



Deuxièmes rencontres internationales de la Gouvernance des Risques en Santé

Moins de 20 ans ont séparé la disparition de Jean Mermoz en 1936, et les premières compagnies d'aviation exploitant le plus sûr et performant des moyens de transport à longue distance. Le risque a cessé d'être la condition obligée de la performance.

Einstein rappelait que « l'homme et sa sécurité doivent constituer la première préoccupation de toute aventure technologique ». Sur ce thème, « Risques et Progrès », les 2^{es} Rencontres Internationales de la Gouvernance des Risques en Santé organisées par le CHU de Toulouse ont réuni les 7 et 8 juin 2010 usagers, médecins et chercheurs, directeurs d'hôpitaux, ingénieurs et éthiciens, gestionnaires de risques.

La recherche: quelle activité plus pertinente pour illustrer ce thème? Clinique ou translationnelle, elle implique par nature une part d'incertitude. Afin de concilier éthique individuelle et collective, la France s'est dotée dès 1988 de dispositions sur la protection des personnes, l'appréciation du rapport bénéfice/risque, la nécessité de l'information et du consentement; ce cadre a été renforcé en 2006: évaluation systématique par un comité de protection des personnes et développement d'une vigilance spécifique. Ces dispositions couvrent de manière exhaustive les essais sur les médicaments et, depuis peu, les dispositifs médicaux. Les travaux sur les stratégies chirurgicales y échappent pour une part, soulignent les usagers. Et les essais chez l'enfant, pourtant indispensables, posent des problèmes encore mal résolus.

Sans doute restera-t-il toujours de ces « Conquistadors de l'Impossible » en quête d'un absolu solitaire, donneurs de rêve et pour qui le plus grand risque est l'absence de tout danger. Mais le patient qui accepte de participer à un essai clinique n'est jamais un aventurier qui s'ignore. C'est un partenaire engagé, partagé entre une opportunité, celle de bénéficier d'une innovation et de contribuer au progrès collectif, et un risque. Plus que jamais, nous devons l'informer.

Dr. Jean Petit,
Directeur Gestion des risques.



ZOOM

L'urine : une source de biomarqueurs pour la clinique

*Dr Stéphane Decramer
Service de Néphrologie-Médecine interne-Hypertension Pédiatrique
Centre de Référence des Maladies Rénales Rares du Sud Ouest
(SORARE)
Inserm U858*

ORGANISATION

Service Commun des Ressources Biologiques :
Quelle organisation ?

*Pr Bertrand Perret
Service de Biochimie
IFB Purpan*

*Benjamin Cottin
Juriste Chargé de la Valorisation des Collections Biologiques
Direction de la Recherche et de l'Innovation*

BON À SAVOIR

Les Délégations Interrégionales
à la Recherche Clinique (DIRC) :
une nouvelle organisation à l'échelon interrégional.

*Mélina Pocard, chef de projets Partenariats – Europe,
Direction de la Recherche et de l'Innovation
Délégation Interrégionale à la Recherche Clinique
Sud-Ouest Outre-Mer*

AGENDA

Appels à projets et congrès

Comité éditorial

Directeur de la publication : Jean-Jacques Romatet
Codirectrice de la publication : Monique Cavalier
Rédactrice en chef: Pr Héliane Hanaire
Responsables Secrétariat de rédaction : Odile Séchoy, Marie-Claude Sudre
Rédacteurs responsables de rubriques : Pr Olivier Rascol, Bertrand Perret, Jean-François Arnal,
Pr Thierry Lang, Michel Soulié, Laurent Molinier, Delphine Nigon - Messagerie : DRC

L'urine : une source de biomarqueurs



Joost Schanstra (biochimiste, à droite) et Jean-Loup Bascands (biologiste, à gauche) sont chercheurs à l'Inserm U858 de Toulouse. Stéphane Decramer (au centre) est pédiatre néphrologue à l'Hôpital des Enfants de Toulouse.

