

**RECOMMANDATIONS POUR LA CRYOPRESERVATION
DE CELLULES ET TISSUS TUMORAUX
DANS LE BUT DE REALISER
DES ANALYSES MOLECULAIRES**



La **méthode utilisée pour rédiger les recommandations** a été celle décrite par l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé dans le document “ Les Recommandations pour la Pratique Clinique. Base méthodologique pour leur réalisation en France ” publié en 1999.

L'ensemble du travail a été réalisé sous l'égide de :

- **la Société Française de Pathologie ;**
- **la Société Française d'Hématologie ;**
- **la Société Française de Cancérologie.**

Le **Comité d'Organisation** comprenait :

- le Professeur Jean Jacques VOIGT, Anatomopathologiste, Institut Claudius Regaud, Toulouse, représentant de la Société Française de Pathologie
- le Professeur Jacques BONNETERRE, Oncologue, Centre Oscar Lambret, Lille, représentant de la Société Française de Cancérologie
- le Professeur François SIGAUX, Hématologue, Hôpital Saint-Louis, Paris, représentant de la Société Française d'Hématologie
- le Professeur Françoise THIVOLET, Anatomopathologiste, Hôpital Cardiovasculaire et Pneumologique, Lyon, représentant de la Société Française de Cytologie clinique
- le Professeur Anne JANIN, Anatomopathologiste, Hôpital Saint-Louis, Paris, coordonnatrice
- le Docteur Bernard ASSELAIN, Statisticien, Méthodologiste, Institut Curie, Paris

Le **Groupe de Travail** comprenait :

- Madame Nicole BARDIN, Cadre en Anatomie Pathologique, Hôpital Henri-Mondor, Créteil
- le Docteur Philippe CHAUMET-RIFFAUD, Méthodologiste, Délégation à la Recherche Clinique, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Paris
- le Docteur Anne-Marie CHESNEAU, Anatomopathologiste, Centre Hospitalier, Pontoise
- le Docteur Hubert EGLOFF, Anatomopathologiste, Laboratoire de Pathologie, Clermont-Ferrand
- le Docteur Dominique ELIAS, Chirurgien, Institut Gustave-Roussy, Villejuif
- le Professeur Jean François FLEJOU, Anatomopathologiste, Hôpital Saint-Antoine, Paris
- le Professeur Anne JANIN, Anatomopathologiste, Hôpital Saint-Louis, Paris, coordonnatrice
- le Professeur Jean Philippe MERLIO, Anatomopathologiste, Hôpital Haut-Lévêque, Pessac
- le Docteur Françoise PADILLA-ARENS, Anatomopathologiste, CNAMTS, Le Mans
- Monsieur Gérard PARMENTIER, Union Nationale Hospitalière Privée de Cancérologie.
- le Professeur François PLENAT, Anatomopathologiste, Hôpital de Brabois, Vandœuvre-lès-Nancy
- le Docteur Daniel RICHARD, Médecin Qualiticien, Hôpital Américain de Paris, Neuilly-sur-Seine
- Madame Chantal ROUVROY, Cadre Infirmier, Bloc opératoire, Hôpital Saint-Louis, Paris
- le Professeur Gilles SALLES, Hématologiste Clinique, Centre Hospitalier Lyon Sud, Pierre Bénite
- le Docteur Xavier SASTRE-GARAU, Anatomopathologiste, Institut Curie, Paris
- le Docteur Pablo URENA-TORRES, Néphrologue, Clinique de l'Orangerie, Aubervilliers

Le **Groupe de Lecture** comprenait :

- le Docteur Bruno d'ACREMONT, Urologue, Hôpital Saint-Jean de Dieu, Paris
- le Docteur Anne BAGLIN, Anatomopathologiste, Hôpital Foch, Suresnes
- le Docteur Ivan BIECHE, Biologiste Moléculaire, Faculté de Pharmacie, Paris
- le Professeur Jacques BONNETERRE, Oncologue, Centre Oscar Lambret, Lille
- Madame Dominique BONDOUX, Cadre en Anatomie Pathologique, Hôpital Saint-Louis, Paris
- Madame Jeanne BOSSI, Juriste, Commission Nationale Informatique et Liberté, Paris
- le Professeur Elisabeth BRAMBILLA, Anatomopathologiste, Hôpital Michallon, Grenoble

- le Professeur Nicole BROUSSE, Anatomopathologiste, Hôpital Necker, Paris
- Monsieur Christophe CATALA, Directeur des Finances et de la Qualité, Hôpital Saint-Antoine, Paris
- le Docteur Philippe CHEMALY, Anatomopathologiste, Laboratoire de la Roquette, Paris
- le Docteur Bruno CLEMENT, Chargé de mission, Direction de Technologie, Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie, Paris
- le Professeur Jean Michel COINDRE, Anatomopathologiste, Institut Bergonié, Bordeaux
- le Professeur Olivier CUSSENOT, Urologue, Hôpital Saint-Louis, Paris
- le Professeur Jacques DAUPLAT, Chirurgien, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand
- le Professeur Georges DELSOL, Anatomopathologiste, Hôpital Purpan, Toulouse
- Madame Jeanne-Hélène DI DONATO, Responsable Banque de Tissus pour la recherche, Association Française des Myopathies
- le Professeur Jacques DIEBOLD, Anatomopathologiste, Hôtel-Dieu, Paris
- le Docteur Didier DROMER, Chirurgien Digestif, Polyclinique Saint-Claude, Saint-Quentin
- Monsieur Marc DUPONT, Juriste, Directeur des Droits du Malade, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Paris
- le Professeur Bernard GOSSELIN, Anatomopathologiste, Hôpital Calmette, Lille
- le Professeur Jean Alexis GRIMAUD, Biologiste Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique, Paris
- le Professeur Jacques HASSOUN, Anatomopathologiste, Institut Paoli-Calmette, Marseille
- le Professeur Jean Jacques HAUW, Anatomopathologiste, Hôpital de La Pitié - Salpêtrière, Paris
- le Docteur François HIRSCH, Directeur de Recherche, Responsable Qualité Recherche, INSERM, Paris
- Monsieur Jean de KERVASDOUE, Economiste, Conservatoire National des Arts et Métiers, Paris
- le Docteur Chantal KALIFA, Oncologue Pédiatre, Institut Gustave-Roussy, Villejuif
- le Professeur Hélène MERLE BERAL, Hématologue Biologique, Hôpital de La Pitié - Salpêtrière, Paris
- le Docteur Bach Nga PHAM, Hématologue Biologique, Hôpital Beaujon, Paris
- le Docteur Vuong PHAT, Anatomopathologiste, Hôpital Saint-Michel, Paris
- Monsieur Gilbert POIRET, Cadre Infirmier, Institut Curie, Paris
- le Docteur Louis RECHAUSSAT, Directeur des projets, coordonnateur CABRI, INSERM, Paris
- le Professeur Benoit SCHLEMMER, Réanimateur Médical, Hôpital Saint-Louis, Paris
- Madame Andrée SONTOT, Juriste, Bureau des Ressources Génétiques, Institut National de la Recherche Agronomique, Paris
- Madame Dominique THOUVENIN, Juriste, Centre d'Études du Vivant, Université Paris VII, Paris
- le Professeur Jean Jacques VOIGT, Anatomopathologiste, Institut Claudius-Regaud, Toulouse
- le Docteur Gérard ZALCMAN, Oncologue, Institut Curie, Paris
- le Docteur Laurent ZERAT, Anatomopathologiste, Laboratoire Victor Hugo, Paris

La recherche documentaire a été effectuée par :

- Madame Guillemette UTARD-WLERICK, responsable du Service de Documentation de l'Institut Universitaire d'Hématologie, Université de Paris VII
- Madame Marie GARREAU, responsable de la Recherche Documentaire de Pathologie, Bibliothèque J Delarue, Faculté de Médecine Cordeliers, Université de Paris VI
- le Docteur Philippe BERTHEAU, Anatomopathologiste
- le Docteur Marjan DANESHPOUY, Hématologue
- Monsieur François PLASSAT, Biologiste Moléculaire

La sélection des articles pour la rédaction de l'argumentaire a été réalisée par :

- le Professeur François PLENAT, Anatomopathologiste
- le Docteur Pablo URENA-TORRES, Néphrologue
- le Professeur Anne JANIN, Anatomopathologiste
- le Docteur CHAUMET -RIFFAUD, Méthodologiste

- le Docteur Bernard ASSELAIN, Statisticien, Méthodologiste

Messieurs PLENAT, URENA-TORRES et CHAUMET-RIFFAUD et madame JANIN appartenaient au groupe de travail. Monsieur ASSELAIN, méthodologiste, appartenait au Comité d'Organisation.

La méthode utilisant des grilles de lecture n'a finalement pas été retenue car le thème et le faible nombre de références ne s'y prêtaient pas.

La **rédaction de l'argumentaire** a été réalisée par madame JANIN et monsieur PLENAT avec l'aide de messieurs PARMENTIER et SASTRE-GARAUD pour les modèles préalables à l'étude des coûts, et avec l'aide de mesdames BOSSI et THOUVENIN et de messieurs CHAUMET-RIFFAUD et DUPONT pour les parties juridiques.

