



Campus Saint-Paul de l'Université
Catholique de Lyon,
10 places des Archives
69002 Lyon



Campus Rockefeller
Université Claude Bernard Lyon 1
8 avenue Rockefeller,
69008 Lyon



Centre Léon Bérard – PGEB
Bâtiment Cheney B (RDC)
28 rue Laënnec
69373 LYON cedex 08

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

MASTER 2 MANAGEMENT DES BIOBANQUES

LE BIOBANKING AU SERVICE DE LA RECHERCHE PÉDIATRIQUE :

VALORISATION D'UNE COLLECTION D'ÉCHANTILLONS
PÉDIATRIQUES DU CENTRE LÉON BÉRARD
CONSTITUÉE DEPUIS 40 ANS



**4 Septembre
2023 au 30
août 2025**

ÉTUDIANTE :
SANVEE-EDOH
Laure

MAITRE D'APPRENTISSAGE :
Dr TABONE-EGLINGER
Séverine

Lyon - Août 2025

Remerciements

Je souhaite tout d'abord adresser mes sincères remerciements à Madame Séverine Tabone-Eglinger, responsable de la Plateforme des Échantillons Biologiques du Centre Léon Bérard et maître de stage, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe. Je lui suis particulièrement reconnaissante pour la qualité de son encadrement, ses conseils tout au long de ce projet et la confiance qu'elle m'a accordée durant ces deux années d'alternance.

Je remercie également Madame Isabelle Iacono di Cacito pour son accompagnement précieux dans la compréhension et la gestion des aspects techniques liés à ce projet. Mes remerciements vont également à Madame Aurélie Galea, Madame Myriam Bourjade et Monsieur Nawar Lwaissa du service informatique pour leur aide concernant la gestion et la structuration des données.

Je remercie Madame Morgane Cortes et Madame Dominique Cogne pour la formation aux techniques de contrôle qualité nécessaires à la gestion de la collection institutionnelle du Centre Léon Bérard.

Je souhaite également remercier Monsieur Kouamé Ambroise Kintossou, Monsieur Emile Vignal et Madame Carmen Acosta, anciens étudiants de l'ESTBB ayant travaillé au sein de la plateforme, dont les travaux complémentaires ont contribué à la continuité de ce projet.

Mes remerciements s'adressent également à l'ensemble de l'équipe de la plateforme pour leur accueil, leur disponibilité et les échanges qui ont contribué à enrichir cette expérience.

Enfin, je remercie Monsieur Maxime Anquetin, tuteur pédagogique, pour son suivi tout au long de ces deux années, ainsi que Madame Melissa Dussoyer et Madame Isabelle Hardy de l'ESTBB pour leur accompagnement durant ce master. Je remercie également l'ensemble des enseignants intervenus dans cette formation pour le partage de leurs expériences et de leurs connaissances.

Table des matières

Remerciements	2
Table des matières	3
Abréviations	5
Glossaire	6
Liste figures, tableaux et annexes	7
Figures	7
Tableaux	7
Annexes	7
Introduction	8
Structure d'accueil et contexte.....	8
Première partie	9
État de l'art des biobanques	9
Définition et missions.....	9
Les échantillons	10
La mise à disposition des échantillons au CLB	11
État de l'art de la recherche pédiatrique	12
Neuroblastome : caractéristiques cliniques, génétiques et enjeux de recherche	14
Présentation de la collection de Neuroblastome du CLB : État des lieux.....	15
Conditions de conservation et organisation des données.....	15
Problèmes identifiés	17
Problématiques du mémoire et intérêt	17
Méthodologie	19
Veille bibliographique	19
Tri des échantillons et corrections de la base.....	19
Implication de la DSID	21
Contrôles qualité.....	21
Comparaisons et analyses des échantillons contrôlés.....	23
Pérennité et suivi de la collection	24
Résultats	24
Aspects réglementaires et éthiques	24
Catégorisation de la collection.....	27
Résultats des tests qualité	29
Analyse de la qualité intrinsèque des échantillons.....	29
Les concentrations et les quantités minimales.....	31
Comparaison de la qualité des échantillons	32
Comparaison des échantillons : identiques ou seulement similaires ?	37

Analyse de la viabilité cellulaire	38
Discussion	39
Réglementaire	39
Interprétation des résultats	40
Résultats des extractions d'ARN	40
Résultats des extractions d'ADN	41
Résultats de la mesure de viabilité	41
Études des résultats globaux	41
Conséquences des résultats.....	42
Traçabilité des données	43
Devenir des échantillons testeurs	44
Pérennité et suivi de la collection	44
Coûts	44
Recherche pédiatrique au CLB	45
Conclusion	46
Implication de ce travail	47
Perspectives	48
Annexes.....	50
Références	56
Bibliographie	56
Webographie.....	59
Documents supports de la PGEB.....	60
Résumé.....	61
Abstract	61

Abréviations

AFNOR	Association Française de NORmalisation
BM-NB	BANQUE MAT NB : Base Access regroupant le matériel de la collection
BIMS	Biobank Information Management System
Bloc FFPE	Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (bloc fixé au formol et inclu en paraffine)
CLB	Centre Léon Bérard
CMT	Comité Médico Technique
CNIL	Commission Nationale Informatique et Libertés
CPP	Comité de Protection des Personnes
CRB	Centre de Ressources Biologiques
CSP	Code de la Santé Publique
DASRI	Déchets d'Activité de Soins à Risques Infectieux (poubelles)
DIN	DNA Integrity Number
DPI	Dossier Patient Informatisé
DSID	Direction des Systèmes d'Information et des Données
EC	Essais cliniques
HAS	Haute Autorité de Santé
NB	Neuroblastome
PBL	Peripheral Blood Leukocytes = PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells ; <i>PBL était le terme utilisé dans la base Access d'origine désignant les lymphocytes, nous parlons maintenant de PBMC</i>
PGC	Plateforme Génomique des Cancers
PGEB	Plateforme de Gestion des Échantillons Biologiques
RB	Ressources Biologiques
RGPD	Règlement Général sur la Protection des Données
RIN	RNA Integrity Number
R(N)IPH	Recherche (Non) Impliquant la Personne Humaine

Glossaire

ADN-ant ADN extraits antérieurement et redosés dans le cadre de nos tests qualité. En opposition aux ADN nouvellement extraits par nos soins en 2025.

BIMS-Gestion CRB Système de management des informations des échantillons biologiques de la PGEB. Indique les informations du patient, l'emplacement, le nombre de ces échantillons et les différentes analyses subies ainsi que ses produits dérivés.

Infrastructures dédiées au développement des biobanques (partage des ressources, groupe de travail...) :

BBMRI Biobanking and BioMolecular Resources Research Infrastructure & son Groupe MIABIS (Minimum Information About Biobank data Sharing)

ESBB European, Middle Eastern and African Society for Biopreservation and Biobanking

IBiSA Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie

ISBER International Society for Biological and Environmental Repositories

MR-004 Méthodologie de Référence n° 4 de la CNIL ; relative aux traitements de données à caractère personnel mis en œuvre dans le cadre des recherches n'impliquant pas la personne humaine, des études et évaluations dans le domaine de la santé (Délibération n° 2018-155 du 3 mai 2018)

(Pseudo)anonymisation

Anonymiser : l'identification n'est possible pour aucune partie concernée. Les données permettant de relier le patient à ses échantillons sont indisponibles pour tous.

Pseudoanonymisation : les données du patient sont disponibles, mais de manière restreinte. Les données ne sont plus associées au nom du patient, mais à un numéro de code lors de la mise à la disposition pour la recherche. Seule l'équipe de soin qui assure habituellement sa prise en charge et le personnel habilité dans l'établissement conservant les échantillons disposeront de la correspondance entre son identité et le numéro de code associé à ses données et prélèvements. Dans tous les cas, les professionnels intervenant dans la recherche sont soumis au secret professionnel.

Liste figures, tableaux et annexes

Figures

Figure 1 : Association des prélèvements et des tables dont ils sont issus	16
Figure 2 : Nombre d'échantillons testeurs par tranche d'années.....	28
Figure 3 : Répartition des échantillons par catégorie (en %)	28
Figure 4 : Scoring des échantillons testés, en fonction de l'année de congélation et du mode de conservation.....	31
Figure 5 : Graphique des concentrations d'ARN et d'ADN des échantillons testeurs.....	32
Figures 6a et 6b : Distribution du RIN et du DIN par année de congélation de l'échantillon parent ...	33
Figure 7a : Variation du RIN selon le type d'échantillon et le mode de conservation	35
Figure 7b : Variation du DIN selon le type d'échantillon et le mode de conservation.....	36

Tableaux

Tableau 1 : Tableau des méthodes et objectifs des contrôles qualité	22
Tableau 2 : Nombre d'échantillons testeurs en fonction du type.....	28
Tableau 3 : Tableau récapitulatif de la répartition des échantillons.....	29
Tableau 4 : Tableau d'attribution des scores, à partir des seuils de la littérature scientifique actuelle	30
Tableau 5 : Comparaison de la concentration et rapport 260/280 (2003-2010 vs 2025).....	34
Tableau 6 : Tableau présentant les différences, en valeur absolue, des échantillons similaires.....	37
Tableau 7 : Tableau de résultats des échantillons testeurs pour la viabilité cellulaire	38

Annexes

Annexe 1 : Schéma du tri des échantillons.....	50
Annexe 2 : Document de la PGEB : Critères de conformité par technique d'analyse de la Plateforme de Génomique des Cancers (PGC) du CLB à la PGEB	51
Annexe 3 : Lettre adressée au CPP	52
Annexe 4 : Champs des tables du fichier Access d'origine et thésaurus de la base Gestion CRB	53
Annexe 5a : Résultats complets des extractions d'ADN.....	54
Annexe 5b : Résultats complets des extractions d'ARN.....	54
Annexe 6 : Circuit de la collection rétrospective Neuroblastome.....	55

Introduction

Structure d'accueil et contexte

Les cancers représentent aujourd'hui l'un des plus grands défis scientifique et médical. En France, ils sont la première cause de mortalité prématurée chez l'homme et la deuxième chez la femme. En 2023, on estime environ 440 000 nouveaux cas et près de 170 000 décès (INCA, 2024a ; Santé Publique France, 2024). Ces pathologies, hétérogènes et multifactorielles, peuvent toucher tous les organes et toutes les populations, des plus jeunes aux plus âgés. Les sciences fondamentales et cliniques, les avancées en génétique, en biologie moléculaire et en immunologie ont permis d'accroître la compréhension des mécanismes biologiques du cancer. Leur développement a révolutionné les approches thérapeutiques, ouvrant la voie à des traitements de plus en plus ciblés et personnalisés. Ces progrès sont le fruit d'un effort multidisciplinaire impliquant chercheurs, cliniciens et techniciens travaillant en synergie. C'est dans ce cadre que prend toute l'importance d'établissements tels que le Centre Léon Bérard (CLB).

Ouvert en 1923 à Lyon, par son éponyme, un éminent médecin chirurgien luttant contre le cancer, le CLB est une institution spécialisée dans la cancérologie. C'est une référence en la matière au travers de ses trois missions : les soins, la recherche (fondamentale, translationnelle et clinique) et l'enseignement. Membre d'UNICANCER, la fédération nationale des centres de lutte contre le cancer, il est le centre hôte de nombreuses collections biologiques. Il est certifié par l'Association Française de Normalisation (AFNOR) et la Haute Autorité de Santé (HAS), il devient en 2017 le 2^{ème} Centre de lutte contre le cancer français, suivant l'institut Gustave Roussy.

Située sur le site de l'hôpital, la Plateforme de Gestion des Échantillons Biologiques (PGEB), créée en 2010, est responsable de la réception, la préparation, le stockage et la mise à disposition de prélèvements biologiques humains. En tant que biobanque du CLB, elle contribue aux activités de diagnostic, de recherche et de traitement des patients ainsi qu'aux essais cliniques grâce à la conservation à long terme des échantillons. Elle propose également une conservation à court terme pour certaines études cliniques externes (UNICANCER, MESOBANK, SHARE4Kids, ...). L'équipe dans laquelle j'ai réalisé mon alternance compte une vingtaine de professionnels, incluant la responsable de la PGEB, une cheffe d'équipe, une coordinatrice des essais cliniques, des techniciens et des aides de laboratoires. La PGEB est également certifiée par l'AFNOR (ISO9001, NF S96-900 et ISO20387) et possède le label Performance Optimisé du club 3C-R. Elle fait partie de différents réseaux et groupes de travail de biobanque tels que le BBMRI-ERIC, l'ESBB, l'IBISA et le groupe OSIRIS de l'INCa.

La PGEB regroupe une tumorothèque (échantillons tumoraux et sains), une sérothèque (cellules sanguines, LCR, urines, selles...), des produits dérivés (ADN et ARN), lamotheque, poudrothèque et blocothèque (blocs FFPE). Près de 210 000 échantillons y sont conservés. Les données associées (diagnostic, stade, âge, etc.), indispensables à la recherche translationnelle, sont

centralisées dans le BIMS-Gestion CRB. Ce système de gestion interne a été développé par le système informatique afin de sécuriser et structurer ces données, en remplacement des anciens supports (Access, Excel, papier).

Ce mémoire porte sur l'intégration d'une collection historique de « Neuroblastome ». Sa constitution débute en 1982 par le Service de Biopathologie du CLB, un des centres de référence pour le diagnostic des neuroblastomes. Cette collection comprend de nombreux échantillons de types variés (tissus, cellules sanguines, produits dérivés, bloc FFPE, lames) collectés dans le cadre du soin ou d'essais cliniques. Ces échantillons, rares et anciens, présentent un intérêt scientifique majeur, notamment pour la recherche en oncopédiatrie. Toutefois, leur intégration dans la collection institutionnelle du CLB soulève des enjeux complexes : hétérogénéité des données, conditions de conservation variables, conformité réglementaire et éthique.

Ma mission d'alternance a été de **mettre en œuvre l'intégration de tout ou partie de la « collection Neuroblastome » à la collection institutionnelle du CLB**. Il s'agissait de définir des critères d'acceptation des échantillons, de corriger et harmoniser les données associées, de réaliser des tests de qualité sur un panel représentatif, et d'étudier un modèle de pérennité et de suivi adapté. Ce travail vise à valoriser de précieuses ressources, tout en garantissant la conformité aux exigences actuelles en matière de qualité, de traçabilité et de réglementation.

Ce mémoire se présente en quatre parties :

1. Une présentation de l'état de l'art des biobanques, de la recherche pédiatrique ainsi que le contexte de la « collection Neuroblastome » et son intérêt scientifique en regard des connaissances et besoins actuels.
2. La méthodologie mise en œuvre pour répondre à la problématique et répondre aux enjeux réglementaires, éthiques et qualitatifs.
3. Les résultats obtenus à partir de l'application de ces méthodes.
4. Une discussion sur l'application du projet, suivi d'une conclusion et de perspectives pour donner suite à ce travail.

Première partie

État de l'art des biobanques

Définition et missions

Une des premières définitions du terme « biobanque » vient de l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE), qui les décrit en 2001 comme « les structures qui se professionnalisent dans la gestion des ressources biologiques à des fins de recherches » (Liney et al., 2020).

Mais il existe une multitude de centres de ressources biologiques (CRB) chacun ayant des spécialités et ainsi une diversité de définitions. Ces dernières années, les biobanques ont évolué et bien qu'encore méconnues du grand public, elles ont une place décisive notamment dans la recherche biomédicale. En effet, de nombreux protocoles s'appuient sur des échantillons biologiques afin de développer des traitements. Mais cela nécessite un accès à des échantillons humains dans le respect de la réglementation en vigueur, avec un niveau de qualité et de spécificité adéquates aux recherches.

Ces structures sont souvent responsables de la réception, préparation, conservation et mise à disposition des échantillons. Ces derniers peuvent être de tout type : animaux, humains, végétaux ou encore des micro-organismes. Dans le cadre d'échantillons humains, des règles éthiques et réglementaires strictes s'appliquent. Les données sont par exemple le plus souvent mises à disposition de façon (pseudo)anonyme, un consentement est nécessaire et l'utilisation de ces échantillons ne doit jamais entraver l'intégrité du diagnostic et droit au traitement du patient. Les échantillons conservés sont des cellules, des produits dérivés, des tissus, mais également des produits sanguins, des selles ou des urines (Annaratone et al., 2021 ; Malsagova et al., 2020).

Les CRB gardent également précieusement les données associées. Ces données sont des informations de santé, des antécédents familiaux, la pathologie du patient, son âge, son sexe, parfois ses informations génétiques. Tout cela permettant d'assurer un suivi complet du patient afin de maximiser la pertinence de la conservation et de l'étude des échantillons, que ce soit dans le cadre de son diagnostic ou de la recherche.

Les biobanques sont reconnues par des entités telles que l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO). Elles sont soumises à des normes comme la NFS96-900, l'ISO9001 et désormais la ISO20387:2018, attestant de la qualité de leur processus de management. Il existe également des organisations internationales dédiées aux biobanques (ISBER, ESBB, BBMRI-ERIC, ...) (Annaratone et al., 2021).

Les échantillons

Ces échantillons sont obtenus soit dans le cadre d'une intervention (prise de sang, chirurgie, biopsie...) lors du diagnostic ou lorsqu'un patient en traitement est inclus dans un essai clinique. Chaque échantillon va alors subir un traitement qui est spécifique au prélèvement parent et à l'usage prévu.

Lorsque les échantillons tumoraux ne sont pas utilisés frais, ils sont fixés avec du formol avant d'être inclus en bloc de paraffine (FFPE), ou congelés. La paraffine et le formol permettent un stockage à température ambiante tandis que les échantillons congelés sont le plus souvent stockés entre -80 °C (congélateurs) et -196 °C (azote liquide ou gazeux). Ces températures, très basses, ont l'avantage de maintenir une meilleure intégrité des acides nucléiques et des cellules des échantillons, permettant des analyses d'amplification et de séquençage par exemple. Pour les protéger de la formation de cristaux qui détruiraient les cellules, des cryoprotecteurs tels que le DMSO sont utilisés.

Le sang est un élément très utilisé en recherche ne nécessitant pas un geste très invasif. Le sang peut être conservé sous sa forme totale ou en fractions. Dans ce cas, en fonction du produit sanguin que l'on veut obtenir (sang total, plasma, sérum) différents tubes de prélèvements peuvent être utilisés. Pour obtenir du *sérum*, nous utilisons des tubes secs, c'est-à-dire sans anticoagulant. Le sérum permet d'effectuer des analyses protéomiques (anticorps, nutriments, lipides et lipoprotéines). Au contraire, le *plasma* et le *sang total* sont prélevés dans des tubes contenant des anticoagulants. Les plus communs sont le citrate, qui permet d'obtenir de meilleurs résultats quant à la qualité des ARN et des ADN ; l'EDTA (Éthylène Diamine Tétracétique) n'est pas adéquat à des études cytogénétiques, mais il permet de bonnes études sur l'ADN et les protéines. Enfin, l'héparine est utilisée le plus souvent pour les études métaboliques. Le sang total est une source d'ADN et d'ARN permettant de mener des études génomiques. À partir du plasma sont réalisés des études protéomiques (études des protéines et des peptides). (Vaught & Henderson, 2012). Concernant la température optimale de congélation des éléments sanguins, certains éléments (exemple des immunoglobulines du plasma stable pendant 24 heures) peuvent rester stables quelques jours à température ambiante, cependant, il est largement préférable de conserver ces échantillons à un minimum de -80 °C. (Malsagova et al., 2020 ; Shabihkhani et al., 2014).

Le temps entre l'heure de prélèvement et l'heure de congélation des échantillons peut avoir un impact déterminant sur la qualité de celui-ci. Plus ce temps est long, plus les éléments ont le temps de se dégrader. Ce paramètre est donc un aspect préanalytique important à prendre en compte. Il faut également limiter les cycles de congélation-décongélation (Malsagova et al., 2020 ; Zou et al., 2023).

La mise à disposition des échantillons au CLB

Certains CRB gèrent directement leurs demandes de mise à disposition d'échantillons, d'autres passent par des intermédiaires. Au CLB, à l'exception des essais cliniques sous responsabilité de la Direction de la Recherche Clinique et de l'Innovation (DRCI), toute demande d'échantillon de la collection institutionnelle, qu'elle soit interne ou externe au site, passe d'abord par le comité médico-technique (CMT). Le CMT est un comité pluridisciplinaire (regroupant des médecins, des chercheurs...) dont les membres donnent leur avis en toute impartialité et en toute transparence ; ils s'assurent notamment des accords à prendre, de la conformité réglementaire et de l'éthique des projets présentés. Ils accompagnent enfin le responsable de la recherche sur les démarches complémentaires le cas échéant. Le CLB mène ses propres essais cliniques, dit de promotion interne (environ 100 EC) et a également un rôle de prestataire pour des essais à promotions externes (environ 450 EC).

