

Projet



MISE EN PLACE D'UNE BIOBANQUE DANS LE CADRE DE LA COHORTE NUTRINET-SANTE

Responsables :

Pilar Galan
DR1 INRA

Serge Hercberg
PU-PH Paris 13/Hôpital Avicenne

U557 Inserm/Inra/Cnam/Université Paris 13

1. Intérêt d'une Biobanque dans le cadre de l'étude NutriNet-Santé

L'étude NutriNet-Santé, dans sa forme initiale, permet de centraliser des données phénotypiques multiples et précises sur une large population qui sera suivie au cours du temps.

Elle n'incluait que le recueil de données par voie Internet et le couplage à des données de mortalité et des données issues de sources médicales (comptes-rendus d'hospitalisations, copies de résultats d'examens...) ou médico-administratives existantes (SNIIRAM, ALD, PMSI, CNAV).

Le protocole initial de l'étude NutriNet-Santé n'intégrait pas la collecte d'échantillons biologiques (pas de prélèvements, pas de stockage d'échantillons), ni la validation directe des événements cliniques.

Il est évident que le fait de coupler aux données disponibles, dans le cadre de la surveillance des participants à la cohorte NutriNet-Santé, des prélèvements biologiques divers (sanguins, urinaires...) permettant différentes sortes d'analyses (génétiques, protéomiques, métabolomiques, biochimiques...) en ferait, compte tenu du phénotypage fin assuré par Internet, une ressource exceptionnelle pour valider de nombreuses hypothèses pour la communauté scientifique, notamment en terme d'hypothèses mécanistiques, d'évaluation de biomarqueurs et d'intégration de dimensions génétiques dans diverses analyses.

2. Objectifs du projet de Biobanque sur la cohorte NutriNet-Santé

Le projet de « Biobanque NutriNet-Santé » a pour objet de rassembler des données biologiques sur un sous-échantillon de sujets participant à la cohorte NutriNet-Santé.

L'objectif est de rassembler des échantillons biologiques de manière à permettre le plus grand nombre possible d'analyses raisonnablement prévisibles dans les années à venir pouvant répondre à un grand nombre de questions scientifiques dépassant le cadre des relations nutrition-santé.

Le développement du protocole de collecte, de traitement et de stockage des échantillons biologiques tient compte du fait qu'il n'existe pas de solution parfaite et idéale pour répondre à toutes les questions scientifiques dans tous les domaines de recherche, et qu'il n'est pas possible à l'heure actuelle de connaître les multiples marqueurs d'intérêt qui risquent d'apparaître dans le futur. Le protocole retenu prend en considération les contraintes techniques et analytiques prévisibles dès à présent, mais également les contraintes financières en termes de coût du programme et des moyens financiers mobilisables.

Des choix ont été faits compte tenu des différentes contraintes du protocole, ce qui a amené à exclure certaines méthodes de recueil de matériel biologique (tels que les recueils urinaires de 24 h dont l'alternative choisie est le recueil de spots urinaires), certains milieux biologiques (salives, cheveux... qui pourront faire l'objet de protocoles ancillaires spécifiques), certaines méthodes de traitement des échantillons (stabilisation directe au niveau des centres de prélèvement, par exemple pour la vitamine C avec l'acide méta-phosphorique) ou certaines conditions de stockage des échantillons (azote liquide).

Les méthodes de prélèvement et de collecte des échantillons biologiques dans le cadre de la cohorte et de la constitution de la Biobanque NutriNet-Santé reprennent en grande partie les méthodes utilisées dans le programme UK Biobank (banque biologique portant sur 500 000 Britanniques prélevés dans 35 centres au niveau national mise en place au Royaume-Uni). Les options retenues ont été définies après une ample consultation de la communauté scientifique et une évaluation par les pairs, suivie de la mise par écrit d'instructions détaillées de manière à s'assurer que les méthodes proposées soient bien adaptées aux objectifs. Le Mode Opérateur Standard du laboratoire coordinateur décrit de manière précise les prélèvements à effectuer, leur traitement immédiat, le transport à des températures définies, le traitement dans le laboratoire central, le nombre d'aliquotes et le stockage. C'est ce « mode opératoire » qui a été transposé et adapté pour le projet de Biobanque NutriNet-Santé.

