synthèse et la structure de la protéine néosynthétisée avant sa configuration définitive :

- . l'elongation de la chaîne naissante (ajout de la coiffe et de la queue poly-A),
- . la maturation du pré-messager et épissage alternatif (élimination des introns),
- . le transport dans le cytoplasme,
- . l'initiation conditionnelle et entretien de la traduction,
- . la dégradation de l'ARNm,
- . les interactions protéine-protéine : ligand-récepteur, enzyme-substrat,
- . les modifications post-traductionnelles,
- . le transport intracellulaire,
- . l'activation par protéolyse partielle,
- . la formation d'homo ou d'hétéro-oligomères,
- . et la dégradation sélective.

L'étude du protéome permettra :

- de vérifier et d'ajuster les analyses du génome

A titre d'exemple de discordance observée entre l'analyse du génome et du protéome, nous pouvons citer le cas du gène et de la protéine 14-3-3 σ . *Ferguson et al.* ont décrit une hyperméthylation du gène de la protéine 14-3-3 σ qui entraîne une absence de détection de l'ARNm correspondant dans les cellules de cancer du sein [67]. En revanche, *Hondermarck et al.* ont trouvé par analyse protéomique de la protéine 14-3-3 σ que même si elle était moins abondante dans ces cellules, elle était tout de même présente [68]. Cet exemple montre bien le haut niveau de précision atteint par l'analyse protéomique et, sa complémentarité avec l'approche génomique.

- de détecter des protéines anormales et des mutations silencieuses

Des protéines anormales peuvent ne pas être détectées par mutation génique si des modifications surviennent après la transcription. On peut aussi disposer d'échantillons portant des mutations géniques qui ne se traduisent pas obligatoirement par une altération protéique si ces mutations ont lieu sur un codon non-sens ou si elles entraînent un décalage du cadre de lecture qui alors peut coïncider avec un autre cadre de lecture codant pour une autre protéine.

Ainsi, l'installation d'une tumorothèque nécessite la mise en place de nouvelles plates-formes technologiques pour l'analyse du génome, du transcriptome et du protéome, techniques que nous développons dans le paragraphe suivant.

III. Techniques d'avenir

III.1. Les puces à ADN

III.1.1. Leur fonctionnement

La méthode dite «des puces à ADN» repose sur l'hybridation d'un ensemble de gènes cibles liés à un support avec une sonde préparée à partir d'un ARN d'intérêt (figure 7).

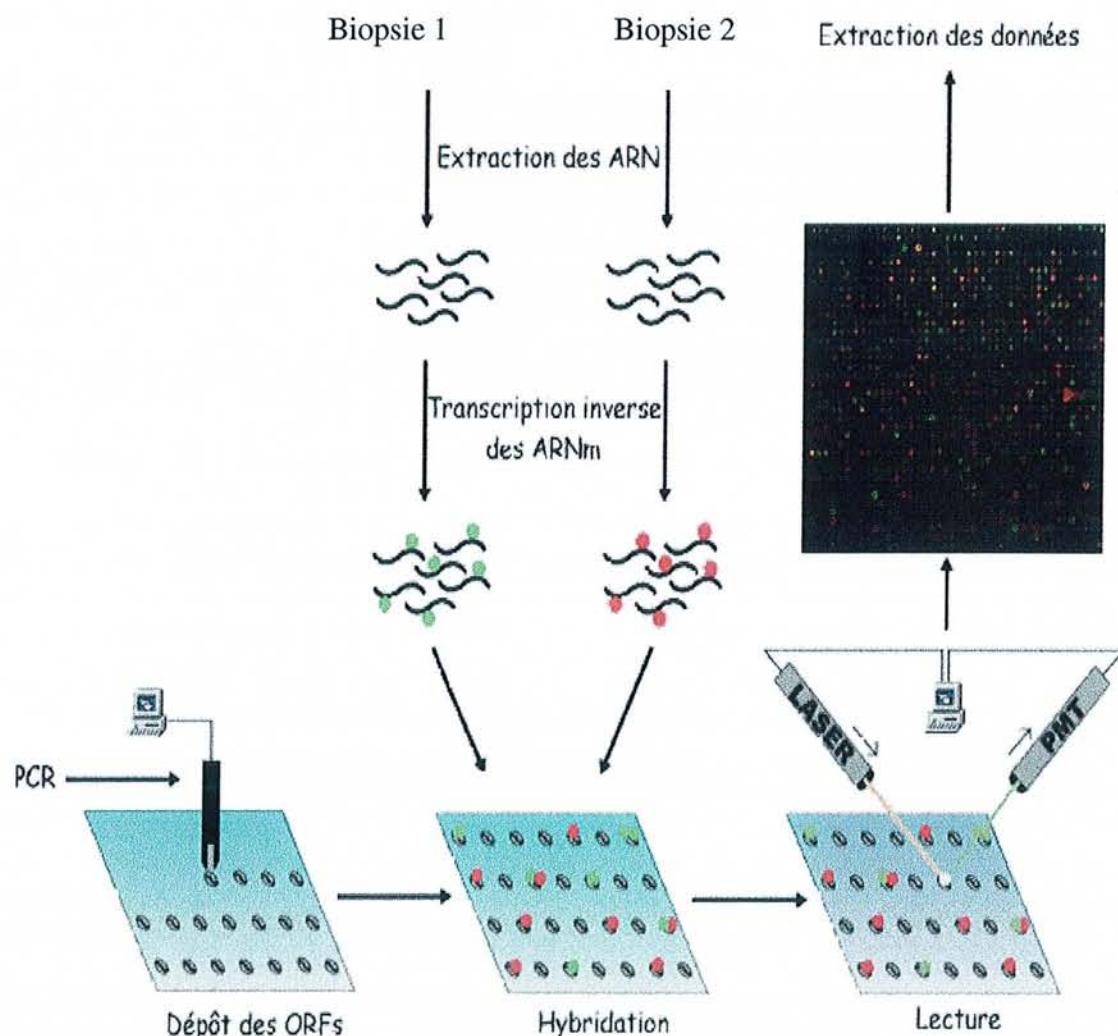


Figure 7: Fonctionnement des puces à ADN (schéma adapté d'après [b]).

- Fabrication de la sonde

La sonde est produite par transcription inverse des ARNm extraits d'un échantillon cellulaire ou tissulaire. Les ADN complémentaires (ADNc) ainsi obtenus sont marqués avec un fluorochrome vert pour le premier échantillon et avec un fluorochrome rouge pour le second, un des deux échantillons étant considéré comme témoin.

- Fabrication de la puce

La puce est une lame de microscope qui a été préalablement recouverte de polylysine dont le rôle est d'assurer la fixation au support de l'ADN déposé via des interactions électrostatiques. Les ADN déposés correspondent uniquement aux séquences codantes de l'ADN appelées les «open reading frame» (ORF), qui sont amplifiés par la technique PCR. La préparation de la lame est achevée en bloquant la polylysine n'ayant pas encore accroché d'ADN de façon à éviter que la sonde ne puisse s'y fixer. Préalablement, on dénature l'ADN sous la forme simple brin sur la puce avant l'hybridation ce qui lui permet de se lier au brin d'ADN complémentaire contenu dans la sonde.

- Hybridation

Les ADN marqués en vert et en rouge sont mélangés et placés sur la puce qui sera alors incubée une nuit à 60°C, température nécessaire à l'appariement entre les deux brins d'ADN complémentaires.

- Lecture

Chaque puits est excité par un laser et on récupère la fluorescence émise *via* un photomultiplicateur (PMT). On obtient alors deux images dont le niveau de gris représente l'intensité de la fluorescence. Si on remplace les niveaux de gris par des niveaux de vert pour la première image et des niveaux de rouge pour la seconde, on obtient en les superposant une image en fausses couleurs composée de spots allant du vert (seulement de l'ADNc de la

première condition fixé) au rouge (seulement de l'ADNc de la deuxième condition fixé) en passant par le jaune (ADN des 2 conditions fixé en quantité égale = fluorescence superposée).

- Analyse des données

- *Estimation du niveau d'expression des gènes des différents échantillons*

A partir des deux images de la puce, il faut calculer le nombre de molécules d'ADN présentes au départ dans l'échantillon. Pour cela, on mesure la quantité de signal dans la longueur d'onde d'émission du fluorochrome vert et la quantité de signal dans la longueur d'onde d'émission du fluorochrome rouge. On normalise ces données en fonction de différents paramètres : quantité d'échantillon présente au départ dans chaque condition, puissance d'émission de chaque fluorochrome. On suppose que la quantité d'ADN fluorescent fixé est proportionnelle à la quantité d'ARNm correspondant dans la cellule de départ et on calcule le *ratio* fluorescence rouge/ fluorescence vert. Si ce *ratio* est supérieur à un, le gène est plus exprimé dans le second échantillon, à *contrario* s'il est inférieur à un, le gène est moins exprimé dans la seconde condition.

- *Comparaison des niveaux d'expression des gènes des différents échantillons*

On peut ensuite comparer le niveau d'expression de gènes de plusieurs échantillons. Un regroupement peut se faire de proche en proche comme pour une phylogénie (technique de pairwise), ce qui consiste à calculer un critère de similitude entre les réponses et à rassembler les profils les plus similaires. La figure 8 illustre cette analyse. Chaque colonne représente un échantillon et chaque ligne représente un gène. Les résultats transformés en échelle logarithmique sont exprimés en niveau relatif d'expression et sont représentés par une échelle de couleur allant du rouge (rapport de 100) pour les gènes surexprimés au vert (rapport de 1/100) pour les gènes sous-exprimés. Les carrés gris (difficilement visibles sur la figure 8)

indiquent les données manquantes. Un *clustering* hiérachique a été appliqué aux échantillons et aux gènes sur la base des niveaux d'expression génique : les échantillons les plus similaires sont regroupés sur l'axe horizontal, de même que les gènes sur l'axe vertical. La longueur des branches du dendrogramme reliant les éléments reflète leur degré de similarité. Le *clustering* sépare nettement les lignées des tumeurs. En effet, au moins deux groupes de gènes sont à l'origine de cette séparation. Le premier surexprimé dans les tumeurs correspond au groupe de gènes impliqués dans les fonctions leucocytaires témoignant de la présence des leucocytes dans l'infiltrat inflammatoire des tumeurs. Le second surexprimé dans les lignées correspond aux gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, traduisant la différence de vitesse de prolifération entre des lignées se multipliant rapidement en culture et des cellules tumorales se divisant lentement dans les tissus.

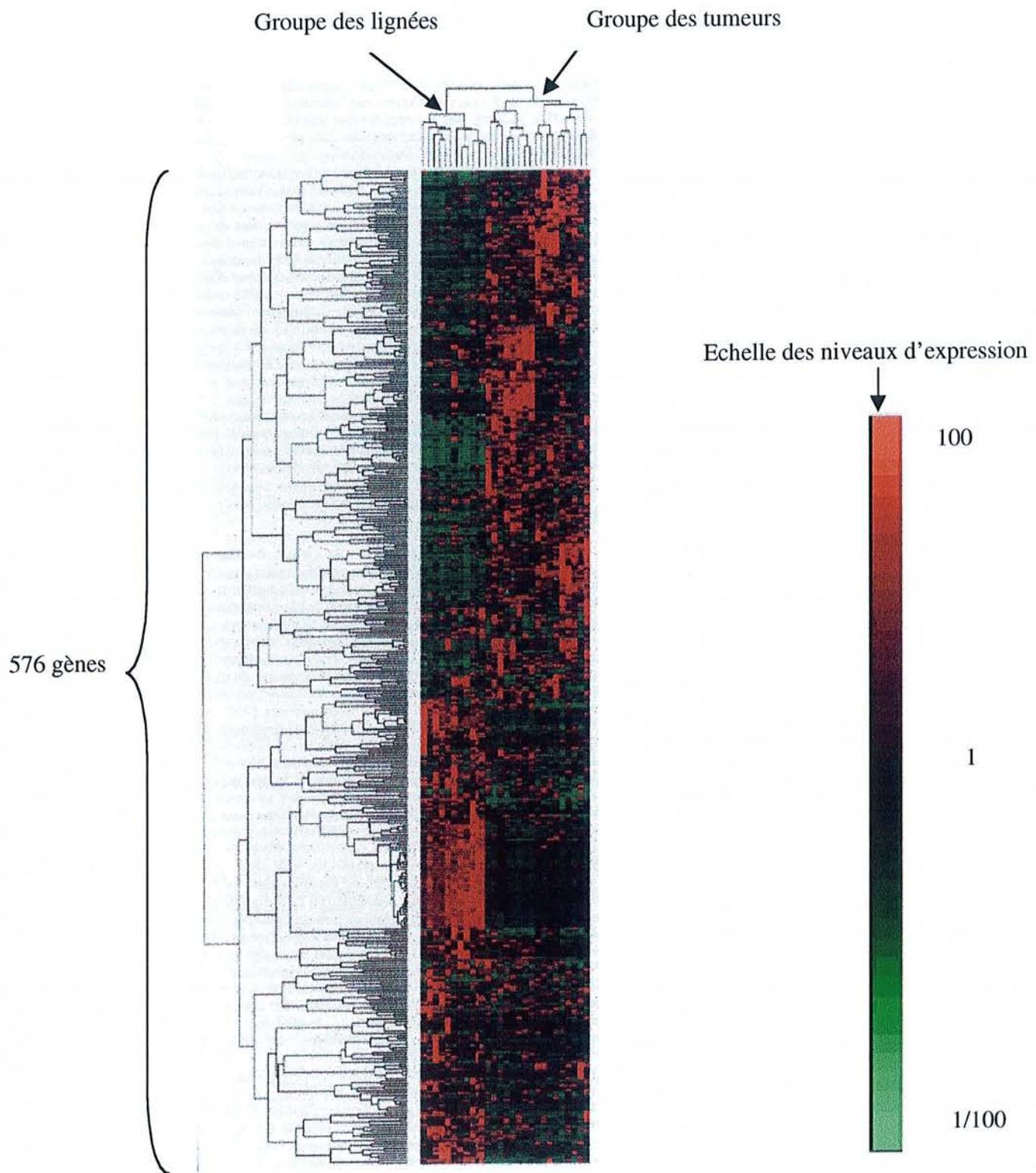


Figure 8 : Représentation schématique des niveaux d'expression de 576 gènes dans 11 lignées cellulaires cancéreuses mammaires et 15 échantillons de cancer du sein (schéma adapté d'après Bertucci et al [69]).

III.1.2. Leurs applications

- Etudes du génome

Les puces permettent :

- la détection de mutation par séquençage,
- la caractérisation des sites de polymorphisme touchant un seul nucléotide : Single Nucleotide Polymorphism (SNP),
- la détection de la présence d'organismes particuliers : micro-organismes pathogènes par exemple,
- et, la caractérisation des remaniements chromosomiques complexes associés aux cancers.

-Etudes du transcriptome

Les puces permettent :

- de mesurer simultanément le niveau d'expression de plusieurs milliers de gènes dans un échantillon. La limite majeure est que cela ne renseigne pas sur les raisons de cette modulation.
- de caractériser des voies de régulation. En mesurant les niveaux de transcription génique dans un organisme dans différentes conditions à différents stades du développement et dans différents tissus, on peut construire un profil d'expression génique qui caractérise la dynamique de chaque gène dans le génome. Ceci permet d'avoir une vision plus claire de l'activité cellulaire dans différentes conditions et de déceler des cibles potentielles d'intervention thérapeutique.

- de développer de nouveaux principes actifs par :

- validation d'un mécanisme d'action : l'action du principe actif est limitée à la seule cible initialement caractérisée en montrant que la signature transcriptionnelle du principe actif est identique à celle d'un mutant d'inactivation de la cible théorique.
- prédiction de certains effets indésirables des principes actifs par l'analyse du profil d'expression des cellules traitées.
- réintroduction sur le marché de certaines molécules dont le développement avait été abandonné à cause de la toxicité d'origine génétique de certaines molécules en ciblant leur utilisation chez des patients non à risque.