État de l'art de la recherche pédiatrique

Les cancers de l'enfant sont des maladies rares et distinctes de cancers de l'adulte demandant une recherche spécifique. Avec un taux de survie à 5 ans supérieur à 80 %, toute pathologie cancéreuse confondue, ils constituent un enjeu de santé publique important. Les types de cancers les plus fréquents chez les moins de 17 ans sont les leucémies, les tumeurs du système nerveux central et les lymphomes. Quasiment inexistantes chez les adultes, les tumeurs embryonnaires (neuroblastome, rétinoblastomes, néphroblastome) représentent un quart de ces tumeurs pédiatriques. Le caractère rare de ces maladies et l'aspect légal complexe rendent cette population sous-représentée dans la recherche médicale (Catchpoole et al. 2020; INCA 2024b).

Les mécanismes sous-jacents et les traitements des cancers de l'enfant sont généralement différents de ceux des adultes. Le métabolisme d'un enfant, ses réactions immunitaires, l'hétérogénéité moléculaire de ses affections et bien d'autres aspects varient grandement selon l'âge. Ainsi, les médications contre les cancers touchant des adultes, sont souvent lourdes de conséquences et inadaptés aux cancers touchants les enfants. De plus, les séquelles, qu'elles soient physiques (troubles de croissance, amputation...) ou psychologiques (anxiété, culpabilité du survivant...), risquent d'avoir un impact bien plus marqué chez un enfant. La balance bénéfice-risque se retrouve changée et des méthodes thérapeutiques spécifiques aux enfants doivent être développées (Cianflone et al., 2023).

Malgré son intérêt, la recherche pédiatrique reste sous-représentée, le développement de nouvelles thérapies pour les cancers pédiatriques n'est pas optimal. Les principaux facteurs expliquant ce fait sont la faible incidence des cancers pédiatriques à laquelle s'ajoutent leur complexité moléculaire, la complexité des protocoles réglementaires et aspects éthiques, la réticence des responsables légaux à inclure leur enfant dans des essais cliniques, et le manque d'intérêt économique (financements et bénéfices faibles) pour les industries pharmaceutiques. En effet, les investissements dans le développement de traitements ciblés pour des maladies rares sont souvent jugés peu rentables (Valle-Simón et al., 2023).

Dans ce contexte, les biobanques pédiatriques jouent un rôle crucial. Elles permettent de centraliser des échantillons biologiques rares, collectés dans le cadre du soin ou de la recherche, et de les conserver dans des conditions optimales pour une réutilisation ultérieure. Ces ressources sont essentielles pour mener des études longitudinales, notamment sur les rechutes ou les seconds cancers à l'âge adulte. Posséder des données antérieures sur leurs états de santé peut faciliter leur traitement, mais également permettre d'étudier les facteurs (génétiques, environnementaux, épidémiologiques) impliqués dans la survenue des cancers pédiatriques (Catchpoole et al., 2020 ; Cianflone et al., 2023).

Les CRB peuvent participer à différents niveaux de la recherche. Dans la phase préclinique, précédant la mise en place de protocoles cliniques chez l'homme, la recherche s'appuie généralement sur des « modèles pré-cliniques », qui sont de différents types :

- In vivo, dans un organisme vivant (xénogreffes sur des souris, lapins... immunodéficient),
- In vitro, en dehors d'un organisme vivant (sur des lignées cellulaires),
- In silico, qui sont des modèles informatiques ou mathématiques.

Ces modèles permettent d'évaluer entre autres l'efficacité, la toxicité, les effets d'une molécule d'intérêt thérapeutique sur le corps (pharmacodynamique) et les effets du corps sur cette molécule (pharmacocinétique) (Inserm, 2017). Il est important que les modèles précliniques représentent au mieux la diversité et les particularités des mécanismes propres à chaque cancer. Ils sont d'ailleurs très souvent dérivés d'échantillons tumoraux conservés en biobanque, comme c'est le cas pour les lignées ou les xénogreffes. Elles permettent de tester des combinaisons thérapeutiques, d'étudier les mécanismes de résistance ou encore d'identifier de nouveaux biomarqueurs (Valle-Simón et al., 2023).

Dans la phase clinique, sur le plan réglementaire, la recherche pédiatrique soulève des enjeux éthiques spécifiques. Le consentement à la participation à une étude clinique doit être recueilli auprès des titulaires de l'autorité parentale, et l'assentiment de l'enfant est requis dès lors qu'il est en âge de comprendre. L'assentiment ne remplace pas le consentement, mais il témoigne de la volonté de l'enfant à participer et doit toujours prévaloir sur l'avis des parents. Cette exigence renforce la nécessité d'une information claire, adaptée à l'âge, et d'un accompagnement individualisé. Il est important que les jeunes malades soient conscients de ce qu'implique leur participation à un essai clinique, tout comme les bénéficiaires qui en résulteraient. (Catchpoole et al., 2020 ; Cianflone et al., 2023).

Un autre enjeu majeur est celui du reconsentement à l'âge adulte. Lorsqu'un patient atteint la majorité, il doit être informé de l'utilisation de ses échantillons et données, et donner son accord pour leur conservation et leur réutilisation. Cette démarche peut être délicate, notamment pour les patients ayant survécu à un cancer pédiatrique. Lorsque recontacter le patient s'avère impossible ou très délicat lors d'une requalification d'échantillons biologiques, en France, l'article L1211-2 du Code de la Santé Publique (CSP) autorise, sous certaines conditions, à demander une dérogation à l'information. Elle est délivrée par un Comité de Protection des Personnes (CPP) agréées par le ministère de la Santé (Légifrance, 2021a).

Les biobanques jouent un rôle crucial face à ces problématiques. En centralisant les échantillons, elles permettent de sécuriser les démarches de mise à disposition de ces éléments en assurant la traçabilité des consentements, des échantillons eux-mêmes et de leurs données, tout en

respectant les normes éthiques et réglementaires. Cette organisation est essentielle pour garantir la qualité des recherches menées à partir de ces ressources biologiques précieuses. L'utilisation d'échantillons pédiatriques issus du soin, et donc sans manipulation autre que celles réalisées dans le cadre de la prise en charge du patient, et transmis à la recherche est une aide précieuse pour combler ces besoins en ressources rares. (Annaratone et al., 2021).

Le CLB favorise l'inclusion de ses patients pédiatriques dans diverses études cliniques, de promotion interne comme externe. Médecins, infirmières de recherche clinique, attachés de recherche clinique et biobanquiers du Centre travaillent en coopération afin de fluidifier le parcours et optimiser la prise en charge.

Neuroblastome : caractéristiques cliniques, génétiques et enjeux de recherche

Se développant dans la partie rétropéritonéale (derrière l'abdomen), le cou, le thorax ou le pelvis le plus souvent, les neuroblastomes (NB) sont des tumeurs embryonnaires rares. Ils sont issus d'une malformation des cellules des crêtes neurales, aux dépens du système nerveux sympathique. Le diagnostic est le plus souvent réalisé à l'âge médian de 18 mois et 97 % du temps détecté avant 10 ans. Il représente environ 10 % des cancers de l'enfant pour 15 % des décès ; c'est la tumeur solide extracrânienne la plus fréquente chez les enfants avec un taux de survie à seulement 50 % pour les cas à haut risque. Les neuroblastomes peuvent avoir un fort potentiel métastatique, mais certains involuent de manière spontanée. Dans les cas de NB à haut risque, les patients répondent souvent au traitement avant qu'une rechute ne se manifeste. Cette maladie est généralement sporadique (sans antécédents familiaux ni transmission génétique) et plus rarement héréditaire. Elle est également souvent détectée en postnatal (Kee Kiat Yeo, 2024 ; Sharma et al., 2025).

Maladie hétérogène, avec diverses représentations cliniques et une complexité moléculaire, les premiers symptômes sont observables à l'examen physique du patient. Ce sont des tumeurs plus ou moins grosses, à divers endroits (glandes surrénales, compression de la moelle épinière, cellules nerveuses...) qui entraînent des signes tels que la protrusion des yeux, des masses dures dans l'abdomen, des nodules sous la peau... Selon l'emplacement de la tumeur, le pronostic du patient est plus ou moins engagé. Les indications géniques les plus communes sont une amplification du gène MYCN dans les NB à haut risque ainsi qu'une mutation du gène ALK et des altérations chromosomiques (Krawczyk & Kitlińska, 2023).

Le traitement des neuroblastomes dépend de l'âge de l'enfant, de son état de santé, du risque et du stade de la pathologie. Si la tumeur n'involue pas de taille par elle-même, le traitement principal en cas de NB de faibles risques est la chirurgie (retrait de la tumeur). Mais en cas de risques plus élevés, la chimiothérapie, la radiothérapie, la greffe de cellule souche ou l'immunothérapie peuvent être nécessaires (Sharma et al., 2025).

La recherche scientifique autour du neuroblastome est importante et des établissements tels que l'Institut Curie, le CLB et l'Institut Gustave Roussy y participent. HR-NBL2 (Numéro national d'essai clinique : NCT04221035) est un essai clinique international multicentrique de phase 3 incluant des patients, et l'un des plus importants pour la cause. De manière générale, les chercheurs se concentrent sur les biomarqueurs et la caractérisation génétique afin d'identifier des cibles thérapeutiques. Des modèles précliniques venant de lignées cellulaires sont produits à partir d'échantillons tumoraux. Pour cela, l'ADN et les chromosomes des échantillons mis à disposition doivent être stables et analysables. Les modèles précliniques, les cultures cellulaires en 2D, voire plus complexes, en 3D et les cellules reprogrammées sont également exploitées afin de faire avancer la recherche. Une approche combinée de traitements est aussi en cours d'étude. Des xénogreffes sont tout autant réalisées afin d'étudier la croissance de la maladie, les métastases qu'elles engendrent, les mécanismes de récives et les différentes réponses aux traitements dans des organismes vivants. Ces dernières sont un bon modèle *in vivo*, mais coûteux en termes de temps et d'investissement (Krawczyk & Kitlińska, 2023 ; Tucker et al., 2023).

Le pronostic d'un NB dépend essentiellement de la quantité de stroma, de l'âge du patient, du stade clinique de la tumeur (local ou métastatique), des gènes altérés et de l'aspect pathologique de la tumeur (présence de nodule ou non). Cela permet de classer le NB de haut ou de bas risque. La recherche a donc besoin de certaines données comme le stade pathologique au moment du diagnostic, les mutations génétiques éventuelles, les données de survie, la viabilité cellulaire, l'aspect de la tumeur, etc. L'hétérogénéité de la maladie implique qu'un nombre important d'échantillons peut permettre d'étudier un plus grand panel de version de la maladie.

Présentation de la collection de Neuroblastome du CLB : État des lieux

On la nomme « collection Neuroblastome », car ce sont des échantillons collectés par le CLB en tant que centre de référence pour le diagnostic du Neuroblastome. Composée de 21 389 échantillons (dont 50 % de NB), cette collection rassemble 117 maladies, provenant de presque 3 650 patients pédiatriques.

Ces échantillons sont issus de différentes maladies (neuroblastome, lymphome non Hodgkinien, adénocarcinome, glianglioneurome, sarcome d'Ewing...) à différents stades pathologiques. Ils ont été collectés lors du diagnostic, lors d'une rechute (1^{ère}, 2^{ème} ...), d'autres lors du début, pendant et à l'arrêt d'une chimiothérapie ainsi qu'avant ou après une chirurgie. Mais ils ont tous été prélevés dans le cadre d'un soin courant.

Conditions de conservation et organisation des données

Les échantillons peuvent avoir été reçus congelés ou frais. Ils sont conservés dans trois congélateurs à -80°C et une cuve d'azote gazeux à -160°C. Les échantillons peuvent avoir été congelés

à sec, avec de l'isopentane ou avec du DMSO. Les blocs FFPE et les lames blanches sont gardés à température ambiante.

Lors de la mise en place de la collection, les données associées aux échantillons ont été renseignées dans des classeurs. Puis, l'ère de l'informatique s'est installée et la collection s'est poursuivie sur une base Access, nommée BANQUE MAT NB (BM-NB) et des fichiers Excel. Ces données regroupent toutes les informations disponibles sur les prélèvements depuis 40 ans, telles que l'identification du patient, la date de congélation du prélèvement, le diagnostic associé, le stade de la maladie...

Les échantillons sont répartis en cinq catégories (figure 1) :

- Les **échantillons tissulaires** (sains et tumoraux associés), regroupant des biopsies (cerveau, rein, foie, ganglions, colon, nodule...), des blocs de paraffine (FFPE) et des lames,
- Les **ADN tumoraux** extraits des échantillons tissulaires,
- Le **matériel normal** conservé en **culot sec** et en **DMSO**,
- Les **échantillons sanguins** : plasma EDTA, plasma citrate, sérum, sang total, moelle et cellules (lymphocytes, NK),
- Les **ADN constitutionnels (ADN-ant)**, issus de l'extraction des échantillons des deux tables précédentes.

Cette collection abrite également des **éléments liquides** tels que du LCR, des ponctions, du liquide pleural et des ascites.

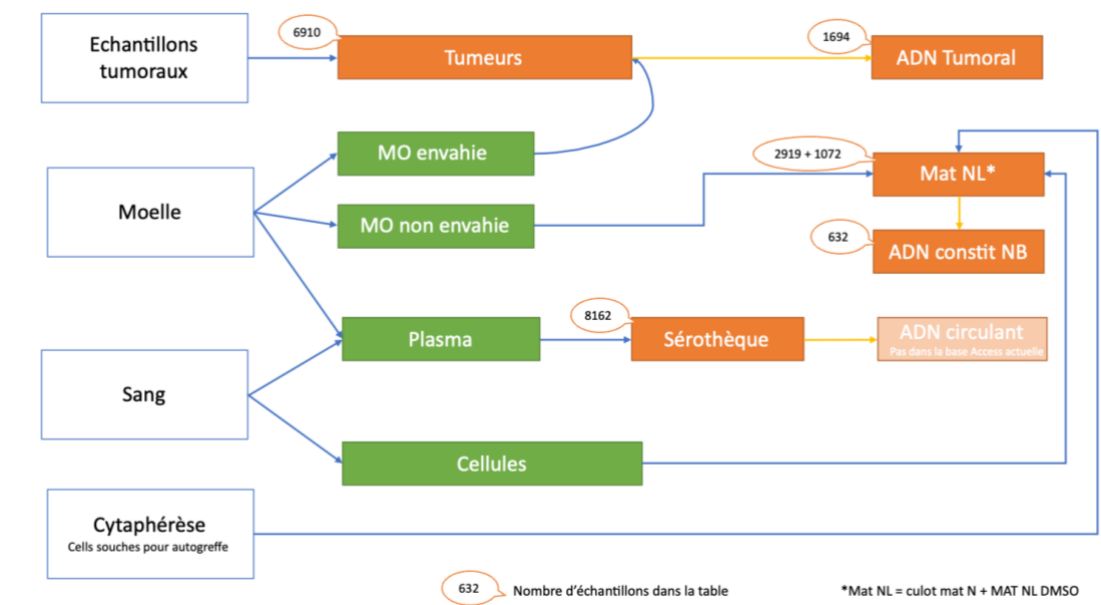


Figure 1 : Association des prélèvements et des tables dont ils sont issus

Légende :

En blanc, les types d'échantillons ;

En vert, les différents sous-types d'échantillons permettant leur rangement ;

En orange, les tables de la base BM-NB associées.

Cette collection de neuroblastome a finalement un fort potentiel d'intérêt pour la recherche. Notamment, car elle est constituée de divers types d'échantillons associés à un même patient qui permettent de comparer différents stades pathologiques (primitif ou rechute) à des cas sains.

Problèmes identifiés

Cette base a été complétée au fil des années par différents techniciens de laboratoire et des incohérences ainsi que de nombreuses informations étaient manquantes et/ou hétérogènes. Un long et fastidieux travail afin de réharmoniser toutes les données a été effectué dans la première partie de mon alternance et décrit plus en détail dans un précédent rapport ainsi que dans un article scientifique. Les informations manquantes ont ensuite permis d'établir des critères de conservation ou d'exclusion des échantillons à la collection.

Problématiques du mémoire et intérêt

À première vue, il est très pertinent d'intégrer la « collection Neuroblastome » à la collection institutionnelle, notamment car ces échantillons sont des échantillons pédiatriques, et par conséquent rares.

Disposer d'un ensemble important d'échantillons, accompagnés de données cliniques et diagnostiques fiables, est une opportunité d'approfondir la connaissance de ces maladies : suivre l'évolution des protocoles thérapeutiques, l'impact de l'hétérogénéité tumorale sur les traitements, approfondir l'identification de nouveaux marqueurs pronostiques ou prédictifs de réponse aux traitements et analyser les mécanismes de résistance. Une telle collection est particulièrement précieuse pour mener des études longitudinales, translationnelles et multicentriques, en partage avec d'autres institutions de recherche. De plus, l'antériorité de cette collection apporte l'intéressante opportunité d'étudier l'évolution des conditions de conservation d'une collection datant de 40 ans.

Cette collection réunit des milliers d'échantillons pédiatriques accumulés depuis plus de quarante ans dans des conditions de conservation globalement pertinentes, mais avec une gestion des données hétérogènes. Malgré cela, elle constitue une ressource rare et précieuse pour la recherche pédiatrique, tant par le grand nombre d'échantillons que par la diversité des profils cliniques (stades différents de la maladie, âges variés...) et l'ancienneté de la collection.

L'enjeu majeur réside dans la mise en conformité de cette collection avec les exigences actuelles de qualité, de traçabilité, de réglementation et d'éthique appliquées par les CRB. D'une part, la diversité des supports de stockage (papier, base Access, tableaux Excel) et le recul incomplet sur certains paramètres préanalytiques (délai de congélation, usage d'anticoagulants, etc.) remettent en question la qualité de certains échantillons. D'autre part, l'intégration dans la collection institutionnelle du CLB implique de réexaminer au préalable la validité réglementaire des prélèvements, notamment en ce qui concerne le consentement et la réutilisation d'échantillons pour

la recherche. Ces aspects sont particulièrement sensibles pour une pathologie rare comme le neuroblastome et pour les patients mineurs, soumis à des contraintes légales spécifiques (accord parental, consentement une fois l'âge adulte atteint...).

L'enjeu principal du projet est donc de requalifier cette collection en définissant des critères d'acceptation clairs, en harmonisant les données, en évaluant la qualité des échantillons par des tests ciblés, et en assurant leur traçabilité via le système BIMS-Gestion CRB. Ce travail implique une collaboration étroite entre la PGEB, la Direction du Système d'Information et des Données (DSID).

L'aspect financier de l'intégration d'une telle collection n'est pas développé dans ce rapport, car son impact reste minime. En effet, les congélateurs contenant les échantillons sont déjà à disposition de la PGEB, il faudra simplement inclure leur maintenance au plan actuel.

Au-delà de cette mission ponctuelle, l'intégration de la collection Neuroblastome constitue un modèle de réflexion reproductible pour la valorisation d'autres collections rétrospectives. Les enseignements tirés de ce projet pourront être appliqués à des initiatives similaires, dans un objectif de pérennisation, de standardisation et d'optimisation des ressources biologiques conservées en biobanque. L'objectif final étant d'offrir aux chercheurs un accès optimisé à des échantillons rares et pertinents.

À travers ces objectifs, le mémoire vise non seulement à répondre aux impératifs qualité et réglementaires liés à la conservation d'échantillons biologiques d'intérêt pédiatrique, mais aussi à souligner l'impact scientifique et médical de ces ressources dans la lutte contre les cancers de l'enfant. L'effort pour sécuriser et valoriser la « collection Neuroblastome » s'inscrit ainsi pleinement dans les missions du Centre Léon Bérard, tout en ouvrant des perspectives innovantes pour la recherche pédiatrique et la biologie des tumeurs rares.

Ce mémoire a donc pour but de décrire la réponse aux objectifs et questions directrices suivantes :

1. Définir et appliquer des critères d'acceptation pour intégrer la collection au CRB : validité et complétude des données, conformité réglementaire, qualité analytique des échantillons pour la recherche scientifique.
2. Définir un plan d'action visant à remédier aux lacunes (consentement, traçabilité des prélèvements, procédures de stockage), en cohérence avec les exigences éthiques et normatives.
3. Décrire le modèle de suivi pérenne, permettant d'assurer la gestion, la mise à disposition et l'actualisation de la collection, en lien avec les processus déjà en place à la PGEB.