3. Population d'étude

Le projet de Biobanque a pour objet de rassembler, de collecter et de stocker du matériel biologique sur un échantillon d'au moins 20 000 participants à la cohorte NutriNet-Santé localisés au niveau national en utilisant des procédures standardisées tant dans la collecte, que dans le transport, le traitement et le stockage des échantillons.

4. Organisation pratique de la Biobanque NutriNet-Santé

4.1. Organisation pratique

4.1.1. Convocation des sujets (au niveau central par la coordination nationale de l'étude NutriNet-Santé)

La population d'étude est invitée à se rendre dans des Centres Locaux de Collecte de Prélèvements NutriNet-Santé (CLCP) spécifiquement mis en place pour la réalisation des prises de sang en région (quatre-vingt-dix centres de prélèvement dans des centres hospitaliers et centres de bilan de santé ; 4 centres fonctionnent en même temps).

L'invitation et la gestion des rendez-vous sont assurées par un système informatique centralisé à l'U557 Inserm (Paris 13), s'appuyant sur Internet, au travers d'un site dédié et uniquement accessible aux Nutrinautes. Ce site permet également de fournir toutes les informations utiles (finalité de la Biobanque, conditions de prélèvement, volume prélevé, plans d'accessibilité aux sites de prélèvement, note d'information, copie du formulaire de consentement...).

Une invitation est adressée aux Nutrinautes par e-mail, avec un lien permettant de modifier sur un site spécifique la date et le lieu de rendez-vous. Une fois le rendez-vous validé par le Nutrinaute, il est renvoyé, de façon automatisée, un e-mail de confirmation puis un e-mail de rappel (48h avant le rendez-vous) précisant outre les coordonnées précises et l'horaire, les informations pratiques (durée du jeûne, aliments autorisés...) et enfin, un e-mail de rappel (la veille du rendez-vous).

Afin de stimuler la participation, il est proposé aux participants de bénéficier d'un bilan comprenant la mesure de la cholestérolémie (avec les fractions HDL et LDL), la triglycéridémie et la glycémie (avec un rendu du résultat et une alerte en cas de valeurs anormales).

4.1.2. Taches planifiées dans les Centres Locaux de Collecte de Prélèvements NutriNet-Santé (CLCP)

Les CLCP sont en charge de l'accueil des participants à l'étude et de notre équipe qui réalise les prélèvements (sang et urines), la collecte de données cliniques complémentaires, le traitement des échantillons biologiques sur place et l'organisation pratique du transport des échantillons vers le laboratoire central qui assurera l'aliquotage avant stockage dans la Biobanque.

4.1.2.1. Identification des tubes prélevés et du pot d'urine

Pour chaque sujet, tous les tubes Vacutainer®, ainsi que le pot pour le recueil d'urines, sont identifiés par une étiquette portant un code barre correspondant à un identifiant unique (unidimensionnel).

Le code unique par sujet contient suffisamment de caractères pour permettre :

- l'identification unique et anonyme du sujet et de tous ses tubes Vacutainer® prélevés ainsi que du pot d'urine,
- l'identification du milieu du prélèvement (tubes secs, tubes EDTA K2, tube héparinate de lithium, pot de recueil d'urines, tube Vacutainer® pour le transvasement des urines).

4.1.2.2. Prélèvements et type de tubes prélevés

Le prélèvement sanguin se fait à l'aide du système type « Vacutainer® ». Au total 43 ml de sang sont prélevés par Nutrinate, dans 5 tubes Vacutainer® différents. Un échantillon d'urine est également collecté sur place (Tableau 1).

Divers types de tubes contenant différents anticoagulants ou séparateurs sont utilisés pour le prélèvement. La variété des anticoagulants utilisés (EDTA K2, héparinate de lithium) et la disponibilité de sérum devraient permettre dans le futur de réaliser un large type d'analyses.

Au total, sont prélevés par sujet : 2 tubes EDTA K2 de 9 ml, 1 tube héparinate de lithium de 9 ml et 2 tubes secs de 8 ml.

L'ordre de prélèvement a été déterminé afin que, dans la situation où il ne serait pas possible de prélever la quantité de sang souhaitée pour tous les tubes, les premiers remplis puissent permettre le plus grand nombre d'analyses (Tableau 1).