RECOMMANDATIONS

I. INTRODUCTION

Dans l'organisation des soins en oncologie et oncohématologie, les analyses moléculaires contribuent à établir le diagnostic, à dépister précocement rechutes et récidives et à établir des facteurs pronostiques. Elles sont, dans ces domaines, le complément des analyses structurales cellulaires et tissulaires. **Leurs indications dans la pratique médicale ne font pas l'objet des présentes recommandations. On se reportera pour ces indications aux recommandations des sociétés scientifiques et des organisations professionnelles habilitées.**

Par contre, la réalisation de nombreuses analyses moléculaires se fait à partir de cellules et tissus congelés, mais la conduite à tenir pour la prise en charge et la gestion des prélèvements cellulaires et tissulaires n'est pas univoque. Il est donc nécessaire de bien préciser les conditions de prise en charge et la gestion de ces prélèvements.

Ces recommandations professionnelles ont pour but:

1. de préserver la possibilité de réaliser des analyses tissulaires et des analyses moléculaires fiables sur tout prélèvement tumoral effectué dans un but diagnostique. Ces analyses tissulaires et moléculaires peuvent être faites dans l'intérêt du patient (recherche d'éléments diagnostiques, de facteurs pronostiques, d'éléments prédictifs de la réponse aux traitements), dans le cadre d'études épidémiologiques ou d'études fondamentales.
2. d'intégrer ces données dans l'organisation des soins pour permettre la réalisation d'examen complémentaires de qualité à partir des prélèvements tumoraux, quels que soient le lieu et la structure de soins où le malade est pris en charge.

En l'absence de précision, les recommandations proposées reposent sur un accord professionnel.

II. RECOMMANDATIONS POUR LE RECUEIL, L'ACHEMINEMENT, LE CONDITIONNEMENT, LA CONSERVATION, LE SUIVI ET LA DISTRIBUTION DES CELLULES ET TISSUS TUMORAUX CONGELES POUR REALISATION D'ANALYSES MOLECULAIRES

L'ensemble des processus décrits dans ce document doit être réalisé en conformité avec les bonnes pratiques en anatomie et cytologie pathologiques et dans les laboratoires de biologie médicale (GBEA).

La garantie de la qualité des cellules et tissus tumoraux cryopréservés implique le respect d'un certain nombre de recommandations :

- il est essentiel que le délai entre le prélèvement et la congélation de cellules ou tissus tumoraux soit court pour la préservation des ARN dont la demi vie peut être de l'ordre de quelques minutes ;
- pour les analyses qui nécessitent une étape de mise en culture de cellules ou tissus, les manipulations du prélèvement doivent le protéger des contaminations et les procédures de congélation doivent préserver la viabilité des cellules ;
- un contrôle microscopique de la nature de la lésion et de la représentativité des prélèvements congelés est indispensable avant toute analyse moléculaire.

II.1. Le recueil et l'acheminement des prélèvements

La prise en charge des prélèvements doit être effective et minutée dès que l'exérèse, la biopsie ou la ponction ont été réalisées.

Pour les analyses qui nécessitent une étape de mise en culture de cellules ou tissus, les manipulations du prélèvement doivent préserver des contaminations (matériel stérile).

Le délai entre le recueil du prélèvement et sa congélation doit être connu pour chaque prélèvement. Il doit être le plus court possible. Chaque prélèvement doit être accompagné d'une feuille à la date du jour, comportant heure et minute de l'exérèse chirurgicale, de la biopsie ou de la ponction et heure et minute d'arrivée au laboratoire.

Les précautions d'usage dans le transport et les manipulations de ces prélèvements qui sont potentiellement à risque doivent être respectées. Leur traçabilité doit être assurée.

Sauf exception, le recueil et l'acheminement des cellules et tissus tumoraux, avant congélation, s'effectuent à température ambiante.

II.2. Sélection des fragments à congeler

Pour les pièces opératoires, le ou les fragments de la pièce destinés à la congélation sont choisis par un anatomopathologiste en fonction des renseignements cliniques et des données macroscopiques afin de ne pas compromettre le diagnostic.

Pour les biopsies, ce choix est fait sur les données macroscopiques recueillies par le médecin préleveur. Dans tous les cas, le préleveur s'assure qu'un fragment représentatif des lésions, si possible contigu, est fixé pour le diagnostic anatomopathologique microscopique.

Pour les prélèvements cytologiques, l'analyse de la représentativité de l'échantillon congelé doit être réalisée. Il est indispensable qu'une partie du prélèvement fasse l'objet d'un contrôle diagnostique cytopathologique.

Chaque fois que possible, il est souhaitable de congeler un ou plusieurs fragments de tumeur, et un ou plusieurs fragments de tissu macroscopiquement non envahi. Ces différents fragments d'un même prélèvement doivent faire l'objet d'un étiquetage qui les différencie.

II.3. Le conditionnement des prélèvements

Le conditionnement des prélèvements doit être fait par du personnel formé à ces techniques et avec un nombre minimum d'intervenants.

Il est recommandé de conditionner les prélèvements dans des tubes ou des sachets adaptés à la cryogénie, qui ferment hermétiquement et résistent à moins 196°C.

Pour les culots et suspensions cellulaires, le nombre de cellules contenues dans chaque tube doit être connu, ainsi que la composition du milieu de suspension ou du liquide de conservation et le caractère stérile ou non du prélèvement.

Pour les prélèvements tissulaires, il est souhaitable que le fragment soit mis à plat et orienté sur un support rigide qui sera introduit dans le tube ou sachet de congélation. Ceci permet de réaliser plus facilement des coupes lorsque le fragment est congelé. L'addition ou non d'un milieu d'enrobage et l'utilisation de procédures stériles pour la préparation des échantillons doivent être connues.

La congélation doit se faire le plus rapidement possible par immersion du tube ou du sachet dans un fluide réfrigérant. La chaîne du froid ne doit pas être rompue jusqu'à l'utilisation finale du prélèvement.

Pour les analyses qui nécessitent une étape de mise en culture, les procédures de congélation doivent préserver la viabilité des cellules.

Pour les prélèvements destinés à une analyse d'ARN, la rapidité avec laquelle le prélèvement est congelé est essentielle pour la préservation des ARN dont la demi-vie peut être très courte (quelques minutes). De plus, les ribonucléases, présentes au niveau de la peau, sont ubiquitaires et difficiles à inactiver. Elles résistent à l'autoclavage et des précautions sont nécessaires pour prévenir les contaminations. Des gants doivent être portés pour toute manipulation et changés autant que nécessaire afin d'éviter toute contamination. Le matériel destiné à entrer en contact avec les tissus doit être stérile, ou à usage unique, ou traité avec un liquide dépourvu de ribonucléases. Lorsque les prélèvements destinés à une analyse d'ARN nécessitent un liquide de conservation, celui-ci doit être libre de ribonucléases.

L'identification du prélèvement doit être faite sur le tube ou le sachet en veillant à l'emploi de moyens adéquats pour préserver la lisibilité (caractères de taille suffisante, majuscules, encre noire permanente, crayons et/ou étiquettes cryogéniques). Une double identification du prélèvement est recommandée chaque fois que possible avec à la fois le numéro d'enregistrement au laboratoire, et au moins les trois premières lettres du nom du malade inscrites en majuscules. Ceci a pour but d'assurer la traçabilité du prélèvement.

II.4. La conservation des prélèvements

La conservation des prélèvements soit en azote liquide, soit en vapeurs d'azote liquide, soit en congélateur garantissant le maintien d'une température inférieure à moins 70°C est indispensable (grade B).

Un enregistrement continu écrit de la température des congélateurs doit assurer la traçabilité de la chaîne du froid.

Les appareils de conservation doivent être placés dans une pièce fermant à clé et climatisée avec un système d'alarme garantissant le maintien de la température requise. A 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.

Une procédure doit être mise en place pour la vérification régulière des dégivrages, des températures indiquées, du bon état de marche de l'enregistrement des températures et des alarmes.

Il faut établir également des procédures décrivant ce qui doit être fait et par qui, lorsqu'un congélateur ou une cuve d'azote tombe en panne. Il faut afficher ces procédures à côté du congélateur ou de la cuve.

II.5. La traçabilité des prélèvements

La traçabilité est " l'ensemble des informations et mesures prises pour suivre et retrouver rapidement l'ensemble des étapes allant de l'examen clinique du donneur à l'utilisation de cet élément ou produit du corps humain, en passant par le prélèvement, la transformation, la conservation, le transport, la distribution " (JO 22 octobre 1995).

Elle passe par la tenue de documents écrits parfaitement archivés : cahiers de laboratoires, modes opératoires, procédures.

Elle doit être assurée dans tous les cas, notamment :

- lorsqu'il y a des prélèvements successifs pour un même malade ;
- lorsqu'un même prélèvement fait l'objet de plusieurs analyses successives.

II.6. La distribution des prélèvements intra et interlaboratoires pour la réalisation des analyses moléculaires

Il est essentiel qu'aucune analyse complémentaire ne soit réalisée sur un prélèvement tumoral sans qu'il n'y ait eu un contrôle anatomopathologique microscopique préalable. Ce contrôle permet de vérifier que le prélèvement concerne bien une zone tumorale et apprécie la qualité du tissu (cellularité, proportion de cellules tumorales, nécrose...).

En cas de transmission de matériel sous forme congelée, et non sous forme d'ADN ou d'ARN, il faut veiller à éviter une rupture de la chaîne du froid.

Une information systématique sur la qualité du matériel congelé doit être assurée. Toute anomalie majeure doit entraîner une enquête.

Il est recommandé qu'une information sur l'utilisation scientifique des prélèvements soit renvoyée au centre transmetteur.

Il est recommandé qu'à l'échelon local, une charte des utilisateurs soit constituée et diffusée.

