

# Plasma

PLASMA

---

Prélèvement et conservation

## Recommandations pré-analytiques en protéomique clinique

Projet INCa : Protéomique et Cancer

P. DUCOROY, DIJON

---

## Introduction

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.

Intérêt de la  
standardisation  
des prélèvements

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.

## Considérations générales

Ce document détaille les choix techniques et les modes opératoires pour le prélèvement et la conservation du plasma. 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.

Protéomique  
clinique et  
pré-analytique

Ces recommandations sont destinées à favoriser une homogénéisation des étapes de recueil, conditionnement et stockage des prélèvements pour l'ensemble des projets de recherche de biomarqueurs utilisant les techniques récemment développées dans le domaine de la protéomique. Il est évident que ces recommandations n'empêchent pas la possibilité d'utiliser des protocoles opératoires différents, cependant la conservation de prélèvements recueillis et stockés de manière homogène entre tous les centres permettra à moyen terme de constituer une banque d'échantillons remarquable et indispensable pour des études de haut niveau dans le domaine de la protéomique. La réussite ne se fera pas sans l'effort de tous.

## Conditions de Prélèvement

Choix initial du prélèvement Sérum/Plasma:

Il est impératif de ne pas modifier le type d'échantillon choisi (plasma/sérum) au cours de l'étude ni entre la phase exploratoire et la phase de validation clinique. Aucun consensus n'existe actuellement sur le type d'échantillon le plus approprié pour réaliser des analyses protéomique du sang périphérique. Cependant, dans le cadre d'une étude multicentrique l'utilisation du plasma est recommandée afin de ne pas ajouter une variable supplémentaire qui est l'étape de coagulation très mal maîtrisée. Lorsque cela est possible il est recommandé d'effectuer des prélèvements spécifiques pour la protéomique afin de faciliter le circuit d'acheminement des produits et de raccourcir le temps entre le prélèvement et la congélation de l'échantillon. Aujourd'hui aucune étude ne permet de valider définitivement l'utilisation de tube de type P100 pour l'analyse protéomique, le rapport bénéfice /coût est encore à l'étude.

L'heure de prélèvement a une incidence sur la concentration de certains marqueurs. Il est donc important de garder les mêmes conditions de prélèvement pour l'ensemble de l'étude. Il est recommandé d'effectuer le prélèvement à jeun.

Le prélèvement du Plasma

1 - Prévenir le service qui devra prendre en charge le prélèvement (indiquer le nombre d'échantillons et le type de conditionnement).

2 - Collecte du sang  
Utilisation d'un tube EDTA : "Spray coated K<sub>2</sub>EDTA"

Intraveineux par ponction veineuse directe. Eviter les prélèvements sur voie veineuse centrale ou chambre implantable chez les patients perfusés.

### Remarque

Remplir le tube au maximum afin de diminuer le risque d'hémolyse (8,5 ml).

- Inverser doucement le tube 8 fois.

### Remarque

S'assurer de l'absence d'hémolyse.

- Le nombre de tube à prélever sera dépendant de l'étude. Il faut bien évaluer les besoins dans le cadre de la phase exploratoire (avec validation et identification) mais ne pas oublier également l'importance des phases de validation clinique (sur les mêmes échantillons) avec

Plasma :  
Remplir la feuille  
de suivie du  
prélèvement

Impératif :  
Avoir l'information sur le  
type de tube et sa  
référence. Noter l'heure de  
prélèvement sur le tube et  
sur la fiche de suivi afin de  
pouvoir définir le temps  
entre le prélèvement et le  
traitement de l'échantillon

nécessité d'un nombre important de patients et l'éventualité d'un transfert de technologie. Au vu des technologies aujourd'hui utilisées, un prélèvement de 4 ml de plasma semble suffisant.