III.1.3. Caractéristiques des puces à ADN

Il existe différentes catégories de puces à ADN qui se différencient par le type de support, la densité et la nature des cibles, les systèmes de marquage et de détection du niveau d'expression des gènes (tableau I). Les « oligochips » présentent l'inconvénient de ne permettre la réalisation de profils d'expression de gènes seulement à partir d'entités déjà séquencées, puisqu'ils sont synthétisés *in situ* sur la lame de verre par des procédés photochimiques. La méthode des « microarray nylon » est la plus sensible puisqu'elle nécessite une quantité d'ARN messager de quelques centaines de nanogramme ce qui représente une avancée importante pour l'emploi de cette approche en pratique clinique.

Tableau I : Principales caractéristiques des différentes puces à ADN [69]

Caractéristiques	Microarray nylon	Microarray nylon	Microarray verre	Puce à oligonucléotides = oligochips
Cibles	Clones ADNc (PCR)	Clones ADNc (PCR)	Clones ADNc (PCR)	Oligonucléotides synthétisés <i>in situ</i>
Densité	1000 / cm ²	1000 / cm ²	1000 / cm ²	100000 / cm ²
Quantité d'ARNm	nanogrammes	microgrammes	microgrammes	microgrammes
Marquage	radioactivité	colorimétrie	fluorescence	fluorescence
Echantillons simultanés	unique	multiple	multiple	unique
Acquisition d'images	radio-imageur	scanner d'ordinateur	scanner laser confocal	scanner laser confocal
Réutilisation	multiple	unique	unique	unique
Coût	faible	faible	moyen	élevé

III.1.4. Limites de l'utilisation des puces à ADN

L'application des puces à ADN à l'étude du cancer permettra en premier lieu de dresser une véritable « **carte d'identité moléculaire** » des tumeurs en caractérisant de façon plus approfondie les gènes déjà impliqués dans la maladie, les gènes potentiellement impliqués dans l'évolution de la maladie et ceux impliqués dans la réponse thérapeutique.

De plus, elle permettra d'améliorer la **classification des tumeurs** en révélant de nouvelles classes diagnostiques ou pronostiques dans des groupes de tumeurs apparemment similaires.

Cependant malgré une stratégie moléculaire très pertinente pour l'étude du transcriptome, cette technique présente des limites dans les informations requises :

- Il est difficile d'extrapoler à partir des niveaux d'expression des ARNm : les protéines sont-elles synthétisées et sont-elles réellement fonctionnelles ?
- Cette technique ne permet pas de connaître les mécanismes de régulation de la transcription, de la traduction et de l'activité enzymatique des molécules étudiées.
- Les résultats ne sont pas fiables à 100 % : il existe sur chaque puce une certaine proportion d'ORF fixés présentant des altérations.
- Cette technique s'applique pour des tissus homogènes or souvent les échantillons étudiés sont hétérogènes.

III.2. L'analyse protéomique

L'analyse protéomique regroupe les recherches (détection, séparation, identification, analyse) permettant d'étudier les protéines, de déterminer leurs activités, leurs fonctions et d'analyser leurs interactions et leur modification au cours du temps.

Elle peut se décomposer en quatre étapes :

1. Séparation des protéines contenues dans un extrait cellulaire ou tissulaire grâce à l'électrophorèse bidimensionnelle

- si la quantité de protéine est d'au moins 20 picomoles, on utilise l'électrophorèse bidimensionnelle classique sur gel.

Elle permet de séparer des protéines contenues dans des extraits cellulaires et d'étudier l'abondance et les modifications post-traductionnelles de plusieurs centaines de protéines en parallèle. C'est actuellement la technique la plus résolutive de séparation de mélanges complexes de protéines. Ces mélanges sont séparés en première dimension suivant leur charge sur un gradient de pH (créé par des ampholines à l'intérieur d'un gel). Sous l'effet d'un gradient électrique, les protéines migrent le long de ce gradient de pH. Quand les

protéines individuelles atteignent les endroits du gel où le pH est égal à leur point isoélectrique, elles s'immobilisent. Le gel sur lequel les protéines se sont focalisées est ensuite transféré sur un gel en plaque et soumis à l'électrophorèse en dodécylsulfate de sodium (SDS). En deuxième dimension, les protéines sont séparées suivant leur masse moléculaire et colorées avec du bleu de Coomassie ou du nitrate d'argent. Après coloration, l'image du gel est acquise à l'aide d'un logiciel de traitement d'image. Ainsi, il est possible de comparer les gels entre eux, de cartographier les protéines, de les quantifier, de calculer leur masse moléculaire et leur point isoélectrique et de procéder à des analyses statistiques diverses.

- si la quantité de protéine est de l'ordre de 1 à 5 picomoles, on peut identifier les protéines par la mesure des masses des peptides trypsiques [70].

La protéine repérée sur un gel d'électrophorèse bidimensionnelle après coloration à l'argent est digérée par la trypsine à l'intérieur même du gel de polyacrylamide. La mesure des masses des peptides trypsiques obtenus permet d'établir la carte peptidique massique de la protéine. Cette carte peptidique constitue une véritable empreinte digitale de la protéine qu'il faut ensuite comparer aux masses théoriques déduites des séquences de chaque protéine présente dans les banques de données. Ces séquences sont obtenues après digestion fictive de ces protéines par la trypsine. Lorsque la protéine n'est pas présente dans ces banques, il est possible d'obtenir des informations sur la séquence en acides aminés des peptides trypsiques en étudiant les masses des produits de fragmentation de ces peptides à l'aide d'un spectromètre de masse de type « nano-electrospray ».

L'étude de la carte peptidique massique d'une protéine permet d'identifier et de localiser d'éventuelles modifications post-traductionnelles (phosphorylation, glycosylation, etc). Ces modifications se traduisent par des peptides présentant des incrément de masse (par exemple 80 Da pour une phosphorylation) par rapport aux masses théoriques attendues d'après la séquence en acides aminés de la protéine. De même, une mutation pourra être détectée par une anomalie dans la carte peptidique massique d'une protéine.

L'électrophorèse bidimensionnelle sur gel, en raison de sa difficulté de mise en œuvre et de sa lourdeur a peu de chance d'être un jour utilisée en routine. En revanche, les **puces à protéines** en développement semblent promises à un grand avenir et devraient permettre idéalement d'identifier en parallèle plusieurs milliers de protéines au sein d'un mélange de façon automatisée et adaptable aux analyses cliniques. Ce système serait basé sur les réactions antigène- anticorps entre les protéines à identifier et les anticorps spécifiques fixés à la surface de la puce.

2. Identification des protéines séparées à l'aide de la spectrométrie de masse

Les protéines sont bombardées par un flux d'électrons et soumises à des champs électriques et /ou magnétiques. Les molécules vont se scinder au niveau des espèces les plus fragiles, libérant des espèces ioniques spécifiques de masse déterminée. Les fragments dissociés sont sélectionnés en fonction du rapport entre leur masse et leur charge électrique. Elle permet d'identifier une protéine et ses modifications en mesurant la masse des peptides issus de la digestion. Les résultats sont stockés dans des bases de données analysables par des programmes spécifiques. Les bases de données de séquences permettent de prédire la masse théorique des fragments de protéolyse d'une protéine. Ainsi, lorsqu'une base de données complète d'un organisme est disponible, il est possible d'identifier une protéine d'après le spectre de masse de ses fragments de protéolyse.

3. Utilisation de la bioinformatique pour la constitution de banques de données

Le très grand nombre d'informations recueillies lors de l'utilisation des puces à ADN et de l'analyse du protéome doivent être stockées, regroupées et analysées dans des bases de données standardisées afin de permettre la comparaison de données de profils d'expression provenant de différents laboratoires et/ou de différentes technologies. Ces bases de données constituent la bioinformatique qui correspond à l'ensemble des concepts et des techniques nécessaires à l'interprétation de l'information génétique (séquences) et structurale (repliement

3-D). C'est le décryptage de la " bio-information ". Son but est d'effectuer la synthèse des données disponibles (à l'aide de modèles et de théories), d'énoncer des hypothèses généralisatrices (ex : comment les protéines se replient), et de formuler des prédictions (ex. : localiser ou prédire la fonction d'un gène).

4. Analyse de l'interactome

- analyse de l'interactome par le système du double-hybride

L'analyse de l'interactome consiste à établir des cartes d'interactions protéiques de manière à reconstituer des voies métaboliques. De telles cartes permettent de connaître le rôle d'une protéine totalement inconnue à la condition qu'elle interagisse avec une autre dont on connaît la fonction. L'analyse bioinformatique de séquences homologues d'acides aminés chez certaines protéines permet d'établir une liste des interactions susceptibles de se produire.

Les interactions protéine - protéine sont à la base des mécanismes cellulaires fondamentaux comme la transcription de l'ADN en ARN, la traduction des ARN en protéines, la transmission des signaux... Ces interactions peuvent être étudiées à l'aide d'une stratégie dite du double-hybride (figure 9).

Principe : Elle consiste à faire co-exprimer dans une cellule de levure deux protéines hybrides et un gène rapporteur dont l'expression dépend de l'interaction entre ces deux protéines (Gal 4-X et Gal 4-Y). Si celles-ci interagissent, l'activateur de la transcription par l'intermédiaire de l'ARN polymérase II est reconstitué et permet l'expression du gène rapporteur (ex gène lac Z) en une protéine dont l'activité est facilement détectable.

La méthode est basée sur les propriétés de la protéine Gal 4 (présente chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*) dont le domaine de liaison à l'ADN est séparé du domaine responsable de l'activation de la transcription. Cette méthode consiste à introduire chez la levure des plasmides codant pour deux protéines hybrides. La première protéine représente le domaine de Gal 4 lié à l'ADN au niveau des régions «Upstream Activating Sequence Gal» (UASG) contrôlant l'activité du gène rapporteur (lac Z) et fusionné à la protéine X (l'appât). La seconde correspond au domaine de Gal 4 activateur de la transcription, fusionné à la

protéine Y (la proie). L'interaction entre les deux protéines X et Y conduit à la reconstitution d'une protéine Gal 4 fonctionnelle et donc à l'activation de la transcription par l'ARN polymérase II du gène rapporteur contenant un site de liaison à Gal 4. Le gène rapporteur le plus utilisé est le gène lac Z, qui code pour une enzyme, la β -galactosidase. L'expression de lac Z peut-être mesurée par un spectrophotomètre après réaction colorimétrique basée sur l'activité de la β -galactosidase.

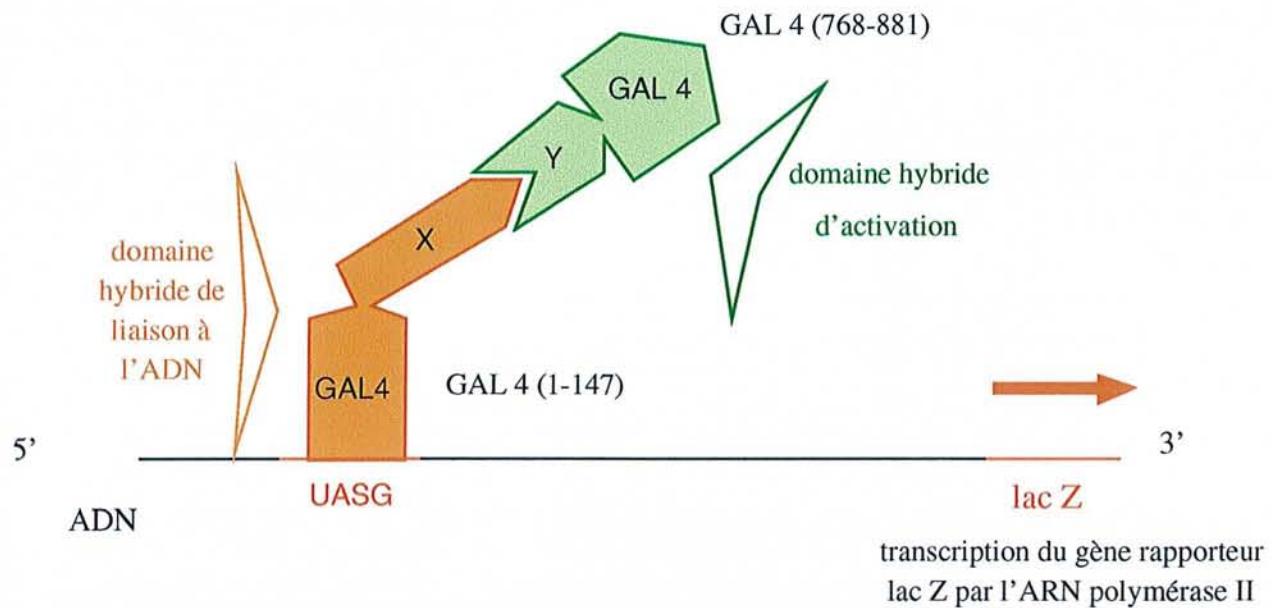


Figure 9 : Représentation schématique du système du double-hybride.

Cette méthode a de nombreuses applications. Elle permet de mettre en évidence les interactions protéine– protéine même de faible affinité, les mutations qui affectent les liaisons (protéine -protéine) et d'identifier de nouveaux partenaires de liaison ainsi que le domaine de la protéine impliqué dans la liaison. En revanche, elle a pour inconvénient de donner de nombreux faux positifs [71,72]. De plus, elle est difficilement réalisable en ce qui concerne les protéines membranaires.

Deux nouvelles techniques dérivent du système double hybride. Il s'agit d'une part, de la technique de la «réverse double hybride» qui permet de détecter les dissociations protéine-protéine et les interactions ADN-protéine et d'autre part, de la méthode triple hybride.

- analyse de l'interactome par le système du triple hybride

Dans cette méthode triple hybride (figure 10), l'interaction entre l'appât et la proie est contrôlée et dépend de l'expression d'une troisième protéine, appelée protéine de liaison (Z).

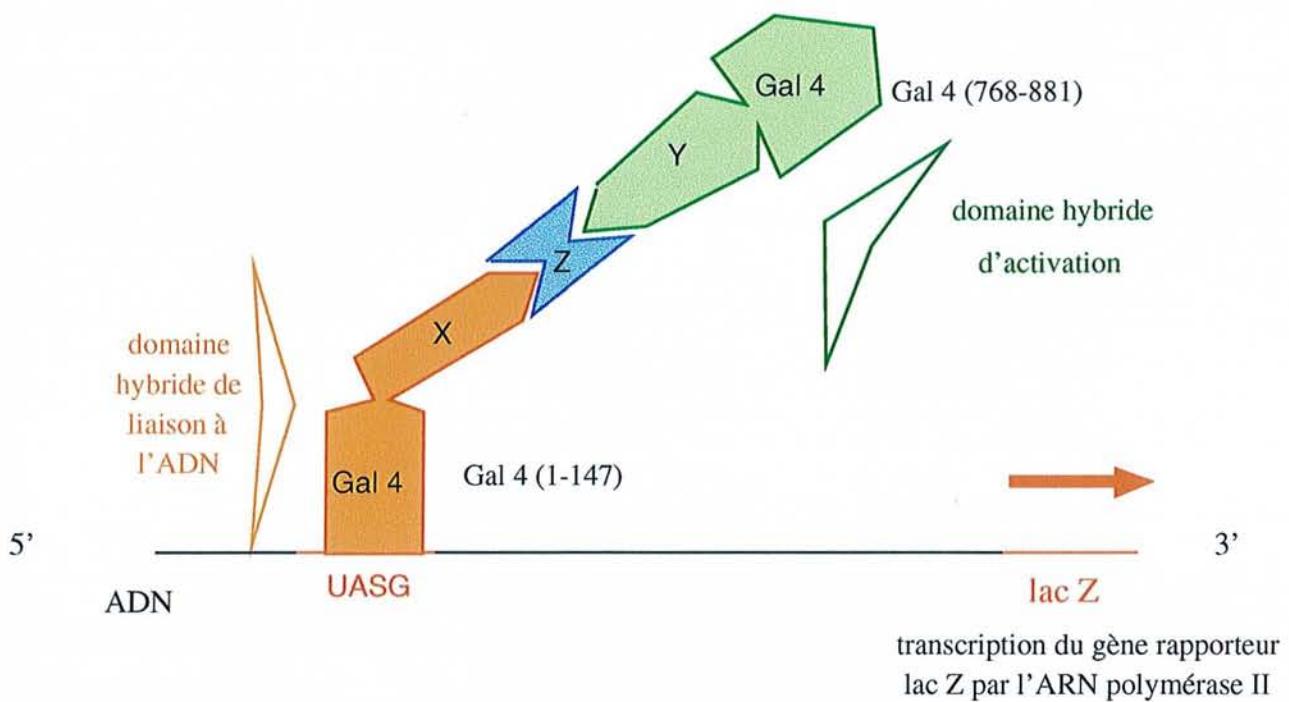


Figure 10 : Représentation schématique du système du triple -hybride.