III. LISTE DES INFORMATIONS MINIMALES COMMUNES ASSOCIEES A CHAQUE PRELEVEMENT

L'exhaustivité, la pertinence et la véracité des données cliniques, cytologiques et anatomopathologiques associées aux prélèvements d'une banque de cellules et tissus tumoraux cryopréservés conditionnent la qualité de cette banque. La gestion informatique de ces informations est indispensable pour rechercher un ou plusieurs prélèvements à partir de clés de tri simples comme les codes lésionnels ou le type d'organe. Pour que cette gestion soit réalisable en pratique courante, les informations doivent être communes et peu nombreuses.

Le transfert des échantillons en dehors du site où a été réalisé leur conditionnement doit se faire dans le respect des textes législatifs et réglementaires qui s'y rapportent. Les recommandations énoncées dans ce chapitre sont donc susceptibles d'être modifiées par la publication de nouveaux textes législatifs et réglementaires après la publication de ces recommandations.

Pour chaque prélèvement dans le laboratoire où le conditionnement du prélèvement a été réalisé :

- a . Identification du Laboratoire et/ou de l'établissement où le prélèvement a été réalisé.
- b. Informations concernant le malade :
 - * Nom marital et patronymique chaque fois que possible
 - * Prénom
 - * Date de naissance
 - * Sexe
 - * Numéro de dossier clinique, si disponible
- c. Identification du prélèvement :
 - * Date du prélèvement
 - * Numéro d'enregistrement du prélèvement au laboratoire
 - * Code d'organe
 - * Coté (droit ou gauche)
 - * Code du type de prélèvement (biopsie, pièce opératoire, prélèvement cellulaire)
 - * Code lésionnel à saisir après l'examen microscopique selon le code ADICAP et/ou CIM 10
- d. Eléments de gestion pour chaque prélèvement :
 - * Nature et nombre des contenants (tubes, sachets)
 - * Nombre total de cellules par tube pour les échantillons cellulaires
 - * Délai avant congélation : la noter en minutes, sinon heure présumée du prélèvement, heure et minute de la congélation
 - * Méthode de congélation (température, par paliers ou en un temps; stérile ou non; milieu d'enrobage ou de conservation)
 - * Nom du médecin et/ou du technicien ayant congelé le prélèvement
 - * Localisation dans le système de stockage
- e. Traçabilité du prélèvement :
 - * Nécessité d'une procédure déterminant les droits d'accès et de modification, de traçabilité et de validation
 - * Nécessité d'une procédure identifiant les acteurs (personnes responsables du prélèvement, de la congélation, de la saisie, de la validation)
 - * Les logiciels devront disposer de contrôles de cohérence pour éviter d'enregistrer plusieurs fois un même échantillon
 - * Recherche systématique de l'existence d'autres fiches pour le même malade
 - * Mémorisation des analyses successives réalisées (date, nombre de coupes ou de tubes utilisés, destinataire). Procédure pour indiquer le nombre de tubes restant disponibles après chaque opération de sortie
 - * Information sur le décès éventuel du patient
 - * Identification des échantillons à conserver dans le cadre d'un protocole
 - * Identification des prélèvements exceptionnels

IV. REGLES DE TRANSPORT DES CELLULES ET TISSUS CRYOPRESERVES ET REGLES DE TRANSFERT DES DONNEES NOMINATIVES CORRESPONDANT AUX PRELEVEMENTS

IV.1. Règles de transport des cellules et tissus cryopréservés

IV.1.1. Les autorisations d'importation et d'exportation de tissus et de cellules du corps humain pour des fins scientifiques sont accordées à un établissement ou un organisme privé ou public par le Ministre chargé de la Recherche au vu d'un dossier dont le contenu est spécifié par décret. Ces autorisations sont régies par les articles R 673-10-8 et R 673-10-13 à R 673-10-15 du Code de la Santé publique.

IV.1. 2. La loi n° 98-535 du 1er juillet 1998, relative au renforcement de la veille sanitaire et du contrôle de la sécurité sanitaire des produits destinés à l'homme, précise que seules peuvent importer ou exporter des échantillons biologiques les personnes morales ou physiques dont l'activité comporte des analyses de biologie médicale, des examens d'anatomo-cytopathologie, des expertises judiciaires ou des contrôles de qualité ou d'évaluation.

IV.2. Règles du transfert de données nominatives portant sur les prélèvements dans le cadre de recherches dans le domaine de la santé

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

IV.2.1. Pour l'envoi des données nominatives sur le territoire national

En application de la loi n° 94-548 du 1er 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, individuellement informées: de la nature des informations transmises, de la finalité du traitement de 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 troisième 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. (article 40-5 de la loi n° 78-17 du 6 janvier 1978”

Une fiche type d'information au malade est proposée en annexe.

IV. 2. 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'Etat destinataire apporte une protection équivalente à la loi française (article 40-9 de la loi n° 78-17 du 6 janvier 1978).

V. ANNEXES

V.1. Annexe 1 : Proposition de modèle de fiche de transmission des prélèvements cellulaires ou tissulaires entre le site de prélèvement et le site de congélation.

- Date du jour
- Identification du préleveur
- Nom du malade, marital et patronymique chaque fois que possible
prénom, date de naissance, sexe
numéro de dossier chaque fois que possible
- Nature de l'intervention
- Organe, côté
- Selon l'intervention, heure et minute de la dévascularisation, ou heure et minute de l'excision, ou de la biopsie, ou de la ponction
- Heure et minute de l'arrivée au laboratoire
- Nom de la personne ayant acheminé le prélèvement

V.2. Annexe 2 : Rappel de l'état de la législation sur les transferts de données nominatives sans finalité thérapeutique pour le patient

La loi n° 94-548 du 1er 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, concerne tous les traitements automatisés de données directement ou indirectement nominatives ayant pour fin la recherche dans le domaine de la santé.

Elle autorise les membres des professions de santé à transmettre les données qu'ils détiennent dans le cadre d'un traitement informatisé de données nominatives dans un but de recherche.

Lorsque ces données permettent l'identification des personnes, elles doivent être codées avant leur transmission, sauf pour les études de pharmacovigilance, les protocoles de recherche réalisés dans le cadre d'études coopératives nationales ou internationales, ou si une particularité de la recherche l'exige.

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 veille à la sécurité des informations et de leur traitement, ainsi qu'au respect de la finalité de celui-ci.

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, individuellement informées :

- de la nature des informations transmises
- de la finalité du traitement des données
- des personnes physiques ou morales destinataires des données
- du droit d'accès et de rectification
- du droit d'opposition
- 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.

V.3. Annexe 3 : Proposition de modèle d'information au patient pour 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 des prélèvements de tissu (selon le cas, préciser le tissu).

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 sur les prélèvements pourra être demandée à : noms, téléphone.

Etiquette avec numéro d'identification patient.

Document remis le :

Signature de la personne qui a délivré l'information

ARGUMENTAIRE

I. MODALITES DE RECHERCHE DES DONNEES DE LA LITTERATURE

I.1. Les banques de données Medline, Pubmed (version Ovid) et Current Contents (version Ovid) ont été interrogées depuis 1986 avec les mots-clés suivants :

(tissue bank NOT (animal OR graft* OR allograft* OR bone)) AND ((rna (All Fields) AND purification (All Fields))), (tissue bank AND cryopreservation), (tissue bank AND neoplasms).

I. 2. Les métamoteurs de recherche savysearch.com et metacrawler.com ont été utilisés pour interroger les sites Internet utilisant les moteurs de recherche suivants : About.com, AltaVista, DirectHit, Excite, Google, Go To.com, Infoseek, LookSmart, Lycos, RealNames, Thunderstone, Webcrawler. Ces métamoteurs de recherche ont été interrogés depuis 1986 avec les mêmes termes :

(tissue bank NOT (animal OR graft* OR allograft* OR bone)) AND ((rna (All Fields) AND purification (All Fields))), (tissue bank AND cryopreservation), (tissue bank AND neoplasms).

I. 3. Des documents de référence ont été analysés :

- les principes de l'OCDE de bonnes pratiques de laboratoire (tels que révisés en 1997). Monographie OCDE 45 sur l'environnement
- les documents de l' ATCC (American Type Culture Collection) Quality Control Methods for cell lines
- les recommandations de la National Bioethics Advisory Commission (" The use of human biological materials in research: ethical issues and policy guidance ")
- les documents du National Cancer Institute, National Institute of Health, Bethesda, MD., en particulier " Recommended policies for uses of human tissue in research, education and quality control " Pathologists consensus statement, 1997

II. ANALYSE DE LA LITTERATURE DISPONIBLE

II.1. Préambule

L'ensemble des publications traitant des banques de cellules et tissus tumoraux cryopréservés correspondent à des recommandations de Sociétés savantes, des accords professionnels ou des comparaisons méthodologiques. Il n'a pas été publié dans ce domaine d'essais comparatifs randomisés de forte puissance.

Toutes les publications insistent sur l'importance capitale de la constitution et la gestion de ces banques de cellules et tissus tumoraux, selon des critères de qualité rigoureux, à la fois pour les analyses moléculaires à visée diagnostique et pronostique, donc d'un intérêt immédiat pour le malade, et pour la recherche.

Il est apparu nécessaire de proposer une étude économique, car aucun schéma d'étude de coût n'est publié dans la littérature

Les aspects bioéthiques et réglementaires sont codifiés différemment selon les pays. Il existe en particulier des différences notables entre la France et les Etats-Unis pour le concept de l'anonymat, les autorisations de commercialisation des produits d'origine humaine et les consentements à demander aux malades pour l'utilisation des cellules et tissus tumoraux pour la recherche.

