



LIQUIDE CEPHALO-RACHIDIEN

Prélèvement et conservation

Recommandations pré-analytiques
en protéomique clinique

Projet INCa : Protéomique et Cancer

S. LEHMANN, MONTPELLIER
F. BERGER, GRENOBLE

1

Introduction

Intérêt de l'étude
du LCR

Le liquide céphalorachidien ou LCR est un fluide biologique présent dans l'espace sous arachnoïdien autour de l'encéphale et de la moelle épinière, ainsi que dans les ventricules cérébraux et le canal rachidien. Il est produit en continu par filtration du sang au niveau de la barrière hémato-encéphalique et par des cellules spécialisées au niveau des plexus choroïdes. Il joue un rôle essentiel au niveau de système nerveux central en permettant les échanges de métabolites et de catabolites entre les cellules cérébrales et le reste du corps. Sa composition est ainsi un reflet, d'une part du sérum, et d'autre part du statut physiopathologique du parenchyme cérébral. Sa composition est ainsi très complexe malgré une concentration protéique de l'ordre de 0,3 à 0,6 g/L soit environ cent fois inférieure à celle du sérum.

L'examen du LCR permet classiquement le diagnostic de méningite mais il est aussi utilisé pour celui d'autres affections du système nerveux central : méningo-encéphalites, tumeurs, maladies neurodégénératives... En cancérologie, l'étude du LCR est réalisée dans de nombreuses explorations de cancer primitif (lymphomes, gliome..) ou secondaire à la recherche notamment d'une dissémination méningée. Cependant, dans la plupart des cas, cette étude qui repose sur la cytologie et les paramètres biologiques classiques du LCR (protéorachie, glycorachie) manquent de spécificité. Le LCR est un liquide de choix pour la recherche de nouveaux biomarqueurs protéomiques.

Considérations générales

Protéomique
clinique et
pré-analytique

La recherche de biomarqueurs diagnostiques, pronostiques ou évolutifs est devenu un enjeu crucial dans la prise en charge des patients atteints de pathologies complexes et en particulier de cancers. La protéomique clinique est une approche majeure permettant l'identification de ces biomarqueurs mais elle pose des problèmes de reproductibilité, de mise en place de procédures opératoires et de contrôle qualité intéressant en particulier les étapes pré-analytiques.

L'assurance de la qualité et de la reproductibilité des analyses en protéomique clinique passe ainsi par un contrôle de l'intégrité initiale des échantillons avec la standardisation des conditions de prélèvement, de conservation et de stockage.

Ce document détaille les choix techniques et les modes opératoires pour le prélèvement et la conservation du liquide céphalorachidien (LCR). Il est destiné aux équipes cliniques, aux laboratoires d'analyses biologiques et aux centres de conservation (Laboratoires, bibliothèques, centres de ressources biologiques). L'objectif est de s'assurer que les collections d'échantillons soient comparables afin de permettre dans le futur leur utilisation croisée pour la recherche de biomarqueurs protéomiques.

Conditions de Prélèvement

La Ponction lombaire

- Les prélèvements sont effectués lors d'une hospitalisation, généralement en fin de matinée, sous contrôle médical. Ce document ne détaille pas cette procédure. Pour cela se référer à des documents médicaux spécialisés.

Note : L'utilisation d'aiguilles a-traumatiques de petit diamètre avec un orifice latéral (type Whitacre) permet de diminuer les céphalées post-ponction lombaire (chez le patient jeune) et de réduire le taux de contamination du LCR par du sérum liés à une déchirure capillaire.

Le prélèvement du LCR

- Prélever le volume nécessaire (dans les tubes adéquats en fonction des pratiques cliniques locales) pour les explorations cliniques (biochimique, bactériologique...).
- Puis prélever au moins 3 ml **directement** à partir de l'aiguille de prélèvement dans un tube en polypropylène.
- Mettre le prélèvement à **4°C** et prévoir le transport **sur glace** au laboratoire dans les meilleurs délais.

Reporter toutes les informations pré-analytiques liées à ces étapes sur la feuille de suivi du prélèvement (voir fin de ce document).

Note : il est généralement déconseillé d'utiliser pour l'analyse du LCR les 4 premières gouttes provenant de la ponction lombaire, afin de minimiser la contamination sérique du LCR. En tout état de cause ne pas utiliser ces gouttes pour l'analyse protéomique.