Les progrès en spectrométrie de masse (SM) permettent aujourd'hui d'analyser en quelques heures le contenu protéique (protéome), de petites quantités de liquides biologiques. Ceci a initié de nombreux travaux visant l'identification de biomarqueurs (BM) dans les liquides biologiques chez l'homme. L'objectif de ces recherches est double : l'identification de BM pour une utilisation en clinique, et une meilleure compréhension de la physiopathologie d'une maladie à travers l'étude de ces BM.

Le sang, en contact avec l'ensemble des tissus et facile d'accès a été le premier liquide biologique dans lequel la présence de BM associés à différentes pathologies a été recherchée. Deux problèmes majeurs sont apparus : 1) l'instabilité du protéome sanguin après le recueil, augmentant significativement la variabilité des échantillons et 2) la présence de protéines majoritaires (Ig, albumine...) représentant 99 % des protéines sanguines, masquant les BM associés aux pathologies.

L'urine est apparue comme une source fiable de BM des pathologies rénales mais aussi pour les pathologies d'autres organes. Le protéome urinaire (PU), essentiellement composé de peptides, s'est avéré être extrêmement stable en aval du recueil urinaire. En l'absence d'infection bactérienne, les échantillons peuvent être gardés 3h à température ambiante et 24 heures à 4 °C sans modification importante du protéome. Ceci est probablement dû au passage des urines par la vessie où l'activité protéasique est optimale, ce qui « standardise » l'état de dégradation des urines. L'autre avantage de l'urine est une réduction des protéines majoritaires sanguines par la filtration glomérulaire, facilitant la mise en évidence de BM faiblement exprimés.

La relative facilité d'étude du PU ne doit pas faire oublier que ce type d'analyse nécessite un investissement important en 1) matériel (SM), 2) infrastructure pour le recueil et le stockage des échantillons, 3) compétences en SM, statistique et clinique.

Une méthodologie précise

Toute étude « protéomique » doit comporter une méthodologie précise permettant de répondre à ces questions

1. Que va apporter l'analyse du PU pour répondre à la question clinique ? Il est utile de poser une question clinique simple où une réponse binaire peut suffire, et avec un « end-point » facile à vérifier. Ex : une analyse du PU peut-elle prédire le rejet d'une greffe rénale ?

2. Le nombre de patients disponibles suffit-il à faire à la fois une étude de découverte de BM et une validation indépendante ? Faut-il une étude « locale » ou une étude multicentrique ?

3. L'outil de l'analyse du protéome est-il adapté à la question ? La sensibilité et la précision de masse du SM sont-elles assez élevées ? La préparation des échantillons est-elle assez reproductible ?

4. Comment est envisagée, après la validation des BM, une application en routine en clinique ?

La majorité des études décrivant la découverte de BM urinaires en pathologie rénale ne comporte qu'une phase de découverte incluant peu de patients. On trouve rarement la validation des BM dans une cohorte prospective nécessaire à un transfert rapide en clinique. Dans le paragraphe suivant nous exposons notre démarche dans la recherche et la découverte de BM dans le syndrome de la jonction urétérale (sJPU) grâce à l'analyse du PU.

Environ 0,5 % des nouveau-nés présentent une néphropathie obstructive malformative dépistée *in utero* par échographie. L'étiologie la plus fré-

quente est le sJPU qui représente environ 120 cas par an à l'hôpital des enfants de Toulouse. Cette population est suffisante pour mener une étude incluant à la fois des patients pour la sélection, et des patients pour la validation prospective des BM. Malgré une détection précoce, souvent au cours de la grossesse, les cliniciens ne savent pas différencier les sJPU intermédiaires qui vont présenter un risque immédiat et donc nécessiter une intervention chirurgicale, de ceux qui peuvent s'améliorer spontanément. Ceci soulève plusieurs problèmes : 1) la décision opératoire peut être prise alors qu'une altération fonctionnelle rénale est déjà apparue, 2) la répétition d'exams lourds et agressifs pour de jeunes enfants afin de déterminer la nécessité d'une pyéloplastie, et 3) des difficultés à mesurer l'impact à long terme de ces uropathies obstructives sur la fonction rénale.