II.2. Résultats de la recherche documentaire : données quantitatives

Le nombre de références obtenues par les banques de données Medline, Pubmed (version Ovid) et Current Contents (version Ovid) ainsi que par les sites internet interrogés par les moteurs de recherche About.com, AltaVista, DirectHit, Excite, Google, Go To.com, Infoseek, LookSmart, Lycos, RealNames, Thunderstone, Webcrawler depuis 1986 a été de :

- 31 avec les mots-clés (tissue bank NOT (animal OR graft* OR allograft* OR bone)) AND ((rna (All Fields) AND purification (All Fields)))
- 55 avec les mots clés (tissue bank AND cryopreservation)
- 33 avec les mots clés (tissue bank AND neoplasms)

Trente cinq références ont finalement été retenues pour la rédaction de l'argumentaire.

II.3. Résultats de la recherche documentaire : données qualitatives

Pour l'analyse des données de la littérature, la méthode utilisant des grilles de lecture n'a finalement pas été retenue car le thème et le faible nombre de références ne s'y prêtaient pas.

II.3.1 Williams C, Ponten F, Moberg C, Soderkvist P, Uhlen M, Ponten J, Sitbon G, Lundenberg J. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. Am J Pathol 1999 ;155:1467-71

Cet article récent est un article purement méthodologique qui compare les résultats des analyses moléculaires génomiques faites sur un fragment congelé et sur un fragment fixé au formol obtenus à partir d'une même tumeur humaine (carcinome basocellulaire). Des échantillons cellulaires quantifiés à partir de zones tumorales microdisséquées ont fait l'objet d'amplification par PCR et de séquençage direct de l'ADN. Le carcinome basocellulaire de référence était connu pour avoir deux mutations.

L'analyse des résultats montre que les PCR faites à partir de fragments fixés au formol n'amplifiaient pas les exons qui correspondaient aux fragments les plus longs (350 paires de bases), alors que tous les exons étaient amplifiés pour tous les échantillons cellulaires prélevés à partir du fragment congelé.

L'analyse des séquences retrouvait seulement les deux mutations connues du carcinome basocellulaire dans les échantillons cellulaires prélevés sur le fragment congelé. Par contre dans les échantillons cellulaires prélevés à partir du fragment fixé au formol, l'analyse des séquences retrouvait, outre les deux mutations connues, une mutation artificielle pour 500 bases.

Une série de contrôles faite à la fois sur les méthodes de PCR et de séquençage, et sur d'autres tumeurs fixées au formol dans différents laboratoires de pathologie, a permis de conclure que ces mutations artificielles étaient dues à la fixation formolée.

Cette publication souligne l'importance primordiale de la congélation des tissus tumoraux en vue des analyses moléculaires.

II.3.2 Finkelstein SD, Dhir R, Rabinovitz M, Bischelia M, Swalsky PA, DeFlavia P, Woods J, Bakker A, Becich M. Cold-temperature plastic resin embedding of liver for DNA- and RNA-based genotyping. J Mol Diagn 1999;1:7-22.

Cet article récent est également purement méthodologique. Il expose l'intérêt d'une technique d'enrobage tissulaire dans une résine polymérisant à froid pour l'extraction d'ADN et d'ARN pour les analyses moléculaires. L'enrobage en résine hydrophile facilite la réalisation de coupes et donc l'analyse microscopique des lésions tissulaires. Le fait que ces résines polymérisent à froid permet d'éviter la dénaturation des acides nucléiques tissulaires. Les auteurs ont ainsi pu extraire de longs fragments d'ADN comme d'ARN (supérieurs à 300 paires de base) d'échantillons cellulaires microdisséqués à partir de biopsies hépatiques pathologiques. Le nombre d'échantillons analysés n'est pas cité. Les résultats sont purement qualitatifs et orientés sur les analyses moléculaires.

L'enrobage en résines hydrophiles polymérisant à froid apparat donc comme une possibilité de cryoconservation des cellules et tissus pathologiques en vue d'analyses moléculaires.

II.3.3 *Ichikawa M, Sasaki K, Ishikawa A. optimal preparatory procedures of cryofixation for immunocytochemistry. J Electron Microsc Tech 1989 ;12:88-94.*

Cet article, bien que publié dix ans auparavant, est à rapprocher du précédent. En effet, les auteurs préconisent la cryosubstitution et l'inclusion en résine hydrophile polymérisant à froid (Lowicryl K4M) plutôt que la fixation aldéhydique classique pour préserver les protéines tissulaires. Comme dans l'article précédent, les auteurs donnent des résultats qualitatifs en comparant les deux méthodes de préparation à l'immunomarquage, mais ne précisent pas combien de prélèvements ils ont étudiés en parallèle.

II.3.4 *American Type Culture Collection Quality Controls for cell lines, Rockville, MD.*

Ce document est établi par une grande institution américaine privée, sans but lucratif, dédiée à " la collection, la préservation et la distribution de cultures authentifiées de microorganismes vivants, de virus, de sondes d'ADN, de plantes et de cellules animales et humaines ".

Cette organisation pratique et finance des recherches technologiques pour améliorer et standardiser les méthodes de caractérisation, traitement, conservation et distribution des types d'échantillons qu'elle gère. A ce titre, elle publie des recommandations pour les procédures de recueil, traitement, conservation et distribution des échantillons cellulaires humains.

II.3.5 *Shannon JE, Macy ML. Freezing, storage, and recovery of cell stocks. In: Tissue Culture:Methods and Applications, edited by PF Kruse and MK Patterson, pp 712-718, Academic Press, New York, 1973.*
Hay PJ. Preservation of cell culture stocks in liquid nitrogen. Tissue Culture Association Manual 1978 ;4:787-790.

Ces deux documents détaillent les procédures pour la congélation, la conservation et la remise en culture de lignées cellulaires.

Tous les prélèvements cellulaires destinés à la culture doivent en particulier être traités le plus rapidement possible, dans des conditions stériles, avec le milieu de conservation approprié et la congélation comme la décongélation doivent se faire par paliers.

II.3.6 *Les principes de l'OCDE de bonnes pratiques de laboratoire (tels que révisés en 1997). Monographie OCDE 45 sur l'environnement.*

Ce document de 14 pages publié par l'Organisation de Coopération et de Développement Economique a été réalisé par un comité spécialisé comprenant des représentants des 29 pays industrialisés d'Amérique du Nord, d'Europe et du Pacifique membres de l'OCDE, ainsi que de représentants de la Commission européenne. Ces principes de bonne pratique de laboratoire font partie d'un travail de la Division de l'Hygiène et de la Sécurité de l'environnement. Ils détaillent le programme d'assurance qualité recommandé pour la manipulation et l'utilisation de produits chimiques et biologiques (animaux et végétaux).

Ce document comporte également les actes du Conseil de l'OCDE pour la vérification du respect des principes de bonnes pratiques de laboratoire. Ceci s'intègre dans le cadre d'un programme inter-organisations pour la gestion rationnelle des produits chimiques pour la santé et l'environnement.

II.3.7 *Grizzle WE, Polt SS. Guidelines to avoid personnel contamination by infective agents in research laboratories that use human tissues. J Tiss Cult Meth 1998;11:191-8*

Ce document reprend les règles de bonne pratique de laboratoire en matière de contamination par des agents infectieux pour les laboratoires traitant des tissus humains.

II.3.8 *Lazarus HM. Alterations of high molecular weight nuclear RNA following kidney storage. Exp Mol Pathol 1974 ;21:155-65.*

Cet article relativement ancien a le mérite d'être un des premiers à démontrer expérimentalement le rôle du temps d'ischémie chaude dans la dégradation des ARN tissulaires.

Les auteurs étudient l'intégrité de l'ARN nucléaire dans une série de reins de souris, en extrayant immédiatement l'ARN d'un des reins, alors que l'autre est maintenu une heure à +37°C avant l'extraction

d'ARN. Ils montrent une baisse de 50% des ARN de haut poids moléculaire dans les reins maintenus une heure en ischémie chaude.

*II.3.9. Mariatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory 1995.
Lewin B. Control of RNA processing. In: Genes VI, pp 921-935, Oxford University Press, 1997.*

Ces documents reprennent l'ensemble des données concernant les procédures d'assurance qualité à suivre pour extraire les ARN de tissus normaux ou tumoraux et pour les conserver. Ils insistent en particulier sur la grande taille et l'instabilité des ARN nucléaires hétérogènes dont la demi vie est de quelques minutes à une heure; sur l'importance d'éviter les contaminations; sur la nécessité d'éviter le contact avec les RNAses cutanées.

II.3.10. Gramza AW, Lucas JM, Mountain RE, Schuller DE, Lang JC. Efficient method for preparing normal and tumor tissue for RNA extraction. Biotechniques 1995 ;18:2282-31.

Cet article décrit une méthode d'extraction des ARN adaptée aux tissus tumoraux humains. En effet, ceux ci doivent être pris en charge dès leur exérèse au bloc opératoire et sont souvent des fragments de petite taille.

II.3.11 Aso Y, Kawamura M, Hamaguchi Y, Shioiri T, Mitsuhashi M. Rapid, stable ambient storage of leukocytes RNA from whole blood. Clin Chem 1998 ;44:1782-3.