Les procédés utilisés afin de répondre à ces problématiques seront développés dans la partie méthodologie qui suit.

Méthodologie

Veille bibliographique

Une bibliographie concernant les aspects réglementaires, éthiques et l'intérêt scientifique s'appliquant au sujet a été réalisée. Tout comme le nettoyage de la base de données, cette veille est décrite avec plus de détails dans le même précédent rapport. Une brève description de cette démarche sera décrite ci-dessous et les résultats les plus pertinents repris dans la partie résultat.

Concernant la partie éthique et réglementaire, cette recherche s'est basée sur des lois du code de la santé publique, de la Commission Nationale Informatique et Libertés (CNIL) et du Règlement Général sur la Protection des Données (RGPD). Il a fallu définir le type de recherche (RIPH ou RNIPH) dans lequel s'inscrivait la collection NB, le mode de gestion du consentement des patients depuis quarante ans et les démarches à suivre afin d'être en conformité réglementaire. La PGEB, active depuis 2010 a déjà de nombreux systèmes en place qui ont facilité les processus.

La partie sur l'intérêt scientifique a été construite autour de la place de la recherche pédiatrique, et notamment du neuroblastome dans le monde scientifique ainsi que l'importance de la contribution des biobanques à ce sujet.

Une veille a également été conduite afin d'établir les tests de qualité susceptibles de donner des indications sur la qualité des échantillons et leur potentiel d'utilisation. Des méthodes d'extractions, de coupe-congélation et de vérification de la viabilité cellulaire ont été retenues.

Cette veille a ainsi permis de définir, en premier lieu, les méthodes de tri des échantillons et les corrections à effectuer sur la base.

Tri des échantillons et corrections de la base

Le tri de la collection a reposé sur la définition de critères d'acceptation, visant à évaluer la pertinence des échantillons pour une intégration dans la collection institutionnelle.

La recherche et l'harmonisation des données étaient des étapes critiques à cette valorisation. Avant toute correction et reprise, les anomalies de la base Access ont été identifiées :

- L'absence de Dossier Patient Informatisé (DPI) : certains échantillons n'étaient pas rattachés à un dossier patient. Il a fallu les réassocier, lorsque cela était possible, à l'aide de leurs échantillons frères présents dans la table.
- La présence d'échantillons dont le matériel a été épuisé, intitulé « 0 MAT » et dont les données ont été exclues du transfert.
- L'absence de consentement d'utilisation. Il a fallu exclure ces échantillons de la possibilité de mise à disposition.

- La présence d'échantillons avec des informations manquantes, qui ont été recherchées et renseignées dans la limite du possible : date, diagnostic, type de prélèvement et d'anticoagulant (pour le plasma), l'intérêt diagnostic (matériel normal avec ou sans échantillon tumoral associé).
- La présence d'échantillons ayant subi des excursions de températures. Phénomène ayant pu altérer leur qualité et les rendre inutilisables.
- La présence d'échantillons portant la mention « À JETER ». Cette mention avait été ajoutée par la précédente responsable de la collection, potentiellement car l'échantillon se révélait sans intérêt pour la recherche ou était de mauvaise qualité.

Les données ont été complétées par recherches informatiques puis manuelles (si inévitables) dans les bases disponibles. Une fois ces données renseignées, la base Access a été transférée sur un nouveau tableau Excel. Les dates de naissance, de décès, de prélèvement, ainsi que le diagnostic ont permis de réaliser les correspondances entre les différentes tables pour associer un patient à chacun de ses échantillons. Pour cela, des formules Excel telles que « UNIQUE », « RECHERCHEX » et « RECHERCHEV » ainsi que des tableaux croisés dynamiques ont été utilisées.

Puis, les échantillons ont été triés en fonction de différents critères qui ont permis de les classer en quatre catégories : à conserver, à éliminer, testeurs, conservés par le service de Biopathologie.

Les échantillons « à conserver » rassemblent ceux dont les informations sont complètes.

Les échantillons « à éliminer » sont divisés en deux parties. Ceux dont le matériel est épuisé ou dont il manque l'emplacement ne seront éliminés qu'informatiquement, c'est-à-dire non transférés dans la base de données. Ceux qui présentent des défauts les rendant inapplicables pour la recherche (excursions de température, origine du prélèvement et anticoagulant [pour le plasma] inconnu, consentement nul) seront physiquement éliminés des congélateurs.

Les échantillons sélectionnés comme « testeurs » ont été sélectionnés en fonction des **informations manquantes** (diagnostic manquant/inintéressant ou date de prélèvement approximative) qui les rendaient inexploitable pour la recherche, mais adéquats pour effectuer des contrôles qualité ou des vérifications de méthodes. Pour le travail ici présenté, ils seront utilisés afin de vérifier leur qualité physique. Pour la sélection finale des testeurs, d'autres critères ont été pris en compte : **type** (tissulaires, produits sanguins ou dérivés), **données antérieures disponibles** (résultat d'analyse ADN au NanoDrop par exemple), **date** de congélation ou de prélèvement (afin d'établir une échelle sur le temps), et du **nombre d'échantillons associés** au même patient afin de faire des comparaisons.

Les échantillons « conservés par le service de Biopathologie » sont des échantillons sanguins d'adultes sains. Ils étaient renseignés dans le même fichier Access que les échantillons pédiatriques,

mais n'en sont pas en réalité. Le service de Biopathologie a souhaité les conserver sous sa responsabilité pour la réalisation de contrôles internes à leur service.

Un schéma a ainsi été dressé (annexe 1) afin de suivre un schéma identique de tri pour chaque table.

Implication de la DSID

La DSID du CLB est responsable du développement informatique et des projets (dont la gestion des DPI), du fonctionnement informatique et support des données enregistrées, ainsi que de la structuration et la réutilisation des données de santé, bien entendu dans le respect des droits des patients. Ils ont donc joué un rôle important dans l'intégration des données de la collection. Plusieurs réunions ont été menées afin de régler différents problèmes :

- Les champs et thésaurus à modifier ou à créer afin de pallier les différences entre la base Access et les besoins de la BIMS-Gestion CRB. Les champs concernaient par exemple les dates de sortie/d'utilisation des échantillons, l'établissement où a été effectué le prélèvement ou encore les commentaires associés. Tandis que les thésaurus dépendaient du type d'échantillon, du contenu du tube ou encore du diagnostic associé à un échantillon. L'annexe 4 regroupe l'ensemble des informations transformées.
- L'enregistrement des échantillons dans la base de données avec toutes leurs informations associées. Il a fallu différencier les échantillons mis à disposition et les testeurs (qu'ils soient sélectionnés ou non). Les échantillons avec ou sans DPI, à créer de manière anonymisée ou non.

Cela a permis de faciliter le transfert pour le service informatique et de s'assurer que les bonnes informations se trouvaient dans les bons champs.

Contrôles qualité

Afin d'étudier l'intégrité physique et moléculaire des échantillons, des contrôles qualité usuels du laboratoire ont été réalisés sur les échantillons identifiés comme testeurs.

Le tableau 1 reprend les méthodes et objectifs ainsi que les appareils utilisés afin de réaliser ces contrôles.

Méthode	Appareil	Nombre et type d'échantillon	Objectifs
Étude de la morphologie cellulaire par analyse de coupes à congélation de 5µm Coloration et lecture des lames par médecin anatomopathologiste	Cryostat CM1950 <i>Leica Biosystems</i>	25 tissus (sains et tumoraux)	Etude de la dégradation de l'échantillon en corrélant son état physique et son état moléculaire (intégrité ADN / ARN).
Analyse de la viabilité cellulaire des cellules sanguines	Cellometer K2 <i>Nexcelom Bioscience</i>	4 PBL (lymphocytes du sang périphérique) en DMSO	Comparaison de deux paires de duplicats. Ils ont été stockés côte à côte en azote. On s'attend à une faible différence, inférieure à 10%.
Extraction des acides nucléiques	Kit AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit ou kit AllPrep DNA/RNA Mini Kit <i>Qiagen</i>	30 échantillons Tissus, PBL, Moelle, Sang	Analyse de l'intégrité des acides nucléiques (ADN/ARN)
Dosage des acides nucléiques	Qubit Flex Fluorometer (<i>Thermo Fisher Scientific</i>), NanoDrop 8000 (<i>Thermo Fisher Scientific</i>), TapeStation 4200 (<i>Agilent</i>)	42 échantillons (total) Tissus, PBL, Moelle, Sang, ADN (constit et tumoraux)	<u>Qubit Flex Fluorometer</u> : (fluorimétrie) concentration ADN <u>NanoDrop 8000</u> : (spectrophotométrie) concentration ADN/ARN, ratios 260/280 (protéines) et 260/230 (sels, solvants) <u>TapeStation 4200</u> : (électrophorèse) DIN, RIN, DV200, rapport 28s/18s

Tableau 1 : Tableau des méthodes et objectifs des contrôles qualité

Il faut préciser que :

- Les rapports 260/280 (protéines) et 260/230 (sels, solvants) définissent la pureté des échantillons, c'est-à-dire la présence de contaminants pouvant fausser les résultats.
- Le NanoDrop surestime souvent les concentrations des produits dérivés, contrairement au Qubit. Cela s'explique par la différence de technologie utilisée (absorbance contre fluorimétrie) (Techozyme, s. d. ; Versmessen et al., 2024).
- Le DV200 est un paramètre permettant de déterminer l'intégrité globale de l'ARN : évalue le pourcentage de fragments de plus de 200 nucléotides (Matsubara et al., 2020).
- Le RIN et le DIN sont les indices d'intégrité respectivement de l'ARN et l'ADN.
- Le rapport 28 s/18 s est automatiquement fourni par l'appareil. Ce paramètre ne sera pas interprété, car il n'est plus demandé par les chercheurs. Le DV200 et le RIN sont actuellement les outils demandés et les plus performants pour étudier la qualité de l'ARN.

Pour chacun de ces paramètres, les valeurs minimales acceptables définies sont celles utilisées pour la PGEB, car la collection est à disposition de leurs clients. Ils dépendent de la demande des chercheurs, mais le plus souvent, ces demandes viennent de la PGC (Plateforme Génomique des Cancers) du CLB. Le document de référence utilisé par la PGEB se trouve en annexe 2. Cependant, les critères de la littérature seront également développés dans la partie résultat.

Ces contrôles qualité sont des premières étapes essentielles, car ils permettent de voir, à coûts raisonnables, si les échantillons seront exploitables par la suite (Lucena-Aguilar et al., 2016 ; Michalska-Falkowska et al., 2023). Selon ces résultats d'extraction, des techniques de caractérisation moléculaire telles qu'une amplification en chaîne par polymérase (PCR), le séquençage haut débit (Next Genome

Sequencing, NGS), ou l'hybridation in situ en fluorescence (FISH) peuvent par la suite être utilisés dans le cadre du diagnostic et/ou de l'étude des échantillons.

Comparaisons et analyses des échantillons contrôlés

L'analyse des échantillons testeurs a été structurée autour de quatre axes complémentaires :

- L'**analyse de la qualité intrinsèque** :
 - Concentration mesurée au NanoDrop et au Qubit,
 - Les ratios de pureté 280/260 et 260/230,
 - Les indices d'intégrité de l'ADN et de l'ARN (DIN / RIN)
 - Et enfin le DV200 (pour l'ARN).

Un score global de ces paramètres a été attribué à chacun des échantillons. Plus il était élevé, plus la ressource était considérée comme exploitable pour la recherche. Ces scores ont été regroupés sous forme de graphique afin d'étudier la tendance formée.

- La comparaison de la **qualité des échantillons** en fonction de :
 - Leur **date de prélèvement**. Nous étudions :
 - Leur RIN et DIN en fonction des années,
 - Les ADN extraits il y a plusieurs années ; en comparant les valeurs des contrôles historiques avec les valeurs obtenues dans le cadre du projet.
 - Leur **mode de conservation** : en azote gazeux ou en congélateur -80 °C selon le type d'échantillon.

Une partie de ces graphiques ont été réalisés par le biais de COPILOT, l'IA approuvée par le CLB pour toute utilisation professionnelle. Seules les données chiffrées issues des tests qualité ont été transmises afin de s'assurer de la confidentialité des données. Les IA pouvant commettre des erreurs, les valeurs apparaissant sur les graphiques générés ont été vérifiées.

- La comparaison de la **qualité des échantillons supposés identiques** : plusieurs morceaux provenant de la même tumeur, conservés dans des emplacements très proches dans une même enceinte de stockage. Ils ont été extraits le même jour, par la même méthode et le même opérateur. Le paramètre majeur inconnu étant la manipulation lors de la phase préanalytique. Cette étape permet d'étudier les différents biais pouvant influencer l'aspect qualitatif d'un échantillon.

Pour les comparer, les différences en valeurs absolues ont été calculées sur Excel pour les paramètres suivants : DIN, RIN, rapport 260/280, concentrations et DV200.

- Et enfin, la **viabilité cellulaire** a été mesurée sur quatre échantillons de PBL conservés en DMSO. Bien que l'effectif soit limité, cette étape a permis d'obtenir une première estimation de la capacité de survie des cellules après décongélation, en complément des analyses moléculaires.

Pérennité et suivi de la collection

Afin de garantir la pérennité, la conformité réglementaire et la valorisation scientifique de la collection Neuroblastome, une réflexion sur son suivi a été établie. Cette démarche, intervenant après le tri, vise à définir une structure de pilotage adaptée aux collections rétrospectives, en précisant les responsabilités des acteurs impliqués (PGEB, chercheurs, grandes instances, etc.), les circuits de validation éthique et les modalités de mise à disposition des échantillons. Un modèle s'appuyant sur les processus de la PGEB a ainsi été esquissé, incluant :

- La désignation d'un référent scientifique pour la collection. Il sera consulté pour toutes demandes concernant la collection.
- L'intégration et l'utilisation de la collection selon les processus de la PGEB, au même titre que les autres collections conservées dans un but similaire.
- L'intégration des demandes d'accès aux échantillons au circuit du comité médico-technique interne. Ce dernier sera composé, le cas échéant, de professionnels spécialisés dans le sujet ; notamment pour les points éthiques, médicaux (pédiatre, anatomopathologiste) et de recherche (chercheurs dans la pédiatrie).
- L'évaluation annuelle de l'usage et de l'état de la collection à l'aide d'indicateurs prédéfinis (qualité analytique des échantillons, nombre de demandes et d'échantillons mis à disposition, etc.).

Ces mesures sont pensées pour s'inscrire dans la démarche qualité de la PGEB, en conformité avec les référentiels en vigueur (ISO 20387). Il pourra être affiné en fonction des décisions institutionnelles et des orientations stratégiques du CLB.

Résultats

Aspects réglementaires et éthiques

Les biobanques manipulent des données sensibles, souvent identifiantes. La PGEB travaille en étroite collaboration avec la partie hospitalière du CLB ; le personnel habilité a donc accès aux noms, prénoms, dates de naissance des patients. Néanmoins, lors de la mise à disposition d'échantillons, ces derniers sont (pseudo)anonymisés conformément aux exigences réglementaires.

Selon l'article R1121-1 du CSP, il existe deux grands types de recherches cliniques :

- Les recherches impliquant la personne humaine (RIPH) définies par la loi Jardé, loi encadrant les règles de consentement des patients. Elles nécessitent un consentement explicite des patients pour l'utilisation des prélèvements. Ces échantillons peuvent être utilisés à d'autres fins secondaires seulement si une réutilisation a été prévue et acceptée lors de la signature du consentement. Il faut également que ces échantillons ne soient plus utiles au diagnostic.
- Les recherches n'impliquant pas la personne humaine (RNIPH), pour laquelle l'information et la non-opposition des patients sont suffisantes à l'utilisation des échantillons.

Le CLB héberge des échantillons pour ces deux types de recherche (CNIL, 2024 ; Légifrance, 2021b).

Les données associées aux échantillons sont soumises au RGPD, soit le Règlement (UE) n° 2016/679, applicable en France depuis le 25 mai 2018. Ce règlement renforce les dispositions déjà établies par la CNIL, l'autorité française chargée de la protection des données personnelles. Les droits des personnes concernées incluent la rectification, l'effacement, l'opposition ainsi que la limitation du traitement et de l'utilisation des données. Les responsables du traitement ont l'obligation d'informer préalablement les individus, de désigner un délégué à la protection des données (DPO), de tenir un registre des traitements, de réaliser une analyse d'impact (évaluation des risques liés aux données, à leur utilisation, leur support et leur sécurité). Le traitement des données est également encadré par des contrats spécifiques. Toute violation de données doit être déclarée à la CNIL, qui propose des méthodologies de référence. Ces références définissent le cadre d'utilisation des données de santé en fonction de leur contexte d'utilisation (CNIL, 2016).

Cette collection suit la Méthodologie de Référence 004 (MR-004) de la CNIL (article 73 de la loi « Informatique et libertés »). La MR-004 est destinée aux RNIPH et inclut deux types de recherche, dont « Les recherches sur des données déjà collectées, lors du soin ou de recherches antérieures (réutilisation de données) ou des données collectées dans le cadre de la prise en charge médicale, au fil de l'eau. » Ce qui est le cas de cette collection dans laquelle les échantillons ont d'abord été prélevés dans le cadre du soin et du diagnostic. Leur conservation n'implique plus aucune intervention sur les donneurs dans le cadre de la recherche.

Depuis 2004, les patients reçoivent une information via le livret d'accueil du CLB mentionnant l'utilisation secondaire de leurs échantillons à des fins de recherche. Cependant, les éléments sur cette communication avant cette année sont absents pour une partie des patients et il faut s'assurer qu'ils ont donc bien reçu les informations pertinentes.

Outre le consentement des patients, la collection doit être déclarée auprès de grandes instances telles que le ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Selon l'article L. 1243-4 du Code de la Santé Publique, « Tout organisme qui assure la conservation et la préparation de

tissus et cellules, d'organes, de sang, de ses composants et de ses produits dérivés, issus du corps humain en vue de leur cession pour un usage scientifique doit être titulaire d'une autorisation délivrée par le ministre chargé de la recherche ». Cette autorisation est valable 5 ans et le renouvellement à effectuer au plus tard 4 mois avant la date d'échéance de l'autorisation en cours. La collection étant existante depuis plusieurs années, elle est déclarée conformément à la réglementation et plusieurs autorisations ont déjà été délivrées. Ainsi, la PGEB possède une Déclaration CODECOH : le droit de conserver des échantillons biologiques dans le cadre des projets de recherche du Centre ; et une Autorisation CODECOH, pour la cession de ces échantillons. Ce sont deux démarches distinctes avec une signification différente. Notre Déclaration CODECOH a été réalisée de manière assez large pour qu'une nouvelle demande intégrant la collection NB ne soit pas nécessaire. Les échantillons la composant sont déjà mentionnés.

Dans notre contexte, il était délicat de recontacter les patients, notamment car le caractère de cancer pédiatrique rend le sujet extrêmement sensible pour les malades et leurs familles. Ainsi, il a été décidé de saisir un CPP. Ces comités d'éthique, issus de la loi Huriot-Sérusclat, sont responsables de délivrer une dérogation concernant la réutilisation d'informations patients sans les en réinformer au préalable.

Cependant, nous avons reçu un avis défavorable de ce dernier. Pour cause « En l'absence de protocole de recherche, le CPP ne peut pas statuer. » Nous avons donc demandé un réexamen de notre cas, en précisant de nouvelles informations. L'annexe 3 présente la dernière lettre leur étant adressée, elle regroupe les deux précédentes lettres ayant essuyé un refus.

En cas de nouveau refus, nous pourrions :

- Documenter et saisir la CNIL afin de justifier le fait qu'elle rentre dans le cadre de la méthodologie MR004, afin de respecter l'aspect RGPD.
- Intégrer la collection Neuroblastome à notre Autorisation CODECOH.
- Limiter l'utilisation des échantillons pour lesquels le consentement n'était pas adapté à toutes les utilisations.
- Demander une dérogation à l'information à chaque demande de mise à disposition dans le cadre d'un projet de recherche.

Une autre solution aurait été d'anonymiser les données dont l'information n'a pas été faite. Mais cela implique un fort biais éthique, en plus de potentiellement pénaliser le patient dans le cadre de son suivi médical, si ce dernier devait revenir.