Les différents tubes prélevés permettent d'obtenir du plasma, du sérum, du buffy-coat (permettant d'extraire de l'ADN) et des globules rouges. Ces tubes sont fractionnés en un nombre d'aliquotes suffisants pour les différentes analyses pouvant être envisagées dans l'avenir. En outre, le tube héparinate de lithium et les tubes secs contiendront un gel inerte qui facilite l'isolement des éléments cellulaires, protégeant ainsi sérum ou plasma des modifications que peut entraîner le délai écoulé entre la centrifugation des tubes dans les centres locaux et l'aliquotage dans le laboratoire central.

Type de tube (nombre)	Ordre de prélèvement	Volume prélevé par tube (en ml)	Température jusqu'au moment de centrifugation et/ou aliquotage ou traitement (en °C)
EDTA K2 (1)	1	9	4
Tube Héparinate de Lithium avec gel séparateur de plasma (1)	2	9	4
Tube sec avec activateur de caillot et gel séparateur de sérum (2)	3	8	4
EDTA K2 (1)	5	9	4
Volume total prélevé		43	
Urine (1)	-	9	4

Tableau 1– Ordre de prélèvement, volume prélevé et température de conservation des tubes jusqu'à centrifugation et/ou aliquotage.

4.1.2.3. Traitement des tubes dans les centres locaux CLCP (traitement pré-analytique)

Les centres locaux sont équipés de centrifugeuses réfrigérées. Ceci permet la séparation du plasma ou sérum dans des délais fixés à l'avance et standardisés afin d'éviter des modifications pouvant survenir si ce délai n'était pas respecté (ex : relargage de certains composants intracellulaires vers le plasma ou sérum).

4.1.2.3.1. Tube héparinate de lithium

La centrifugation de ce tube est effectuée :

- immédiatement après le prélèvement
- température centrifugation : + 4°C
- vitesse de centrifugation : 2 500 g pendant 10 min

Les tubes sont gardés à + 4°C jusqu'à l'enlèvement des tubes l'après-midi même par le transporteur.

4.1.2.3.2. Tubes secs

Après le prélèvement les tubes secs sont :

- laissés pendant 30 minutes à température ambiante afin de faciliter la rétraction du coagulum avant sa centrifugation
 - température centrifugation : + 4°C
 - vitesse de centrifugation : 2 500 g pendant 10 min
- Les tubes sont gardés à + 4°C jusqu'à l'enlèvement des tubes l'après-midi même par le transporteur.

4.1.2.3.3. Tubes EDTA K2

Les deux tubes EDTA K2 sont gardés directement à + 4°C sans centrifugation. Le traitement de ces tubes (centrifugation, séparation du plasma, buffy-coat et globules rouges) est effectué secondairement au niveau du laboratoire central dès réception des tubes.

4.1.2.3.4. Pot de recueil d'urine

La collecte des urines (spot urinaire) est effectuée sur place par le volontaire. Ce pot intègre un système permettant le transvasement direct des urines, en circuit fermé, du pot vers un tube Vacutainer®. Ce transvasement s'effectue sur place dans les centres locaux. Le tube Vacutainer® contenant les urines est gardé à + 4°C jusqu'à l'enlèvement des tubes l'après-midi même par le transporteur.

4.1.2.4. Monitoring des opérations dans les centres locaux

Pour chaque sujet sont enregistrés, dans la base de données, des informations concernant les conditions de prélèvement (date, heure, respect ou non de la durée du jeûne conseillée, problèmes rencontrés au moment du prélèvement...).

4.1.3. Transport des échantillons des CLPC au laboratoire central

L'enlèvement des colis contenant les tubes prélevés dans chaque centre local se fait au milieu de l'après-midi du lundi au vendredi, ce qui permet des livraisons au laboratoire central du mardi au samedi. Le transport est effectué à + 4°C pendant la nuit afin de pouvoir réceptionner dans le laboratoire central les tubes provenant des différents centres locaux. Cette livraison est assurée tôt le matin (avant 9 heures).

Le ramassage des tubes et leur transfert quotidien sont effectués par un transporteur habilité, dans des containers appropriés (avec respect des normes en vigueur), permettant le maintien d'une bonne température de l'ensemble des tubes pendant le transport jusqu'au laboratoire central.