Les auteurs de cet article proposent une méthode rapide de purification d'ARN intact à partir de sang total. Les leucocytes sont séparés par centrifugation conventionnelle en gradient de densité. Les cellules en suspension sont filtrées à travers une membrane en fibres de verre. Cette membrane est très rapidement séchée sous vide. Des ARN de haute qualité sont obtenus à partir de ces membranes, même lorsque celles ci ont été stockées deux semaines à température ambiante.

L'intérêt de cette méthode est qu'elle est réalisable dans les conditions habituelles où sont prélevés les malades.

II.3.12. Farkas DH, Kaul K, Wiedbrauk DL, Kiechle FL. Specimen collection and storage for diagnostic molecular pathology investigation. Arch Pathol Lab Med 1996;120:591-6.

Cette revue est tirée d'un travail réalisé par le College of American Pathologists sur le thème " Patient preparation and specimen handling " pour définir des critères d'accréditation pour les laboratoires.

Elle traite plus spécifiquement des conditions de stockage de l'ADN et de l'ARN extraits des tissus pathologiques. Les températures optimales de conservation et les précautions à prendre pour éviter les contaminations par les protéases spécifiques des acides nucléiques sont très étudiées.

*II.3.13. Eymen C. Freezing storage of whole brain preparations. J Neural Transm 1993; S39:130-1
Gill SS, Aubin RA, Bura CA, Curran IH, Matula TI. Ensuring recovery of intact RNA from rat pancreas. Mol Biotechnol 1996,3:359-62.
Damen M, Sillekens P, Sjerps M, Melsert R, Frantzen I, Reesink HW, Lelie PN, Cuypers HT. Stability of hepatitis C virus RNA during specimen handling and storage prior to NASBA amplification. J Virol Methods 1998;72:175-84*

Ces trois articles complètent les données de l'article précédent sur l'influence des température de stockage sur la conservation des acides nucléiques cellulaires et tissulaires. Ils font l'objet d'une analyse comparative dans le tableau récapitulatif ci dessous.

II.3.14. Burke HB, Henson DE. Specimen banks for cancer prognostic factor research. Arch Pathol Lab Med 1998;122:871-4.

Cet article est écrit par un bioinformaticien et un médecin du département de prévention du cancer du National Cancer Institute. A partir de l'analyse des éléments nécessaires pour réaliser une recherche sur un facteur pronostique de cancer, ils analysent le fonctionnement en réseau des banques de tissus pathologiques américaines. La qualité et l'exhaustivité des données cliniques associées aux prélèvements sont discutées, ainsi que les contrôles possibles de ces données. L'acquisition, la préparation, le stockage et la cession des prélèvements tissulaires sont également détaillés, en soulignant l'importance des contrôles d'assurance qualité pour un fonctionnement en réseau. Enfin les auteurs soulignent que c'est la connaissance des méthodes d'analyse tissulaire employées pour rechercher un facteur pronostique qui conditionne le type de banque

tissulaire qu'il faut solliciter (tissus fixés pour l'immunohistochimie, tissus congelés pour les analyses moléculaires).

II.3.15 Clauzen KP, Grizzle WE, LiVolsi V, Newton WA, Aamodt R. The cooperative human tissue network. Cancer 1989; 63:1452-5.

LiVolsi VA, Clausen KP, Grizzle W, Newton W, Pretlow TG, Aamodt R. The cooperative human tissue network. An update. Cancer 1993; 71:1391-4.

Ces deux articles exposent le mode de fonctionnement d'un des premiers réseaux de banques de tissu humain tumoraux.

Fondé en 1987 par le National Cancer Institute, ce réseau a pour but " de stimuler, pour le bien du public, une coopération pour collecter et distribuer des tissus tumoraux humains pour la recherche sur le cancer ". Il associe trois institutions déjà expérimentées en matière de collection et de distribution d'échantillons tissulaires tumoraux, l'University of Alabama à Birmingham, le National Disease Research Interchange avec l'Hospital University of Pennsylvania et la Ohio State University. Les procédures de contrôle de qualité des échantillons et de prévention des infections sont détaillées. Un problème reste en suspens: la cession de ces échantillons à des firmes privées impliquées dans la recherche ou la production de lignées cellulaires tumorales.

Le bilan de 5 ans de fonctionnement est fait dans le deuxième article. Le réseau s'est élargi à cinq institutions, en incluant le Columbus Children's Hospital et la Case Western Reserve University. Ces cinq institutions collectent chacune des prélèvements tumoraux dans un réseau régional. Les échantillons tumoraux sont ensuite distribués aux équipes de recherche. En 5 ans, 29 000 fragments tumoraux ont été transmis à 500 équipes de recherche sur tout le territoire américain.

Les procédures d'assurance qualité sont désormais plus particulièrement centrées sur la bonne conservation de l'ADN et de l'ARN dans les échantillons tissulaires.

II.3.16. Duyckaerts C, Sazdovitch V, Seilhean D, Delaère P, Hauw JJ. A brain bank in a neuropathology laboratory. J Neural Transm 1993;S39:107-18

Palacin A, Cardoso A; Cardesa A, Cruz-Sanchez F. Brain banks and non nervous tissues. J Neural Transm 1993 ; S39:87-96.

Ces deux articles ont été publiés dans un numéro spécial du Journal of Neural Transmission et reprennent les données d'une réunion internationale pour l'organisation de banques de tissus pour les études neuropathologiques. La nécessité de prélever et de conserver des tissus non nerveux de malades atteints de maladies nerveuses est également soulignée. Ces articles décrivent aussi bien le schéma organisationnel pour réaliser des prélèvements fixés et congelés en vue d'analyses multiples ultérieures, que les procédures de congélation et de conservation des différents tissus.

II.3.17. Naber SP, Andreis CM. Equipment and organization of a frozen tissue bank- an update. Verh Dtsch Ges Pathol 1994; 78:153-60.

Naber SP. Continuing role of a frozen-tissue bank in molecular pathology. Diagn Mol Pathol 1996 ;5:253 :9.

Ces deux articles du même pathologiste américain décrivent l'organisation et les procédures à respecter pour l'organisation d'une banque de tissus congelés en vue d'analyses moléculaires.

Le premier article est destiné à un public de pathologistes germanophones et il a l'originalité de donner quelques notions de coût, pour l'équipement et le consommable. Ces données économiques sont cependant limitées à un tableau dans l'article et sont assez grossières puisque le calcul des consommables ne se fait pas en fonction du nombre de prélèvements traités. Le coût du personnel n'est pas non plus évoqué.

II.3.18 Bardsley JS. Establishment of human tissue banks. Hum Exp Toxicol 1994;13:435-7.

Cet article émane de l'International Institute for Advancement of Medicine, situé en Pennsylvanie. Cet institut sans but lucratif a été créé en 1986 pour organiser l'utilisation scientifique des tissus humains non utilisables pour les greffes. En huit ans, cet institut a transmis plus de 10 000 prélèvements à 300 organisations de recherche. Il est financé par les sommes que paient les chercheurs pour la collection, la préparation et l'envoi des spécimens.

L'auteur expose les difficultés à étendre ce système de banque de tissus en Angleterre, pour répondre plus facilement aux besoins des chercheurs locaux. La législation sur les dons et les cessions d'organes, les règles éthiques et les pratiques professionnelles diffèrent en effet dans les deux pays.

II.3.19. Haimonitz MD. Practical issues in tissue banking. Pathology patterns. 1997;107:Ss75-S81. Supplement to the American Journal of Clinical Pathology.

Cet article est écrit par un médecin spécialisé à la fois en pathologie et en médecine transfusionnelle, directeur médical d'une banque de tissus, puis d'une banque de sang en Californie. Il reprend les recommandations de pratiques professionnelles pour la réception, le stockage et la distribution des tissus humains. Il insiste particulièrement sur les aspects réglementaires et la traçabilité des prélèvements.

Un des points d'intérêt de cet article est la comparaison des standards pour les banques de tissus recommandés respectivement par les JCAHO (Joint Commission on Accreditation of Healthcare Organizations), le CAP (College of American Pathologists), l'AABB (American Association of Blood Banks) et l'AATB (American Association of Tissue Banks). Ce qui concerne les banques de cellules et tissus pathologiques n'est donc pas traité à part, mais intégré avec les recommandations générales pour les tissus et cellules prélevées dans un but thérapeutique.

II.3.20. Grizzle WE, Woodruff KH, Trainer TD. The pathologist's role in the use of human tissues in research: legal, ethical and other issues. Arch Pathol Lab Med 1996;120:909-12. National Cancer Institute, National Institute of Health. "Recommended policies for uses of human tissue in research, education and quality control" Pathologists consensus statement, Bethesda, MD 1997. Grizzle WE, Grody WW, Noll WW, Sobel ME, Stass SA, Trainer T, Travers H, Weedn V, Woodruff K, Members of the ad hoc committee on stored tissue, College of American Pathologists. Recommended policies for uses of human tissue in research, education, and quality control. Arch Pathol Lab Med 1999;123:296-300.

Ces trois documents sont complémentaires. Le premier a été écrit par le Committee on stored tissue de l'American College of Pathologists. Il fait le point en 1996 sur les aspects légaux, éthiques et réglementaires aux Etats-Unis pour l'utilisation à visée scientifique de tissus pathologiques prélevés dans le cadre de procédures diagnostiques. Le deuxième correspond au document de consensus des pathologistes américains sur l'ensemble des procédures recommandées pour l'utilisation des tissus humains pathologiques pour la recherche, l'enseignement et les contrôles de qualité. Le troisième document complète les deux premiers sur trois points: la différence entre tests génétiques donnant lieu à un conseil génétique et recherche génétique en général; les règles de confidentialité; et les consentements à demander aux malades.