En attendant, nous avons rempli une « déclaration de traitement de données et d'analyse des risques ». Cette procédure gérée par le Délégué à la Protection des Données (DPD) du CLB permet de

déterminer le type de traitement de données personnelles et les conditions qui s'y appliquent, tout en s'assurant de respecter les codes du RGPD.

Catégorisation de la collection

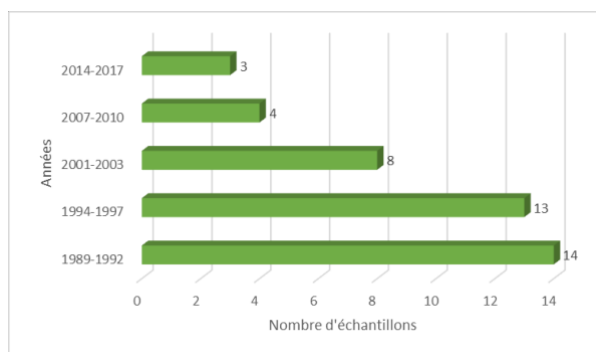
Pour être conservées et mises à disposition de la recherche, les données minimales choisies ont été : le diagnostic, la date de congélation/prélèvement, l'emplacement, le consentement, le type de prélèvement et d'anticoagulant (pour le plasma), la tumeur d'origine (pour les ADN tumoraux) et l'intérêt diagnostic.

Si l'une de ces conditions n'était pas respectée, les échantillons étaient soit enregistrés comme testeurs soit éliminés. Ci-dessous, une description plus détaillée des quatre catégories finales dans lesquelles ils ont été rangés :

- À conserver (« MAD ») : *13 810 échantillons*
 - Les échantillons avec toutes les informations disponibles en priorité,
 - Les échantillons ayant subi une excursion de température, mais précieux (échantillons difficilement prélevables tels que la moelle ou le LCR),
 - Les échantillons sans consentement, mais qui doivent être conservés pour raisons médico-légales (avec indication qu'ils ne peuvent être mis à disposition),
 - Les échantillons dont la date est approximative : seule l'année est disponible.
- À éliminer (« El Physique / El info »)
 - Physiquement, *1 865 échantillons* :
 - Les échantillons de mauvaise qualité (excursions de T°, reçu décongelé),
 - Ceux dont nous n'avons pas pu retrouver de cruciales informations,
 - Dont nous ne connaissons pas le type de prélèvement ou d'anticoagulant utilisé ou l'échantillon père (pour les ADN tumoraux),
 - Et enfin, ceux avec un refus de consentement d'utilisation.
 - Informatiquement, *4 983 échantillons* :
 - Les échantillons dont le matériel est épuisé (« 0 MAT »),
 - Dont nous ne connaissons pas l'emplacement ou le numéro de culot du tube de conservation.
- Testeurs (« Testeur », *550 échantillons* + « Test Q », *42* échantillons sélectionnés*)
 - Les échantillons dont il manquait la date de congélation/de prélèvement,
 - Les échantillons dont il manquait le diagnostic,
 - Les échantillons d'intérêt pour tester la qualité de la collection, mais sans intérêt pour la recherche,

- Les testeurs potentiels qui pourront servir à des formations pour les techniciens sur des techniques d'extraction ou de coupe au cryostat.

Les échantillons ont été catégorisés par période et par type dans la figure 2 et le tableau 2. Nous observons une majorité d'échantillons datant de plus de 20 ans. En effet, ce sont les échantillons les plus susceptibles d'avoir été impactés par la conservation à long terme et par conséquent les plus intéressants à étudier dans le cadre actuel.



Echantillons	ADN	MO	PBL	Sang	Tumeurs	
Nombre	12	3	6	1	20	Total = 42

Tableau 2 : Nombre d'échantillons testeurs en fonction du type

Figure 2 : Nombre d'échantillons testeurs par tranche d'années

➤ Conservés par le service de Biopathologie (« Transfert Coll ») ou mis à disposition, 142 échantillons :

- Cette catégorie concerne des échantillons qui n'ont pas été transférés. Ils ont été soit conservés par le service de Biopathologie (« échantillons sains »), soit conservés par une équipe de recherche du site (lignées cellulaires), soit utilisés avant l'enregistrement dans la gestion du CRB (échantillons de patients inclus dans un essai clinique, sur demande du promoteur).

L'élimination des échantillons a été réalisée de manière physique et informatique. Comme il est précisé dans les articles R. 1335-8 et R. 1335-11 du CSP, l'élimination des déchets biologiques à la PGEB suit un processus (MO-1587 de la PGEB) précis : les tubes ont été sélectionnés, sortis de leur stockage et jetés dans des bacs DASRI (Déchets d'Activités de Soins à Risques Infectieux) adéquats afin d'être incinérés. Concernant l'élimination informatique, les échantillons ont été identifiés comme éliminés dans la base de données BM-NB et exclus de la liste des échantillons à transférer informatiquement. Ils seront conservés dans un Excel au cas où ils seraient retrouvés en dehors de l'emplacement renseigné, ils pourront tout de même être identifiés.

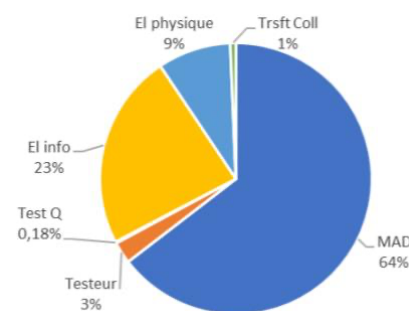


Figure 3 : Répartition des échantillons par catégorie (en %)

La figure 3 et le tableau 3 résument pour chaque table la répartition des échantillons en fonction de la catégorie. Nous observons que ce sont les échantillons des tables Sérothèque et Tumeurs qui ont été les plus affectés par ce tri ; avec respectivement 57 % et 63 % d'échantillons transférés dans la base de données de la PGEB. Ce sont également les tables avec le plus d'échantillons au départ.

	Total ech dans la table	MAD	Testeur	El info	El physique	Trsft Coll	Test Q	Total ech transférés dans Gestion CRB (MAD+Testeur)	% d'échantillons conservés / table
ADN Constit	632	483	38	1	17	86	7	521	82%
ADN Tumoral	1694	1586	66	26	5	6	5	1652	98%
Culot MAT NL	2919	2116	73	561	163	1	5	2189	75%
MAT NL DMSO	1072	838	167	21	42	0	4	1005	94%
Sérothèque	8162	4542	112	2282	1182	44	0	4654	57%
Tumeurs	6910	4245	94	2092	456	5	18	4339	63%
Total	21389	13810	550	4983	1865	142	39*	14360	67%

Tableau 3 : Tableau récapitulatif de la répartition des échantillons

* NB : Trois tumeurs ont été utilisées comme testeurs, et remises dans la catégorie « Mise à disposition » par la suite.

Légende

En gris, le nombre total d'échantillons par table

En bleu les échantillons conservés et transférés dans la Gestion CRB par table

En jaune, le pourcentage d'échantillons conservés et transférés dans la Gestion CRB

Résultats des tests qualité

Les tests décrits dans la partie Contrôles qualités (tableau 1) ont été réalisés sur l'ensemble des échantillons, selon leur type.

L'extraction d'ARN a été réalisée sur 25 échantillons (tumeurs, MO, PBL), l'extraction d'ADN sur 30 échantillons (tumeurs, MO, PBL, sang) et 12 échantillons d'ADN ont été dosés.

La qualification des échantillons se fait sur les critères d'intégrité du matériel obtenu (RIN, DIN, DV200, ...), paramètres dont la mesure peut être influencée par la concentration, elle-même dépendante de la taille du fragment ou du nombre de cellules dans l'échantillon de départ. Il est à noter que le RIN et le DIN n'ont pu être calculés que sur les échantillons avec une concentration suffisante (> 20 ng/μL), dû aux seuils de détection minimums des appareils de dosage (NanoDrop, Qubit et TapeStation). Les résultats de ces extractions ont ensuite été analysés par une combinaison de tests descriptifs et statistiques.

Analyse de la qualité intrinsèque des échantillons

Une recherche dans la littérature scientifique actuelle a été effectuée et mise en parallèle des critères de conformité par technique d'analyse demandés par la PGC (annexe 2). Cela a permis de dresser le tableau 4, et d'établir des scores pour nos échantillons testeurs (figure 4).

QC	Seuils de la littérature scientifique					
DIN	> 7	Seuil	< 3	3 - 7	> 7	
		Score attribué	0	3	5	
A260/280 ADN	1,8-2,0	Seuil	< 1,8	> 1,8		
		Score attribué	0	5		
A260/230 ADN	2,0-2,2	Seuil	< 2,0	> 2,0		
		Score attribué	0	3		
[Conc ADN]	QT min dépend de la technique	Seuil (ng/μL)	< 7	7 - 13	13 - 20	> 21
		Score attribué	0	1	2	3
RIN	> 7	Seuil	< 3	3 < x < 7	> 7	
		Score attribué	0	3	5	
DV200	> 30%	Seuil (%)	< 20	21 - 40	40 - 60	> 60
		Score attribué	0	2	4	6
A260/280 ARN	2,0-2,2	Seuil	< 2,0	> 2,0		
		Score attribué	0	5		
A260/230 ARN	2,0-2,2	Seuil	< 2,0	> 2,0		
		Score attribué	0	3		
[Conc ARN]	QT min dépend de la technique	Seuil (ng/μL)	< 7	7 - 13	13 - 20	> 21
		Score attribué	0	1	2	3

Tableau 4 : Tableau d'attribution des scores, à partir des seuils de la littérature scientifique actuelle

Légende :

Score maximum ADN : 16 ; Score maximum ARN = 22

Score global maximal = 38

L'objectif de ce scoring est de déterminer si un échantillon peut être considéré comme exploitable en prenant en compte plusieurs paramètres. Les scores attribués à chaque paramètre reflètent leur poids dans l'évaluation globale de la qualité d'un échantillon. Le DIN et le RIN sont les marqueurs principaux exigés par les plateformes d'analyse, suivi du rapport 260/280 et du DV200. Le rapport 260/230 et la concentration sont davantage fluctuants et moins représentatifs de la qualité. Ainsi, ils présentent des scores moins impactant.

Ex : si la qualité d'un ADN est idéalement DIN > 7 (score = 5), il est parfois accepté d'utiliser un ADN de qualité inférieure si les autres paramètres sont bons et selon l'usage qui en est fait (on associe donc pour un DIN entre 3 et 7 un score = 3). En revanche un ADN de DIN < 3 est en deçà du seuil de qualité acceptable (score à 0).

Les échantillons tumoraux reçoivent en moyenne des scores plus élevés, car ils combinent à la fois des résultats ADN et ARN. Cela signifie que même s'ils présentent un score supérieur à 10, il faudra ensuite regarder séparément les scores de qualité des paramètres d'ADN et d'ARN tumoraux.

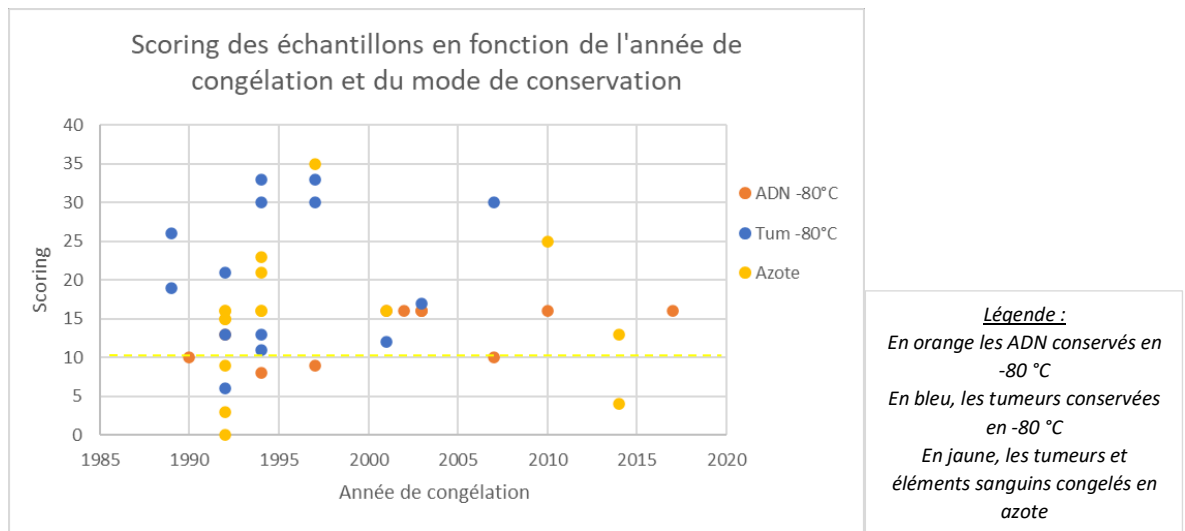


Figure 4 : Scoring des échantillons testés, en fonction de l'année de congélation et du mode de conservation

Nous étudions les valeurs les plus basses parmi les 42 échantillons testés : 9 présentent un score inférieur ou égal à 10. Parmi eux, 4 échantillons d'ADN (score entre 8 et 10), présentent un DIN > 7 et une concentration > 20 ng/μL. Mais leurs rapports 260/280 et 260/230, témoins de la présence d'une contamination, présentent des résultats en dessous des seuils. Comme les paramètres clés sont bons, ils restent exploitables sous réserve des critères spécifiques à l'usage prévu. Il serait également possible de repurifier les acides nucléiques pour se débarrasser des contaminants.

Les 5 autres échantillons sont des tissus tumoraux (scoring entre 0 et 6), qui après extraction ont des concentrations ARN (< 7 ng/μL) et ADN (entre 0,45 et 16,50 ng/μL) assez faibles. De plus, trois de ces échantillons présentent des dégradations physiques (« coloration pâle, cellules altérées ») d'après le médecin anatomopathologiste qui a lu les lames. Pour ceux-ci, nous concluons à une inexploitabilité.

En conclusion, un **score entre 7 et 10 doit être analysé au cas par cas** : il peut masquer des échantillons encore exploitables, notamment si les marqueurs principaux sont bons, mais que la pureté est dégradée. Mais un **score inférieur ou égal à 6** est très probablement **évocateur d'une mauvaise qualité globale**, tant sur le plan moléculaire que physique.

Les concentrations et les quantités minimales

Les concentrations et les quantités minimales en ADN et ARN sont des paramètres importants pour déterminer si un échantillon peut être utilisé pour réaliser une technique d'analyse moléculaire (NGS, PCR et FISH dans le cadre du neuroblastome). Les concentrations minimales nécessaires à leur réalisation sont très diverses et varient en fonction des laboratoires et des techniques utilisées. Les concentrations oscillent de 1 à 20 ng/μL tandis que les quantités minimales vont de 1 ng à 100 ng. À la PGEB, avec chaque demande est précisée la quantité souhaitée (*NGS concentration, Sciensano 2022*).

Les concentrations mesurées, pour l'intégralité des échantillons, montrent que :

- Pour l'ADN, nous obtenons une concentration moyenne de 338 ng/μL, avec 78 % des échantillons avec une concentration supérieure à 25 ng/μL.

Les quantités actuelles de nos ADN, outre 4 valeurs extrêmes (9 ng ; 25 ng ; 117 420 ng ; 123 600 ng), se situent entre 218 ng et 64 400 ng par aliquote.

- Pour l'ARN, nous obtenons une concentration moyenne de 75 ng/μL et 48 % d'échantillons au-dessus de ce seuil de 25 ng/μL.

La quantité par aliquote varie entre 106 ng à 14 416 ng.

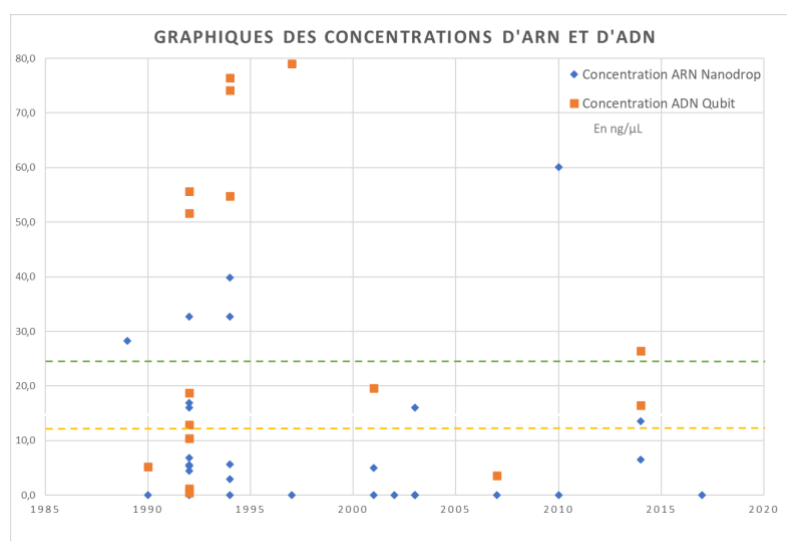


Figure 5 : Graphique des concentrations d'ARN et d'ADN des échantillons testeurs

Légende

Seuil vert standard = 25 ng/μL

Seuil jaune = 11 ng/μL (seuil intermédiaire, certaines extractions d'ADN restent valides en dessous de ce seuil)

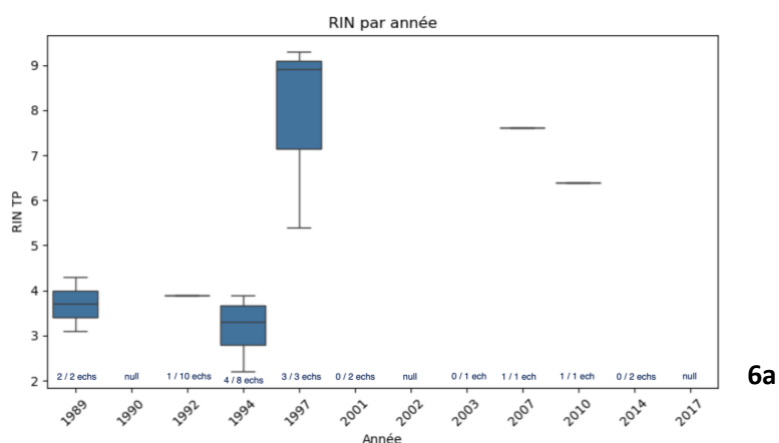
La figure 5 représente les concentrations d'ARN (en bleu) et d'ADN (en orange) en fonction de leur année de prélèvement. Ici sont représentés 19 échantillons sur les 25 d'ARN et 16 sur les 42 échantillons d'ADN. Les échantillons restants ont tous une concentration > à 80 ng/μL. Ils ont été exclus du graphique, car ils rendaient sa lecture difficile.

Nous observons 13 ARN et 9 ADN en dessous du seuil de référence de 25 ng/μL. Les résultats confirment que la **majorité des échantillons (66 %) ont une concentration suffisante**, pour des analyses complémentaires, malgré quelques cas extrêmes.

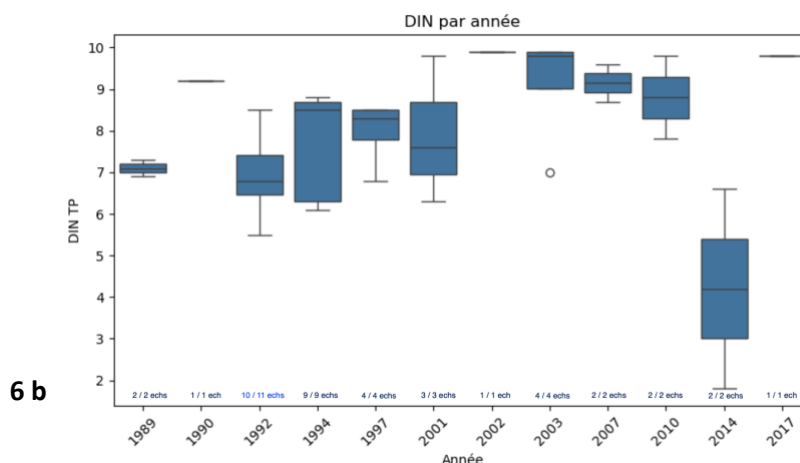
Comparaison de la qualité des échantillons

Cette partie analyse la qualité des échantillons selon deux paramètres de références : le DIN et le RIN ; en fonction de l'année de congélation de l'échantillon parent (figures 6a et 6b) et du mode de conservation selon le type d'échantillon (figures 7a et 7b).

Intégrité des acides nucléiques extraits; En fonction des dates de prélèvement/de congélation des échantillons



Les échantillons « null » sont les années pour lesquelles il n'y avait aucun échantillon à mesurer.