Cette approche a permis la détection et l'analyse de très nombreuses interactions protéine - protéine mais, n'est pas adaptée à l'étude des protéines régulatrices de la transcription capables d'activer seules la transcription du gène rapporteur par l'ARN polymérase II. Or, ces protéines régulatrices sont au cœur des mécanismes permettant la différenciation cellulaire et l'oncogénèse.

C'est pourquoi *Sentenac et coll.* ont mis au point une nouvelle technique : le double-hybride pol III [73].

- analyse de l'interactome par la technique du double - hybride pol III

Principe : Cette technique utilise un gène rapporteur différent, le gène SNR6, qui est normalement transcrit en un petit ARN U6 indispensable à la survie cellulaire.

La transcription du gène SNR6 par l'ARN polymérase III dépend de la fixation de plusieurs protéines dont la protéine TFIIIC qui en se fixant sur les régions de contrôle du gène SNR6 permet le recrutement de la protéine TFIIIB qui positionne l'ARN polymérase III pour la transcription du gène SNR6.

Le système comprend une construction dans laquelle une des régions de contrôle du gène a été remplacée par une séquence d'ADN (UASG) reconnue par une autre protéine que TFIIIC, le polypeptide Gal 4.

Dans une première approche (figure 11), deux protéines hybrides sont requises, la première formée de la sous-unité de la protéine TFIIIC et de la protéine Y, et la seconde constituée du polypeptide Gal 4 lié à l'ADN et de la protéine X. La fixation de TFIIIC sur les régions UASG via les protéines X, Y et Gal 4 permet au complexe ainsi formé de se positionner correctement au niveau du gène SNR6 et de recruter l'ARN polymérase III pour la transcription via la protéine TFIIIB.

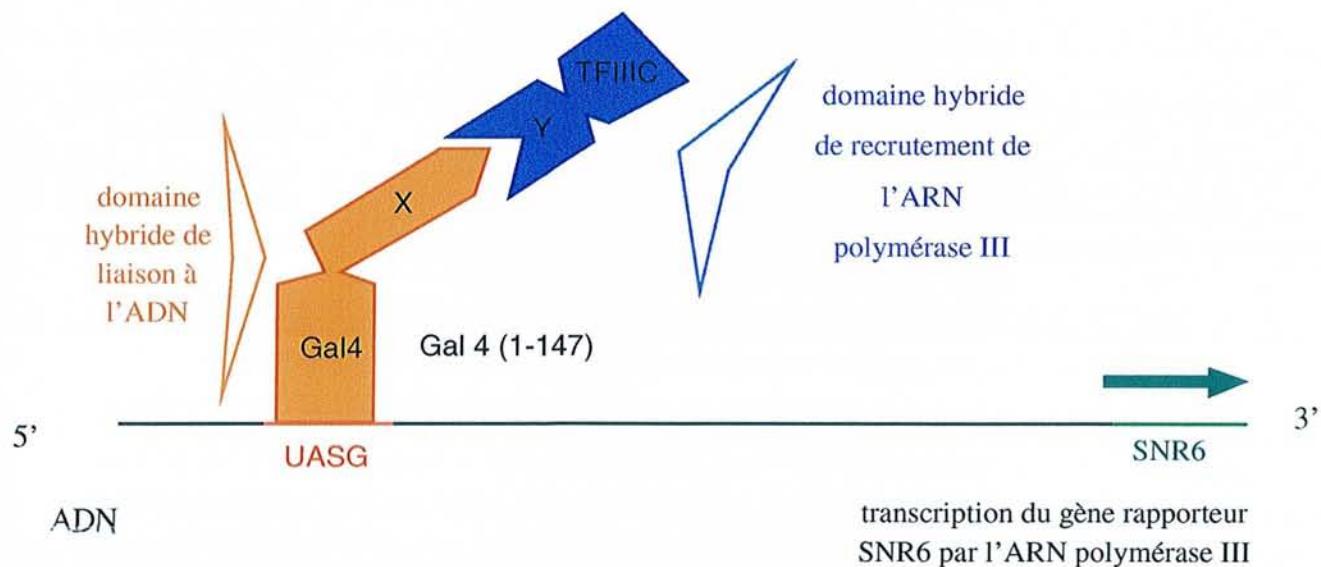


Figure 11 : Représentation schématique du système du double hybride pol III par la première approche.

Une deuxième approche (figure 12) permet de faire appel aux banques d'hybrides de type Y-Gal 4 (domaine activateur) développées pour le double hybride polymérase II. Pour cela, la protéine Gal 80 qui interagit avec le domaine activateur de la transcription de Gal 4 est utilisée. La protéine de fusion [Gal 80-TFIIC] peut réagir avec les molécules hybrides de type Y-Gal 4 (domaine activateur). Dès lors, le complexe {Y-Gal 4 (domaine activateur) / Gal 80-TFIIC} peut s'il interagit avec la protéine hybride [X-Gal 4 liée à l'ADN] activer la transcription du gène SNR6 par l'ARN polymérase III.

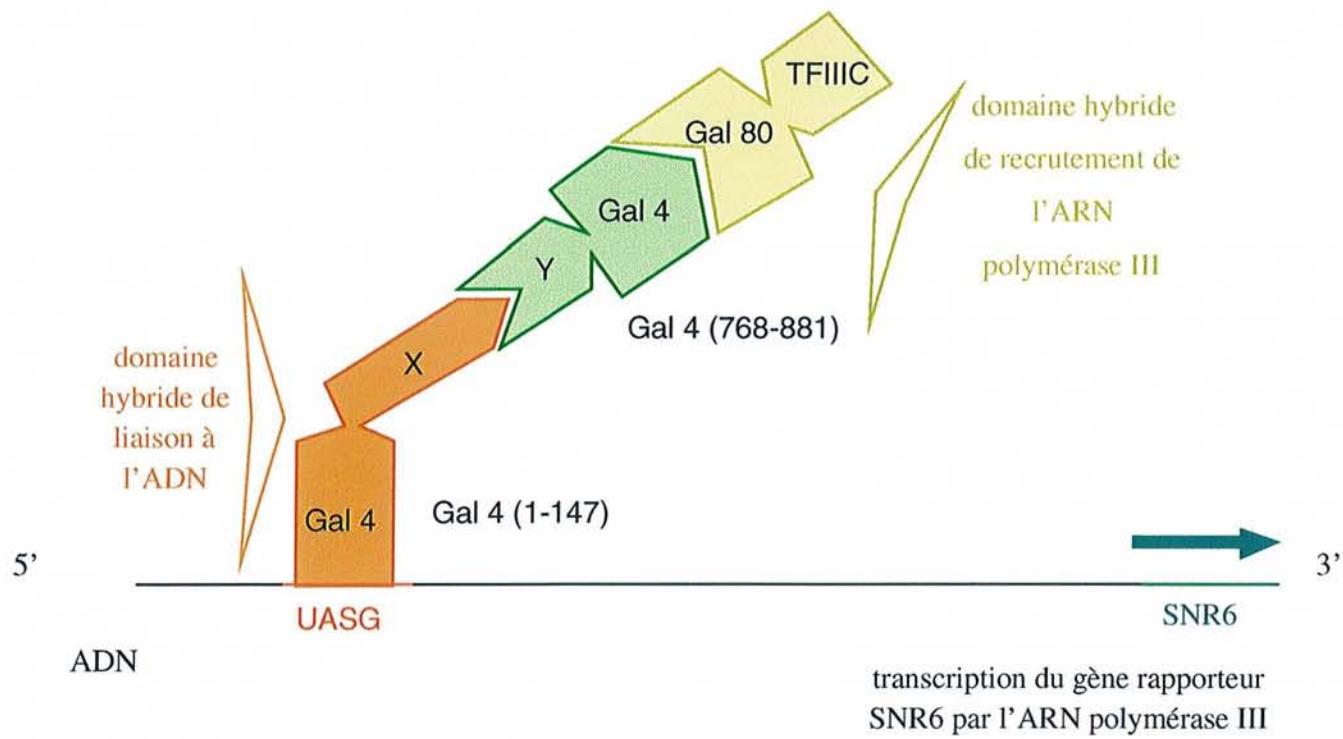


Figure 12 : Représentation schématique du système du double hybride pol III par la seconde approche.

III.3. L'analyse du métabolome

Le métabolome correspond à l'étude de l'ensemble des petites molécules (sucres, sels, acides aminés, nucléotides) et de tous leurs intermédiaires dans un état physiologique ou comportemental particulier.

L'étude du métabolome présente deux avantages :

- Les métabolites sont des entités biologiques dont le taux varie selon le contexte physiologique.
- Le nombre de métabolites à étudier est nettement inférieur au nombre de gènes ou de leurs produits. En effet, une cellule eucaryote contient en moyenne 10^5 gènes et 10^4 protéines mais seulement 10^3 métabolites connus. L'analyse des métabolites est donc beaucoup moins vaste que celle des gènes ou de leurs produits.

Le rôle de la moitié des gènes de chaque génome est encore inconnu. Pour découvrir le rôle de ces gènes chez la levure, *Oliver et al.* [74] se sont intéressés aux mutants de *Saccharomyces cerevisiae*.

Le principe de cette étude est basé sur le fait que le taux de croissance d'une espèce mutante de levure n'est pas modifié par rapport à une espèce sauvage en raison du changement de concentration en métabolites intracellulaires qui compense l'effet de cette mutation. Des phénotypes silencieux peuvent ainsi être déterminés grâce à ces changements de concentration.

De plus, en quantifiant les changements de concentration des métabolites provoqués par des mutations survenant sur des gènes «silencieux» (qui n'entraînent pas de changement manifeste du phénotype), on pourrait identifier le site d'action des produits de ces gènes. En effet, le profil de réponse d'une espèce délétère d'un gène codant pour une fonction inconnue devrait être similaire à celui d'une espèce délétère d'un gène codant pour une fonction connue et agissant sur la même voie métabolique cellulaire. *Oliver et al.* ont pris «une empreinte» du

méabolome de chaque mutant de *Saccharomyces cerevisiae* et ont identifié et mesuré grâce à des techniques sensibles approximativement 600 métabolites présents dans une cellule de levure.

En regroupant les mutants qui ont des profils semblables de méabolome, cette méthode permet de relier des gènes inconnus aux activités métaboliques de la cellule. La capacité à localiser l'emplacement de lésions métaboliques spécifiques présente un intérêt scientifique notable en permettant de détecter des cibles potentielles pour le traitement de certaines pathologies.

Comme nous l'avons décrit précédemment, les analyses du génome, du transcriptome, du protéome et du méabolome indispensables à l'élaboration de nouvelles stratégies diagnostiques et thérapeutiques nécessitent du matériel tumoral de qualité. Ce dernier sera obtenu uniquement si le prélèvement est conservé dans des conditions adaptées pour éviter toute dégradation. Lors de la mise en place d'une tumorothèque, l'aspect technique est donc capital mais est indissociable des aspects éthiques et juridiques car une telle structure renferme une « mine d'informations confidentielles ».

B. ASPECTS ETHIQUES, JURIDIQUES ET
TECHNIQUES DE MISE EN PLACE D'UNE
TUMOROTHEQUE

Après nous être intéressé aux éléments justifiant la mise en place des tumorothèques pour améliorer la lutte contre le cancer, nous nous interrogerons dans une seconde partie aux aspects réglementaires à respecter pour la mise en place d'une telle structure.

I. Objectifs

Une biothèque doit permettre de collecter, cataloguer, stocker, déstocker et distribuer les sérum ou autres constituants biologiques résultant :

- soit d'un travail de routine, comme celui effectué dans les centres de transfusion sanguine (ex de la biothèque internationale Jean Mérieux à Annemasse), dans les centres de médecine préventive (ex de la biothèque dirigée par le docteur J. Henny à Vandoeuvre-lès-Nancy), dans les laboratoires d'analyse hospitaliers ou non, publics ou privés...
- soit d'un travail de recherche dans une population donnée, dans un but d'investigation biomédicale sur des pathologies bien précises (cancer, maladies cardiovasculaires, maladies infectieuses...) ou dans le cadre d'une surveillance épidémiologique faisant suite à un problème particulier (épidémie, pollution, intoxication...).

Le projet du Centre Alexis Vautrin (CAV) soutenu par le Centre Régional de Lutte Contre le Cancer de Lorraine, est de mettre en place une structure permettant la collection et l'exploitation de prélèvements biologiques à visée d'études diagnostiques et thérapeutiques en cancérologie.

Cette structure desservira le CAV et le service de cytogénétique du CHU de Nancy.

Elle s'appuiera sur l'expérience du centre Alexis Vautrin en matière de recherche de transfert à partir d'expérimentations sur modèles précliniques et de validation multicentrique sur prélèvements biologiques (Laboratoire de Recherche en Oncologie) aboutissant à la

promotion d'études cliniques prospectives mono ou multicentriques (Unité de Recherche Clinique et de Biostatistique).

II. Aspects éthiques et juridiques

II.1 Introduction

Une biothèque, pose sur le plan éthique de multiples interrogations. Elle représente en effet, comme le souligne *H. Kefi* [75], une mine d'informations confidentielles.

Elle abrite d'une part, les données médicales résultant des investigations menées sur des échantillons biologiques et d'autre part, une quantité d'informations encore inconnues contenues dans les spécimens entreposés [76].

Sur le plan légal, les autorisations nécessaires pour les activités de conservation sont bien définies : la loi n° 94-654 du 29 juillet 1994 (relative au don et à l'utilisation des éléments et produits du corps humain, à l'assistance médicale à la procréation et au diagnostic prénatal) stipule dans son article L 672-10, alinéa 1 que « *seuls peuvent assurer la transformation, la conservation, la distribution et la cession des tissus et des cellules, les établissements publics de santé et les organismes à but non lucratif autorisés à cet effet par l'autorité administrative* ».

Le secteur public et le secteur privé à but non lucratif semblent donc bénéficier d'un quasi-monopole concernant la cryopréservation.

Toutefois, l'alinéa 2 du même article précise que les autorisations de transformation, conservation, distribution et cession *peuvent être accordées dans les mêmes formes à d'autres organismes pour les activités requérant une haute technicité* ouvrant ainsi ce champ d'activité au secteur privé, en cas uniquement de défaillance du service public.

Indépendamment des autorisations légales pour la cryoconservation, la constitution d'une biothèque engendre d'autres questions touchant au droit et à l'éthique comme le statut des échantillons biologiques, le consentement du patient qui subit un prélèvement destiné à être

stocké, la propriété des spécimens biologiques et la confidentialité des informations détenues dans la biothèque.

II.2. Statut des échantillons biologiques

-Les produits biologiques humains ne relèvent pas du droit des personnes. En effet, seul le corps humain pris dans son ensemble peut prétendre à une protection sur le plan juridique.