L'ensemble de ces documents a permis d'établir en avril 1999 un document de consensus validé par 17 Sociétés savantes : l'Academy of Clinical Laboratory Physicians and Scientists; l'American Association of Cancer Research; l'American Association of Neuropathologists, Inc; l'American College of Veterinary Pathologists; l'American Registry of Pathology; l'American Society for Investigative Pathology; l'American Society of Clinical Pathologists; l'American Society of Cytopathology; l'Arthur Purdy Stout Society of Surgical Pathologists; l'Association for Molecular Pathology; l'Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology; l'Association of Pathology Chairs; le College of American Pathologists; la Society for Hematopathology; la Society of Toxicologic Pathologists; l'United States and Canadian Academy of Pathology; les Universities Associated for Research and Education in Pathology.

II.3.21. Stephenson J. Pathologists enter debate on consent for genetic research on stored tissue. JAMA 1996 ;21:503-4.

Cet article est centré sur le fait que la définition d'un échantillon d'ADN comme " tout prélèvement biologique à partir duquel de l'ADN peut être extrait " rend *de facto* les pathologistes gestionnaires d'énormes " banques " d'ADN puisque l'ADN peut être extrait des fragments tissulaires pathologiques archivés dans les laboratoires de pathologie. La discussion sur les règles de confidentialité, les consentements à demander au malade et la définition des tests génétiques est très proche de celle des trois documents précédents.

II.3.22. LiVolsi VA. Use of human tissue blocks for research. Am J Clin Pathol 1996 ;105:260-1

Cet éditorial est centré sur le fait que les prélèvements de tumeurs humaines représentent des quantités finies, quelquefois limitées à un seul échantillon. L'éventuelle utilisation de cet unique échantillon pour la recherche implique de se préoccuper du consentement du malade, de respecter la durée légale de conservation des documents pathologiques pour le diagnostic (de 5 ans à 20 ans selon les états pour les États-Unis), de déterminer qui peut avoir accès aux informations génétiques de l'échantillon, et qui peut avoir accès aux données cliniques sur la famille. Enfin, les problèmes de coûts sont abordés, à la fois pour financer de façon pérenne la conservation des collections et pour mettre à disposition les échantillons pour les équipes de recherche.

II.3.23. Marshall E. Whose DNA is it, anyway? Science 1997 ; 278:564-7.

Ce document de quatre pages, dans la rubrique " News and Comment " de la revue Science, expose les difficultés rencontrées dans l'utilisation pour la recherche des spécimens des banques de tissus pathologiques ou d'ADN.

Trois départements du National Institute of Health: le National Heart, Lung and Blood Institute, le National Institute of Mental Health, et le National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism étudient les conditions de cession d'une partie de leurs spécimens pour des programmes de recherche en dehors de leurs institutions. Pour pallier le caractère limité des ressources biologiques, la constitution d'un service central qui immortaliserait l'ADN dans des lignées cellulaires qui seraient conservées dans une banque centrale est envisagée. Ce service central devrait sélectionner le matériel biologique à immortaliser, respecter les règles de confidentialité et céder les échantillons biologiques aux équipes de recherche. Restent à définir comment couvrir les frais de cession des échantillons, et surtout combien de temps un spécimen pathologique doit rester pour l'utilisation scientifique exclusive de l'équipe qui l'a collecté. Un délai de 5 ans minimum et 10 ans maximum est proposé.

II.3.24. Research involving human biological materials: ethical issues and policy guidance. Vol 1: Report and Recommendations of the National Bioethics Advisory Commission. Rockville, Maryland, August 1999

Ce volumineux document est la publication officielle de la National Bioethics Advisory Commission (NBAC) sur l'utilisation de tissus humains pour la recherche. La NBAC a été créée en octobre 1995 par le président Clinton pour le conseiller ? ainsi que le National Science and Technology Council, sur les sujets de bioéthique.

Vingt trois recommandations ont été formulées pour répondre à deux évolutions récentes. La première est la possibilité pour les chercheurs, du fait de nouvelles technologies, d'utiliser des prélèvements biologiques humains prélevés dans le cadre de procédures diagnostiques, ou collectés pour des programmes de recherche. La NBAC a estimé à 282 millions le nombre des spécimens conservés aux États-Unis et désormais utilisables par les chercheurs. La deuxième évolution récente est l'inquiétude croissante soulevée par une diffusion inappropriée des informations génétiques ou médicales associées à ces prélèvements.

Les chapitres consacrés à l'étude des différentes formes de consentement à demander au malade, au bien fondé et à la manière de transmettre les résultats de la recherche au malade, à l'utilisation des données cliniques, et au mode de publication et de dissémination des résultats des recherches sont particulièrement approfondis.

III. SYNTHÈSE DES GRANDS AXES COMMUNS AUX DIFFÉRENTES SÉRIES DE RECOMMANDATIONS PROFESSIONNELLES DISPONIBLES DANS LA LITTÉRATURE

III.1. L'enjeu de santé publique

Dans le domaine de la pathologie tumorale, l'établissement de facteurs pronostiques est important pour comprendre l'histoire naturelle des cancers, pour déterminer les thérapeutiques optimales et pour apprécier l'efficacité des traitements. Les analyses moléculaires permettent une meilleure définition individuelle des tumeurs, une prédiction de réponse à l'hormonothérapie et à la chimiothérapie adjuvantes et la recherche d'une maladie résiduelle. Elles nécessitent l'utilisation de tissus congelés, conservés et distribués avec des critères de qualité rigoureux.

Deux facteurs limitent les études de facteurs pronostiques: le temps nécessaire entre le diagnostic et l'analyse des données de survie, et le nombre de tumeurs à étudier pour obtenir des résultats statistiquement fiables (Burke, Marshall).

Pour pallier ces difficultés, les pathologistes américains (LiVolsi, Burke, NCI-NIH) recommandent dans les documents de consensus pour les banques de cellules et tissus tumoraux :

- de conserver au moins dix ans les spécimens pour l'établissement de facteurs pronostiques à 10 ans
- de conserver au moins 20 ans les spécimens de tumeurs à croissance lente

Or la durée de l'archivage des prélèvements congelés ne fait actuellement en France l'objet d'aucun texte réglementaire.

Ces mêmes documents de consensus recommandent également d'établir des fichiers informatisés et de suivre et de contrôler les procédures de traitement tissulaire permettant de réaliser des analyses moléculaires. Nous verrons successivement l'analyse des documents publiés dans ces différents domaines.

III.2. Le recueil et l'acheminement des cellules et tissus tumoraux, leur préparation, leur stockage et leur redistribution

L'analyse des documents existants donnent essentiellement des lignes générales de recommandations, fondées sur des accords professionnels pour les pratiques de laboratoires.

Seule l'influence de la température de stockage sur la durée de vie des ADN et des ARN a pu donner lieu à l'étude comparative des données publiées. Cette étude comparative fait l'objet du *tableau 1* ci-dessous. De l'analyse de ces données, on peut conclure que dans toutes les séries publiées, la conservation des cellules et tissus congelés doit se faire à une température au moins égale à - 70°C pour avoir une conservation des ARN sur une durée au moins égale à un an. Ceci correspond à un niveau de preuve de grade B.

Par ailleurs, l'analyse des documents publiés permet de souligner la concordance des recommandations sur les points suivants :

- la congélation des tissus tumoraux doit se faire le plus rapidement possible après l'excision (Naber, LiVolsi, Gramza, Gill, Farkas)
- elle doit se faire dans l'azote liquide et être suivie d'un stockage à moins 70°C (Burke, Gramza, Gill, Palacin) ou dans les vapeurs d'azote (Naber, ATCC)
- les analyses moléculaires d'ARN ne peuvent se faire que sur tissus rapidement congelés (Burke, Naber, Clausen, Mariatis, Gramza, Farkas)
- la bonne conservation des ARN dans les tissus tumoraux congelés nécessite l'utilisation de gants et de matériel sans RNase pour préparer et manipuler les échantillons (LiVolsi, Naber, Clausen, Grizzle, Mariatis, Farkas, Lewin)
- le contrôle microscopique de l'échantillon avant toute transmission pour analyses moléculaires est essentiel (Naber, LiVolsi, Clausen, Bateman, ATCC)

Sur trois points publiés dans la littérature par une seule équipe, le groupe de travail a fait réaliser des enquêtes de pratique et des tests d'applicabilité :

- l'influence du temps d'ischémie chaude (temps écoulé entre le clamage vasculaire et l'excision) sur la dégradation des ARN a été montrée expérimentalement sur une série de rats par Lazarus (test sur 60 mn à 37°C). Pour les pièces opératoires de deux équipes chirurgicales, le temps d'ischémie chaude a été mesuré pendant deux mois. Ceci a permis de montrer qu'un temps d'ischémie chaude supérieur à 30 minutes entraînait une dégradation d'une partie des ARN dans les tissus de la pièce opératoire.
- les analyses moléculaires nécessitant de longs fragments d'ADN (d'une taille supérieure à 300 paires de bases) ne peuvent se faire qu'à partir de tissus congelés (Burke) ou inclus dans des résines polymérisant à froid (Finkelstein). La taille des ADN extraits de 20 tissus tumoraux congelés en moins de 15 minutes dans l'azote a été mesurée par deux équipes de biologie moléculaire et a permis de confirmer ces données de la littérature.
- le partage d'un même échantillon de tissu tumoral peut être nécessaire pour réaliser plusieurs analyses moléculaires. La quantification du tissu nécessaire pour chaque analyse moléculaire est donc nécessaire. (Naber 1994, Naber 1996). Une série de tests comparatifs a également été conduite par deux équipes de biologie moléculaire pour déterminer la quantité d'ADN et d'ARN qui peut être extraite de coupes de 10 et 20 microns de tissu tumoral congelé en blocs de 5 mm sur 10 mm. Il a été conclu que si le tissu tumoral destiné aux analyses moléculaires

a bien été contrôlé microscopiquement afin de vérifier si le prélèvement était bien fait dans la tumeur et si celle-ci n'était pas nécrosée, plusieurs analyses moléculaires pouvaient être réalisées à partir du même bloc congelé.