Figures 6a et 6b : Distribution du RIN et du DIN par année de congélation de l'échantillon parent

Sur les 25 échantillons testés pour l'ARN, seuls 12 ont un RIN mesurable. Les échantillons les plus anciens, notamment ceux de 1997 (trois échantillons), présentent les meilleurs RIN. Nous observons que les deux échantillons de 2014 ne présentent pas de valeurs, dues à une concentration trop faible (6 et 14 ng/μL) pour être analysée au TapeStation.

Concernant le DIN, qui a pu être mesuré pour 41 échantillons sur 42, nous observons des valeurs supérieures à 6 pour la majorité des échantillons, ce qui indique une bonne intégrité. Les échantillons de 2014 présentent des DIN de 1,8 et 6,6, qui suggèrent des dégradations.

Malgré les résultats des échantillons de 2014, nous pouvons supposer que les échantillons récents restent tout de même globalement de meilleure qualité, car les conditions de préparation, de conservation et de suivi des échantillons se sont améliorées avec le temps. Ce résultat nous permet également d'estimer que malgré l'âge des échantillons, si les conditions de manipulation (et de stockage) ont été correctement suivies, un échantillon de presque 30 ans peut figurer parmi les plus exploitables.

On observe également que pour un même échantillon, l'ADN se conserve effectivement mieux que l'ARN.

Intégrité des acides nucléiques extraits; Comparaison de valeurs dosées entre 2003-2010 et redosage en 2025

L'évolution des paramètres peut rendre compte de la stabilité dans le temps d'un échantillon. À défaut d'avoir les mesures des DIN et RIN de l'époque, le tableau 5 présente la comparaison des valeurs de concentrations et rapports 260/280 mesurés au NanoDrop en 2003-2010 contre le redosage de ces sept mêmes échantillons en 2025.

Année 1ère extraction	[Concentration] ADN (ng/μL)			Rapport 260/280		
	T0	T0-2025	Différence	T1	T1-2025	Différence
juin-2003	1088	753	-335	1,61	1,93	0,32
dec-2003 Normal	979	1079	100	1,57	1,87	0,30
dec-2003 Tum	1016	666	-350	1,54	1,87	0,33
juil-2007	1179	24	-1155	1,76	1,74	-0,02
mars-2010	2391	648	-1743	1,63	1,84	0,21
oct-2010	232	3005	2773	1,80	1,68	-0,12
juil-2017	479	646	168	1,81	1,80	-0,01
<i>p-value, Wilcoxon apparié</i>	<i>p = 0,57</i>			<i>p = 0,21</i>		

Tableau 5 : Comparaison de la concentration et rapport 260/280 (2003-2010 vs 2025)

À première vue, nous observons des variations. Mais un test de Wilcoxon démontre une différence non significative (car une p-value > 0,05) entre la première extraction des ADN et leur redosage. Cela démontre une stabilité globale, bien que les résultats restent à prendre avec du recul, notamment dû au faible nombre d'échantillons impliqués. Les écarts peuvent s'expliquer par l'évolution des techniques d'extraction et de dosage, la calibration du NanoDrop, la dilution effectuée ou encore l'homogénéisation de l'échantillon avant dosage (la viscosité pouvant avoir un impact). Une perte importante de concentration se justifie par des conditions de conservation inadéquates : tube mal refermé, ayant subi plusieurs cycles de congélation-décongélation ou également un mauvais dosage lié à la manipulation de l'appareil de mesure.

On observe cependant un écart grotesque de l'échantillon d'octobre 2010 ; il présente une augmentation de concentration de 2 773 ng/μL. Nous avons vérifié les paramètres au Qubit et au TapeStation, de respectivement 79 et 105 ng/μL, qui semblent plus cohérents.

Nous avons donc refait les dosages, et nous avons obtenu des résultats similaires pour le Qubit (90 ng/μL) et le TapeStation (86 ng/μL), mais une concentration au NanoDrop de 1 006 ng/μL. Le NanoDrop mesure donc certainement des contaminations. Le graphique des résultats fournis par le NanoDrop allant également dans ce sens.

Cette situation prouve l'intérêt de tester les échantillons avec divers appareils afin d'étudier et de mettre en perspective les résultats obtenus.

Intégrité des acides nucléiques extraits; En fonction du type d'échantillon et du mode de conservation

La figure 7a présente la variation du RIN selon le type d'échantillon et le mode de conservation.

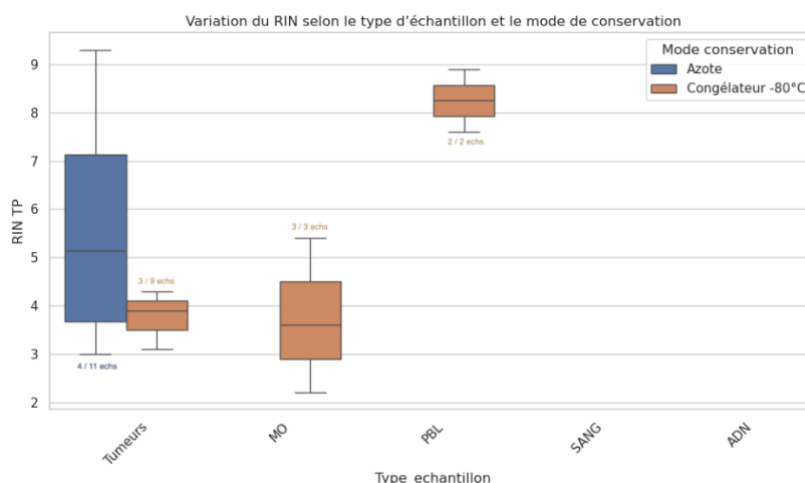


Figure 7a : Variation du RIN selon le type d'échantillon et le mode de conservation

- Les **échantillons tumoraux** sont répartis dans la tranche de 1989-1997 et l'année 2010 :
 - En azote, le RIN va de 3,0 (1994) à 9,3 (1997). Les deux autres échantillons présentent des RIN égaux à 3,9 (1994) et 6,4 (2014).
 - En -80 °C, les valeurs sont plus homogènes avec des RIN égaux à 3,10 (1989) ; 3,9 (1992) et 4,3 (1989).
- Les **échantillons de moelle (MO)** présentent un minimal et maximal respectivement égaux à 2,2 (1994) et 5,4 (1997).
- Les **PBL** conservés en congélateur sont les échantillons présentant les meilleurs RIN avec des RIN égaux à 7,6 (2007) et 8,9 (1997).

Concernant le mode de conservation, un t-test a mis en évidence l'absence de différence significative (p -value t-test = 0,28) entre la conservation en azote et en congélateur -80 °C, probablement du fait de la faible taille de l'échantillonnage. L'interprétation des résultats des RIN est ici délicate, car il y a peu d'échantillons, davantage d'échantillons testés seraient nécessaires. Ces résultats sont statistiquement fragiles. Nous pouvons tout de même souligner que, quelle que soit la méthode de conservation, les ARN tumoraux présentaient des concentrations très faibles. Les RIN n'ont ainsi pas pu être calculés pour plus de la moitié des échantillons. Nous observons également une plus grande dispersion des RIN pour les tumeurs, signe potentiel d'une susceptibilité à la dégradation des ARN par rapport aux ADN. En effet, la structure en simple brin de l'ARN le rend plus fragile et susceptible aux dégradations, contrairement à la structure double brin de l'ADN. Ainsi, l'ARN est un

indicateur plus précis de l'état d'un échantillon. Mais le DIN reste complémentaire lors de la vérification de l'intégrité des échantillons.

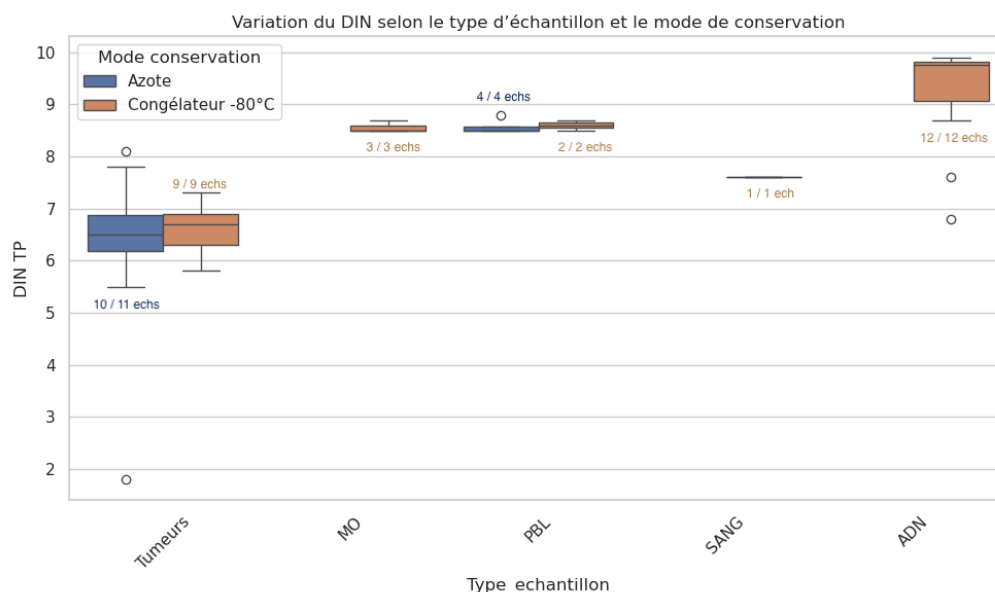


Figure 7b : Variation du DIN selon le type d'échantillon et le mode de conservation

La figure 7 b présente la variation du DIN selon le type d'échantillon et le mode de conservation. Le graphique met en évidence :

- Que contrairement au RIN, le DIN a pu être calculé sur la quasi-totalité des échantillons. Cela montre une meilleure intégrité et stabilité de l'ADN. De plus, 40 échantillons sur ces 41 présentent un DIN supérieur ou égal à 5,5 ; avec une valeur maximale égale à 9,9. Nous rappelons qu'un DIN supérieur à 6,0 est généralement considéré comme acceptable pour des études moléculaires.
- Les **échantillons d'ADN-ant** (catégorie « ADN ») présentent les DIN les plus élevés, ce qui est attendu, car ils sont souvent extraits dans des conditions optimales (échantillons frais).

Le **mode de conservation** semble avoir un impact plus modéré sur le DIN que sur le RIN, avec des valeurs moins dispersées. Un test de Mann-Whitney U conclue également sur une différence non significative (p -value = 0,93) entre la conservation en azote et en -80 °C.

Le DIN est un indicateur plus facilement mesurable que le RIN, mais il reste sensible à la nature de l'échantillon. Les échantillons d'ADN-ant et les PBL sont ici les échantillons les mieux conservés.

NB : Le choix des tests statistiques a été réalisé en fonction de l'allure des données. Nous utilisons un test paramétrique avec une distribution normale (t-test) ou non paramétrique si la distribution de l'est pas (test de Mann-Whitney U).

Comparaison des échantillons : identiques ou seulement similaires ?

Il y a quatre phases dans la vie d'un échantillon destiné à la recherche : les phases de prélèvement, de préparation, de conservation et enfin de mise à disposition. Afin d'évaluer la robustesse des étapes préanalytiques (prélèvement et préparation), une comparaison a été menée entre des échantillons dits « identiques », c'est-à-dire issus du même prélèvement, conservés dans des conditions similaires (côte à côte pour la majorité), et analysés selon les mêmes protocoles. Cette étape permet d'étudier l'hétérogénéité de l'échantillonnage. Chaque échantillon possède un ou deux échantillons frères, permettant ainsi de mesurer les écarts relatifs pour différents paramètres de qualité. Nous comparons des tumeurs, des PBL et les paramètres entre de l'ADN tumoral conservé après extraction, et une nouvelle extraction de cet ADN provenant de la même tumeur.

Comparaison des différences (en valeur absolue) des échantillons identiques							
ID ech	diff-DIN	diff-260/280 ADN	diff-Conc ADN	diff-RIN	diff-260/280 ARN	diff-DV200	diff-Conc ARN
32-34-35 Azote	0,10	0,54	51,15	NA	0,99	18,45	11,54
01-02 Azote	4,80	0,07	9,90	NA	0,39	9,04	7,08
37-38 Azote	0,90	0,10	42,70	NA	0,91	21,03	11,31
29-30 Azote	0,30	0,01	21,60	0,90	0,57	15,46	7,14
07-08 Congel	0,20	0,02	11,00	NA	0,44	20,45	2,71
16-17 Congel	0,40	0,07	213,10	1,20	0,08	2,92	71,81
21-22 Congel	0,10	0,08	140,30	NA	0,78	30,16	22,42
05-06 Congel	0,20	0,01	111,00	1,40	0,01	5,47	8,00
54-55 Congel	0	0,06	528,00	3,50	0,22	2,60	344,96
08-09 ADN PBL Azote	0,30	0	108,00	NA	NA	NA	NA
35-36 ADN PBL Azote	0	0	126,00	NA	NA	NA	NA
40 ADN vs TUM	2,90	0,05	485,20	NA	NA	NA	NA
14-15 ADN vs TUM	1,80	0,32	1019,60	NA	NA	NA	NA
11 ADN vs TUM	1,30	0,28	813,00	NA	NA	NA	NA
59 ADN vs TUM	2,00	0,03	120,00	NA	NA	NA	NA
Légende	Concentration	diff ≤ 50	50 < diff < 150	diff ≥ 150			
	DV 200	diff ≤ 7	7 < diff < 15	diff ≥ 15			
	Autre paramètres	diff ≤ 1,5	1,5 < diff < 3,5	diff ≥ 3,5			

Tableau 6 : Tableau présentant les différences, en valeur absolue, des échantillons similaires

Légende :

« 32-34-35 Azote » = n° ech + mode de conservation

« 11 ADN vs TUM » = n° ech + dosage ADN tumoral contre ADN extraits de la tumeur d'origine

NB : Ce tableau n'a pas pour vocation de vérifier si les échantillons ont des résultats (DIN, RIN, DV200, ...) convenables à leur utilisation. Le tableau ne présente que les différences par échantillon, pas les résultats globaux auxquels ils se rapportent.

Les résultats complets se trouvent dans les annexes 5a et 5b.

Les résultats révèlent des variations sur plusieurs indicateurs clés tels que la concentration et le DV200. Cependant, nous voyons que le DIN et le RIN présentent peu de variations pour la majorité des échantillons.

Comme précédemment évoqué, la concentration peut changer en fonction de la quantité qui se trouvait dans le tube. Un écart n'est donc pas forcément significatif, surtout si la concentration est supérieure au seuil d'utilisation des tests moléculaires ; mais elle reste tout de même intéressante à observer. Les différences des DV200, cependant, démontrent que la qualité des ARN issus de tumeurs est très variable, même entre échantillons frères.

Ces résultats montrent que la conservation ne peut à elle seule expliquer ces disparités. L'origine des écarts réside probablement dans les étapes préalables à la congélation, notamment les conditions de prélèvement (quantité dans les tubes), le délai avant traitement, ou la manipulation des échantillons. Cette variabilité remet en question l'interchangeabilité supposée des aliquotes d'un même échantillon. Cet aspect est à prendre en compte lors d'une demande de mise à disposition. Tous les échantillons ne se valent pas...

Analyse de la viabilité cellulaire

Seulement 4 échantillons étaient adéquats à cette analyse. Deux paires d'échantillons de PBL conservés en DMSO. Le tableau 7 résume les résultats des divers paramètres mesurés pour chacune de ces paires.

Echantillon ID	Date de congélation	Quantité de cells totales (10 ⁶)	% viabilité	[C] ADN Nano (ng/μL)	260/280 Nanodrop	260/230 Nanodrop	DIN	Quantité/ aliquot (ng)	Scoring
PBL A.1	1992	7,3	46	368	1,89	2,26	8,5	5372	16
PBL A.2	1992	7,0	47	329	1,89	2,39	8,8	3744	16
PBL B.1	1994	6,5	64	261	1,88	2,19	8,5	5032	16
PBL B.2	1994	8,2	60	456	1,88	2,24	8,5	3060	16

Tableau 7 : Tableau de résultats des échantillons testeurs pour la viabilité cellulaire

Les échantillons sont peu nombreux et donc faiblement représentatifs de l'état cellulaire de la collection.

Ces quatre échantillons de PBL, congelés entre 1992 et 1994, ont été analysés pour évaluer leur viabilité post-décongélation ainsi que la qualité de l'ADN extrait. Les résultats montrent **une viabilité cellulaire comprise entre 46 % et 64 %**, ce qui reste dans une plage exploitable pour certaines applications biologiques, mais peut poser des difficultés pour des cultures cellulaires prolongées. Il est malheureusement impossible de comparer ce pourcentage ou la quantité de cellules à ceux au moment de la congélation, car les informations n'étaient pas renseignées dans la base Access.

Malgré tout, nous observons des paramètres élevés. Le DIN (8.5-8.8) témoigne d'une bonne intégrité de l'ADN malgré l'ancienneté des échantillons ; nous obtenons de bonnes concentrations (>250 ng/μL) s'expliquant par de bonnes quantités de matériel par aliquote (>3 000 ng). Les ratios 260/280 et 260/230 sont également satisfaisants (autour de 1,88 et 2,2 respectivement), indiquant

une pureté correcte de l'ADN. Ces résultats produisent un **scoring de qualité maximal** (=16) selon notre échelle.

Discussion

L'objectif de ces deux années de travail était de requalifier une collection d'échantillons rares et précieux afin qu'elle contribue à la recherche pédiatrique. Composée de 21 389 échantillons provenant de près de 3 650 patients, et de divers types (ADN, tumeurs, échantillons cellulaires), elle représente un intérêt scientifique non négligeable. La complexité du travail se trouvait dans l'état primaire de la base Access, notamment la disparité des informations renseignées.

La méthodologie a inclus un état des lieux de la collection, le suivi des processus de la PGEB, l'aide de l'équipe technique de la PGEB, du service informatique du CLB (DSID) ainsi qu'une importante bibliographie concernant les contrôles qualités, l'intérêt scientifique de la collection et la réglementation.

Réglementaire

La réglementation actuelle quant à ce type de collection est délicate. En effet, nous trouvons dans l'article L. 1211-2 du CSP une possibilité de déroger à l'obligation d'information à condition d'obtenir l'autorisation d'un CPP. Or, ce cas ne s'applique visiblement que dans le cadre d'un projet de recherche défini. Il manque ainsi des instructions quant aux démarches à suivre lorsque nous avons un statut de biobanque. C'est un travail de longue haleine soutenu par des professionnels tels que Thomas ROCHE (avocat) et Jeanne-Hélène di Donato (responsable 3cR). Nous les avons sollicités dans notre cas et des discussions sont en cours afin de pouvoir pallier ce manque d'instructions et pouvoir exploiter notre collection.

De même, le temps de conservation dans le cadre du biobanking est mal défini. Dans le cadre d'une recherche conforme à la MR-004 (ce qui est le cas ici), les données sont conservées « [...] jusqu'à 2 ans après la dernière publication des résultats de la recherche ou, en l'absence de publication : conservation jusqu'à la signature du rapport final de la recherche ». Au-delà les données peuvent être archivées pendant 20 ans sur un support distinct. Cependant, l'institut National du Cancer a émis des recommandations quant à la conservation d'échantillons dans le cadre de maladie rare, qui pourraient alors être gardés par une biobanque sans durée légale définie. Cet aspect, bien que non traité en profondeur dans ce mémoire a été pris en compte. Les échantillons étant précieux, ils seront conservés dans la limite de leur qualité, tant qu'ils n'ont pas été mis à disposition pour une recherche spécifique. Cependant, si des instructions venaient à éclaircir le sujet, les directives changeraient en conséquence.

Interprétation des résultats

Les résultats des tests sont en réalité assez surprenants. Nous observons une tendance des échantillons contraires à ce que nous pourrions penser. Notamment, ce ne sont pas les échantillons les plus vieux qui montrent les plus mauvais résultats.

Nous avons calculé l'intégrité de l'ADN et de l'ARN, mais c'est ce dernier qui nous intéresse particulièrement. En effet, l'ARN étant plus sujet à la dégradation, il est le meilleur témoin quant à la qualité d'un échantillon conservé à long terme (JoVE, 2019 ; Kornienko et al., 2024). Ce qui est particulièrement pertinent dans notre cas, car l'ADN et l'ARN ont été extraits des mêmes échantillons pour la moitié de notre sélection.