-Les produits biologiques humains ne sont pas des marchandises. L'ensemble des éléments et produits du corps humain est soumis au principe de gratuité du don. L'article 16-6 du code civil dispose ainsi : « *Aucune rémunération ne peut être allouée à celui qui se prête à une expérimentation sur sa personne, au prélèvement d'éléments de son corps ou à la collecte de produits de celui-ci.* »

En revanche, les produits d'origine humaine peuvent faire l'objet d'un don. A cet égard, le Comité Consultatif National d'Ethique (CCNE) précise dans son avis n°9 du 23 février 1987 : « *Les cellules, qui sont un produit du corps humain ne peuvent en cela faire l'objet d'un commerce de la part de la personne dont elles sont issues. Toutefois, cette personne peut en faire don comme de son sang.* »

On déduit des remarques précédentes que les échantillons détenus par une biothèque ne peuvent avoir été acquis que gratuitement et ne peuvent faire l'objet de transactions financières avec les laboratoires préleveurs, ou avec les équipes utilisatrices (hormis les frais engagés pour le stockage).

-Leur statut peut dépendre du mode de collecte.

Les échantillons sanguins conservés dans une sérothèque « donneurs » sont issus du don du sang, volontaire, bénévole et anonyme; ils ont donc eux-mêmes fait l'objet d'un don.

En revanche, les échantillons stockés dans une sérothèque « receveurs » ne peuvent être qualifiés de don en toute connaissance de cause de la part du patient si le malade receveur de produits sanguins n'est pas averti qu'une partie de son sang, prélevé lors d'un bilan pré-ou post transfusionnel sera conservée au sein d'une biothèque .

Il en est de même pour les déchets humains post-opératoires (tumeurs, placenta, etc...) récupérés et parfois conservés en raison de leur intérêt pour la recherche médicale. Le patient a-t-il voulu en faire don à la biothèque qui les reçoit ?

Ce point nous conduit à évoquer la question du consentement.

II.3. Consentements

- Définition

En médecine, le consentement du patient se définit comme l'acte autorisant le médecin à mettre en œuvre un traitement qu'il a au préalable expliqué au patient (traitement de nature thérapeutique ou expérimentale). Il est requis pour tout geste médical, de façon plus ou moins explicite.

Par exemple, le consentement à l'auscultation est généralement tacite, voire présumé. Le consentement à des tests de routine (prise de sang pour la glycémie) peut être implicite ou verbal.

- Consentement à l'intervention

Par contre, le consentement à l'intervention qui incombe au médecin préteur est à formuler par écrit. Il en est de même pour l'expérimentation humaine depuis la loi Huriet (loi n° 88-1138 du 20 décembre 1988).

- Consentement pour la recherche

Dans une biothèque, on distingue 2 catégories de produits de nature différente :

- . des échantillons contenant du matériel génétique (cellules vivantes, fragments de tissus), qui permettent donc de reconstituer le patrimoine génétique d'un individu.
- . des produits dépourvus de matériel génétique, provenant de liquides biologiques comme le sérum, les urines...

La loi Huriet-Sérusclat qui exige le recueil du consentement libre, éclairé, exprès du sujet ne s'applique pas pour tous les prélèvements. Cela dépend du cadre juridique de la procédure [77] :

- pour les prélèvements réalisés dans le cadre de procédures diagnostiques

La conservation des prélèvements congelés faits à partir de biopsies à visée diagnostique ou de pièces opératoires n'entre pas dans le champ d'application de la loi Huriet-Sérusclat dès lors que ces actes n'entraînent pas pour le malade de prélèvements supplémentaires ne modifient pas le traitement et sont prélevés sur des tissus qui s'ils n'avaient pas fait l'objet d'une congélation, auraient été incinérés comme déchets opératoires.

L'article L 145-15 du code de la santé publique définit les conditions dans lesquelles une analyse génétique peut être réalisée. Il impose de recueillir un consentement écrit lorsqu'on analyse à des fins médicales les caractéristiques génétiques d'une personne.

Mais l'analyse génétique d'une tumeur, à la recherche d'anomalies somatiques, ne peut être assimilée à une analyse des caractéristiques génétiques de la personne chez qui s'est développée la tumeur en ce sens qu'il ne s'agit pas d'une identification de la personne.

- pour les prélèvements réalisés dans le cadre de procédures de recherche

Lorsqu'un prélèvement biologique est fait sur une personne dans un but de recherche, que toute la procédure de prélèvement soit uniquement pour la recherche ou que l'on fasse des prélèvements supplémentaires pour la recherche en élargissant une exérèse ou en augmentant le nombre de biopsies au cours d'un acte de soins, la loi Huriet- Sérusclat est applicable.

Mais lorsqu'un projet de recherche implique l'utilisation de fragments congelés obtenus à partir de biopsies à visée diagnostique ou de pièces opératoires :

- . si le projet de recherche implique la caractérisation génétique d'une personne, l'article 145-15 de la loi 94-654 s'applique pour ce projet de recherche. Le consentement libre, éclairé, exprès du malade doit être obtenu par écrit.

. si le projet de recherche n'implique aucune caractérisation génétique ou ne concerne pas la caractérisation génétique de la personne, seul l'article 672-1 du code de la santé publique s'applique c'est-à-dire que le seul consentement à recueillir est le consentement à l'intervention.

Les consentements à recueillir avant toute procédure diagnostique ou de recherche sont résumés dans la figure 13.

PRELEVEMENT DE LA BIOPSIE

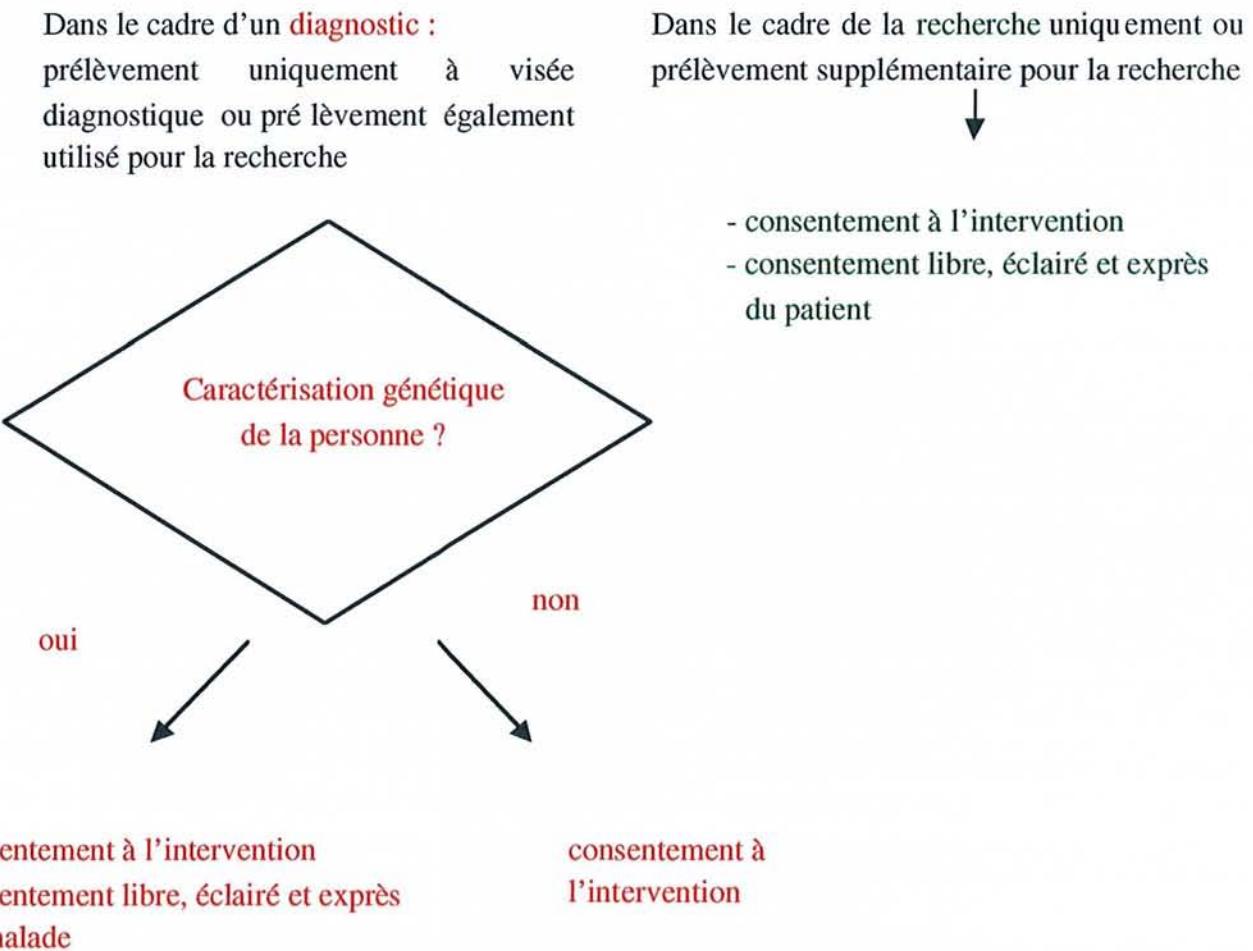


Figure 13 : Représentation schématique de l'arbre décisionnel des consentements à recueillir avant toute procédure diagnostique ou de recherche lors du prélèvement d'une biopsie.

II.4. Propriété des échantillons biologiques

La richesse des informations contenues dans un produit biologique humain en fait un objet spécifique qui ne peut être traité selon les principes du code civil. Les règles de ce dernier précisent que le transfert de propriété d'un bien entre deux personnes entraîne une déchéance des droits du cédant sur le bien considéré, le nouveau propriétaire pouvant en faire ce que bon lui semble.

Il paraît nécessaire, comme le suggère J.Lartigau [78] d'envisager une solution intermédiaire entre le don pur et simple de la part du sujet et l'absence de droit sur l'échantillon de la part de l'établissement bénéficiaire du prélèvement. Il s'agirait d'un contrat de dépôt passé entre les deux parties, avec charge pour la biothèque de faire la meilleure utilisation scientifique et éthique du don consenti par le prestataire. Celui-ci pourrait en vertu du principe de révocabilité du don récupérer son bien à tout moment.

II.5. Confidentialité des informations et respect du secret médical

L'obligation de confidentialité entourant les biothèques découle des impératifs du secret médical et de la loi « informatique et libertés » du 6 janvier 1978 (loi n°78-17).

La réglementation est différente selon que l'envoi des données nominatives se fait sur le territoire national ou en dehors du territoire national.

II.5.1. Pour l'envoi des données nominatives sur le territoire national

En application de la loi n° 94-548 du 1^{er} juillet 1994 relative au traitement des données nominatives ayant pour fin la recherche dans le domaine de la santé et modifiant la loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, et aux textes qui lui font suite,

- Tout fichier, informatisé ou non, est concerné par la loi. Celle-ci concerne en effet, tous les traitements automatisés de données directement ou indirectement nominatives.

- Les données recueillies auprès des personnes ou transmises par les médecins dans le but de recherches permettant l'identification des personnes doivent être codées avant leur transmission, sauf dérogation prévue par la loi.

- Les données transmises ne peuvent être conservées sous une forme nominative au-delà de la durée nécessaire à la recherche.

- La personne qui reçoit les données est responsable de la sécurité des informations et de leur traitement.

« Les personnes auprès desquelles sont recueillies des données nominatives ou à propos desquelles de telles données sont transmises, sont, avant le début du traitement de ces données, des personnes physiques ou morales destinataires des données, du droit d'accès et de rectification institué au chapitre V, du droit d'opposition institué aux premiers et troisièmes alinéas de l'article 40-4 ou, dans le cas prévu au deuxième alinéa de cet article, de l'obligation de recueillir leur consentement.

Toutefois, ces informations peuvent ne pas être délivrées si, pour des raisons légitimes que le médecin traitant apprécie en conscience, le malade est laissé dans l'ignorance d'un diagnostic ou d'un pronostic grave.

Dans le cas où les données ont été initialement recueillies pour un autre objet que le traitement, il peut être dérogé à l'obligation d'information individuelle lorsque celle-ci se heurte à la difficulté de retrouver les personnes concernées.

Les dérogations à l'obligation d'informer les personnes de l'utilisation des données les concernant à des fins de recherche sont mentionnées dans le dossier de demande d'autorisation transmis à la Commission nationale de l'informatique et des libertés, qui statue sur ce point. »

Dans la page suivante est présentée une fiche qui sera destinée au patient pour l'informer des recherches qui seront effectuées sur le prélèvement et qui pourront figurer sur un fichier informatique.

Exemple de fiche d'information destinée au patient concernant les recherches nécessitant un traitement automatisé de données nominatives

Dans le cadre des soins dont vous avez bénéficié et pour poser un diagnostic, nous avons réalisé une microbiopsie.

Nous vous informons que, sauf opposition de votre part, des fragments non utilisés pour ce diagnostic pourront être conservés sous notre contrôle. Ils pourront servir à des recherches dans le domaine de la pathologie dont vous êtes atteint, à l'exclusion de toute recherche visant à étudier des caractéristiques génétiques identifiantes (c'est-à-dire qui permettrait de vous identifier par l'analyse de vos cellules).

Ces fragments seront susceptibles le cas échéant d'être transmis à d'autres équipes de recherche médicale, pour les besoins de leurs propres travaux de recherche. Les données nominatives portant sur ces fragments seront transmises dans les conditions prévues au chapitre 5 bis de la loi n°78-17 du 6 janvier 1978.

Les données nominatives vous concernant recueillies à cette occasion pourront par ailleurs faire l'objet d'un traitement automatisé (c'est-à-dire figurer sur un fichier informatique).

Conformément à l'article 40-4 de la loi n°78-17 du 6 janvier 1978, vous avez le droit de vous opposer à ce que les données nominatives vous concernant fassent l'objet d'une exploitation.

Si vous ne vous opposez pas à cette dernière, vous pourrez exercer à tout moment votre droit d'accès et de rectification sur ces données comme prévu par la loi « Informatique et Libertés » auprès des responsables de l'étude.

Pour toutes les informations de nature médicale, ce droit pourra être exercé par l'intermédiaire d'un médecin de votre choix (article 40-5 de la loi 78-17 du 6 janvier 1978).

Toute information complémentaire pourra être demandée à :

Etiquette avec numéro d'identification du patient :

Document remis le :

Signature de la personne qui a délivré l'information :

II.5.2. Pour l'envoi des données nominatives en dehors du territoire national

La transmission hors du territoire français de données nominatives non codées faisant l'objet d'un traitement automatisé n'est autorisée que si la législation de l'état destinataire apporte une protection équivalente à la loi française.

Pour les prélèvements congelés faits dans un laboratoire d'anatomie-pathologique, dans le cadre d'une procédure de soins, à partir de biopsies ou de pièces opératoires, aucune déclaration particulière n'est nécessaire si l'enregistrement informatique est fait sur le système utilisé pour les prélèvements en paraffine ou la cytologie puisque les systèmes informatiques des laboratoires ont déjà l'agrément de la CNIL.

En ce qui concerne notre projet, les prélèvements s'effectuent dans le cadre d'une procédure de soins et seront sûrement enregistrés sur le système informatique utilisé pour la cytologie des laboratoires donc nous n'aurons pas besoin de faire de déclaration d'un traitement automatisé d'informations nominatives.

II.6. Le droit à l'oubli et les « purges »

Le droit à l'oubli est une notion liée à celle du consentement. Dans le cadre d'une biothèque, il faut envisager le droit qu'à toute personne d'être « oubliée », c'est-à-dire l'obligation de détruire le matériel biologique qui le concerne après un certain délai de conservation. À l'heure actuelle, il n'existe pas de texte de loi fixant une durée maximale de conservation. Toutefois, dans un domaine proche, on peut se référer à la loi n° 79-18 du 3 janvier 1979 sur les archives, qui indique dans son article 7 : « Le délai au-delà duquel les documents d'archives publiques peuvent être librement consultés est porté à 150 ans à compter de la date de naissance pour les documents comportant des renseignements individuels de caractère médical ». La durée de conservation des dossiers médicaux est fixée quant à elle à trente ans au maximum.