III.3. Les renseignements minimum à collecter pour chaque prélèvement

Ils doivent faire l'objet d'un consensus entre les différentes banques pour permettre des études multicentriques (Burke, LiVolsi, Clausen, Komender, Bardsley).

Des procédures d'assurance qualité doivent être mises en œuvre pour vérifier la véracité des données originales et compléter les données manquantes (Burke, Naber, Clausen, Komender).

L'absence de données sur la survie de certains patients rend inexploitable certaines études (Burke).

La standardisation des renseignements minimum à collecter pour chaque prélèvement apparaît comme essentielle.

La date de décès des malades, lorsqu'elle est connue est un élément qui peut être ajouté aux renseignements associés à chaque prélèvement.

III.4. L'anonymat et les consentements demandés aux malades

De grandes différences sur ce sujet sont observées entre les articles publiés aux Etats-Unis et en Europe.

La traçabilité des prélèvements biologiques est une règle européenne.

Des procédures d'anonymat complet sont demandées aux Etats-Unis avant l'utilisation d'un prélèvement pour la recherche.

Les consentements à demander au malade relèvent en France de la loi dite Huriet – Sérésclat pour les prélèvements réalisés dans un but de recherche; le consentement libre, éclairé et exprès du malade doit alors être obtenu par écrit. Ils relèvent de l'article 672-1 du code de la Santé Publique pour les prélèvements réalisés dans un but diagnostique; le seul consentement à recueillir est alors le consentement à visée diagnostique ou curative, dont la responsabilité incombe au médecin préleveur.

Aux Etats-Unis, le " Code of Federal Regulations, title 45, part 46 " régit ce sujet. La National Bioethics Advisory Commission a conseillé trois niveaux de consentement : le premier niveau correspond à un consentement spécifique pour un protocole unique; le second correspond à un consentement pour une catégorie de recherches ayant une thématique proche de celle de la recherche initiale; le troisième niveau correspond à un consentement général, pour de recherches à venir, non encore spécifiées, dont les thématiques peuvent être différentes de la thématique de la recherche initiale.

IV. ANALYSE ECONOMIQUE

IV.1 Propositions de modèles préalables à l'étude des coûts

Les schémas présentés ci-dessous correspondent à des études de coût direct marginal de la prestation, y compris l'amortissement des matériels requis.

Cette présentation ne tient pas compte de toutes les charges nécessaires à cette prestation. Il est en général admis que le coût direct est de l'ordre de 50 % du coût total, mais ceci varie en fonction de l'organisation, de l'historique et des choix d'opportunité de chaque structure.

IV.2. Etude du coût de la préparation d'un échantillon congelé à partir d'un fragment de tissu frais arrivé par coursier sur le site de congélation

IV.2.1. Investissement: amortissement du cryotome et du microscope

IV.2.2. Fonctionnement

Consommables pour les deux systèmes de congélation, en azote ou en congélateur moins 80°C :

- tubes cryogéniques, boîtes de rangement,
- marqueurs, étiquettes, bistouris, gants stériles
- consommable informatique
- azote (2 litres par jour pour congélation immédiate des tissus)

IV.2.3. Personnel

- Coursier du bloc : 30 minutes par pièce
- Médecin : 30 minutes par pièce: examen macroscopique et recoupe, examen microscopique pour contrôler la qualité du prélèvement et sa représentativité
- Technicien : 30 minutes coupe en congélation et coloration, préparation du tube, congélation, codage, enregistrement, rangement.

L'hypothèse a été retenue de prendre en compte en prix de revient le double du temps chronométré pour l'acte en question. Les estimations présentées sont issues d'enquêtes menées de façon concertée entre 15 hôpitaux français. Elles ne peuvent avoir de valeur normative.

IV.3 Etude du coût de la conservation pour un an d'un tube contenant un prélèvement congelé en azote liquide et en congélateur moins 80° C.

IV.3.1. Investissement

IV.3.1.1. Equipement

- a. Système de conservation en azote : conteneur, alarme, aérateur, informatique
- b. Système de conservation en congélateur moins 80°C : congélateur, un congélateur de secours par groupe de 5 congélateurs, rampe pour obus de CO2, climatiseur, alarme, informatique

IV.3.1.2. Amortissement

- a. Système de conservation en azote: conteneur 7 ans
- b. Système de conservation en congélateur moins 80°C : congélateur 5 ans, climatiseur 3 ans
- c. Pour les deux systèmes : informatique 3 ans

IV.3.2. Fonctionnement

IV.3.2.1. Consommables

- a. Système de conservation en azote : consommation d'azote
- b. Système de conservation en congélateur moins 80°C : électricité, bouteilles de CO2

IV.3.2.2. Exploitation

- a. Système de conservation en azote : maintenance manomètre et alarme
- b. Système de conservation en congélateur moins 80°C : maintenance congélateurs, climatiseur
- c. Pour les deux systèmes : maintenance informatique

Une variation dans le coût annuel de conservation d'un tube apparaît selon que la conservation se fait :

- dans des systèmes de moyenne contenance
 - . azote conteneur 2400 tubes
 - . congélateur 15000 tubes
- dans des systèmes de grande contenance
 - . azote conteneur 4800 tubes
 - . congélateur 32400 tubes

IV.3.3. Personnel

Pour la gestion de la banque et les manipulations d'échantillons : salaire d'un cadre médico-technique ou d'une technicienne de plus de 5 ans d'ancienneté sur la base d'un plein temps pour 5000 échantillons par an, d'un mi-temps pour 2500 échantillons, etc.

V. BANQUES DE TISSUS ET CELLULES CRYOPRESERVES : LE POINT SUR LES TEXTES LEGISLATIFS ET REGLEMENTAIRES FRANÇAIS

Dans trois circonstances, le consentement du malade doit être recherché. Il s'agit du :

- consentement à l'acte médical, nécessaire pour les actes médicaux amenant à prélever tissus ou organes
- consentement dans le cadre de la loi du 20 décembre 1988 (dite loi Huriet - Sérusclat) pour la participation à des recherches biomédicales : consentement libre, éclairé et exprès de la personne, qui doit être écrit
- consentement au don d'organes ou de cellules dans un but thérapeutique, qui est régi par la loi n° 94-654 du 29 juillet 1994, et ne s'applique pas aux prélèvements traités dans un laboratoire d'Anatomie pathologique.

Dans ces trois circonstances, il s'agit de consentements à des actes portant sur le corps du patient.

Lorsqu'il s'agit de données nominatives le concernant, le malade a le droit de s'opposer pour des raisons légitimes à ce que celles-ci fassent l'objet d'un traitement pour son suivi thérapeutique ou médical individuel; il a le droit de s'opposer sans avoir à fournir une quelconque explication à ce que des données nominatives le concernant soient recueillies ou transmises pour un traitement automatisé ayant pour but la recherche dans le domaine de la santé.

V.1. Pour les prélèvements réalisés dans le cadre de procédures diagnostiques

V.1.1. **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 prélèvement supplémentaire, 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.

La conservation de ces prélèvements congelés faits à partir de biopsies à visée diagnostique ou de pièces opératoires relève donc de l'article 672-1 du code de la Santé Publique. Le seul consentement à recueillir est le **consentement à l'intervention à visée diagnostique ou curative**, dont la responsabilité incombe au médecin préleveur.

Le principe de l'**anonymat** concerne tous les prélèvements, mais la traçabilité de tout prélèvement doit pouvoir être assurée pour respecter les règles de sécurité sanitaire. Les modalités du respect de l'anonymat ne sont pas explicitées par les lois et règlements à ce jour. Il est donc important de s'assurer que les procédures d'identification utilisées dans les laboratoires respectent les droits des malades, et en particulier que leur identité n'est pas divulguée.

V.1.2. L'article L 145-15 du Code de la Santé Publique définit les conditions dans lesquelles peuvent être réalisées une **analyse génétique**. Il impose de recueillir un consentement écrit lorsqu'on analyse à des fins médicales les caractéristiques génétiques **d'une personne**.

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.

V.1.3. **L'archivage des fragments congelés** n'est régi par aucun texte de loi.

L'article R 710-2-1 du Code de la Santé Publique prévoit que le dossier médical comporte **au moins** le compte-rendu des examens anatomopathologiques, la réglementation des archives hospitalières prévoit que ce dossier doit être conservé 20 ans, sauf pour la pédiatrie, la neurologie, la stomatologie et les maladies chroniques où le dossier doit être conservé 70 ans. Il n'est pas fait mention dans ce document des blocs de paraffine, lames ou fragments congelés.