Résultats des extractions d'ARN

D'après nos résultats, le temps de conservation semble avoir un impact limité sur l'intégrité de l'ARN.

La qualité de l'ARN varie toutefois selon le type d'échantillon :

- Les PBL présentent généralement des RIN plus élevés, traduisant une meilleure intégrité de l'ARN par rapport aux autres types d'échantillons.
- Les tumeurs montrent une plus grande variabilité et des RIN souvent plus faibles, ce qui peut s'expliquer par la complexité de leur composition cellulaire (certains morceaux extraits pouvaient contenir peu de cellules) et leur sensibilité à la dégradation lors des étapes de prétraitement (temps d'ischémie, etc.).
- Les échantillons de moelle osseuse (MO) affichent des RIN plus faibles, mais ces résultats doivent être interprétés avec prudence en raison du faible effectif (n=3).

Concernant le mode de conservation, les échantillons conservés en azote gazeux présentent des RIN légèrement supérieurs qu'en congélateur -80 °C. Cependant, cette différence n'est pas statistiquement significative ($p\text{-value} = 0,28 > 0,05$) et la variabilité intragroupe suggère que d'autres facteurs préanalytiques (temps avant congélation, conditions de manipulation, etc.) pourraient jouer un rôle important. Nous ne pouvons donc pas conclure avec assurance sur l'impact du mode de conservation. Une plus grande proportion d'échantillons testés donnerait des résultats plus significatifs.

Enfin, la concentration moyenne des échantillons d'ARN est de 75 ng/μL, une quantité satisfaisante pour la majorité des applications en biologie moléculaire. Bien que 52 % des échantillons soient en dessous du seuil 25 ng/μL, la quantité totale par aliquote reste souvent suffisante pour des analyses ciblées.

Résultats des extractions d'ADN

Concernant la qualité de l'ADN, nous obtenons de bons résultats de DIN par rapport au RIN, avec des valeurs globalement élevées (valeurs moyennes = 7.6) en accord avec les données scientifiques actuelles.

- Les échantillons d'ADN-ant congelés qui ont été redosés présentent les meilleurs DIN, traduisant une excellente intégrité des échantillons.
- Les échantillons tumoraux présentent une grande dispersion des DIN, similaire à celle observée pour leur RIN. Certains présentent des signes physiques de dégradation, probablement liés à des variations dans les conditions préanalytiques. Bien que la durée de conservation puisse être un facteur, les résultats ne montrent pas de corrélation claire avec l'année de congélation, suggérant que la qualité est davantage liée à la manipulation et échantillon-dépendante.

Concernant le mode de conservation, nous observons des résultats très similaires. Les différences sont minimales et ne permettent pas d'affirmer que dans notre cas, la conservation de l'ADN est mieux en azote qu'en congélateur -80 °C. Toutefois, ces résultats sont importants, car ils montrent que les échantillons conservés à -80 °C restent parfaitement exploitables, ce qui est un point fort pour la requalification de la collection. Cela est d'autant plus pertinent que la littérature reste partagée sur la supériorité d'un mode de conservation sur l'autre, et que les pratiques varient selon les biobanques.

Résultats de la mesure de viabilité

Nous observons de faibles différences, de manière générale, entre les échantillons frères, qui présentent par ailleurs un scoring de qualité maximale. Ces échantillons datant de 1992 et 1994, nous pouvons supposer que la majorité des échantillons de PBL conservés en DMSO et traités dans les mêmes conditions de conservation présenteront des résultats aussi satisfaisants.

Les résultats obtenus démontrent que, malgré plus de 30 ans de conservation, les PBL présentent une viabilité partielle, mais exploitable, une bonne qualité d'ADN, avec un DIN élevé et des ratios de pureté acceptables.

Études des résultats globaux

Ainsi, le mode de conservation a un impact plus modéré sur la qualité des ADN que les ARN, bien que l'azote gazeux semble légèrement plus performant pour les échantillons sensibles.

Les graphiques indiquent également que, quel que soit le paramètre (RIN ou DIN), le type d'échantillon, l'année de congélation n'ont pas de réels impacts sur la qualité du prélèvement. Nous

observons par exemple de bons résultats des échantillons datant de l'année 1997 (4 échantillons provenant de 2 patients), contrairement aux échantillons de l'année 2014 (1 patient).

Plusieurs facteurs peuvent expliquer les différences qualitatives observées : l'échantillon a pu subir sa dégradation au moment de la phase préanalytique (temps d'ischémie non respecté, conditions de manipulation inadéquates...), avoir subi une excursion de température, des cycles de congélation/décongélation non renseignés dans ses données, ou encore un défaut de manipulation par le technicien. D'autres problèmes lors de la découpe, de la création des copeaux, ou encore lors de l'extraction sont envisageables. Toutefois, nous aurions observé un impact sur l'ensemble des échantillons du batch dans le cadre de ces dernières explications. Ce qui signifie que si l'ensemble des résultats étaient biaisés, nous serions revenus à un standard permettant de les comparer.

Ce sont ces mêmes paramètres qui peuvent influencer sur les différences observées entre échantillons supposés identiques. A ces raisons, s'ajoute qu'un morceau peut être moins riche en cellules, ce qui explique que nous n'avons pas pu en tirer la même conclusion.

Ces tests démontrent donc une bonne qualité globale de la collection, mais la réalisation de contrôles qualité seront essentiels afin de s'assurer que les échantillons sont exploitables dans le cadre de la recherche et adéquats à la demande de mise à disposition. Selon les standards de qualité définis au moment de la mise à disposition, les échantillons pourront s'avérer très utiles.

Cependant, il est nécessaire de noter que, pour les tests statistiques, la puissance statistique et la robustesse des résultats pâtissent de la faible taille de l'échantillonnage. En effet, la puissance statistique est la probabilité que le test détecte une différence significative s'il y en a une dans la population que les échantillons représentent. Or une différence, significative ou non, sera plus difficilement identifiée si la taille de l'échantillon est faible.

Également, la mesure des concentrations justifie qu'il manque certaines informations. Par exemple, une concentration trop faible explique qu'un RIN n'ait pu être calculé, dû à un manque de matière détectable. La concentration reste une donnée importante, car nous obtenons des informations précieuses sur la qualité grâce à la mesure des paramètres.

Le système de scoring permet une standardisation de l'évaluation et facilite la prise de décision pour la réutilisation des échantillons. Avec 78 % des échantillons ayant un score supérieur à 10, ces résultats confirment la bonne qualité globale des échantillons.

Conséquences des résultats

La qualité des échantillons a un impact crucial sur la recherche biomédicale et la fiabilité des analyses moléculaires, notamment dans le cadre d'études multi-omiques. Ces méthodes sont utilisées de façon générale en recherche sur la santé humaine et également dans le cadre du neuroblastome

(Chen et al., 2023 ; Krawczyk & Kitlińska, 2023). Ainsi, les résultats de nos tests qualité sont importants et impactant quant au devenir des échantillons.

Afin de vérifier le caractère exploitable et fonctionnel de nos acides nucléiques, une technique de PCR peut être réalisée ; 4 à 20 ng d'échantillons suffisent pour l'ADN comme pour l'ARN. Tout en ne remplaçant pas les mesures de qualité, la PCR peut servir de test fonctionnel :

- Si l'ADN ou l'ARN extrait est intact et pur, la PCR produira une amplification efficace.
- Si l'échantillon est dégradé ou contaminé, l'amplification sera faible, absente ou non spécifique.

Ce résultat nous indique donc si l'échantillon peut être utilisé dans des études de caractérisation moléculaire voire des études multi-omiques.

Ces méthodes sont cohérentes avec l'article *Applied Molecular-Based Quality Control of Biobanked Samples for Multi-Omics Approach* (Michalska-Falkowska et al., 2023). Cet article définit la construction d'un workflow attestant de l'utilité des méthodes d'extraction et d'études morphologiques avant de s'engager dans des tests plus coûteux tels que la PCR comme outils d'évaluation de la qualité.

De récentes recherches attestent également que les modifications des histones, la méthylation de l'ADN ou encore le fonctionnement de certaines molécules telles que les microARN, des régulateurs de l'expression génique à l'étape post-transcriptionnelle sont anormaux dans le cadre des neuroblastomes. Les échantillons tissulaires peuvent également abriter des biomarqueurs spécifiques à la pathologie (Sharma et al., 2025).

Cela signifie bien que dans le cadre de la recherche, nos échantillons peuvent se révéler précieux. Cela démontre également que nos contrôles qualité sont cohérents avec les méthodes permettant de futures utilisations des échantillons, notamment pour des applications en génomique (PCR, séquençage), où l'intégrité des acides nucléiques est primordiale.

Traçabilité des données

Une des difficultés de ce projet a été de s'assurer de la traçabilité et la fiabilité des données ; les données renseignées, mais également les données qu'il a fallu retrouver. Les collections actuelles sont le plus souvent construites selon un schéma cadré et identique. C'est-à-dire que les données sont uniformisées et standardisées, avec des données minimales, et toute personne habilitée peut remplir les données sans provoquer d'écart majeur. Dans ce projet, de nombreux croisements, entre les tables Access du fichier d'origine et les dossiers patients (informatiques et papiers) des patients ont été exploités. Cela a pu être possible grâce à un management des données régulé et appliqué, ayant évolué avec le temps. Ainsi, lors d'une prochaine étape de requalification d'une ancienne collection, il sera

essentiel de d'abord s'assurer de l'état des données ; vérifier si les données sont complètes, pertinentes, correctes et disponibles.

Lorsqu'un doute se pose sur une information pour un échantillon, il vaut mieux l'exclure que le conserver au risque de fausser les étapes suivantes.

Devenir des échantillons testeurs

Les testeurs finaux, avec lesquels ont été réalisés les contrôles qualités (coupe-congélation, viabilité et mesures sur l'ARN et l'ADN) ont été identifiés, enregistrés dans le BIMS-Gestion CRB puis rangés dans des congélateurs -80 °C ou en azote (selon le type d'échantillon). Ils pourront être intégrés à une procédure d'étude de stabilité des échantillons au sein de la PGEB. Les résultats de 2025 serviront de point de départ de ce suivi.

Pérennité et suivi de la collection

L'objectif de ce travail était l'intégration de la collection Neuroblastome dans la collection institutionnelle. Cela signifie qu'une fois ce travail accompli, la gestion de la collection s'intégrera à celle des collections déjà existantes à la PGEB. Elle demandera, comme tout autre, une coordination entre les techniciens de la PGEB, le référent scientifique dédié à la collection, les chercheurs et le comité médico-technique pour la validation des projets de recherche.

Concernant le suivi de la collection, la gestion du CRB permettra l'enregistrement de ces échantillons, afin de faciliter le suivi des demandes de mises à disposition et de leurs sorties.

Une procédure sera également rédigée afin de garantir la pérennité de la collection. En effet, les informations étaient multiples, denses et parfois mal organisées. Bien qu'un travail de grande ampleur ait eu lieu, il peut rester des coquilles. Il est donc important que tous acteurs, et en premier lieu les techniciens, puissent connaître et pallier les potentielles erreurs restantes. Cette procédure précisera entre autres un accès au fichier d'origine ainsi que les éléments dont il faudra se méfier.

Coûts

Selon l'article 16-5 du Code civil, le principe de non-patrimonialité du corps s'applique aux échantillons biologiques récoltés et cédés. Ni le patient donneur ni la biobanque ne peuvent réclamer une rémunération. Cependant, chaque étape de la gestion d'échantillons biologiques est coûteuse et les services associés à cela peuvent être rémunérés.

Dans cette situation, l'aspect du coût et des ressources utilisées afin de mener à bien le projet sont relativement minimes. En effet, aucun système de stockage (congélateur ou cuve d'azote) ni

congélateur n'a dû être déplacé, car le transfert de la collection restait intrastructurel. Cependant, récupérer une ancienne collection peut engendrer des frais de traitement, notamment de logistique, de transfert physique et informatique des échantillons et leurs données.

Le transfert de cette collection Neuroblastome s'est inscrit dans les activités de la plateforme. Ces frais ont impliqué sur le moyen terme l'implication d'une alternante et le temps de membres du système informatique. Sur le long terme, ces coûts regroupent la maintenance des enceintes de stockage ayant changé de responsabilité et selon les demandes, les techniciens membres de la PGEB (mise à disposition, méthodes d'extractions, de coupe-congélation...) et de médecins anatomopathologiste du CLB (lecture et interprétation des lames).

Recherche pédiatrique au CLB

Le CLB a pour vocation d'offrir à ses patients un circuit d'accompagnement complet et d'excellence ; du dépistage aux traitements les plus innovants, il prend en compte des aspects annexes tels que la nutrition et la réadaptation en regard de chaque individu et de son cancer. Conjointement avec l'activité de soin, le CLB participe au développement d'une recherche interdisciplinaire de pointe en recherche contre le cancer en s'appuyant notamment sur les équipes du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL).

Médecins, infirmiers de soins et de recherche clinique, promoteurs, attachés de recherche cliniques (ARC) pédiatriques, techniciens de laboratoire, chercheurs et bien d'autres acteurs sont impliqués dans la recherche clinique pédiatrique.

Chacun intervient à un rôle différent, mais tous travaillent en collaboration. Lorsqu'un enfant est accueilli au CLB, ses parents signent un consentement général concernant l'utilisation de ces échantillons en tant que reliquat du soin. Mais l'inclusion dans un essai clinique pédiatrique diffère. Nous recueillons le consentement des deux parents ou de l'autorité parentale et l'assentiment des enfants (selon leur âge et leur capacité de compréhension). Le consentement implique que les tenants et les aboutissants du projet aient été compris, tandis que l'assentiment signifie un accord, même si tous les aspects du projet n'ont pas été entièrement saisis.

Cette recherche n'est en réalité pas si différente de celle impliquant des adultes. Les soins peuvent être plus délicats, car les prélèvements sont effectués sur des enfants, les techniques doivent être adaptées. Ainsi, les rôles du médecin et des infirmières (cliniques et d'étude) sont essentiels et demandent davantage de vigilance que dans les cas d'adultes. Vigilance quant aux explications que l'on donne, l'assentiment de l'enfant, la compréhension des parents, etc. Mais une fois ces échantillons récoltés, bien que plus précieux, car plus rares, ils sont traités de la même manière.

Le CLB, participant à des études pédiatriques telles que EuroNet-PHL-C2 (NCT02684708), un essai clinique multinational ; ou encore l'essai MICCHADO, porté par l'Institut Curie. Mais ce site de Grange Blanche est également un lieu de travail pour des médecins et équipes dévoués à la recherche pédiatrique telles que celles composant le CRCL :

- « KidsCaN — Neuroscience du cancer et métastase des cancers pédiatriques » portée par Mme Céline DELLOYE-BOURGEOIS,
- Ou encore « Mort cellulaire et cancers de l'enfant », portée par Mme Marie CASTETS et Mr Jean-Yves BLAY, directeur général du Centre Léon Bérard.

Ces collections représentent les potentielles futures collections historiques.

Conclusion

Ce travail avait pour ambition d'accompagner l'intégration de la collection rétrospective « Neuroblastome » dans la biobanque institutionnelle du Centre Léon Bérard (PGEB) et d'en démontrer l'intérêt scientifique, qualitatif et réglementaire.

Les critères d'acceptation des échantillons ont pu être définis et le tri effectué. À partir de ces critères ont été réalisés des tests de qualité sur un panel représentatif d'échantillons. Ils ont démontré :

1. Une conservation globalement satisfaisante des échantillons (d'après les extractions ADN/ARN et les re dosages des ADN), sans corrélation directe entre la date de congélation et la dégradation,
2. Un impact modéré du mode de stockage (-80 °C vs azote gazeux) sur l'intégrité des acides nucléiques, confirmant que les anciens et actuels modes de conservation restent adaptés et similaires,
3. Une hétérogénéité entre échantillons, attribuables non uniquement à l'ancienneté, mais également à des facteurs préanalytiques variables (délais et manipulations précongélation, densité cellulaire...).

Sur le plan réglementaire et éthique, l'étude a mis en lumière les zones d'ombre qui subsistent pour la requalification d'anciens échantillons. La plupart de ces problématiques sont liées au fait que cette collection ne s'inscrit pas dans un projet de recherche défini, mais susceptible d'être mis à disposition de la communauté scientifique. Des interrogations subsistent :

- Quelles instances sont à saisir et quel mode opératoire suivre en l'absence de projet de recherche ciblé ?
- Comment établir la durée de conservation au-delà d'une recherche clinique ?

- Quelle est la nécessité d'une réinformation du patient dans le cadre d'une utilisation secondaire, d'autant plus délicate que l'on traite d'échantillons pédiatriques ?

Ces constats ont motivé la consultation d'experts juridiques.

L'importance de ce travail a résidé dans la stabilisation de cette collection, afin qu'elle puisse s'ajouter aux ressources déjà existantes. La gestion de la collection rejoindra les procédures existantes de la PGEB. Elle bénéficiera désormais du même suivi spécifique que toute collection sous la responsabilité de la PGEB, grâce notamment aux compétences des techniciens et au logiciel BIMS-Gestion CRB. Cela assurera la pérennité de la collection et garantira qu'en cas de besoin, elles puissent être exploitées. Ce modèle pourra servir de référence pour d'autres collections historiques confrontées aux mêmes défis.

Malgré la taille limitée de l'échantillonnage test et quelques données manquantes, les résultats convergent vers une conclusion positive :

- La qualité de la collection la rendant globalement exploitable, sa valeur ajoutée pour la recherche en oncopédiatrie semble élevée.

Implication de ce travail

En théorie, l'intérêt et l'importance de cette collection sont élevés. En pratique, il est possible que son utilisation soit malheureusement minime. Il faut également prendre en compte le fait que certains échantillons conservés ne seront en réalité pas aussi exploitables que souhaité. Cependant, une bonne visibilité de la collection (intégration au catalogue) et de bons tests qualité pour chaque échantillon mis à disposition peuvent aider à résoudre ce problème.

L'avantage de ce travail est également qu'il pourra servir d'appui à de futures intégrations d'anciennes collections. Nous savons qu'un premier état des lieux de la collection est nécessaire : statuer sur son état, la pertinence de ses données, comment elles ont été renseignées et suivies au cours du temps.

On vérifiera ensuite la cohérence de ces données et les moyens pour lier ces données à celles déjà existantes, si elles sont présentes.

Il faudra ensuite statuer sur les données manquantes et donc ce que cela engendre en termes de conservation ou de complémentation des données.

Sur le plan réglementaire, un suivi sera nécessaire. Cette collection met par exemple en évidence des difficultés juridiques et des lois imprécises et inadaptées à la situation actuelle. Ici, on procède à la saisie d'un CPP dans le cadre d'une dérogation à l'information qui n'est finalement pas capable de statuer, car il n'y a pas de protocole de recherche précis associé. Or, il existe de nombreux

échantillons conservés dans diverses biobanques françaises qui sont destinés à la recherche, sans être pour autant associés à un protocole de recherche précis.

De plus, volontairement non mentionnée précédemment, cette collection représentait la partie rétrospective de la collection Neuroblastome. Depuis avril 2024, les nouveaux échantillons, représentant la collection prospective, ont été traités selon les procédures classiques de la PGEB. Nous retrouvons l'organisation de leur prise en charge dans l'annexe 6.

Perspectives

Un des points d'approfondissement de ce mémoire aurait été **l'évaluation approfondie de l'intérêt scientifique** d'une telle intégration pour la communauté de recherche en oncopédiatrie, incluant celle du CLB. Son impact sur :

- La consolidation et la valorisation de données conservées à long terme (études longitudinales),
- La caractérisation moléculaire plus fine du neuroblastome, ou autre affection pédiatrique
- La valorisation au sein d'essais cliniques et de projets de recherche translationnelle.

Pour cela, la méthode principale aurait été d'aller à la source, d'interroger des médecins et chercheurs, spécialisés dans ce domaine et pour lesquels ces échantillons sont les plus pertinents.