Mais, comparativement à une biothèque réalisée dans le cadre de la transfusion sanguine dont l'intérêt serait médico-légal, notre projet se situerait dans une optique de biothèque à conservation longue dans laquelle des spécimens biologiques soigneusement sélectionnés, issus de donneurs volontaires dûment sélectionnés seraient conservés pour la postérité.

III. Aspects techniques

Les conditions sont définies, de façon générale, par le code du travail, livre II, titre III « Hygiène et Sécurité ». Certaines recommandations d'AIR LIQUIDE Santé FRANCE ont été rédigées par *N. Angelier* sous la forme des bonnes pratiques de conservation en cryobiologie concernant l'aménagement du local de stockage de la cuve d'azote liquide.

III.1. Aménagement des locaux

L'accès des locaux doit être réservé aux personnes autorisées, ils ne doivent pas être utilisés comme lieu de passage par ceux qui n'y travaillent pas. Ils doivent être conçus, construits et adaptés pour éviter les risques d'erreur et les risques d'accident pour le personnel.

La mise en place des récipients doit se faire de façon à ne pas gêner la libre circulation du personnel, à favoriser la manipulation aisée de tous les récipients cryogéniques.

Par mesure de précaution, ces locaux doivent être fermé à clé et l'accès doit être réservé aux personnes autorisées.

- porte du local

La porte d'entrée du local doit s'ouvrir vers l'extérieur et être équipée d'une ouverture anti-panique pour l'évacuation en urgence. Elle doit avoir une partie vitrée suffisamment grande à la partie supérieure afin de faciliter la surveillance depuis l'extérieur du laboratoire et doit comporter un pictogramme avertissant du risque de brûlure cryogénique.

- *revêtement du sol*

Le sol doit pouvoir se nettoyer facilement et résister aux basses températures. Un revêtement contenant des parties métalliques est déconseillé car le métal est un bon conducteur thermique et peut provoquer des risques de brûlures.

- *chauffage de la pièce*

Le chauffage du local doit être prévu à une température de l'ordre de 20°C. L'absence de chauffage, dans une atmosphère humide, provoque des condensations importantes sur les parois froides et peut donc gêner le bon fonctionnement des équipements cryogéniques en empêchant l'ouverture des récipients.

- *ventilation de la pièce*

La ventilation est obligatoire et permanente. Elle doit être à deux vitesses : une ventilation permanente et une ventilation forcée déclenchée à partir d'un certain seuil de teneur en oxygène de l'air ambiant (19 %) dont la mise en service doit être automatique.

- *systèmes de contrôle*

Différentes alarmes doivent être connectées en permanence à un poste de surveillance où une présence est assurée 24 heures sur 24. Les différents systèmes connectés à ce poste sont :

- . un système de contrôle du fonctionnement du système de ventilation de la pièce,
- . un système de contrôle de la teneur en oxygène dans la pièce,
- . un système de contrôle du niveau d'azote dans la cuve,
- . un système de contrôle de fermeture du couvercle,
- . et un système de contrôle de la température : alarme visuelle et sonore.

- *appareils de réanimation*

En cas d'asphyxie dans le local de la cuve d'azote liquide, il est nécessaire de disposer d'appareils de réanimation à proximité du local de la tumorothèque :

- un masque autonome de ventilation type Oxalair 35-65 AIR LIQUIDE *santé*
- un ballon de ventilation assisté type IM 5 et une bouteille d'oxygène prête à l'emploi de 0,5 m³ type bouteille PRESENCE

- *appareil de secours*

À proximité des appareils de conservation, un appareil de secours doit être maintenu en état de marche afin de pouvoir y transférer les prélèvements en cas de défaillance technique.

- *arrivée d'eau*

L'installation d'une douche est nécessaire en cas de brûlure cryogénique.

III.2. Techniques de conservation

III.2.1 . Production du froid

- *congélateurs*

L'apport de froid se fait par l'intermédiaire de compresseurs, qui sont au nombre de un ou deux selon la température à atteindre. Ils agissent en comprimant un gaz rare qui se détend brutalement en produisant du froid (réaction endothermique).

Les congélateurs peuvent être à ouverture verticale ou horizontale, disposer d'un ou plusieurs compartiments. Ils sont dépendants d'une alimentation électrique ce qui les rend sensibles aux pannes de secteur. Cet inconvénient rend hautement souhaitable l'acquisition d'enregistreurs de température en continu et d'un congélateur de secours, afin d'éviter la perte irrémédiable des échantillons en cas de panne mécanique ou de coupure d'électricité. Ceci impose la connexion à un système de surveillance continu avec présence d'une alarme.

- cuves d'azote liquide

Elles permettent de stocker une grande quantité d'échantillons conditionnés dans des cryotubes et garantissent une température de -196°C à l'intérieur de la cuve. Ces cuves peuvent contenir jusqu'à 38 000 tubes. Les échantillons baignent soit directement dans l'azote soit dans les vapeurs qu'il dégage. Ces installations sont recommandées pour des échantillons fragiles sur de longues périodes. Elles présentent l'avantage d'assurer une sécurité maximale pour les échantillons. En revanche, l'approvisionnement hebdomadaire en azote est onéreux et la manipulation des échantillons présente certains dangers qu'il faut prévenir par une formation et par le port d'un équipement spécifique. Les principaux dangers sont le risque d'explosion et de brûlure cryogénique ; il est donc indispensable de prévoir des appareils de réanimation et de secours à proximité en cas d'accident.

Le stockage en azote liquide représente plus de risques potentiels pour l'utilisateur que la conservation en congélateurs mais assure une qualité optimale des échantillons ce qui est l'argument de choix pour la conservation des prélèvements.

III.2.2. Stockage des échantillons

Les microbiopsies seront stockées dans des cryotubes de polycarbonate qui offrent une meilleure tenue au froid. Ces tubes ont une contenance de 0,5 à 2 ml. On peut écrire dessus à l'aide de cryomarqueurs et des codes couleurs des bouchons des cryotubes et des cryoboîtes peuvent faciliter le repérage des échantillons. Ces cryotubes seront rangés dans des cryoboîtes placées aux différents étages des canisters.

III.3. Influence du froid sur la conservation des échantillons biologiques

Le mode de conservation des biothèques est la cryoconservation. Cette technique est celle qui préserve le mieux les structures cellulaires comparativement à la dessiccation et à la lyophilisation.

L'eau étant le constituant majoritaire de tout tissu vivant, les phénomènes de congélation et de décongélation sont liés directement aux propriétés de l'eau à basse température.

III.3.1. Congélation de l'eau

Lors du refroidissement, l'eau reste liquide jusqu'à une valeur inférieure à la température de congélation avant de remonter à 0°C. Cette phase de refroidissement précédant le plateau de congélation à 0°C est appelée « *pic de surfusion* » (figure 14).

Puis, il y a libération de chaleur lors de la formation de la glace à 0°C (réaction exothermique), ce qui explique que pour une vitesse de refroidissement constante, la température de l'échantillon reste stable alors que celle de l'enceinte continue à s'abaisser : cette phase est appelée « *plateau de congélation* ». La température reste stable jusqu'à la transformation complète du corps liquide en corps solide. Cette transformation en glace se fait à partir des centres de cristallisation qui apparaissent dans le liquide. La taille des cristaux de glace dépend principalement de la vitesse de refroidissement.

Le nombre de centres germinatifs augmente avec la vitesse de refroidissement et les cristaux étant plus nombreux, leur taille est réduite.

En revanche, les cristaux de grande taille se développent avec des vitesses de refroidissement lentes.

Ce phénomène de cristallisation influence la survie des cellules. Au cours d'un réchauffement trop lent, les cristaux de petite taille se transforment en cristaux de plus grande taille qui pourront endommager les structures cellulaires.

Ceci peut également être observé lors du phénomène de recristallisation qui se produit en cours de conservation entre -20°C et -100°C. L'utilisation de très basses températures telles que celle de l'azote liquide (-196°C) est donc indiquée pour la conservation de cellules.

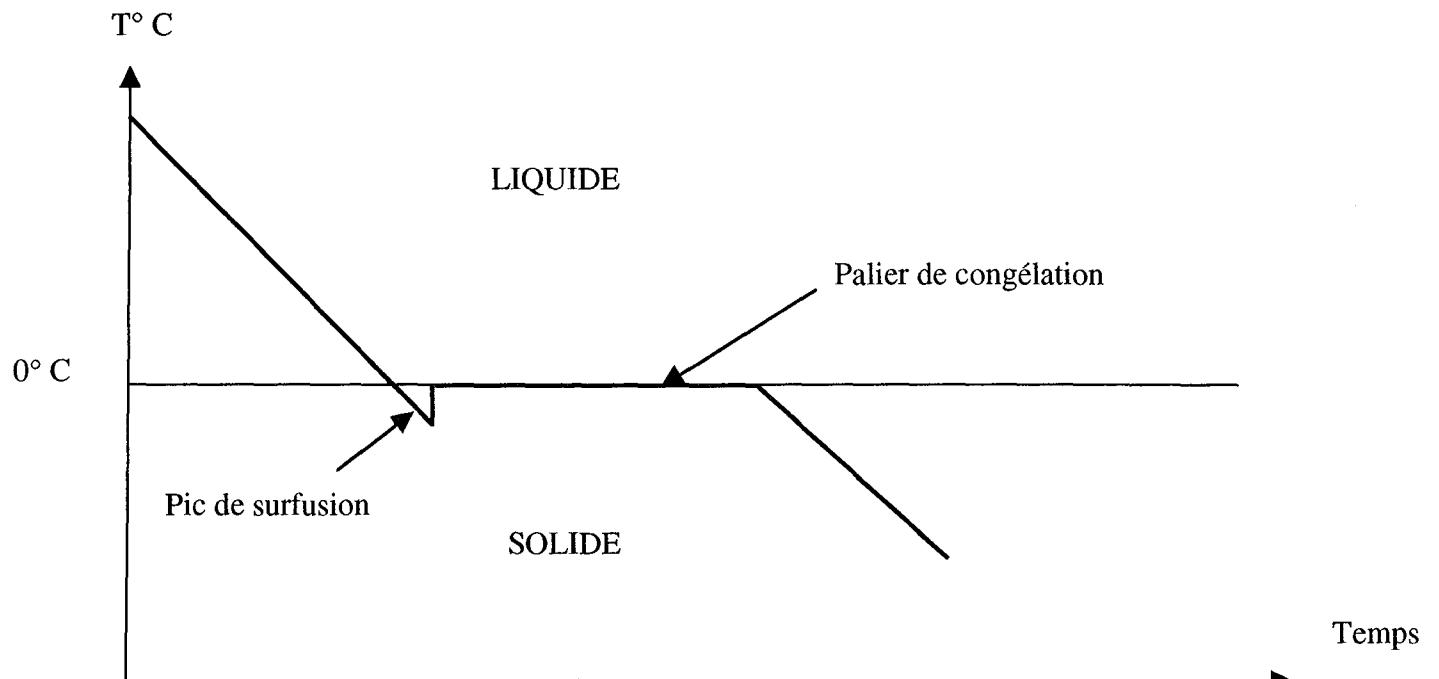


Figure 14 : Courbe de refroidissement de l'eau [79].

III.3.2. Congélation des solutions salines

Lors du refroidissement de solutions salines simples (chlorure de sodium 0,9 %), les premiers cristaux apparaissent à une température de $-0,5^{\circ}\text{C}$. Puis, lors du plateau de congélation, l'eau pure cristallise sous forme de glace ce qui entraîne une augmentation de la concentration saline de la solution résiduelle non cristallisée.

Cette concentration en sel s'accroît jusqu'à ce que la solution saline devienne elle-même solide. La température est alors de $-21,3^{\circ}\text{C}$ et la concentration saline est de 30,7 %. Cet état pour lequel le mélange se solidifie directement sans formation de glace correspond au « point d'eutaxie » et la température atteinte à ce niveau est appelée « température eutectique ». Chaque solution saline possède une température eutectique qui lui est propre.

III.3.3. Congélation des solutions biologiques complexes

Les solutions biologiques sont des solutions complexes contenant de l'eau, des sels et des substances organiques.

Les sels présents constituent des mélanges eutectiques complexes. La courbe de refroidissement de telles solutions a une allure proche de celle de l'eau avec un pic de surfusion et un plateau de congélation.

On observe la formation de glace pure avec une solution interstitielle fortement concentrée en protéines. Ces protéines peuvent être altérées de façon irréversible si le sel est en grande quantité et peuvent nuire ainsi à la récupération de la fonction de substances comme les enzymes ou les anticorps.

III.3.4. Congélation de structures cellulaires

La formation de glace entraîne une augmentation de la concentration saline du milieu jusqu'à une valeur particulière correspondant au point eutectique. L'augmentation de la concentration en électrolytes provoque la déshydratation et la contraction des cellules. Ce phénomène peut être néfaste en dessous d'un certain seuil en raison de l'augmentation de la perméabilité membranaire à certains ions et à certaines molécules qui peuvent être toxiques pour la cellule (Ca^{2+} , PO_4^-).

Il existe deux solutions pour palier à ces inconvénients.

- La première solution consiste à ajouter des agents cryoprotecteurs (glycérol, diméthylsulfoxyde) qui vont se fixer sur les molécules d'eau par des liaisons hydrogènes. Ces agents vont ainsi maintenir l'eau à l'état liquide à des températures inférieures aux points où débute normalement la congélation des solutions ce qui entraîne une diminution de la quantité de glace formée et de la concentration saline de la phase liquide. En atténuant la déshydratation et la contraction cellulaire, les agents cryoprotecteurs évitent les hyperconcentrations salines et les précipitations et par voie de conséquence les dénaturations protéiques. Leur inconvénient est leur grande toxicité cellulaire qui tout comme leur efficacité est fonction de leur concentration [76].

- La seconde solution est d'agir sur la vitesse de refroidissement. Si elle est trop rapide, un choc thermique peut se produire entraînant des lésions au niveau de la membrane cellulaire. Par contre, si elle est trop lente, la taille des cristaux de glace extracellulaires augmente ce qui induit une sortie d'eau massive, une salinité accrue du milieu intérieur et donc une rétraction de la cellule (figure 15). *N. Coudurier* propose pour les sérums une phase de congélation de dix minutes en vapeur d'azote avant de plonger le prélèvement dans l'azote liquide [80].