4.1.4. Travail réalisé au niveau du laboratoire central

Note : *il est difficile d'envisager un aliquotage manuel effectué par des techniciens pour les échantillons à congeler étant donné que le nombre de personnes prélevées (60 personnes par jour) donne lieu à un très grand nombre d'aliquotes (30 aliquotes par personne, soit 1 800 aliquotes par jour).*

La décision de ne pas congeler les échantillons dans les centres locaux offre des avantages évidents sur le plan organisationnel (traçabilité, utilisation d'automates pour l'aliquotage...). Mais le délai entre le moment du prélèvement dans les centres locaux jusqu'à l'aliquotage dans le laboratoire central et le stockage dans les congélateurs à - 80°C pourrait avoir des conséquences sur la teneur de certaines molécules labiles.

Le laboratoire central est localisé à la Faculté de Médecine de l'Université Paris 13, dans des locaux contigus à ceux de la Biobanque NutriNet-Santé.

Les codes-barres des tubes Vacutainer® sont scannés dès l'arrivée des tubes au laboratoire central afin de pouvoir s'assurer que tous les tubes prélevés le jour précédent dans les centres locaux ont bien été réceptionnés et un contrôle des spécimens lors de l'arrivée au laboratoire est effectué. Une liaison informatique entre les centres de prélèvement locaux et le laboratoire central permet d'obtenir avant l'arrivée des tubes au laboratoire central toutes les informations nécessaires au traitement des tubes. Les données concernant le transport sont saisies à la réception au laboratoire central.

Pour chaque sujet, les différents tubes prélevés ainsi que le tube d'urine donnent lieu à un total de 30 aliquotes qui sont stockés à - 80°C. Deux copies sont stockées dans deux congélateurs différents pour des raisons de sécurité. Afin d'assurer un aliquotage rapide des tubes, éviter des erreurs et garantir une grande traçabilité, l'aliquotage est effectué à + 4°C par un automate spécialement conçu à cet usage. La raison du fractionnement des tubes en un grand nombre d'aliquotes est d'éviter la détérioration des échantillons par de multiples cycles de décongélation/recongélation nécessaires aux différentes analyses futures.

Partant d'une base de 60 sujets prélevés quotidiennement au niveau des 4 sites de prélèvement, avec les 5 tubes prélevés par sujet plus le tube Vacutainer® contenant les urines (soit au total 6 tubes par sujet), cela correspond à environ 360 tubes Vacutainer®, qui sont traités dans le laboratoire central chaque jour.

Les tubes sont traités à + 4°C avec l'objectif que tous les échantillons soient stockés à -80 °C dans un délai maximal de 24 h après le prélèvement (voir description dans le tableau 2). Les tubes EDTA sont centrifugés dès leur arrivé au laboratoire central à 2500 g pendant 10 minutes et à + 4°C.

Les différents aliquotes effectués à partir de chaque tube Vacutainer® sont conservés dans des tubes cryogéniques gravés avec des codes 2D. Chaque jour, sont donc produits à partir des 4 centres de prélèvements, 1 800 aliquotes d'un volume de 850 µl. Cette opération d'aliquotage est robotisée et des lecteurs de plaques de tubes 2D sont incorporés dans l'automate d'aliquotage permettant une traçabilité parfaite des sujets et de leurs aliquotes jusqu'à leur rangement dans les congélateurs à - 80°C de la Biobanque.

Tube prélevés	Fractions	Nombre d'aliquotes congelées à - 80 °C
EDTA K2 x 2	Plasma	8
	Couche leucocytaire (buffy coat)	2
	Globules rouges	2
Héparinate de lithium avec gel séparateur de plasma.	Plasma	4
Tube sec avec activateur de caillot et gel séparateur de sérum x2	Sérum	6
Tube d'urine	Urine	8
Total aliquotes		30

Tableau 2– Fractions et aliquotes à partir des tubes Vacutainer® prélevés et du pot d'urine.

4.1.5. Stockage des échantillons biologiques dans la Biobanque

La quantité de tubes à congeler au niveau de la Biobanque, jointe à la nécessité d'un suivi rigoureux, exigent la mise en place d'un logiciel de traitement de l'information (LIMS) depuis le centre local de prélèvement, au laboratoire central et jusqu'à la salle de stockage des échantillons (Biobanque).