L'article 3 du décret n° 88-280 du 24 mars 1988 pour l'application de l'article L 761.11 du Code de la Santé Publique prévoit que les anatomopathologistes installés en ville en dehors des laboratoires d'analyses de biologie médicale doivent conserver dix ans les blocs d'inclusion et documents microscopiques leur ayant permis d'établir un diagnostic, que celui-ci ait fait apparaître une pathologie ou non.

La loi énumérant les éléments qui doivent **au moins** figurer dans le dossier médical n'exclut pas d'y faire figurer d'autres éléments nécessaires à la bonne pratique médicale. Nous proposons la notion de "**dossier médical étendu**" pour régir la conservation des tissus tumoraux congelés.

V.1.4. La loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 sur la CNIL concerne les **traitements automatisés de données directement ou indirectement nominatives** et définit les conditions de collection, de stockage, d'accès, de transmission et le droit à rectification.

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.

V.1.5. Pour les anatomopathologistes qui effectuent, dans le cadre d'une procédure de soins, des prélèvements cytologiques ou biopsiques sur les patients dans leur laboratoire, la responsabilité du prélèvement incombe au médecin, même si le prélèvement est réalisé par un technicien.

V.2. Pour les prélèvements utilisés pour la recherche

V.2.1. 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.

C'est au clinicien investigateur qui suit le patient de demander le consentement exprès du malade.

Le prélèvement doit être fait dans des locaux ayant reçu l'agrément de la DRASS pour des recherches biomédicales qualifiées " sans bénéfice individuel direct ".

Le promoteur de la recherche a comme obligation de veiller au respect des dispositions légales, dont l'obtention des consentements.

La conservation de ces prélèvements n'est pas évoquée dans la loi. Les directives européennes pour les bonnes pratiques cliniques (directives 65/65/CEE et 75/318/CEE) demandent la conservation des documents sources pendant 15 ans. Il paraît logique de proposer que les prélèvements ayant fait l'objet de recherche puissent être gardés pendant le même délai.

V.2.2. 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 et 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,

dont la responsabilité incombe au médecin préleveur.

Pour les **travaux de recherche rétrospectifs**, portant sur des prélèvements réalisés sur des personnes vivantes, qui sont **décédées** depuis, la seule obligation légale, à notre connaissance, est celle de l'article 40-4 de la loi n°94-548 relative au traitement de données nominatives ayant pour fin la recherche dans le domaine de la santé : " Les informations concernant les personnes décédées ... peuvent faire l'objet d'un traitement de données, sauf si l'intéressé a, de son vivant, exprimé son refus par écrit ".

V.2.3. L'importation et l'exportation hors de France des tissus congelés à visée scientifique sont régies par le décret n° 96-327 du 16 avril 1996.

En pratique, chaque établissement hospitalier doit avoir une autorisation précisant quels types d'organe, de tissu ou de cellule du corps humain il importe ou exporte. Cette autorisation tient compte de l'avis de l'Etablissement Français des Greffes, de la Direction Générale de la Santé et du Ministère de la Recherche.

Au cas où un projet de recherche implique l'importation ou l'exportation d'un nouveau type de tissu, une demande de modification de l'autorisation précédente doit être faite au directeur de l'établissement hospitalier, en joignant à cette demande le projet de recherche.

Si l'importation ou l'exportation de tissus s'accompagne de la transmission de fichiers nominatifs informatisés, il faut l'autorisation du " Comité consultatif sur le traitement de l'information en matière de recherche dans le domaine de la santé ".

BIBLIOGRAPHIE SELECTIVE

1. Aso Y, Kawamura M, Hamaguchi Y, Shioiri T, Mitsuhashi M. Rapid, stable ambient storage of leukocytes RNA from whole blood. *Clin Chem* 1998;44:1782-3.
2. American Type Culture Collection Quality Controls for cell lines, 2nd edition, 1992, Rockville, MD
3. Bardsley JS. Establishment of human tissue banks. *Hum Exp Toxicol* 1994;13:435-7.
4. Bateman AC, Theaker JM, Howell WM. Whose tissue is it, anyway? *J Pathol* 1996; 179:229-31.
5. Burke HB, Henson DE. Specimen banks for cancer prognostic factor research. *Arch Pathol Lab Med* 1998;122:871-4.
6. Charrow RP. Whose tissue is it anyway? *JNCI* 1994;6:79-81.
7. Clauzen KP, Grizzle WE, LiVolsi V, Newton WA, Aamodt R. The cooperative human tissue network. *Cancer* 1989; 63:1452-5.
8. Damen M, Sillekens P, Sjerps M, Melsert R, Frantzen I, Reesink HW, Lelie PN, Cuypers HT. Stability of hepatitis C virus RNA during specimen handling and storage prior to NASBA amplification. *J Virol Methods* 1998;72:175-84.
9. Duyckaerts C, Sazdovitch V, Seilhean D, Delaère P, Hauw JJ. A brain bank in a neuropathology laboratory. *J Neural Transm* 1993;S39:107-18
10. Eymin C. Freezing storage of whole brain preparations. *J Neural Transm* 1993; S39:130-1.
11. Farkas DH, Kaul K, Wiedbrauk DL, Kiechle FL. Specimen collection and storage for diagnostic molecular pathology investigation. *Arch Pathol Lab Med* 1996;120:591-6.
12. Finkelstein SD, Dhir R, Rabinovitz M, Bischelia M, Swalsky PA, DeFlavia P, Woods J, Bakker A, Becich M. Cold-temperature plastic resin embedding of liver for DNA- and RNA-based genotyping. *J Mol Diagn* 1999;1:7-22.
13. Gill SS, Aubin RA, Bura CA, Curran IH, Matula TI. Ensuring recovery of intact RNA from rat pancreas. *Mol Biotechnol* 1996; 3:359-62.
14. Gramza AW, Lucas JM, Mountain RE, Schuller DE, Lang JC. Efficient method for preparing normal and tumor tissue for RNA extraction. *Biotechniques* 1995;18:228-31.
15. Grizzle WE, Woodruff KH, Trainer TD. The pathologist's role in the use of human tissues in research: legal, ethical and other issues. *Arch Pathol Lab Med* 1996;120:909-12.
16. Grizzle WE, Polt SS. Guidelines to avoid personnel contamination by infective agents in research laboratories that use human tissues. *J Tiss Cult Meth* 1998; 11:191-8.
17. Grizzle WE, Grody WW, Noll WW, Sobel ME, Stass SA, Trainer T, Travers H, Weedn V, Woodruff K, Members of the ad hoc committee on stored tissue, College of American Pathologists. Recommended policies for uses of human tissue in research, education, and quality control. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:296-300.
18. Hay PJ. Preservation of cell culture stocks in liquid nitrogen. *Tissue Culture Association Manual* 1978;4:787-90.
19. Haimonitz MD. Practical issues in tissue banking. *Pathology patterns*. 1997, 107:Ss75-S81. *Am J Clin Pathol* (S).
20. Ichikawa M, Sasaki K, Ishikawa A. Optimal preparatory procedures of cryofixation for immunocytochemistry. *J Electron Microsc Tech* 1989;12:88-94.

21. Komender J. Tissue banking 1997;standardization of procedures. *Bone Marrow Transpl* 1997; 22, S 116-8.
22. Lazarus HM. Alterations of high molecular weight nuclear RNA following kidney storage. *Exp Mol Pathol* 1974; 21:155-65.
23. Lewin B. Control of RNA processing. In: *Genes VI*, pp 921-935, Oxford University Press, 1997.
24. LiVolsi VA. Use of human tissue blocks for research. *Am J Clin Pathol* 1996;105:260-1.
25. LiVolsi VA, Clausen KP, Grizzle W, Newton W, Pretlow TG, Aamodt R. The cooperative human tissue network. An update. *Cancer* 1993; 71:1391-4.
26. Mariatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory 1995.
27. Marshall E. Whose DNA is it, anyway? *Science* 1997; 278:564-7.
28. Naber SP, Andreis CM. Equipment and organization of a frozen tissue bank- an update. *Verh Dtsch Ges Path* 1994; 78:153-60.
29. Naber SP. Continuing role of a frozen-tissue bank in molecular pathology. *Diagn Mol Pathol* 1996;5:253-9.
30. National Cancer Institute, National Institute of Health. "Recommended policies for uses of human tissue in research, education and quality control" Pathologists consensus statement, Bethesda, MD 1997
31. Palacin A, Cardoso A; Cardesa A, Cruz-Sanchez F. Brain banks and non nervous tissues. *J Neural Transm* 1993; S39:87-96.
32. Recommandations de Bonnes Pratiques en Anatomie et Cytologie Pathologiques. Document préparé par l'Association Française d'Assurance Qualité en Anatomie et Cytologie Pathologiques (AFAQAP). Commission n° 4 :organisation et fonctionnement des structures d'ACP. *Ann Pathol* 1998 ;18 :227-36.
33. Research involving human biological materials: ethical issues and policy guidance. Vol 1: Report and Recommendations of the National Bioethics Advisory Commission. Rockville, Maryland, August 1999
34. Shannon JE, Macy ML. Freezing, storage, and recovery of cell stocks. In: *Tissue Culture:Methods and Applications*, edited by PF Kruse and MK Patterson, pp 712-718, Academic Press, New York, 1973.
35. Stephenson J. Pathologists enter debate on consent for genetic research on stored tissue. *JAMA* 1996; 21:503-4.
36. Williams C, Ponten F, Moberg C, Soderkvist P, Uhlen M, Ponten J, Sitbon G, Lundenberg J. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathol* 1999 ;155:1467-71.