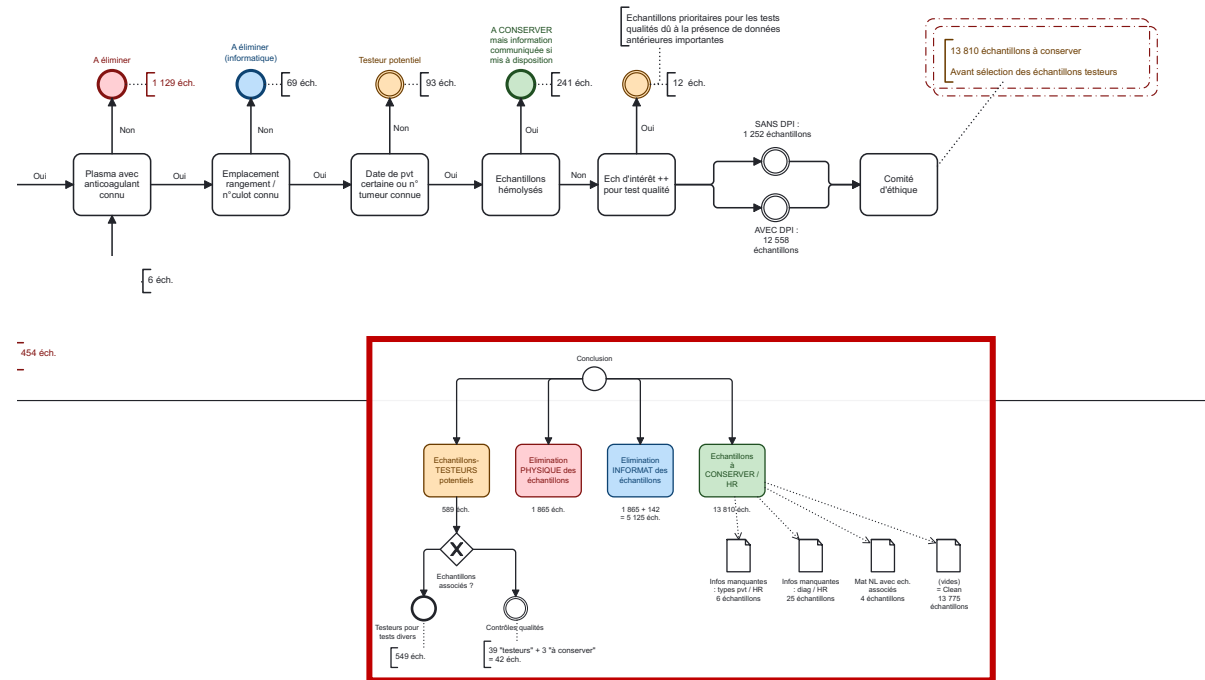
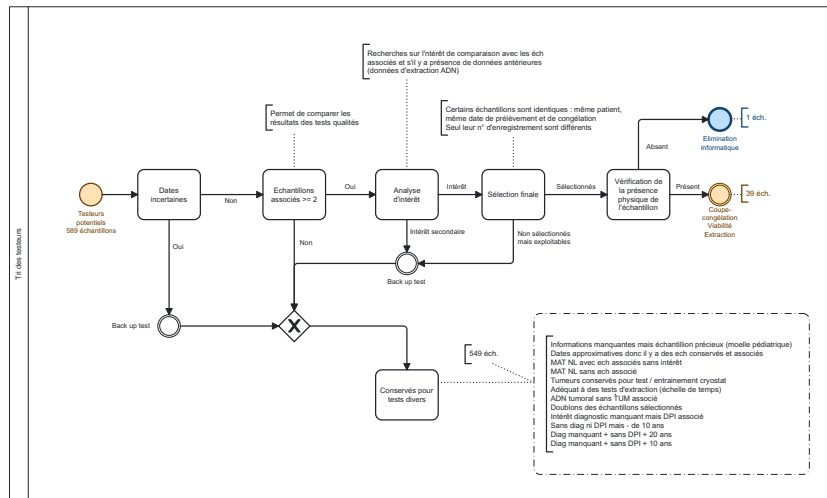
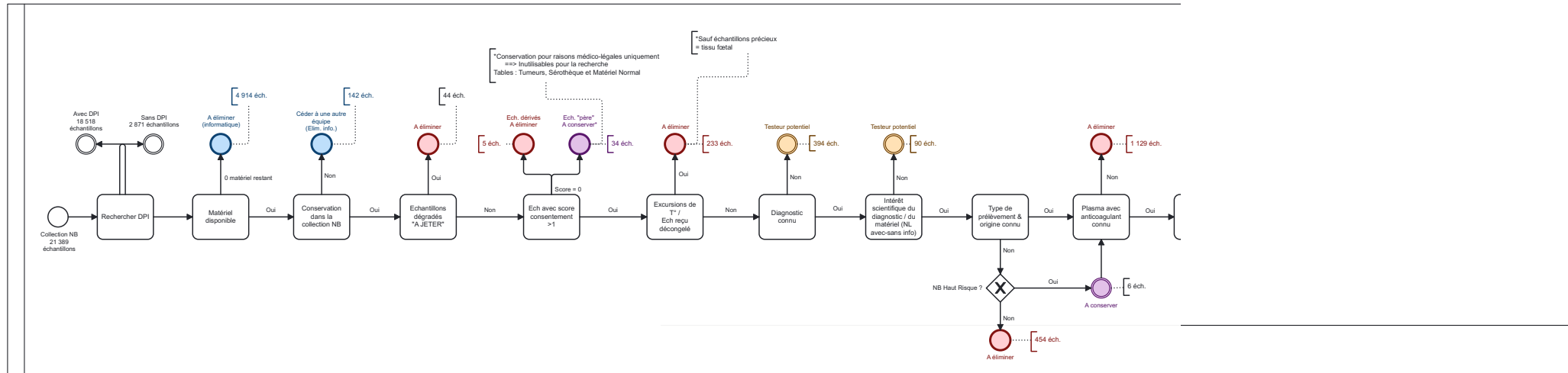
Les objectifs sont désormais de :

- Valoriser scientifiquement la collection : Partager et nourrir, avec les équipes cliniques et de recherche, des projets pilotes (transcriptomique de rechute, études de résistance thérapeutique...) exploitant ces ressources.
- Participer à l'évolution réglementaire : Contribuer, via des retours d'expérience et en collaboration avec les professionnels et instances concernés, à l'élaboration de lignes directrices nationales pour la conservation longue durée de collections diverses et variées, à destination de la recherche, même sans protocole de recherche défini au préalable.

En définitive, l'intégration de la collection « Neuroblastome » est une réussite. Elle illustre la capacité du CLB à valoriser des ressources biologiques historiques tout en respectant les standards modernes de qualité et d'éthique. Ce projet constitue ainsi une étape décisive vers une biobanque robuste, contenant des échantillons pédiatriques au service d'une recherche translationnelle plus ambitieuse et, in fine, d'une meilleure prise en charge des jeunes patients atteints de cancer.

Annexes

Annexe 1 : Schéma du tri des échantillons



Annexe 2 : Document de la PGEB : Critères de conformité par technique d'analyse de la Plateforme de Génomique des Cancers (PGC) du CLB à la PGEB

Documents A-2450D Critères d'acceptation des RB à la PGEB							
Critères de conformité par technique d'analyse (PGC)							
Technique	Total RNA	mRNA	RNA exome	XTHS2* RNA	RibomethSeq	XTHS* DNA	XTHS2* DNA
Qté	100 à 1000ng	100 à 1000ng	100ng (min 20ng)	10 à 200ng	50 à 200ng	10 à 200ng	100ng
vol technique	10µl	50µl	8,5µl	10µl	7µl	7µl	5µl
Conc min	10ng/µl	2ng/µl	2,5ng/µl	5ng/µl (min1ng/µl)	5ng/µl (min1ng/µl)	5ng/µl (min1ng/µl)	20ng/µl
QC		RIN>4,5	DV200>30%	DV200>20%	DIN >3	DIN >3	
Type de tissu	FFPE, tissu, lignée	Tissu, ligné	FFPE, tissu, lignée	FFPE, tissu		FFPE, tissu, lignée	FFPE, tissu, lignée
Espèce	Humain, rat, souris	Humain, rat, souris, bovin, mammifère	Humain				
				XTHS* = Technique NGS			

Annexe 3 : Lettre adressée au CPP

Cette annexe n'est pas incluse dans la version publique de ce mémoire.

Elle contient des informations confidentielles appartenant au **Centre Léon Bérard (CLB)** et n'est donc pas diffusée.

Annexe 4 : Champs des tables du fichier Access d'origine et thésaurus de la base Gestion CRB

Une harmonisation des données (champs et thésaurus) afin de faciliter le transfert sur la gestion du CRB a été effectuée. Nous observons que les données brutes n'étaient elles-mêmes pas homogènes en fonction des tables. Se rapporte à la partie « Implication de la DSID » des Résultats.

Annexe 4.a :
Données brutes de la table Access

ADN constit	ADN Tumoral	Sérothèque	Culot Mat NL	MAT NL DMSO	Tumeurs
//	DPI	N° Patient = DPI	//	//	DPI
NOM / PRENOM	NOM / PRENOM	NOM / PRENOM	NOM / PRENOM	NOM / PRENOM	NOM / PRENOM
N° ADN	N° TUM	N° ENR	N° Culot	N° de dossier	N° Tumeur
Ref sur classeur	Ref sur classeur	N° Echantillon		N° enregistrement	Enregistrement
Date extraction	DATE	DATE	Date Entrée	Date de congélation	Date de réception
Matériel extrait	//	Echantillon	Type de pvt	TYPE PVT	//
//	//	VOL microL	NB cell	NB CELL	Obs clinique
//	//	Provenance	//	//	Provenance
Emplacement stockage	Emplacement stockage	STOCK	Stockage	Lieu de stockage	Etat du stock
//	//	Stade de la maladie	//	//	DIAGNOSTIC
//	//	//	//	//	Stade de la maladie
//	//	//	//	//	Envahiss tumoral
//	//	//	//	//	évènement de réception
//	//	//	//	//	Type prelev + obs
//	//	//	//	//	T° de congélation
//	//	DATE 1 / 2 / 3	R_1 / 2 / 3	//	Date utilisation
//	//	UTIL 1 / 2 / 3	DATE 2 / 3	Date utilisation	Sortie1 / Sortie2
//	//	R_1 / 2 / 3	UTIL 2 / 3	Utilisation	Nom utilisation
//	NOTES	Observation	Observations	Observations	Observation
//	N° MICCHADO	N° MICCHADO	MICCHADO	//	N° MICCHADO
N° PHRC_MIC	N° SIOPEN	PHRC	//	//	//
CODE EUROP	//	N° Europ	CODE EUROP	//	CODE EURO

ADN constit	ADN tumoral	Sérothèque	Culot MAT NL	MAT NL DMSO	Tumeurs
NOMPAT	NOMPAT	NOMPAT	NOMPAT	NOMPAT	NOMPAT
PREPAT	PREPAT	PREPAT	PREPAT	PREPAT	PREPAT
DEXT	DEXT	DCON	DCON	DCON	DCON
NOCONG	NOCONG	NOCONG	NOCONG	/	NOCONG
TYPE	TYPE	TYPE	TYPE	TYPE	TYPE
NUM1	NUM1	NUM1	NUM1	NUM1	NUM1
NUM2	NUM2	NUM2	NUM2	NUM2	NUM2
NUM3	NUM3	NUM3	NUM3	NUM3	NUM3
ADAM	ADAM	CONTENU	CONTENU	CONTENU	CONTENU / SOUS-TYPE
COMM	COMM	COMM	COMM	COMM	COMM + COMM
/	/	ANTICOAGULANT	ANTICOAGULANT	ANTICOAGULANT	/
/	/	/	QTE_C	QTE_C	/
/	/	VOL_TUBE	/	/	/
/	/	/	/	/	POURTISSU
/	/	/	/	/	ORIG
/	/	/	/	/	NUM_CENTRE
/	NUM_INCLUSION MICCHADO	/	NUM_INCLUSION MICCHADO	/	NUM_INCLUSION MICCHADO
/	NUM_INCLUSION SIOPEN	/	NUM_INCLUSION CODE EUROP	/	NUM_INCLUSION CODE EUROP
/	/	/	/	/	NUM_INCLUSION N°ARIANE
/	/	/	/	/	MILIEU
/	/	DATE_SORTIE	DATE_SORTIE	/	DATE_SORTIE
/	/	DATE_REENTREE	DATE_REENTREE	/	DATE_REENTREE
/	/	ANALYSE	ANALYSE	/	ANALYSE

Annexe 4.b :

Champs modifiés
pour l'intégration à
la Gestion du CRB

Annexe 4.c :
Thésaurus Gestion
du CRB

THESAURUS SANG : CONTENU		THESAURUS TUMEURS : SOUS_TYPE	
Buffy-Coat	Moelle	Biopsie cutanée	Liquide pleural
Cellules	PBMC cd34+	Cellules non tumorales	Pièce tumorale
Cellules buccales	PBMC DMSO	Cellules pathologiques	Tissu non tumoral
Cellules d'ascite	PBMC sec	Cellules tumorales	Tissu pathologique
CMN Moelle	Plaquettes	Ganglions	Tissu tumoral
CSP	Plasma Moelle		
Culot LCR	Plasma Sang		
Culot Tube Sec	Salive	ORIG	
Ecouvillon nasopharyngé	Sang total	Métastase	Transformation
Ecouvillon oropharyngé	Sang total sur buvard	Non précisé	Tumeur primitive
LCR	Selles	Récidive	
Lignée	Sérum		
Liquide d'ascite	Surnageant LCR	MILIEU	
Liquide pleural	Urine	DMSO	Milieu de culture
		EDTA	Non précisé
		Isopentane	Pas de milieu (=culot sec ou tissu

Annexe 5a : Résultats complets des extractions d'ADN

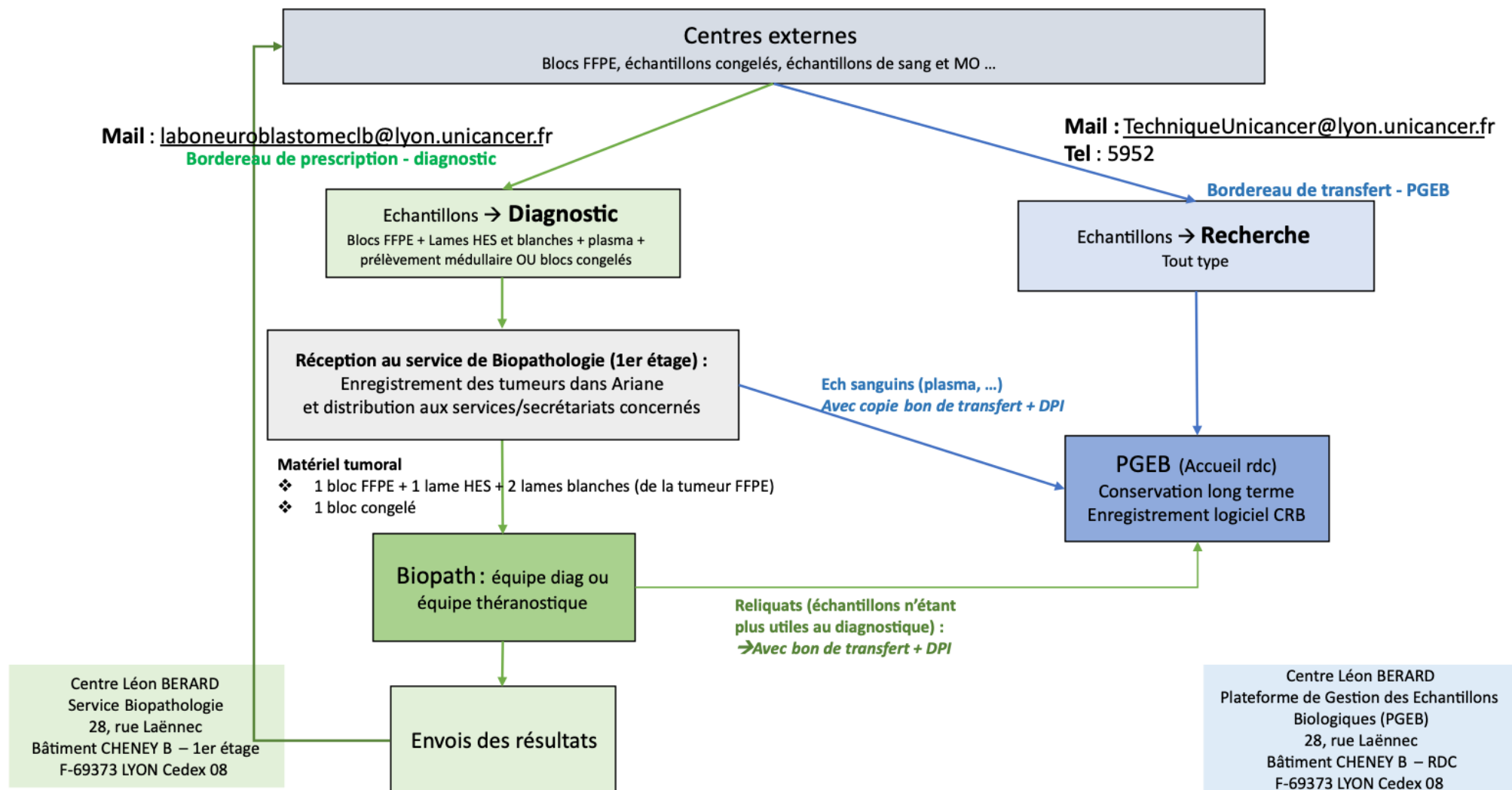
Note : Les identifiants d'échantillons d'ADN et d'ARN ont été modifiés pour des raisons de confidentialité.