L'identification de nouveaux marqueurs fiables permettant de préciser le degré d'obstruction et/ou une atteinte rénale infra clinique apparaissait donc comme indispensable. Dans un premier temps, nous avons décidé d'analyser le PU de ces nouveaux nés porteurs d'un sJPU afin d'identifier des BM, non invasifs, susceptibles d'aider à poser l'indication d'une pyéloplastie. Ainsi nous avons une question clinique et un « endpoint » simple : **pyéloplastie ou pas**.

Nous avons utilisé la technique d'électrophorèse capillaire (EC) couplée à la SM (EC-MS) pour l'identification de BM urinaires du sJPU. L'EC est l'outil de choix pour la séparation à haute résolution des peptides et des petites protéines, présents dans les urines. Après séparation dans l'EC les peptides sont injectés dans un SM qui analyse leur quantité relative. On obtient des profils peptidiques urinaires (voir figure 1) où chaque peptide est identifié par un couple de coordonnées unique : temps de migration et masse. Cette approche permet d'analyser, à partir de 0,75 ml d'urine, l'expression de 1500-2000 polypeptides urinaires par échantillon. Les phases pré analytique et analytique prennent environ 24h/échantillon.

Nous avons inclus 103 nouveau-nés dans cette étude. Pour la phase de découverte des BM d'obstruction nous avons utilisé 3 groupes d'environ 20 individus/groupe : un groupe

de nouveau nés sains, un groupe porteur d'un sJPU associé à la résolution spontanée de l'obstruction et un groupe porteur d'un sJPU sévère nécessitant une pyéloplastie rapidement après la naissance. Ceci a permis d'identifier 53 BM peptidiques. L'étape suivante a consisté à valider en aveugle ces BM sur une cohorte de nouveaux patients. Ainsi, à partir de 36 patients ayant un sJPU intermédiaire (le groupe de patients qui posent problème aux cliniciens) nous avons prédit, à un mois de vie, que 11 patients allaient évoluer vers la résolution spontanée et 25 patients vers la pyéloplastie. La comparaison de cette prédiction à l'évolution clinique à 24 mois de vie montre que nous avons une prédiction correcte pour 35 patients [Decramer S, *Nat Med.* 2006; 12:398-400]

L'étude de profils peptidiques spécifiques du PU de nouveau-nés porteurs d'un sJPU semble être un outil prédictif fiable de l'évolution clinique de ces enfants.

Une étude prospective dans le cadre d'un PHRC

Nous avons démarré en 2008 une étude prospective dans le cadre d'un PHRC national multicentrique incluant plus de 300 patients. Pour ces patients, en utilisant un échantillon urinaire obtenu dans le premier mois de vie, une prédiction par EC-MS en se basant sur les 53 BM identifiés dans la première étude sera faite. Puis, après 2 ans de suivi, cette prédiction sera comparée à l'évolution clinique. Cette validation sur un très grand nombre de patients doit permettre de faire la validation finale de ces BM et ainsi de proposer cette approche en routine au niveau clinique.

Parmi les BM identifiés on retrouve des BM « structurels »: un fragment de la chaîne $\alpha 3$ du collagène de type 9, un fragment de la chaîne $\alpha 2$ du préprocollagène de type V et d'autres, ainsi que des BM possiblement impliqués dans la physiopathologie de la pathologie tels que la pro SAAS (inhibiteur de la prohormone convertase 1 qui transforme la prorénine en rénine). L'expression du pro SAAS est diminuée chez les porteurs d'un sJPU sévère nécessitant une pyéloplastie. Cette baisse d'expression du pro SAAS pourrait lever l'inhibition de la prohormone convertase 1 et entraîner une activation du système rénine

angiotensine (SRA). Le SRA est bien connu comme agent responsable de l'apparition d'une fibrose interstitielle dans le modèle d'obstruction urétérale chez l'animal [Decramer S, *Mol Cell Proteomics.* 2008; 7 (10):1850-62]. On voit donc que le pro SAAS, identifié comme BM, pourrait avoir un rôle physiopathologique chez l'homme dans les phénomènes de fibrose secondaires à l'obstruction.