Les porte-tubes contenant les 96 tubes cryogéniques à code 2D sont informatisés en ce qui concerne leur localisation dans les congélateurs à - 80°C (compartiment, rack et position à

l'intérieur du rack). Pour des raisons de sécurité, les aliquotes d'un même sujet sont stockés dans deux congélateurs différents de la Biobanque de l'Université Paris 13 (Bobigny).

Chaque congélateur contient les aliquotes correspondants à environ 2 700 sujets, rangés dans des racks adaptés. Des congélateurs supplémentaires vides (2 congélateurs) sont disponibles pour faire face au problème technique pouvant survenir au niveau d'un congélateur particulier (ceci donnera une sécurité supplémentaire en cas de panne d'un congélateur). Tous les congélateurs sont connectés à des sondes de détecteurs de température qui sont connectées à des alarmes téléphoniques et informatiques afin d'assurer une traçabilité continue des températures et un déclenchement d'alarmes téléphoniques en cas de problème d'un congélateur ou du système électrique de la pièce de stockage. La Biobanque est équipée d'un système anti-incendie, d'une alarme anti-intrusion et est connectée à un groupe électrogène pour palier à une éventuelle panne électrique générale.

Ce système de sécurité permet d'informer téléphoniquement les personnes d'astreinte lorsque la température d'un congélateur dépasse le seuil fixé. Le système d'alarme téléphonique est relié 24 h/24 aux portables des personnes d'astreinte de la Biobanque et d'une société spécialiste en charge du dépannage en urgence des congélateurs.

La Biobanque est localisée au sous-sol de l'UFR SMBH à l'UREN dans des locaux mis à disposition par l'Université Paris 13. Ces locaux sont composés d'une grande salle de 250 m², destinée à accueillir la salle des congélateurs (possibilité d'accueillir 40 congélateurs) et le laboratoire central. Ces locaux sont climatisés.

5. Organisation et gestion de la Biobanque

L'investigateur principal de l'étude NutriNet-Santé est le Pr Serge Hercberg, Directeur U557 Inserm (UMR Inserm/Inra/Cnam/P13).

La Biobanque est placée sous la responsabilité du Dr Pilar Galan (DR1 INRA, UMR Inserm/Inra/Cnam/P13).

Personnel de terrain

Le personnel de terrain est constitué de 4 techniciens de laboratoire, un technicien par centre ouvert aux consultations (sur une base de 15 sujets prélevés par technicien et par jour).

Les données individuelles de la Biobanque sont informatisées de façon centralisée à l'U557 Inserm, sous le contrôle des coordinateurs de l'étude NutriNet-Santé. Une interface est assurée pour le chaînage des données avec les données phénotypiques stockées au sein de l'UMR INSERM U557/INRA U1125/CNAM/Université Paris 13 (dans les conditions d'anonymat, de protection et de sécurité garanties, en accord avec la législation).

6. Aspects réglementaires et assurance qualité

L'étude NutriNet-Santé (recrutement des participants, collection des données par Internet) bénéficie d'un avis favorable du Comité de Qualification Institutionnel de l'INSERM (obtenu

le 10/07/2008), du CCTIRS (obtenu le 11/07/2008, n°08.301) et de la CNIL (obtenu le 24/02/2009, n°908450).

La Biobanque répond à tous les aspects de la législation en vigueur en France : déclaration de la collection à l'ARH, au ministère de la Recherche (art L 1243-3 ; décret n°2007-1220), avis de l'AFSSAPS, du CPP, du CCTIRS et de la CNIL.

La Cellule de présélection de l'Institut thématique Santé Publique de l'INSERM a donné un avis favorable concernant la promotion de l'INSERM du projet (Dossier n° C09-42, 22/12/2009).

Ce projet a été approuvé par le CCTIRS (obtenu le 15/07/2010, n°10-367).

L'ensemble des procédures de fonctionnement et l'assurance qualité de la Biobanque NutriNet-Santé s'appuie sur :

- les recommandations éditées dans le référentiel NF S96-900 de juillet 2008 « Qualité des centres de ressources biologiques (CRB) - Système de management d'un CRB et qualité des ressources biologiques d'origine humaine et microbienne »,
- les lignes directrices de l'OCDE relatives aux pratiques exemplaires concernant les centres de ressources biologiques, OCDE, avril 2007.