Tubes recommandés : Tube sec en polypropylène

Il semble préférable d'utiliser des tubes à fond conique afin de faciliter la séparation entre le culot et le surnageant lors de la centrifugation et des tubes stériles afin d'éviter au maximum une contamination bactérienne.

En date du 21/03/2007 le tube de prélèvement utilisé par défaut est le suivant :

Tube Greiner Référence: 188271
TUBE, 15 ML, PP, FOND ROND / CONIQUE, 17x120MM, STERILE, 100PCS/SACHET
http://www.greinerbioone.com/fr/france/articles/catalogue/article/204_5/4483/

Des études de validation en cours permettront d'ajouter des références de tubes supplémentaires à ce premier choix.

Remarque

Il est essentiel de collecter directement le LCR dans un tube en polypropylène. Un transvasement même rapide suite à un prélèvement dans un tube d'une autre nature risque de modifier significativement les analyses ultérieures, en particulier protéomique, du LCR.

Ponction
Lombaire :
Remplir la feuille
de suivie du
prélèvement

Ponction
Lombaire :
Prélèvement direct
en tube de
polypropylène

Transport au Laboratoire

Transport au
Laboratoire :
Réduire au
maximum le temps
d'attente < 4h

Transférer le prélèvement au laboratoire le plus rapidement possible, de préférence à **sur glace** afin de minimiser l'activité des protéases. Noter cette information sur la **feuille de suivi**.

Le temps maximum entre prélèvement et traitement au laboratoire doit être de **quatre heures**.

Traitement au Laboratoire et Stockage

Arrivée au laboratoire

Prévoir pour
chaque LCR
l'analyse
cytologique et la
mesure de la
protéinorachie

- Noter l'heure d'arrivée du prélèvement sur la **feuille de suivi** et calculer le temps passé entre prélèvement et traitement.
- Vérifier si tous les items de la **feuille de suivi** ont été complétés, sinon joindre le service clinique.
- Vérifier qu'un aliquot de LCR a bien été fourni pour mesurer la **protéinorachie** et pour la **cytologie**.

Centrifugation et aliquotage principale

- **Centrifuger** le LCR dans le tube original de prélèvement,

DE PREFERENCE : 10 minutes à 1000 g, à 4°C, sans frein

En tout état de cause, noter sur la feuille de suivi les conditions de centrifugation en reportant bien le nombre de g (à calculer, et non les rpm). Noter également l'aspect du LCR après la centrifugation (voir feuille de suivi). Eviter une centrifugation supérieure à 1000 g qui risque de faire éclater les cellules éventuellement présentes.

Calculer le
nombre de « g »
pour la
centrifugation pas
simplement les RPM

- **Aliquoter** par 500 µl dans des tubes en polypropylène (voir ci-dessous). Ne pas utiliser les derniers 50 µl du tube car trop proche du culot.
- Une **deuxième centrifugation** à 14 000 – 20 000 g, 10 min à 4°C, peut être envisagée afin de se débarrasser des débris cellulaires éventuellement présents. Ceci doit être envisagé en fonction des possibilités du laboratoire et des technologies protéomique utilisées avec les prélèvements. Cette deuxième centrifugation nécessite un transfert du surnageant dans un nouveau tube eppendorf avant stockage.
- **Numéroter** les tubes (étiquettes résistantes au congélateur, marqueur..) selon le protocole en vigueur (code, anonymisation etc.).

En date du 21/03/2007 le tube de stockage utilisé par défaut est le suivant :

Tube Eppendorf Protein LoBind, Référence: 0030 108.116

1,5 ml, PCR clean, par 100

<http://www.eppendorf.com/int/index.php?l=5&pb=5372c8a874fa68d6&sitemap=2.1&action=products&catalognode=19439>

Des études de validation en cours permettront d'ajouter des références de tubes/plaques/palettes supplémentaires à ce premier choix.

Stockage

- Conservation immédiate à -80°C.

Eviter toute conservation temporaire à -20°C. Si elle est néanmoins inévitable, l'indiquer sur la feuille de suivi avec sa durée.

Décongélation pour utilisation ou aliquotage secondaire

- Il est conseillé de toujours respecter le même protocole. Afin de standardiser cette étape une décongélation dans la glace 15 minutes est conseillée.
- Centrifuger 5 minutes à 1000 g, utiliser ou répartir le LCR dans des tubes secondaires.