- Conserver le tube en position verticale le maximum à 4°C
- 3 - La Feuille de suivi de l'échantillon doit être remplie afin de pouvoir informatiser l'ensemble des données correspondant à l'échantillon

## Transport, Traitement au Laboratoire et Stockage

Transport au Laboratoire :  
Il est impératif de réduire les temps d'attente. Le délai maximum entre le prélèvement et la congélation doit être de 4 h

- Téléphoner au service qui doit prendre en charge le prélèvement
- 4 - Faire transporter le prélèvement jusqu'au laboratoire qui traitera l'échantillon pour sa conservation
- Arrivée au laboratoire
- 5 - Noter l'heure d'arrivée du prélèvement sur la **feuille de suivi** et calculer le temps passé entre prélèvement et traitement.
- 6 - Vérifier si tous les items de la **feuille de suivi** ont été complétés, sinon joindre le service clinique.

### Centrifugation et aliquotage principal

- 7 - Centrifuger le tube dans une centrifugeuse climatisée à 20°C à 1200g, 10 min.
- Transférer le surnageant dans un nouveau tube puis effectuer une nouvelle centrifugation, centrifugeuse climatisée à 20°C, à 1200g, 10 min.
- Aliquoter le plasma par 500µl dans des paillettes ou cryotubes appropriées. Ces échantillons sont les échantillons « mères » de grand volume pour une conservation à long terme.

### Remarque

Ces échantillons sont les échantillons "mères" de grand volume pour une conservation à long terme, à l'opposé des tubes "fils" de faible volume (50 µl) générés à la première décongélation et qui devront être utilisés rapidement.

La conservation optimum pour assurer une bonne stabilité est aujourd'hui la conservation en azote liquide en système clos. La conservation à -80°C peut être envisagée pour des études à court terme.

La congélation en paillettes permet à la fois de s'assurer d'une absence totale d'échange entre l'air et l'échantillon, de plus celles-ci peuvent être stockées à -196°C. Plusieurs travaux ont montré une dérive des échantillons à -80°C. Au-delà de 18 mois, la question se pose de savoir si c'est du à la

température ou au conditionnement (en général faible volume d'échantillon dans un tube de grand volume). La comparaison entre les deux conditions est en cours d'étude.

La paillette permet l'identification par code barre et l'anonymisation du prélèvement tout en gardant le lien avec le dossier clinique.

#### Stockage

- 8 - Conserver l'ensemble des paillettes à 4°C avant la mise en congélation (maximum 1h). Dans le cas de l'utilisation de cryotubes mettre les échantillons directement à -80°C
  - Dans les 3 heures qui suivent le prélèvement, incuber les paillettes en vapeur d'azote
- 9 - Entrer toutes les informations nécessaires à l'identification de l'échantillon ainsi que les informations concernant sa nature (plasma, sérum...) et les références du matériel utilisé pour le conditionnement (voir fin de ce document).

#### Décongélation pour utilisation et aliquotage secondaire

- 10 - Demande d'échantillons de la plateforme protéomique à l'interlocuteur CRB pour les laboratoires extérieurs.
- 11 - Décongélation rapide des échantillons (au laboratoire du CRB), sonication brève (2 min) puis homogénéisation de l'échantillon. Le surplus d'échantillon devra être très rapidement (30 min) reconditionné et aliquoté en petit volumes (50 µl), puis recongelé à -80°C (tubes « fils »).

#### Important :

Un échantillon ne doit pas subir plus de deux décongélation entre son entrée au CRB et son arrivée sur la plateforme protéomique.

- 1- Conditionnement initial : paillette.
- 2- Reconditionnement en tube.

#### Remarque

Il est important d'avoir un rapport volume de l'échantillon / taille du tube le plus proche de 1.

La conservation des tubes "fils" sera de courte durée < 24 mois.

Les tubes fils seront préférentiellement utilisés pour l'étape d'identification des biomarqueurs.

- 12 - Envoi à la plateforme protéomique de la quantité demandée (à -80°C).
- 13 - Décongélation rapide pour utilisation (dans la 1/2 heure).
  - Après décongélation, les échantillons doivent rester à 4°C en attendant d'être traités afin d'éviter toute dégradation post conservation.