En suivant les mêmes recommandations, d'autres laboratoires ont montré l'existence de profil de BM urinaires très prometteurs dans le pronostic d'autres pathologies rénales et, plus récemment, pour des maladies cardiovasculaires. (figure 1)

Enfin l'urine fœtale et le liquide amniotique nous sont apparus comme des fluides adaptés à la recherche de tels BM (figure 2). Nous avons utilisé les urines fœtales pour essayer de mieux mesurer la fonction rénale fœtale et prédire la fonction rénale postnatale de fœtus porteurs de valves de l'urètre postérieur (travaux en cours). En effet il apparaît clairement que l'absence de BM anténataux et l'insuffisance des critères échographiques actuels conduit à des interruptions médicales de grossesse « à tort ».

Perspectives

Nous débuterons en janvier 2011 une étude prospective multicentrique (PHRC national 2010) ayant pour but l'amélioration de la prise en charge anténatale et du pronostic postnatal de pathologies sévères que sont les anomalies bilatérales du développement rénal: reins hyperéchogènes, kystiques ou dysplasiques bilatéraux fœtaux. (figure 2)



Figure 1 : L'électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse permet de mettre en évidence entre 1500-2000 peptides urinaires par individu. Chaque peptide (pics) est identifié par une masse précise (échelle de gauche) et un temps de migration sur le capillaire (échelle du bas). La hauteur des pics représente l'abondance de chaque peptide dans un échantillon.

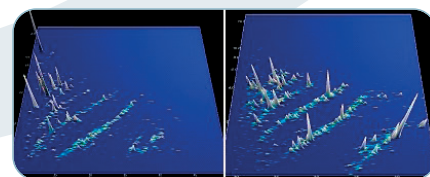


Figure 2 : Profil du protéome du liquide amniotique (à gauche) comparé au profil protéomique de l'urine analysé par EC-MS. Environ 1200 peptides sont détectés dans des liquides amniotiques (n=15 individus sains) contre 1500-2000 dans l'urine

Stéphane Decramer, Joost P. Schanstra, Jean-Loup Bascands
Service de Néphrologie – Médecine Interne – Hypertension Pédiatrique
Centre de Référence des Maladies Rénales Rares du Sud Ouest (SORARE)
Inserm U858, Toulouse.

ORGANISATION

Service Commun des Ressources Biologiques : quelle organisation ?

Plusieurs équipes du CHU de Toulouse travaillent actuellement sur la mise en place d'un Service Commun des Ressources Biologiques (SCRB) en étroite collaboration avec la Direction de la Recherche et de l'Innovation. Celui-ci devrait voir le jour prochainement et s'appuiera entre autre sur les plateaux de Biologie de Rangueil et de Purpan.

Le SCRB a une vocation de recherche scientifique et non sanitaire. Son rôle sera d'organiser la réception, le stockage, la gestion et la mise à disposition d'échantillons biologiques humains, tout en répondant à des critères élevés de qualité et d'expertise.

Ce projet se met en place entre le CHU et l'Inserm et plus généralement, les équipes de l'IFR 150. Dans ce contexte, la construction d'un bâtiment CHU-INSERM est prévue qui

doit permettre l'hébergement des plateformes technologiques. Une partie des collections biologiques du CHU et de l'Inserm y seront réunies, en complément de l'espace disponible à l'IFB-Purpan. Concernant le site de Rangueil, différentes hypothèses sont à l'étude pour l'identification de locaux dédiés.