ID_père	N°ech	Stockage	Année	%CT	AN / autres données	Concentration ADN (ng/µl) <small>Quanti</small>	Concentration ADN (ng/µl) <small>Qualitélog</small>	260/280 Nanodrop	260/230 Nanodrop	DIN TP	Aliquots	Volume / aliquot (µL)	quantité/ aliquot (ng)
P19_ADN	A-32	Azote	1992	70,00%	Copeaux tumeurs	51,6	100,6	1,8	1,2	6,9	1	21,0	1083,6
P20_ADN	A-34	Azote	1992	NA	Copeaux tumeurs	1,2	8,1	1,4	0,1	6,8	1	21,0	25,2
P21_ADN	A-35	Azote	1992	80%	Copeaux tumeurs	0,4	2,5	1,3	0,1	-	1	20,0	8,9
P22_ADN	A-37	Azote	1992	70%	Copeaux tumeurs	12,9	25,9	1,7	0,8	6,4	1	21,0	270,9
P23_ADN	A-38	Azote	1992	70%	Copeaux tumeurs	55,6	92,9	1,8	1,4	5,5	1	20,0	1112,0
P24_ADN	A-29	Azote	1994	80%	Copeaux tumeurs	54,8	120,8	1,9	1,4	6,1	1	20,0	1096,0
P25_ADN	A-30	Azote	1994	80%	Copeaux tumeurs	76,4	143,2	1,9	1,6	6,4	1	21,0	1604,4
P26_ADN	C16	Congel -80°C	1989	70%	Copeaux tumeurs	210,0	345,6	1,9	1,7	7,3	1	20,0	4200,0
P27_ADN	C17	Congel -80°C	1989	60%	Copeaux tumeurs	95,8	132,5	1,8	0,9	6,9	1	20,0	1916,0
P28_ADN	ADN-14	Congel -80°C	1992	NA	ADN Tumoral	1030,0	1453,0	1,9	0,9	7,6	1	120,0	123600,0
P28_ADN	C-15	Congel -80°C	1992	90%	Copeaux tumeurs	10,4	17,9	1,6	0,2	5,8	1	21,0	218,4
P29_ADN	C-21	Congel -80°C	1992	80%	Copeaux tumeurs	159,0	216,3	1,9	1,2	6,8	1	21,0	3339,0
P30_ADN	C-22	Congel -80°C	1992	70%	Copeaux tumeurs	18,7	28,7	1,8	0,4	6,7	1	21,0	392,7
P31_ADN	C-07	Congel -80°C	1994	100%	Copeaux tumeurs	85,2	124,4	1,8	1,7	6,1	1	20,0	1704,0
P32_ADN	C-08	Congel -80°C	1994	100%	Copeaux tumeurs	74,2	101,4	1,8	1,6	6,3	1	20,0	1484,0
P33_ADN	C-763	Congel -80°C	2001	100%	Copeaux tumeurs	19,6	28,9	1,8	1,0	6,3	1	21,0	411,6
P34_ADN	C-40	Congel -80°C	2003	100%	Copeaux tumeurs	82,8	99,1	1,8	0,9	7,0	1	19,0	1573,2
P35_ADN	ADN-40	Congel -80°C	2003	NA	ADN Tumoral	568,0	665,5	1,9	2,0	9,9	1	88,0	49984,0
P39_ADN	A-11	Azote	1997	100%	Copeaux tumeurs	892,0	1217,0	2,0	2,2	8,1	1	20,0	17840,0
P40_ADN	ADN-11	Congel -80°C	1997	NA	ADN Tumoral	79,0	3005,0	1,7	2,3	6,8	1	470,0	37130,0
P51_ADN	A-01	Congel -80°C	2014	10%	Copeaux tumeurs	26,4	34,3	1,7	0,4	6,6	1	22,0	580,8
P52_ADN	A-02	Congel -80°C	2014	100%	Copeaux tumeurs	16,5	27,4	1,7	0,5	1,8	1	18,0	297,0
P54_ADN	A-59	Azote	2010	100%	Copeaux tumeurs	524,0	647,5	1,8	1,6	7,8	1	20,0	10480,0
P55_ADN	ADN-59	Congel -80°C	2010	NA	ADN Tumoral	644,0	892,7	1,9	2,3	9,8	1	100,0	64400,0
P56_ADN	C-54	Congel -80°C	1997	NA	PBL	732,0	722,2	1,9	2,2	8,5	1	17,0	12444,0
P57_ADN	C-55	Congel -80°C	1997	NA	MO	1260,0	1823,0	1,9	2,2	8,5	1	18,0	22680,0
P58_ADN	C-04	Congel -80°C	1994	NA	MO	1140,0	1701,0	2,0	2,2	8,5	1	18,0	20520,0
P59_ADN	C-05	Congel -80°C	1994	NA	MO	1300,0	1590,0	2,0	2,2	8,7	1	18,0	23400,0
P61_ADN	C-313	Congel -80°C	2007	NA	PBL	560,0	688,5	1,9	1,9	8,7	1	18,0	10080,0
P65_ADN	ADN-281	Congel -80°C	2001	NA	ADN constit	1010,0	800,0	1,9	2,3	9,8	1	50,0	50500,0
P66_ADN	ADN-106	Congel -80°C	2002	NA	ADN constit	158,0	857,5	1,9	2,2	9,9	1	220,0	34760,0
P67_ADN	ADN-108	Congel -80°C	2003	NA	ADN constit	558,0	753,4	1,9	2,2	9,7	1	60,0	33480,0
P68_ADN	ADN-240	Congel -80°C	2003	NA	ADN constit	624,0	1079,0	1,9	2,1	9,9	1	30,0	18720,0
P69_ADN	ADN-250	Congel -80°C	1990	NA	ADN constit	5,2	24,3	1,8	0,2	9,2	1	120,0	621,6
P70_ADN	ADN-310	Congel -80°C	2007	NA	ADN constit	3,6	24,0	1,7	1,4	9,6	0	NA	NA
P71_ADN	ADN-525	Congel -80°C	2017	NA	ADN constit	142,0	646,2	1,8	2,2	9,8	1	20,0	2840,0
P73_ADN	ADN-353	Congel -80°C	1994	NA	ADN Tumoral	618,0	1612,0	1,6	1,6	8,7	1	190,0	117420,0
P74_ADN	A-676	Azote	2001	NA	SANG	298,0	390,0	1,9	2,3	7,6	1	18,0	5364,0
P75_ADN	A-08	Azote	1994	NA	PBL	316,0	368,0	1,9	2,3	8,5	1	17,0	5372,0
P75_ADN	A-09	Azote	1994	NA	PBL	208,0	328,8	1,9	2,4	8,8	1	18,0	3744,0
P76_ADN	A-35	Azote	1992	NA	PBL	296,0	260,7	1,9	2,2	8,5	1	17,0	5032,0
P76_ADN	A-36	Azote	1992	NA	PBL	170,0	455,7	1,9	2,2	8,5	1	18,0	3060,0

Annexe 5b : Résultats complets des extractions d'ARN

ID_père	N°ech	Stockage	Année	%CT	AN / autres données	Concentration ARN (ng/µl) <small>Nanodrop</small>	260/280 Nanodrop	260/230 Nanodrop	DV200 (%) TP	28s/18s TP	RIN TP	Aliquots	Volume / aliquot (µL)	quantité/ aliquot (ng)
P19_ARN	A-32	Azote	1992	70,00%	Copeaux tumeurs	15,99	1,63	0,13	29	-	-	1	36,0	575,6
P20_ARN	A-34	Azote	1992	NA	Copeaux tumeurs	4,4	0,64	0,06	10	-	-	1	34,0	151,2
P21_ARN	A-35	Azote	1992	80%	Copeaux tumeurs	5,319	0,88	0,07	16	-	-	1	36,0	191,5
P22_ARN	A-37	Azote	1992	70%	Copeaux tumeurs	5,567	0,68	0,06	10	-	-	1	40,0	222,7
P23_ARN	A-38	Azote	1992	70%	Copeaux tumeurs	16,88	1,59	0,2	31	-	-	1	37,0	624,6
P24_ARN	A-29	Azote	1994	80%	Copeaux tumeurs	39,9	1,94	0,64	62	0,5	3	1	34,0	1355,6
P25_ARN	A-30	Azote	1994	80%	Copeaux tumeurs	32,73	1,37	0,31	47	0,9	3,9	1	34,0	1112,8
P26_ARN	C-16	Congel -80°C	1989	70%	Copeaux tumeurs	100,1	2	0,83	39	0,8	3,1	1	34,0	3403,4
P27_ARN	C-16	Congel -80°C	1989	60%	Copeaux tumeurs	28,29	1,92	0,55	36	1	4,3	1	36,0	1018,4
P28_ARN	C-15	Congel -80°C	1992	90%	Copeaux tumeurs	6,84	1,64	0,44	25	-	-	1	36,0	246,2
P29_ARN	C-21	Congel -80°C	1992	80%	Copeaux tumeurs	32,73	1,91	0,56	51	0,7	3,9	1	36,0	1178,3
P30_ARN	C-22	Congel -80°C	1992	70%	Copeaux tumeurs	10,3	1,13	0,05	21	-	-	1	34,0	350,5
P31_ARN	C-07	Congel -80°C	1994	100%	Copeaux tumeurs	2,939	1,57	0,05	37	-	-	1	36,0	105,8
P32_ARN	C-08	Congel -80°C	1994	100%	Copeaux tumeurs	5,653	1,13	0,08	17	-	-	1	37,0	209,2
P33_ARN	C-763	Congel -80°C	2001	100%	Copeaux tumeurs	4,991	1,43	0,15	34	-	-	1	37,0	184,7
P34_ARN	C-40	Congel -80°C	2003	100%	Copeaux tumeurs	16,05	1,13	0,13	36	-	-	1	40,0	642,0
P39_ARN	A-11	Azote	1997	100%	Copeaux tumeurs	260,2	2	0,84	84	2,1	9,3	1	36,0	9367,2
P51_ARN	A-01	Congel -80°C	2014	10%	Copeaux tumeurs	13,5	1,51	0,17	19	-	-	1	31,0	419,7
P52_ARN	A-02	Congel -80°C	2014	100%	Copeaux tumeurs	6,5	1,12	0,05	28	-	-	1	31,0	200,2
P54_ARN	A-59	Azote	2010	100%	Copeaux tumeurs	60,0	1,85	0,16	74	0,9	6,4	1	32,0	1921,3
P56_ARN	C-54	Congel -80°C	1997	NA	PBL	79,0	1,84	0,48	80	2,2	8,9	1	34,0	2687,4
P57_ARN	C-55	Congel -80°C	1997	NA	MO	424,0	2,06	0,91	77	1,3	5,4	1	34,0	14416,0
P58_ARN	C-04	Congel -80°C	1994	NA	MO	292,2	2,08	1,62	60	0,6	3,6	1	34,0	9934,8
P59_ARN	C-05	Congel -80°C	1994	NA	MO	300,2	2,09	1,47	66	0,7	2,2	1	34,0	10206,8
P61_ARN	C-313	Congel -80°C	2007	NA	PBL	117,1	1,95	0,28	89	1,4	7,6	1	34,0	3981,4

Circuit Neuroblastome



Références

Bibliographie

- Annaratone, L., De Palma, G., Bonizzi, G., Sapino, A., Botti, G., Berrino, E., Mannelli, C., Arcella, P., Di Martino, S., Steffan, A., Daidone, M. G., Canzonieri, V., Parodi, B., Paradiso, A. V., Barberis, M., & Marchiò, C. (2021). Basic principles of biobanking : From biological samples to precision medicine for patients. *Virchows Archiv*, 479(2), 233-246. <https://doi.org/10.1007/s00428-021-03151-0>
- Catchpoole, D. R., Carpentieri, D., Vercauteren, S., Wadhwa, L., Schleif, W., Zhou, L., Zhou, J., Labib, R. M., Smits, E., & Conradie, E. H. (2020). Pediatric Biobanking : Kids Are Not Just Little Adults. *Biopreservation and Biobanking*, 18(4), 258-265. <https://doi.org/10.1089/bio.2020.29071.djc>
- Chen, C., Wang, J., Pan, D., Wang, X., Xu, Y., Yan, J., Wang, L., Yang, X., Yang, M., & Liu, G. (2023). Applications of multi-omics analysis in human diseases. *MedComm*, 4(4), e315. <https://doi.org/10.1002/mco2.315>
- Cianflone, A., Savoia, F., Parasole, R., & Mirabelli, P. (2023). Pediatric biobanks to enhance clinical and translational research for children. *European Journal of Pediatrics*, 182(4), 1459-1468. <https://doi.org/10.1007/s00431-023-04818-3>
- CNIL. (2016). *Le règlement général sur la protection des données—RGPD*. <https://www.cnil.fr/fr/reglement-europeen-protection-donnees>
- CNIL. (2024). *Recherches dans le cadre de la santé : Quelles sont les formalités ?* <https://www.cnil.fr/fr/recherches-sante-queelles-formalites>
- INCA. (2024a). *Cancers : Les chiffres clés—Qu'est-ce qu'un cancer ?* <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Qu-est-ce-qu-un-cancer/Chiffres-cles>
- INCA. (2024 b). *Les cancers pédiatriques en France*. <http://pediatrie.e-cancer.fr/chercheur/acteurs-de-la-recherche/les-cancers-pediatriques-en-france>
- Inserm. (2017). *Développement du médicament · Inserm, La science pour la santé*. Inserm. <https://www.inserm.fr/dossier/medicament-developpement/>
- JoVE. (2019). RNA vs DNA Stability. *JoVE*. <https://www.jove.com/fr/science-education/v/11009/rna-binding-proteins-and-rna-stability>
- Kee Kiat Yeo. (2024). *Neuroblastome—Pédiatrie*. Édition professionnelle du Manuel MSD. <https://www.msmanuals.com/fr/professional/pediatrie/cancers-pediatriques/neuroblastome>
- Kornienko, I. V., Aramova, O. Y., Tishchenko, A. A., Rudoy, D. V., & Chikindas, M. L. (2024). RNA Stability : A Review of the Role of Structural Features and Environmental Conditions. *Molecules*, 29(24), Article 24. <https://doi.org/10.3390/molecules29245978>
- Krawczyk, E., & Kitlińska, J. (2023). Preclinical Models of Neuroblastoma—Current Status and Perspectives. *Cancers*, 15(13), 3314. <https://doi.org/10.3390/cancers15133314>
- Légifrance. (2021a). *Article L1211-2—Code de la santé publique—Légifrance*. https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000043895792/2024-06-12

- Légifrance. (2021 b). *Article R1121-1—Code de la santé publique—Légifrance*.
https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000043723460
- Liney, T., Mitov, A., Onivogui, G. L., & Arrighi, N. (2020). Les biobanques, des structures essentielles à la recherche médicale. *médecine/sciences*, *36*(3), 274-276. <https://doi.org/10.1051/medsci/2020040>
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A., & Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and Biobanking*, *14*(4), 264-270. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>
- Malsagova, K., Kopylov, A., Stepanov, A., Butkova, T., Sinitsyna, A., Izotov, A., & Kaysheva, A. (2020). Biobanks—A Platform for Scientific and Biomedical Research. *Diagnostics*, *10*(7), 485. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10070485>
- Matsubara, T., Soh, J., Morita, M., Uwabo, T., Tomida, S., Fujiwara, T., Kanazawa, S., Toyooka, S., & Hirasawa, A. (2020). DV200 Index for Assessing RNA Integrity in Next-Generation Sequencing. *BioMed Research International*, *2020*, 9349132. <https://doi.org/10.1155/2020/9349132>
- Michalska-Falkowska, A., Niklinski, J., Juhl, H., Sulewska, A., Kisluk, J., Charkiewicz, R., Ciborowski, M., Ramlau, R., Gryczka, R., Piwkowski, C., Kozlowski, M., Miskiewicz, B., Biecek, P., Wnorowska, K., Dzieciol-Anikiej, Z., Sargsyan, K., Naumnik, W., Mroz, R., & Reszec-Gielazyn, J. (2023). Applied Molecular-Based Quality Control of Biobanked Samples for Multi-Omics Approach. *Cancers*, *15*(14), 3742. <https://doi.org/10.3390/cancers15143742>
- NGS concentration, *Sciensano* 2022. (s. d.). Consulté 15 juillet 2025, à l'adresse https://www.sciensano.be/sites/default/files/eeq_nginx_-_rapport_global_-_2022-1.pdf
- Santé Publique France. (2024). *Cancers*. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/cancers>
- Shabihkhani, M., Lucey, G. M., Wei, B., Mareninov, S., Lou, J. J., Vinters, H. V., Singer, E. J., Cloughesy, T. F., & Yong, W. H. (2014). The procurement, storage, and quality assurance of frozen blood and tissue biospecimens in pathology, biorepository, and biobank settings. *Clinical Biochemistry*, *47*(4-5), 258-266. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.01.002>
- Sharma, R., Yadav, J., Bhat, S. A., Musayev, A., Myrzagulova, S., Sharma, D., Padha, N., Saini, M., Tuli, H. S., & Singh, T. (2025). Emerging Trends in Neuroblastoma Diagnosis, Therapeutics, and Research. *Molecular Neurobiology*, *62*(5), 6423-6466. <https://doi.org/10.1007/s12035-024-04680-w>
- Techozyme. (s. d.). *Techozyme Quantification & pureté des acides nucléiques*. Consulté 5 juin 2025, à l'adresse <https://yris.ozyme.fr/fr/techozyme31-quantification-acide-nucleique>
- Tucker, E. R., Jiménez, I., Chen, L., Bellini, A., Gorrini, C., Calton, E., Gao, Q., Che, H., Poon, E., Jamin, Y., Martins Da Costa, B., Barker, K., Shrestha, S., Hutchinson, J. C., Dhariwal, S., Goodman, A., Del Nery, E., Gestraud, P., Bhalshankar, J.,... Schleiermacher, G. (2023). Combination Therapies Targeting ALK-aberrant Neuroblastoma in Preclinical Models. *Clinical Cancer Research*, *29*(7), 1317-1331. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-22-2274>

- Valle-Simón, P., Borobia, A. M., & Pérez-Martínez, A. (2023). Clinical research with targeted drugs in paediatric oncology. *Drug Discovery Today*, 28(8), 103672. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2023.103672>
- Vaught, J. B., & Henderson, M. K. (2012). *Biological sample collection, processing, storage and information management*.
- Versmessen, N., Van Simaey, L., Negash, A. A., Vandekerckhove, M., Hulpiau, P., Vanechoutte, M., & Cools, P. (2024). Comparison of DeNovix, NanoDrop and Qubit for DNA quantification and impurity detection of bacterial DNA extracts. *PLOS ONE*, 19(6), e0305650. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0305650>
- Zou, C., Ji, C., Zhu, Y., Liu, N., Zhang, S., Peng, H., Zhang, X., Wang, H., Deng, Y., & Qian, K. (2023). Effects of Freezing and Rewarming Methods on RNA Quality of Blood Samples. *Biopreservation and Biobanking*, 21(2), 176-183. <https://doi.org/10.1089/bio.2022.0007>

Webographie

Santé Publique France, 2024 [Les cancers en France - SPF](#) [Consulté le 20 janvier 2025]

Institut National du Cancer, 2024 [INCA - Cancers : les chiffres clés](#) [Consulté le 20 janvier 2025]

Centre Léon Bérard [Centreleonberard.fr](#) [Consulté le 20 janvier 2025]

Institut National du Cancer, 2024 [Les cancers pédiatriques en France](#)[Consulté le 23 janvier 2025]

MDS Manuals, 2024 [MDS MANUALS - Neuroblastome](#) [Consulté le 23 janvier 2025]

CPP [Comité de Protection des Personnes](#) [Consulté le 23 janvier 2025]

Code de la Santé Publique, 2021 [Article R1121-1 — Code de la santé publique — Légifrance \(legifrance.gouv.fr\)](#) [Consulté le 24 janvier 2025]

Code de la Santé Publique, 2021 [Article L1211-2 — Code de la santé publique — Légifrance \(legifrance.gouv.fr\)](#) [Consulté le 27 janvier 2025]

Ozyme [Quantification Acide Nucléiques et Rapport Absorbance](#) [Consulté le 27 mai 2025]

Creative Proteomics [Sample Quality Control in Omics Research](#) [Consulté le 27 mai 2025]

Clinical trials.gov [Clinical studies from around the world](#) [Consulté le 23 juin 2025]

Code civil, 1994 [Code civil : non patrimonialité du corps humain](#) [Consulté le 27 juin 2025]

Documents supports de la PGEB

MO-2695 **_Requalification des collections biologiques**

RE-CRB-PR-0018 **_Contrôle qualité des processus**

- MO-2700 **_Contrôle des échantillons biologiques en tumorothèque**
- MO-2089 **_Test de la stabilité des acides nucléiques**
- MO-1031 **_Test de la viabilité des PBMC**

A-2450D **_Critères d'acceptation des ressources biologiques à la PGEB**

RE-CRB-PR-0005 **_Conservation des ressources biologiques et données associées**

MO-2105 **_Usage des données de santé et des prélèvements pour la recherche**

MO-1587 **_Destruction des échantillons biologiques**

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

MASTER 2 MANAGEMENT DES BIOBANQUES

LE BIOBANKING AU SERVICE DE LA RECHERCHE PÉDIATRIQUE :

VALORISATION D'UNE COLLECTION D'ÉCHANTILLONS PÉDIATRIQUES DU CENTRE LÉON BÉRARD CONSTITUÉE DEPUIS 40 ANS

Résumé

Le Centre Léon Bérard (CLB) est un centre reconnu de lutte contre le cancer impliqué dans la recherche clinique et translationnelle. Dans le cadre d'un changement d'organisation, une partie de la collection institutionnelle du service de Biopathologie va désormais être prise en charge par la Plateforme de Gestion des Echantillons Biologiques (PGEB) du Centre Léon Bérard. Cette collection regroupe plus de 21 000 échantillons de divers types (sanguins, tumoraux, acides nucléiques...) et de diverses maladies pédiatriques, dont la moitié sont des cas de neuroblastome. Collectés depuis 1982, ces échantillons sont conservés selon différentes modalités : à froid, en azote, en congélateur -80°C ou à température ambiante.

Les données associées ont été renseignées sur différents supports (Access et Excel) qui les rendaient pour le moment difficile d'exploitation ; l'objectif étant la requalification de ces échantillons pour la recherche pédiatrique. Ils ont dû être étudiés, organisés et nettoyés afin d'être transférés dans la base de données du CLB. Ce tri s'effectuera notamment selon les directives de trois aspects : réglementaires, qualitatifs et scientifiques. Ce mémoire retrace les étapes nécessaires au tri et à l'intégration de la collection rétrospective à celle de la PGEB.

Abstract

The Centre Léon Bérard (CLB) is a renowned cancer research and treatment center involved in both clinical and translational research. As part of an organizational restructuring, part of the institutional collection managed by the Biopathology Department will now be taken over by the Biological Sample Management Platform (PGEB), biobank of the CLB. This collection entrusts over 21,000 samples of various types (blood, tumor tissue, nucleic acids, etc.) and pediatric diseases, with halves of them being neuroblastoma. Collected since 1984, these samples have been preserved using different methods: cryogenic storage in liquid nitrogen, in -80°C freezers, or at room temperature.

The associated data were recorded in various formats (Access and Excel), making them difficult to exploit until now. The goal is to requalify these samples for pediatric research. The data had to be reviewed, organized, and cleaned before being transferred into CLB's database. This sorting process is guided by three main criteria: regulatory, qualitative, and scientific aspects. This thesis outlines the necessary steps for sorting and integrating the retrospective collection into PGEB's system.

ÉTUDIANTE :

SANVEE-EDOH Laure

MAITRE D'APPRENTISSAGE :

Dr TABONE-EGLINGER
Séverine



Lyon - Août 2025