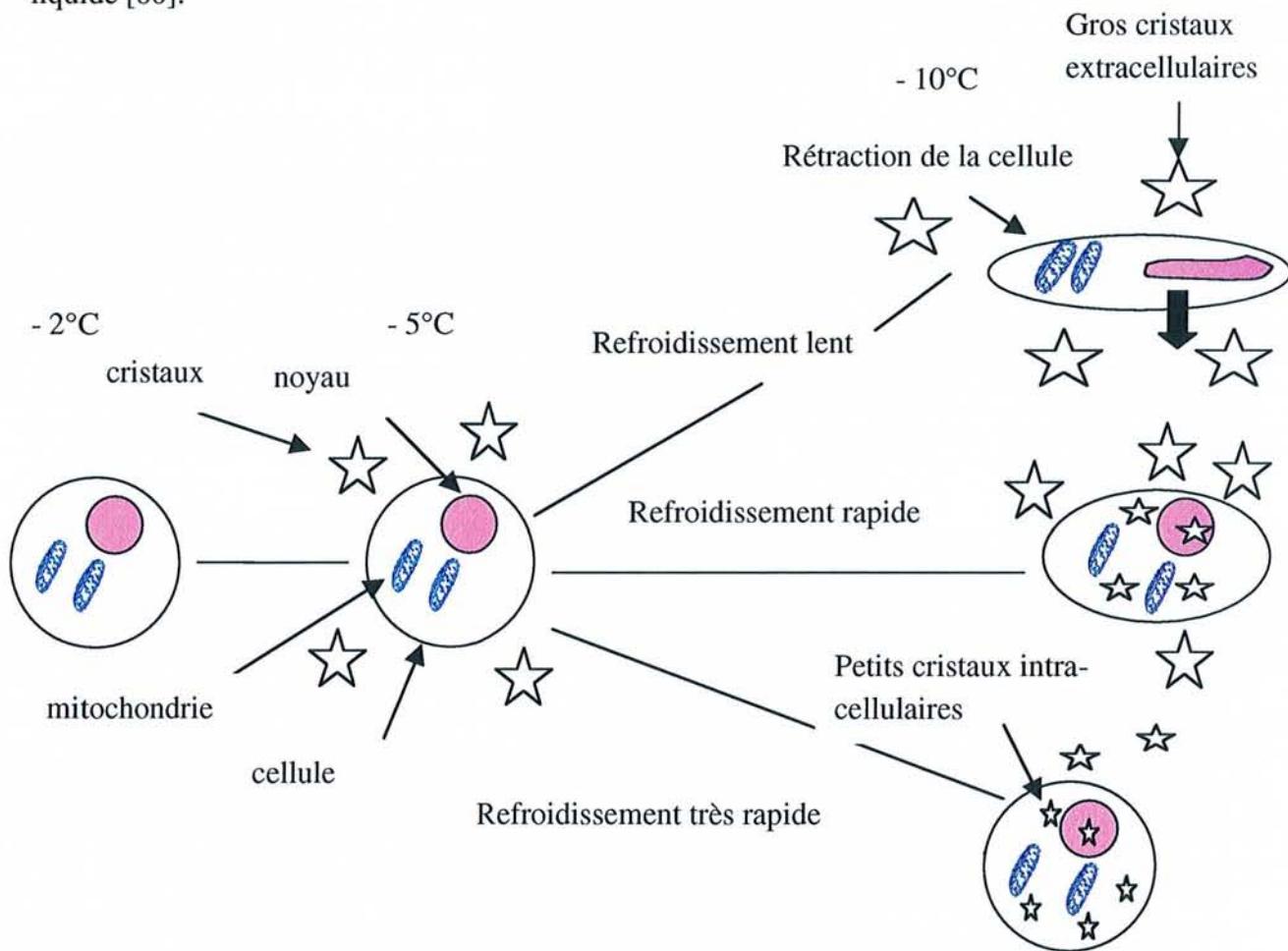


Figure 15 : Représentation schématique de l'effet de la vitesse de refroidissement sur la cristallisation intra et extracellulaire (schéma adapté d'après Mazur et al [81]).

La vitesse du réchauffement influence aussi la survie des cellules ; il est préférable qu'elle soit relativement rapide car c'est lors de la décongélation lente qu'apparaissent les lésions dues aux cristaux plutôt que lors de la congélation. *N. Coudurier* conseille donc pour une

décongélation au bain-marie à 37°C [80] cependant, cette température n'est pas toujours adaptée au maintien de l'intégrité de tous les constituants cellulaires. En ce qui concerne l'extraction des ARN, la décongélation doit se faire dans de la glace pilée afin d'éviter la dégradation des ARN par la chaleur.

D'après *Karlsson et Toner* [82], les vitesses de réchauffement rapides semblent bénéfiques pour les prélèvements congelés rapidement tandis que les vitesses lentes de réchauffement semblent être mieux adaptées pour les prélèvements congelés lentement. Il a été proposé que les altérations consécutives à un réchauffement rapide sont dues aux stress osmotiques qui peuvent survenir pendant la réhydratation rapide des cellules et sont moins susceptibles d'apparaître dans des cellules congelées rapidement parce qu'il n'y a pas de déshydratation significative pendant la congélation.

Il existe des différences indiscutables entre le comportement cryobiologique des cellules cultivées et celui des cellules isolées d'un organe.

Les hépatocytes de rats cultivés dans un double gel de collagène montrent une tendance plus importante à la formation de glace intracellulaire que ne le font les hépatocytes isolés [83]. Ces différences dans les cinétiques de formation de glace intracellulaire entre les cellules isolées et les cellules cultivées indiquent que les paramètres biophysiques qui gouvernent les flux d'eau et la dynamique de nucléation intracellulaire pendant la congélation sont différents pour les cellules isolées et les cellules des tissus.

Les raisons pour ces différences observées entre les cellules isolées et les cellules cultivées ne sont pas connues mais il a été suggéré que les interactions cellules - cellules et cellules - matrice puissent être responsables de ce phénomène. Une autre possibilité d'interprétation est que le processus de congélation des cellules isolées à partir d'un tissu change les propriétés biophysiques des cellules.

La mise en place d'une tumorothèque impose de maîtriser un certain nombre de facteurs concernant d'une part, la collecte et la conservation des échantillons et d'autre part, la gestion informatisée des données relatives au fonctionnement de la biothèque et à son utilisation ultérieure à des fins scientifiques. Afin d'assurer la sécurité des manipulateurs, la qualité des échantillons et des données médicales associées il est indispensable d'élaborer un schéma d'assurance - qualité indispensable au bon fonctionnement d'une telle structure.

C. SCHEMA DE MISE EN PLACE D'UNE
ASSURANCE QUALITE

I. Assurance - qualité

I.1. Modélisation du système

Un diagramme «blocs – actions» (figure 16) permet d'avoir une vision dynamique du système. La représentation des flux permet d'envisager les alternatives en cas de choix ou de dysfonctionnements.

Explications du diagramme blocs – actions de la tumorothèque

Ce schéma permet de mettre en évidence les interactions entre les différents partenaires du système : le service de soins (bloc opératoire, radiodiagnostic, salle de pansement), le laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologique, les locaux de la tumorothèque et le laboratoire de biologie des tumeurs. Les acteurs des différentes actions n'ont pas tous été identifiés.

- Le laboratoire de biologie des tumeurs ou les promoteurs industriels expriment un besoin d'analyse de biopsies et sélectionnent une catégorie de patients.

- Le service de soins prévient le laboratoire de biologie des tumeurs de la date et de l'heure de l'intervention :

. s'il s'agit d'une microbiopsie, une personne du laboratoire (à définir) se déplace en radiodiagnostic ou en salle de pansement pour faire la prise d'empreinte et congeler la microbiopsie dans le cryoconservateur portable en emportant avec elle tout le matériel nécessaire pour la réalisation de ces opérations. Cette personne remplit ensuite la fiche accompagnant l'empreinte.

. s'il s'agit d'une pièce opératoire, le chirurgien qui effectue l'opération sélectionne le fragment, fait la prise d'empreinte et congèle l'échantillon dans le cryoconservateur portable. Il remplit ensuite la fiche accompagnant l'empreinte.

- La prise d'empreinte est ensuite amenée au laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologique avec la feuille d'accompagnement des empreintes.

- Le laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologique analyse l'empreinte et remplit la fiche accompagnant le prélèvement. Le devenir du prélèvement sera en fonction du résultat de l'analyse :

. si l'échantillon n'est pas cancérogène il suivra la filière des déchets anatomiques non identifiables et sera incinéré.

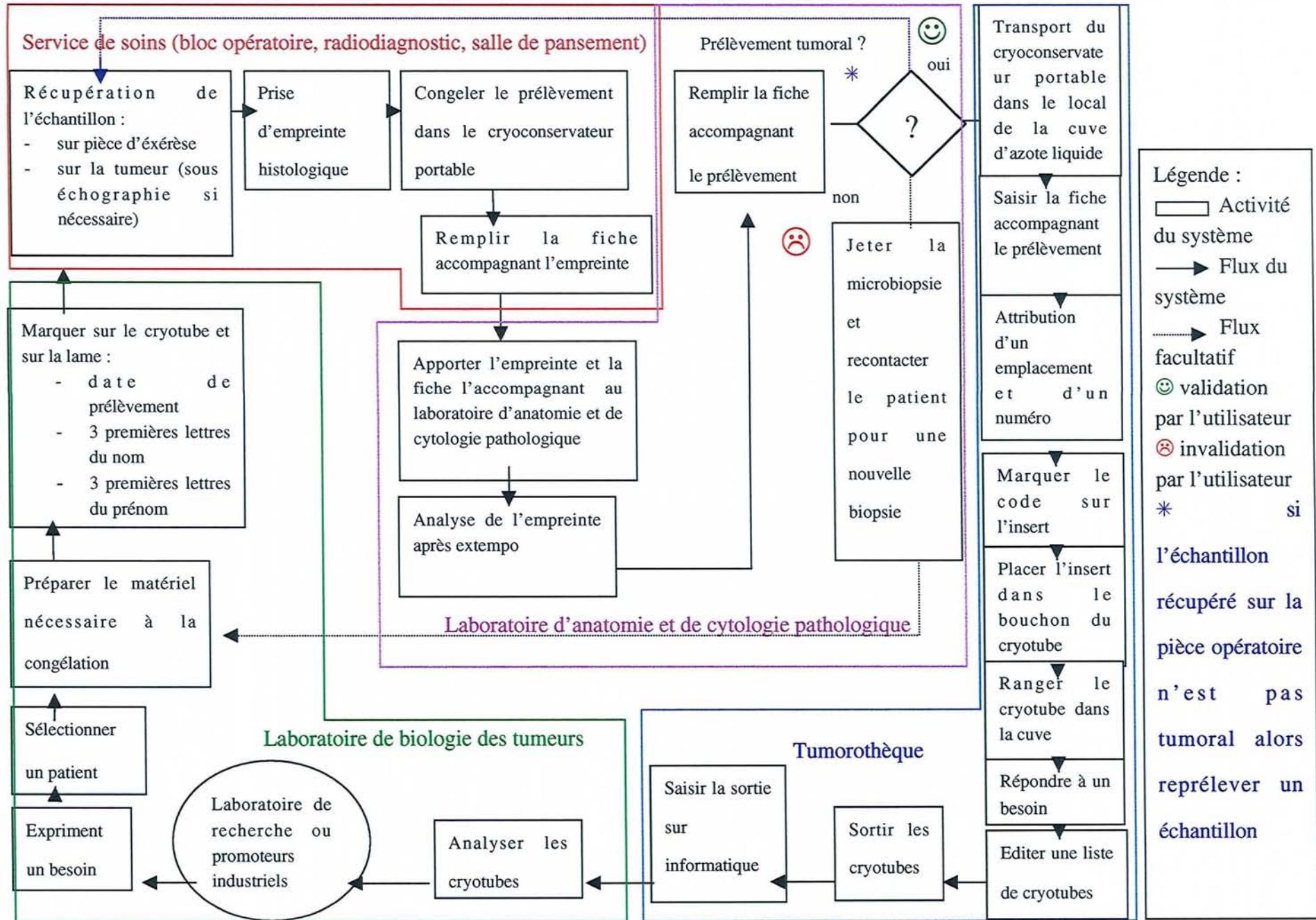
. si l'échantillon est cancérogène, il est transporté du service de soins au local de la cuve d'azote liquide avec la feuille d'accompagnement des prélèvements.

- Une personne saisit informatiquement le prélèvement à l'aide de la feuille d'accompagnement des prélèvements. Un emplacement et un numéro d'enregistrement sont attribués informatiquement pour chaque prélèvement. Le numéro d'enregistrement est marqué sur l'insert qui est placé dans le bouchon du cryotube. L'échantillon est transféré du cryoconserveur portable dans la cuve d'azote liquide.

Les feuilles d'accompagnement des empreintes et des prélèvements seront ensuite archivées en respectant le procédé d'anonymat des patients. Lors de la demande d'analyses effectuées au laboratoire de recherche sur des échantillons congelés dans la tumorothèque, une sortie matérielle est réalisée suivie d'une sortie informatique.

La feuille d'accompagnement des prélèvements est présentée en annexe.

Figure 16 : Diagramme « blocs-actions » de la tumorothèque.



I.2. Logiciel informatique

Le logiciel informatique reste encore à déterminer. Il existe un logiciel Diamic CS commercialisé par la société Infologic qui comporte un module de gestion des prélèvements congelés intitulé «tissuthèque». Ce logiciel permettrait le recueil des informations afférentes aux prélèvements congelés, aux données anatomo-pathologiques et administratives au sein d'une banque de données unique avec un paramétrage conforme à la réglementation en terme de confidentialité et de sécurité informatique.

Les procédures relatives à la saisie des informations lors de l'inclusion et lors de la sortie des cryotubes seront à rédiger suite à cette acquisition. Il est impératif de modifier l'état du stock lors des sorties des cryotubes de façon à ce que le stock réel soit en adéquation avec le stock informatique.

II. Assurance – sécurité

L'utilisation de l'azote liquide en toute sécurité impose de connaître les risques particuliers encourus par les personnes du laboratoire qui le manipule et par la même de les prévenir par une formation, un équipement et du matériel adapté [84].

II.1. La formation

Selon l'article R 231 636 du code du travail, « La formation à la sécurité relative à l'exécution du travail a pour objet d'enseigner au salarié, à partir des risques auxquels il est exposé, les comportements les plus sûrs en ayant recours si possible à des démonstrations, de lui expliquer les modes opératoires retenus s'ils ont une incidence sur sa sécurité ou celle des autres salariés, de lui montrer le fonctionnement des dispositifs de protection et de secours et

de lui expliquer les motifs de leur emploi. Cette formation doit s'intégrer dans la formation que reçoit le salarié ; elle est dispensée sur les lieux du travail.»

II.2. Les risques

Il existe trois types de risques liés au stockage et à la manipulation de la cuve d'azote liquide :

- un risque de **surpression** provoqué par une obturation du col du réservoir empêchant l'évaporation de l'azote gazeux,
- un risque de **brûlure cryogénique** causé par le contact ou la projection d'azote liquide,
- un risque d'**asphyxie** dû à une évaporation incontournable de l'azote gazeux lors des manipulations cryogéniques (remplissage des réservoirs, congélations d'échantillons).

II.3. Prévention des risques

II.3.1. Prévenir la surpression

Il est indispensable de s'équiper d'un système de chauffage pour régler la température des locaux entre 20°C et 25°C pour éviter les condensations sur les parties très froides des équipements cryogéniques et le dépôt de glace à l'intérieur des récipients.

Par ailleurs, il faut utiliser régulièrement une balayette et une pelle pour éliminer les cristaux de glace déposés sur le col et le bouchon du réservoir.

De plus, il faut utiliser des bouchons adaptés parfaitement étanches pour éviter l'entrée d'azote liquide à l'intérieur du tube qui risquerait de s'évaporer brutalement lors du réchauffement (c'est-à-dire lors de la sortie du tube du récipient de stockage) ce qui pourrait faire exploser le tube ou projeter le bouchon.

II.3.2. Prévenir la brûlure cryogénique

Il faut mettre en évidence sur la porte du local un pictogramme spécifique pour avertir du risque de brûlure lié à la manipulation de la cuve d'azote liquide.

De plus, certaines règles sont à respecter afin d'éviter tout contact avec l'azote liquide :

- porter des gants cryoprotecteurs, des lunettes de protection ou une visière pour le visage ainsi que des chaussures fermées lors de toute manipulation cryogénique.
- utiliser des pinces isolantes dès que possible lors de manipulation de la cuve d'azote liquide.

II.3.3. Prévenir l'asphyxie

Afin de prévenir le risque d'asphyxie, il faut disposer d'un équipement spécifique :

- un système de ventilation à deux vitesses : une ventilation permanente et une ventilation forcée déclenchée à partir d'un certain seuil de teneur en oxygène de l'air ambiant (19 %)
- un système de contrôle de la teneur en oxygène
- une porte de laboratoire vitrée ou équipée d'un hublot
- un matériel de premier secours à l'extérieur de la porte :
 - un masque autonome de ventilation type Oxalair 35-65 AIR LIQUIDE *santé* permet de pénétrer sans danger dans le laboratoire pour porter assistance à une personne inanimée.
 - un ballon de ventilation assistée type IM 5 et une bouteille d'oxygène prête à l'emploi de 0,5 m³ type bouteille PRESENCE.

III. Rédaction des procédures

Elle a été réalisée à l'aide du logiciel SURIQUAT qui a pour vocation de faciliter la construction, la diffusion et la maintenance du système qualité et qui centralise l'ensemble des procédures du Centre Alexis Vautrin.