56 collections recensées au CHU et 18 à l'Inserm

Les collections biologiques ont été recensées et déclarées auprès du Ministère chargé de la Recherche conformément aux exigences légales et réglementaires en vigueur. Au total, 56 collections ont été recensées au CHU et 18 à l'Inserm. Ce potentiel est appelé à s'enrichir régulièrement, notamment à l'occasion des avenants

annuels qui sont proposés. Le SCRB permettra de gérer les collections selon les normes qualité, de les exploiter et les valoriser efficacement.

Le CHU, suite à un Appel d'Offres des projets structurants, a reçu pour l'année 2009/2010 une enveloppe financière afin de structurer le projet de SCRB en personnel et en équipement. La technicienne de recherche clinique et les trois biologistes attachés (5 vacations), ont pour mission de définir les aspects organisationnels et techniques au fonctionnement du futur SCRB et d'intervenir, à la demande, auprès de collections spécifiques, pour des mises à niveau ou la mise en place d'une démarche « qualité ». Un travail important de structuration a depuis été réalisé et présenté en réunion de la DRCI en mars dernier.

Des Centres de Ressources Biologiques identifiés

Au sein du SCRB, des Centres de Ressources Biologiques (CRB) thématiques sont identifiés. Ils correspondent à des regroupements de collections autour d'une thématique, engagés dans une démarche qualité qui mène à la certification des structures. Aujourd'hui, la Tumorothèque du CHU de Toulouse, la Cérébrothèque et la Germéthèque sont les CRB qui se sont engagés, grâce à des financements dédiés, dans la certification.

En 2009 le Groupement d'Intérêt Scientifique IBISA qui labellise les plateformes et les plateaux techniques, a lancé un Appel à Projets « CRB ». Cette labellisation constitue une étape importante vers la certification. Dans ce cadre, la Tumorothèque du CHU et la Tumorothèque de l'Institut Claudius Régaud ont répondu à cet appel à projet et ont obtenu un financement pour un qualitatif et un chef de projet. Outre sa mission principale auprès des Tumorothèques, ce

dernier devra veiller à la meilleure synergie possible avec les acteurs du SCRB pour tendre vers une harmonisation des pratiques et des procédures.

Une Germéthèque unique en France

Au sein des biothèques toulousaines, un élément fort est représenté par la Germéthèque qui est unique en France. Ce CRB multi sites fondé en 2007 est constitué de 5 Centres d'Etude et de Conservation des Oeufs et du Spermé humains des CHU de Clermont-Ferrand, Grenoble, Marseille, Paris Tenon et Toulouse qui est le Centre Coordonnateur.

Son objectif principal est de permettre des études dans les domaines de la fertilité, de la procréation et du développement humain. Du point de vue de sa structuration la Germéthèque bénéficie d'un état d'avancement important et a reçu la certification ISO 9001 adaptée suivant l'esprit de la NF S 9690 pour les CRB en 2009.

Aujourd'hui l'organisation du SCRB est un enjeu majeur pour le CHU de Toulouse. Les collections biologiques d'origine humaine, souvent associées aux bases de données biologiques et cliniques qui les accompagnent, représentent une source d'innovations biotechnologiques en matière de santé. Le SCRB ainsi constitué sera garant d'une démarche d'assurance-qualité et de traçabilité favorisant la reconnaissance des collections au niveau national et international. Il contribuera à mettre en lumière leur potentiel de valorisation dans des programmes de recherche et de développement associant partenaires académiques et/ou industriels. En parallèle, ces collections biologiques constituées en accord avec le patient représentent un patrimoine et un outil majeur pour la recherche scientifique.