Des procédures ont été rédigées dans l'optique d'une part de garantir une qualité optimale de la biopsie et d'autre part d'assurer une sécurité maximale pour le manipulateur.

De plus, des procédures d'urgence adaptées aux différents types d'incidents et nécessaires pour éviter des interventions intempestives pouvant aggraver la situation ou provoquer des accidents en cascade ont été rédigées. Elles devront faire l'objet d'exercices répétés.

Les procédures rédigées sont les suivantes :

- procédure de congélation et de réalisation d'empreintes des tissus au bloc opératoire,
- procédure de transfert des tissus du cryoconservateur portable dans la cuve d'azote liquide,
- procédure de transport des empreintes des tissus du bloc opératoire au laboratoire d'anatomie-pathologie,
- procédure de marquage des cryotubes,
- procédure de manipulation de la cuve d'azote liquide,
- procédure de remplissage de la cuve d'azote liquide,
- procédure d'isolation de l'ARN total et d'ADN génomique à partir d'une biopsie,
- procédure en cas d'asphyxie lors de manipulation de la cuve d'azote liquide,
- procédure en cas de brûlure cryogénique.

Les procédures restant à rédiger sont les suivantes :

- procédure de saisie informatique lors de l'entrée d'un cryotube dans la tumorothèque,
- procédure de saisie informatique lors de la sortie d'un cryotube de la tumorothèque,

- procédure de conditionnement et d'élimination des déchets (déchets potentiellement infectieux, toxiques ou radioactifs),
- procédure d'entretien des locaux,
- procédure d'utilisation et de maintenance des appareils.

IV. Points cruciaux à respecter concernant la procédure de congélation des tissus pour l'analyse moléculaire des ARN

- L'utilisation de gants et de matériel sans RNAase est indispensable pour préparer et manipuler les échantillons des tissus tumoraux congelés.
- Le délai entre le prélèvement et la congélation doit être le plus bref possible : les ARN ont des demi-vies extrêmement courtes ; la plupart des ARN se dégradent très vite. *Lazarus et al.* ont montré une baisse de 50 % des ARN de haut poids moléculaire extraits des reins de souris maintenus une heure en ischémie chaude [85].
- La taille de l'échantillon doit être adaptée à la taille du cryotube.
 - Elle ne doit pas être trop volumineuse car lors de la congélation, le tissu se rigidifie et prend la forme du cryotube. Il devient alors très difficile de sortir le prélèvement du cryotube.
 - Elle ne doit pas être trop petite sinon la quantité d'ARN extrait est trop faible. La taille idéale d'une biopsie fraîche pour l'extraction des ARN est d'environ 50 mg.

V. Echéancier de mise en place de la biothèque

Une lecture du cahier des charges met l'accent sur les actions à mener avant la mise en route effective de la biothèque.

- Vérifier l'adéquation entre les besoins de la recherche et les capacités de recrutement des patients

- S'accorder sur les modalités de recueil et de transport des échantillons, leur conditionnement, leur conservation, leur suivi, leur traçabilité et sur la distribution des tissus tumoraux congelés pour la réalisation d'analyses moléculaires
- Définir les modalités pratiques de réalisation : qui fait quoi et à quel moment ?
- S'accorder sur la ou les personnes à recruter
- Définir le local de stockage de la cuve (pièce fermée à clé et climatisée avec un système d'alarme)
- Commander le matériel de stockage et le consommable
- Faire les déclarations nécessaires : CNIL, CCPRB
- Définir la durée de conservation des prélèvements et le devenir des « périmés »
- Prévoir de séparer ou non les échantillons en fonction de leur taille et en fonction de leur future analyse et avant ou après congélation
- Définir le code des échantillons
- Définir le logiciel informatique et les informations à recueillir pour chaque prélèvement (cf fiche d'accompagnement des prélèvements)
- Rédiger les procédures
- Prévoir un raccordement des systèmes d'alarme à un poste de surveillance 24 heures sur 24
- Convenir d'une conduite à tenir en cas de panne - Rédiger une procédure à afficher à côté de la cuve
- Décider du remplissage hebdomadaire de la cuve d'azote de secours
- Prévoir maintenance de la cuve d'azote liquide
- Former les utilisateurs de la cuve aux risques encourus liés au stockage et à la manipulation de l'azote liquide, et aux interventions d'urgence en cas d'incident.

D. CONCLUSION

Les enjeux et les contraintes de réalisation d'une tumorothèque sont encore relativement imprécis. Si la cryobiologie ouvre de larges perspectives dans la recherche anticancéreuse, certains points restent encore obscurs quant à la durée maximale de conservation des biopsies. L'ensemble de ce travail n'est qu'une étape dans la réalisation du projet ; il sera suivi des phases de mise en place, de fonctionnement et d'évolution ultérieure de la tumorothèque. Une utilisation optimale de cette structure nécessite le développement de nouvelles plates-formes technologiques comme les puces à ADN et l'électrophorèse bidimensionnelle afin de pouvoir établir «les cartes génétiques» des tumeurs.

La connaissance des altérations génétiques et moléculaires de ces dernières devrait permettre de préciser les classifications histopronostiques tumorales voire de fournir des éléments prédictifs et pronostics des réponses thérapeutiques. Un diagnostic plus fin des cancers, résultant de ces découvertes, devrait permettre d'orienter plus efficacement l'arsenal thérapeutique éventuellement validé par des études prospectives ou rétrospectives réalisées sur l'échantillothèque.

Dans l'avenir, la tumorothèque pourrait faire partie intégrante du dossier médical. Des patients en rechute après une longue phase de rémission et qui pourraient bénéficier de nouvelles molécules thérapeutiques seraient soumis à un diagnostic biologique précis. Ils pourraient être traités grâce aux informations issues des analyses effectuées sur les prélèvements.

Si la tumorothèque tient ses promesses, elle pourrait contribuer à transformer la prise en charge du cancer en une science plus précise, plus personnalisée et plus efficace.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. HILL C, DOYON F. Cancer prevalence in France. *Bull Cancer*. 2001 ; **88**(10):1019-22.
2. HILL C. What rate of cure for cancer ? *Bull Cancer*. 1998 ; **85**(9):745-6.
3. DENIS R. Génétique et biologie moléculaire au service de la cancérologie. Les multiples pistes de biothérapie. *Le moniteur hospitalier*. 2001 ; **138**:16-19.
4. FIALAIRE A. Les biothèques en transfusion. Les biothèques. Comptes-rendus de la réunion organisée par la fondation Marcel Mérieux et la biothèque internationale d'Annemasse avec l'agence française du sang. Collection Fondation Marcel Mérieux. Lyon 1997 :13.
5. ARTEAGA CL. The epidermal growth factor receptor: from mutant oncogene in non human cancers to therapeutic target in human neoplasia. *J Clin Oncol*. 2001 ; **19**(18 Suppl):32S-40S.
6. SLAMON DJ, CLARK GM, WONG SG et al. Human breast cancer : correlation of relapse and survival with amplification of the HER 2/neu oncogene. *Science* 1987 ; **235**(4785):177-82.
7. BASELGA J, ALBANEJ J. Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies. *Annals of oncology* 2001 ; **12** Suppl 1:S35-S41.
8. VIDAL 2002. Le dictionnaire. Les éditions du Vidal. 78^{ème} édition: 849-851.
9. ROSS JS, FLETCHER JA. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells*. 1998 ; **16**(6):413-28.
10. MITCHELL MS, PRESS MF. The role of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization for HER2/neu in assessing the prognosis of breast cancer. *Oncol Semin*. 1999 ; **26**(4 Suppl 12):108-16.
11. CHAFFANET M, CHAUVIN C, LAINE M, BERGER F, CHEDIN M, ROST N, NISSOU M.F, BENABID A.L. EGF receptor amplification and expression in human brain tumors. *Eur. J. Cancer* 1992 ; **28**(1):11-17.
12. FRANK JL, GARB JL, BANSON BB, PETERMAN J, NEIFELD JP, KAY S, KORNSTEIN MJ, SISMANIS A, WARE JL. Epidermal growth factor receptor

- expression in squamous cell carcinoma of the hypopharynx. *Surg Oncol.* 1993 ; 2(3):161-7.
13. GOLDSTEIN NI, PREWETT M, ZUKLYS K, ROCKWELL P, MENDELSOHN J. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res.* 1995 ; 1(11):1311-8.
14. ROBERT F, EZEKIEL MP, SPENCER SA, MEREDITH RF, BONNER JA, KHAZAEILI MB, SALEH MN, CAREY D, LOBUGLIO AF, WHEELER RH, COOPER MR, WAKSAL HW. Phase I study of anti-epidermal growth factor receptor antibody cetuximab in combination with radiation therapy in patients with advanced head and neck cancer. *J Clin Oncol.* 2001 ; 19(13):3234-43.
15. HERBST RS, LANGER CJ. Epidermal growth factor receptors as a target for cancer treatment: the emerging role of IMC-C225 in the treatment of lung and head and neck cancers. *Semin Oncol.* 2002 ; 29(1 Suppl 4):27-36.
16. MERIC JB, FAIVRE S, MONNERAT C, ADI VAGO N, LE CHEVALIER T, ARMAND JP, RAYMOND E. [Zd 1839 "Iressa"]. *Bull Cancer.* 2000 ; 87(12):873-6.
17. DE BONO JS, ROWINSKY EK. The ErbB receptor family: a therapeutic target for cancer. *Trends Mol Med.* 2002 ; 8(4):S19-26.
18. KANTARJIAN H, SAWYERS C, HOCHHAUS A, GUILHOT F, SCHIFFER C, GAMBACORTI-PASSERINI C, NIEDERWIESER D, RESTA D, CAPDEVILLE R, ZOELLNER U, TALPAZ M, DRUKER B. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med.* 2002 ; 346(9):645-52.
19. VUAILLE B. Glivec : une efficacité sur les tumeurs digestives du tissu conjonctif. *Le quotidien du médecin.* 2001 ; 6929:12.
20. PRENDERGAST GC, RANE N. Farnesyltransferase inhibitors: mechanism and applications. *Expert Opin Investig Drugs.* 2001 ; 10(12):2105-16.
21. WASELENKO JK, SHINN CA, WILLIS CR, FLINN IW, GREVER MR, BYRD JC. Carboxyamido-triazole (CAI) a novel "static" signal transduction inhibitor induces apoptosis in human B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma.* 2001 ; 42(5):1049-53.

- 22.KOHN EC, ALESSANDRO R, SPOONSTER J, WERSTO RP, LIOTTA LA. Angiogenesis: role of calcium-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 ; **92**(5):1307-11.
23. SMOLICH BD, YUEN HA, WEST KA, GILES FJ, ALBITAR M, CHERRINGTON JM. The antiangiogenic protein kinase inhibitors SU5416 and SU6668 inhibit the SCF receptor (c-kit) in a human myeloid leukemia cell line and in acute myeloid leukemia blasts. *Blood.* 2001 ; **97**(5):1413-21.
24. GILES FJ. The vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway: a therapeutic target in patients with hematologic malignancies. *Oncologist.* 2001 ; **6** Suppl 5:32-9.
25. MESTERS RM, PADRO T, BIEKER R, STEINS M, KREUTER M, GONER M, KELSEY S, SCIGALLA P, FIEDLER W, BUCHNER T, BERDEL WE. Stable remission after administration of the receptor tyrosine kinase inhibitor SU5416 in a patient with refractory acute myeloid leukemia. *Blood.* 2001 ; **98**(1):241-3.
- 26.[No authors listed]. Atrasentan prolongs time to progression in prostate cancer patients. *Oncology (Huntingt).* 2001 ; **15**(7):833-917.
27. BAILLY C, LANSIAUX A. [An angiogenesis inhibitor: TNP-470]. *Bull Cancer.* 2000 ; **87**(6):449-54.
28. MUJAGIC H, CHABNER BA, MUJAGIC Z. Mechanisms of action and potential therapeutic uses of thalidomide. *Croat Med J.* 2002 ; **43**(3):274-85.
29. LITTLE RF, WYVILL KM, PLUDA JM, WELLES L, MARSHALL V, FIGG WD, NEWCOMB FM, TOSATO G, FEIGAL E, STEINBERG SM, WHITBY D, GOEDERT JJ, YARCHOAN R. Activity of thalidomide in AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J Clin Oncol.* 2000 ; **18**(13):2593-602.
30. MARX GM, PAVLAKIS N, MCCOWATT S, BOYLE FM, LEVI JA, BELL DR, COOK R, BIGGS M, LITTLE N, WHEELER HR. Phase II study of thalidomide in the treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* 2001 ; **54**(1):31-8.
31. BARLOGIE B, TRICOT G, ANAISSE E. Thalidomide in the management of multiple myeloma. *Semin Oncol.* 2001 ; **28**(6):577-82.
32. EVANS JD, STARK A, JOHNSON CD, DANIEL F, CARMICHAEL J, BUCKELS J, IMRIE CW, BROWN P, NEOPTOLEMOS JP. A phase II trial of marimastat in advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 2001 ; **85**(12):1865-70.

33. PATEL SR, JENKINS J, PAPADOPOLOUS N, BURGESS MA, PLAGER C, GUTTERMAN J, BENJAMIN RS. Pilot study of vitaxin, an angiogenesis inhibitor in patients with advanced leiomyosarcomas. *Cancer*. 2001 ; **92**(5):1347-8.
34. ABE S, KUBOTA T, OTANI Y, FURUKAWA T, WATANABE M, KUMAI K, AKIYAMA T, AKINAGA S, KITAJIMA M. UCN-01 (7-hydroxystaurosporine) inhibits in vivo growth of human cancer cells through selective perturbation of G1 phase checkpoint machinery. *Jpn J Cancer Res*. 2001 ; **92**(5):537-45.
35. WANG H K. Flavopiridol. National Cancer Institute. *Curr Opin Investig Drugs*. 2001 ; **2**(8):1149-55.
36. PARKINSON DR, ABRAMS JS, WIERNIK PH, RAYNER AA, MARGOLIN KA, VAN ECHO DA, SZNOL M, DUTCHER JP, ARONSON FR, DOROSHOW JH, et al. Interleukin-2 therapy in patients with metastatic malignant melanoma: a phase II study. *J Clin Oncol*. 1990 ; **8**(10):1650-6.
37. PARKINSON DR, SZNOL M. High-dose interleukin-2 in the therapy of metastatic renal cell carcinoma. *Semin Oncol*. 1995 ; **22**(1):61-6.
38. FINTOR L. Melanoma vaccine momentum spurs interest, investment. *J Natl Cancer Inst*. 2000 ; **92**(15):1205-7.
39. LIVINGSTON PO. The case for melanoma vaccines that induce antibodies. In: Kirkwood JM, editor: Molecular diagnosis and treatment of melanoma. New-York, NY: Marcel Dekker. 1997.
40. HSUEH EC, GUPTA RK, QI K, MORTON DL. Correlation of specific immune responses with survival in melanoma patients with distant metastases receiving polyvalent melanoma cell vaccine. *J Clin Oncol*. 1998 ; **16**(9):2913-20.
41. HABAL N, GUPTA RK, BILCHIK AJ, YEE R, LEOPOLDO Z, YE W, ELASHOFF RM, MORTON DL. CancerVax, an allogeneic tumor cell vaccine, induces specific humoral and cellular immune responses in advanced colon cancer. *Ann Surg Oncol*. 2001 ; **8**(5):389-401.
42. MORSE MA. Technology evaluation: Theratope, Biomira Inc. *Curr Opin Mol Ther*. 2000 ; **2**(4):453-8.

43. PECHER G, SPAHN G, SCHIRRMANN T, KULBE H, ZIEGNER M, SCHENK JA, SANDIG V. Mucin gene (MUC1) transfer into human dendritic cells by cationic liposomes and recombinant adenovirus. *Anticancer Res.* 2001 ; **21**(4A):2591-6.
44. BELLI F, ARIENTI F, RIVOLTINI L, SANTINAMI M, MASCHERONI L, PRADA A, AMMATUNA M, MARCHESI E, PARMIANI G, CASCINELLI N, et al. Treatment of recurrent in transit metastases from cutaneous melanoma by isolation perfusion in extracorporeal circulation with interleukin-2 and lymphokine activated killer cells. A pilot study. *Melanoma Res.* 1992 ; **2**(4):263-71.
- 45 ROSENBERG SA, YANNELLI JR, YANG JC, TOPALIAN SL, SCHWARTZENTRUBER DJ, WEBER JS, PARKINSON DR, SEIPP CA, EINHORN JH, WHITE DE. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst.* 1994 ; **86**(15):1159-66.
46. BELLDEGRUN A, PIERCE W, KABOO R, TSO CL, SHAU H, TURCILLO P, MOLDAWER N, GOLUB S, DEKERNION J, FIGLIN R. Interferon-alpha primed tumor-infiltrating lymphocytes combined with interleukin-2 and interferon-alpha as therapy for metastatic renal cell carcinoma. *J Urol.* 1993 ; **150**(5 Pt 1):1384-90.
47. LESIMPLE T, MOISAN A, TOUJAS L. Autologous human macrophages and anti-tumour cell therapy. *Res Immunol.* 1998 ; **149**(7-8):663-71.
48. BETJES MG, TUK CW, STRUIJK DG, KREDIET RT, ARISZ L, BEELEN RH. Antigen-presenting capacity of macrophages and dendritic cells in the peritoneal cavity of patients treated with peritoneal dialysis. *Clin Exp Immunol.* 1993 ; **94**(2):377-84.
49. TOUJAS L, DELCROS JG, DIEZ E, GERVOIS N, SEMANA G, CORRADIN G, JOTEREAU F. Human monocyte-derived macrophages and dendritic cells are comparably effective in vitro in presenting HLA class I-restricted exogenous peptides. *Immunology.* 1997 ; **91**(4):635-42.
50. HADDADA H, LOPEZ M, MARTINACHE C, RAGOT T, ABINA MA, PERRICAUDET M. Efficient adenovirus-mediated gene transfer into human blood monocyte-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993 ; **195**(3):1174-83.
51. CHATTERGOON MA, ROBINSON TM, BOYER JD, WEINER DB. Specific immune induction following DNA-based immunization through in vivo transfection

- and activation of macrophages/antigen-presenting cells. *J Immunol.* 1998 ; **160**(12):5707-18.
52. MURPHY G, TJOA B, RAGDE H, KENNY G, BOYNTON A. Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen. *Prostate.* 1996 ; **29**(6):371-80.
53. CELLUZZI CM, MAYORDOMO JI, STORKUS WJ, LOTZE MT, FALO LD JR. Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *J Exp Med.* 1996 ; **183**(1):283-7.
54. TJOA BA, ELGAMAL AA, MURPHY GP. Vaccine therapy for prostate cancer. *Urol Clin North Am.* 1999 ; **26**(2):365-74.
55. LI Z. Targeting HER-2/neu- overexpressing breast cancer cells by an antisense iron responsive element-directed gene expression. *Cancer letters* 2001 ; **174**(2):151-158.
56. SIM BK, MACDONALD NJ, GUBISH ER. Angiostatin and endostatin: endogenous inhibitors of tumor growth. *Cancer Metastasis Rev.* 2000 ; **19**(1-2):181-90.
57. ROCHLITZ C, DRENO B, JANTSCHEFF P, CAVALLI F, SQUIBAN P, ACRES B, BAUDIN M, ESCUDIER B, HEINZERLING L, MORANT R, HERRMANN R, DIETRICH PY, DUMMER R. Immunotherapy of metastatic melanoma by intratumoral injections of Vero cells producing human IL-2: Phase II randomized study comparing two dose levels. *Cancer Gene Ther.* 2002 ; **9**(3):289-95.
58. PELEGRI M. [Second annual meeting of the American Society of Gene Therapy (ASGT)]. *Bull Cancer.* 1999 ; **86**(9):782-6.
59. BONINI C, FERRARI G, VERZELETTI S, SERVIDA P, ZAPPONE E, RUGGIERI L, PONZONI M, ROSSINI S, MAVILIO F, TRAVERSARI C, BORDIGNON C. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science.* 1997 ; **276**(5319):1719-24.
60. HESDORFFER C, AYELLO J, WARD M, KAUBISCH A, VAHDAT L, BALMACEDA C, GARRETT T, FETELL M, REISS R, BANK A, ANTMAN K. Phase I trial of retroviral-mediated transfer of the human MDR1 gene as marrow chemoprotection in patients undergoing high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation. *J Clin Oncol.* 1998 ; **16**(1):165-72.

61. LOENNECHEN T, UTSI E, HARTZ I, LYSAA R, KILDALSEN H, AARBAKKE J. Detection of one single mutation predicts thiopurine S-methyltransferase activity in a population of Saami in northern Norway. *Clin Pharmacol Ther.* 2001 ; **70**(2):183-8.
62. LU Z, ZHANG R, DIASIO RB. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity in human peripheral blood mononuclear cells and liver: population characteristics, newly identified deficient patients, and clinical implication in 5-fluorouracil chemotherapy. *Cancer Res.* 1993 ; **53**(22):5433-8.
63. RIDGE SA, SLUDDEN J, WEI X, SAPONE A, BROWN O, HARDY S, CANNEY P, FERNANDEZ-SALGUERO P, GONZALEZ FJ, CASSIDY J, MCLEOD HL. Dihydropyrimidine dehydrogenase pharmacogenetics in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer.* 1998 ; **77**(3):497-500.
64. HARRIS BE, SONG R, SOONG SJ, DIASIO RB. Relationship between dihydropyrimidine dehydrogenase activity and plasma 5-fluorouracil levels with evidence for circadian variation of enzyme activity and plasma drug levels in cancer patients receiving 5-fluorouracil by protracted continuous infusion. *Cancer Res.* 1990 ; **50**(1):197-201.
65. LOS G, YANG F, SAMIMI G, MANOREK G, GUERORGUIEVA IM, HOWELL S, VAN ERP N, BREAUX JK. Using mRNA expression profiling to determine anticancer drug efficacy. *Cytometry.* 2002 ; **47**(1):66-71.
66. MIRJOLET JF. Rôle de la thymidylate synthase et de P53 dans la résistance cellulaire au 5-fluorouracile. 2000. Université Henri Poincaré, Nancy I. 239 pp.
67. FERGUSON AT, EVRON E, UMBRECHT CB, PANDITA TK, CHAN TA, HERMEKING H, MARKS JR, LAMBERS AR, FUTREAL PA, STAMPFER MR, SUKUMAR S. High frequency of hypermethylation at the 14-3-3 sigma locus leads to gene silencing in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 ; **97**(11):6049-54.
68. VERCOUTTER-EDOUART AS, LEMOINE J, LE BOURHIS X, LOUIS H, BOILLY B, NURCOMBE V, REVILLION F, PEYRAT JP, HONDERMARCK H. Proteomic analysis reveals that 14-3-3 sigma is down-regulated in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 2001 ; **61**(1):76-80.
69. BERTUCCI F, LORIOD B, TAGETT R, GRANJEAUD S, BIRNBAUM D, NGUYEN C, HOULGATTE R. DNA arrays : technological aspects and applications. *Bull cancer.* 2001 ; **88**(3):243-52.

70. SHEVCHENKO A, WILM M, VORM O, MANN M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 1996 ; **68**(5) :850-8.
71. BARTEL P, CHIEN CT, STERNGLANZ R, FIELDS S. Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques.* 1993 ; **14**(6):920-4.
72. COLAS P, BRENT R. The impact of two-hybrid and related methods on biotechnology. *Trends Biotechnol.* 1998 ; **16**(8):355-63.
73. MARSOLIER MC, SENTENAC A. RNA polymerase III-based two-hybrid system. *Methods Enzymol.* 1999 ; **303**:411-22.
74. RAAMSDONK LM, TEUSINK B, BROADHURST D, ZHANG N, HAYES A, WALSH MC, BERDEN JA, BRINDLE KM, KELL DB, ROWLAND JJ, WESTERHOFF HV, VAN DAM K, OLIVER SG. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nat Biotechnol.* 2001 ; **19**(1):45-50.
75. MASSE L. Mémoires biologiques. Sérothèques et biothèques. *Santé publique* 1989 ; **4**:67-72.
76. BOUTOU P. Intérêts de la conservation par le froid d'échantillons biologiques: exemple de la biothèque internationale Jean Mérieux. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en médecine. 1996. Lyon:62-71.
77. Agence Nationale d'Accreditation et d'Evaluation en Santé. Recommendations for cryopreservation of cells tumor tissues to be used for molecular analyses. *Ann Pathol* 2001 ; **21**(2):184-201.
78. LARTIGAU J. Les biothèques médico-légales. Les biothèques, ibid :43-50.
79. ANGELIER N. Données de base des transformations liquide – solide au cours de la congélation des milieux biologiques. 9 ème séminaire Y. Biraud, Sérothèque Rhône-Alpes. Collection Fondation Marcel Mérieux, Lyon, 1986, p 13-23.
80. COUDURIER N, GUIGNIER F, HENNY J, HERVE P, RIBOLI E, SALMI R. Biothèques. *La gazette de la transfusion* 1994 ; **97**:1-12.
81. MAZUR P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* 1977 ; **14**(3):251-272.

82. KARLSSON J, TONER M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials* 1996 ; **17**(3):243-256.
83. HUBEL A, TONER M, CRAVALHO EG, YARMUSH ML, TOMPKINS RG. Intracellular ice formation during the freezing of hepatocytes cultured in a double collagen gel. *Biotechnol Prog* 1991 ; **7**(6):554-559.
84. BELTRAMO P, RAVEAU C, GOTTY M, ROSIN S. Technologie et sécurité du personnel ou prévention des accidents par l'information : Utilisation de l'azote liquide en toute sécurité. *La gazette de la transfusion*. 1997 ; **135**:1-7.
85. LAZARUS HM. Alterations of high molecular weight nuclear RNA following kidney storage. *Exp Mol Pathol.* 1974 ; **21**(2):155-65.

REFERENCES INTERNET

- a. <http://clinicaltrials.gov/ct/gui>
- b. <http://www.biologie.ens.fr/fr/genetiqu/puces/pucesadnframe.html>

ANNEXES

FICHE D'ACCOMPAGNEMENT DES PRELEVEMENTS

Identification du lieu du prélèvement _____ Service _____
Nom du médecin préleveur _____ Email _____
N° de téléphone _____ Numéro de fax _____

Informations concernant le malade

Nom _____ Prénom _____
Date de naissance _____ Sexe _____
N° de dossier clinique _____

Identification du prélèvement

Date et heure _____

N° d'enregistrement du prélèvement au laboratoire _____

Code d'organe _____

Côté (droit ou gauche) _____

Code du type de prélèvement :

- Biopsie	oui	non
- Pièce opératoire	oui	non
- Prélèvement cellulaire	oui	non

Code lésionnel (à remplir par le laboratoire d'anatomie-pathologie) après l'examen microscopique selon le code ADICAP _____

Informations à reporter sur le cryotube au cryomarqueur

- Date du prélèvement_____
- Trois premières lettres du nom et du prénom du patient_____
- Numéro d'enregistrement dans la tumorothèque_____

Identification et signature du document _____

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messager

AS : antisens

ATP : adénosine triphosphate

BCG : bacille calmette guerin

CAI : carboamido-triazole

CDK : cyclin dependant kinase

CCNE : comité consultatif national d'éthique

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CNIL : commission nationale de l'informatique et des libertés

DCI : dénomination commune internationale

DPD : dihydropyrimidine déshydrogénase

EBV : epstein - barr virus

EGF : epidermal growth factor

FEV : fraction d'éjection ventriculaire

bFGF : basic Fibroblast Growth Factor

HER : human epidermal growth factor receptor

ICH : immunohistochemistry

IFN - α : interféron α

IL -2 : interleukine 2

IRE : iron responsive element

IRP : iron regulatory proteins

LMC : leucémie myéloïde chronique

MetAP2 : méthionine aminopeptidase de type 2

ORF : open reading frame

ORL : orthorhinolaryngo

PCR : polymerase chain reaction

PMT : photomultiplicateur

PSA : prostate specific antigen

PSMA : prostate specific membran antigen

rICH : radioimmunohistochemistry

SCF : stem cell factor

SDS : sodium dodécylsulfate

SNP : single nucleotid polymorphism

TIL : tumor infiltrating-lymphocytes

TIMPS : tissue inhibitors of metalloproteinases

TGF : transforming growth factor

TK : thymidine kinase

TPMT : thiopurine méthyltransférase

VEGF : vascular endothelial growth factor

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

TABLEAUX

Tableau I : Principales caractéristiques des différentes puces à ADN	43
---	----

FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique de l'homologie structurale et des ligands des quatre membres de la famille des récepteurs HER	4
Figure 2 : Représentation schématique du mécanisme d'action des inhibiteurs des récepteurs à activité tyrosine-kinase	4
Figure 3 : Représentation schématique d'un des sites d'action de l'imatinib	10
Figure 4 : Représentation schématique de l'effet du gène antisens de la protéine HER 2, intégré dans une séquence d'ADN nommée «Iron Responsive Element» sur le gène codant pour la protéine bax dans les cellules normales	24
Figure 5 : Représentation schématique de l'effet du gène antisens de la protéine HER 2, intégré dans une séquence d'ADN nommée «Iron Responsive Element» sur le gène codant pour la protéine bax dans les cellules tumorales	24
Figure 6 : Voies d'induction contrôlées par P 53	33
Figure 7 : Fonctionnement des puces à ADN	36
Figure 8 : Représentation schématique des niveaux d'expression de 576 gènes dans 11 lignées cellulaires cancéreuses mammaires et 15 échantillons de cancer du sein	40
Figure 9 : Représentation schématique du système du double-hybride	48
Figure 10 : Représentation schématique du système du triple -hybride	49
Figure 11 : Représentation schématique du système du double hybride pol III par la première approche	50

Figure 12 : Représentation schématique du système du double hybride pol III par la seconde approche	51
Figure 13 : Représentation schématique de l'arbre décisionnel des consentements à recueillir avant toute procédure diagnostique ou de recherche lors du prélèvement d'une biopsie	59
Figure 14 : Courbe de refroidissement de l'eau	69
Figure 15 : Représentation schématique de l'effet de la vitesse de refroidissement sur la cristallisation intra et extracellulaire	71
Figure 16 : Diagramme «blocs – actions» de la tumorothèque	76

N° d'identification : PH Nanuy 02 n° 203

TITRE

Importance des tumorothèques dans l'évaluation et la mise en œuvre de nouvelles stratégies diagnostiques et thérapeutiques en cancérologie

Thèse soutenue le 27 Juin 2002

Par Madame Ingrid LABADIE épouse JAUSIONS

RESUME

La «mémoire» biologique que représente les tumorothèques est un outil scientifique d'une valeur reconnue. Une exploration bibliographique des nouvelles approches thérapeutiques anticancéreuses (biothérapie, immunothérapie, thérapie génique) a souligné l'importance scientifique de développer conjointement de nouvelles plates-formes technologiques. Si l'aspect technique à prendre en compte est fondamental pour assurer la qualité de l'échantillothèque, les aspects éthiques et juridiques sont essentiels pour préserver la confidentialité des informations recueillies. L'ensemble de ces données a permis de proposer l'élaboration d'un schéma d'assurance-qualité pouvant servir de réflexion à la mise en place d'une tumorothèque. Etant donné le grand espoir soulevé dans les domaines diagnostique, thérapeutique et fondamental du cancer, cette structure doit être mise en œuvre de la manière la plus efficace possible et être intégrée dans des programmes de recherche fondamentale ou clinique en cancérologie.

MOTS CLES : Tumorothèque - Cryoconservation - Stratégies thérapeutiques - Cancérologie

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Dr J-L. MERLIN	Laboratoire de Recherche en Oncologie Centre Alexis Vautrin	Expérimentale <input type="checkbox"/> Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/> Thème 5