Pr Bertrand Perret
Service de Biochimie, IFB Purpan

Benjamin Cottin
Juriste Chargé de la Valorisation des
Collections Biologiques
Direction de la Recherche et de l'Innovation

AGENDA

Les dates limites de candidature aux appels d'offres

15 septembre 2010

Roche : Appels : « Identification et validation de marqueurs biologiques et cliniques pour une détection précoce de la maladie d'Alzheimer » et « Biomarqueurs circulants prédictifs de la réponse tumorale »

24 septembre 2010

Déclaration d'intention pour déposer un dossier au PHRC national hors cancer ou inter-régional.

30 septembre 2010

Roche : Bourses de Recherche « Angiogenèse »

8 octobre 2010

Projets PREQHOS date limite réception DRCI

Pour plus d'informations :
www.chu-toulouse.fr/-appels-d-offre-prix-

BON À SAVOIR

Les DIRC: nouvelle organisation à l'échelon interrégional

La circulaire DHOS de 2005¹ a permis la création de 7 Les Délégations Interrégionales à la Recherche Clinique (DIRC) dans le but : d'assurer des missions spécifiques d'animation et de soutien de l'activité de recherche, de mutualiser les moyens, et de rendre visibles et compétitives les structures de recherche clinique à l'échelle internationale.

Le CHU de Toulouse fait partie de la DIRC Sud-Ouest Outre-mer (SOOM) qui réunit les CHU de Bordeaux, Limoges, Toulouse, Fort-de-France, Pointe-à-Pitre et de la Réunion.

Sa mission est de mettre en place les bases d'un partenariat durable entre ces CHU afin de renforcer les capacités et la qualité de la recherche clinique hospitalière.

Cinq groupes de travail ont été créés:

- 1. Valorisation** (CHU de Toulouse) : définir une politique de valorisation et de transfert vers l'industrie, et appréhender les problématiques liées à la propriété intellectuelle. Il est complété par deux sous-groupes : Collections biologiques et Pharmacogénétique.
- 2. Europe** (CHU de Toulouse) : accroître l'activité de recherche dans l'inter région à l'échelle internationale.
- 3. Qualité** (CHU de Bordeaux) : accompagner la démarche qualité en créant un système d'assurance qualité commun.
- 4. Formation** (CHU de Bordeaux) : proposer un cursus de formation permanente adapté aux différents intervenants de la recherche clinique.
- 5. Développement de la recherche dans les établissements non CHU** (CHU de Limoges) : favoriser et renforcer les collaborations entre les CHU et les CHG de l'inter région.

Chaque année, la DIRC SOOM assure la gestion de l'appel à projets interrégional du Programme Hospitalier de Recherche Clinique et encourage des projets faisant intervenir une collaboration entre plusieurs centres hospitaliers (CHU et CH) de l'inter région.

Lien utile : <http://www.dirc-soom.fr>

¹ Circulaire DHOS n°252 du 26 mai 2005, relative à l'organisation de la recherche clinique et au renforcement des personnels de recherche clinique

Mélina Pocard

Chef de projets Partenariats – Europe, Direction de la Recherche et de l'Innovation
Délégation Interrégionale à la Recherche Clinique Sud-Ouest Outre-Mer

Manifestations scientifiques

26 août - 4 septembre 2010

“Viral Vectors in Gene Therapy : Applications & Novel Production Methods Advanced Symposium and EMBO Practical Course”, Kuopio, Finlande

12-15 septembre 2010

21^e Colloque des Canaux Ioniques, Presqu'île de Giens

Pour plus d'informations :
www.chu-toulouse.fr/-actualites-manifestations-

Pour plus d'informations

Site de la Recherche et de l'Innovation
www.chu-toulouse.fr

→ « Professionnels, Recherche »

→ « Recherche et Innovation médicale »

→ « DRI »

Contact DRRCI

drci.toulouse@chu-toulouse.fr
Délégation Régionale à la Recherche Clinique et à l'Innovation – Hôtel-Dieu – 2, rue Viguerie
TSA 80035 – 31059 Toulouse Cedex 9