



Preanalytical guidelines for clinical proteomics investigation of biological fluids

Sylvain Lehmann, S. Roche, Y. Allory, A. Barthelaix, J.-L. Beaudoux, F. Berger, F. Betsou, J. Borg, A. Dupuy, J. Garin, et al.

► To cite this version:

Sylvain Lehmann, S. Roche, Y. Allory, A. Barthelaix, J.-L. Beaudoux, et al.. Preanalytical guidelines for clinical proteomics investigation of biological fluids. *Annales de Biologie Clinique*, John Libbey Eurotext, 2009, 67 (6), pp.629-639. 10.1684/abc.2009.0374 . hal-00444355

HAL Id: hal-00444355

<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00444355>

Submitted on 18 Dec 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Recommandations préanalytiques pour les analyses de protéomique clinique des fluides biologiques

Rapport des travaux du Groupe de travail
« Préanalytique et analyses multiplexes en protéomique »
de la SFBC 2007-2009 et des membres du Projet INCa*
« Protéomique des fluides biologiques et cancer »
Projet INCa : PD, YA, JG, SL, SR, FB, MR
Groupe SFBC : JLB, AB, FB, JB, AD, GL, KP, MQ, SL

Preanalytical guidelines for clinical proteomics investigation of biological fluids

S. Lehmann¹
S. Roche¹
Y. Allory²
A. Bartheleix³
J.-L. Beaudeau⁴
F. Berger⁵
F. Betsou⁶
J. Borg⁷
A. Dupuy⁸
J. Garin⁹
M. Quillard¹⁰
G. Lizard¹¹
K. Peoc'h¹²
M. Riviere¹³
P. Ducoroy¹⁴

¹ CHRU de Montpellier,
Laboratoire de biochimie,
Hôpital Saint Eloi, Montpellier
<s-lehmann@chu-montpellier.fr>

² Département de pathologie,
Hôpital Henri Mondor, Créteil

³ Service de pathologie cellulaire
et tissulaire, CHU d'Angers

⁴ Service de biochimie,
Hôpital universitaire Charles Foix
(APHP), Ivry-sur-Seine

⁵ Inserm Unité 318,
CHU Albert Michallon, Grenoble

Résumé. La recherche de biomarqueurs diagnostiques, pronostiques ou évolutifs est devenue un enjeu crucial pour 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 en particulier pour les étapes préanalytiques. L'assurance de la qualité et de la reproductibilité de ces analyses passe ainsi par un contrôle de l'intégrité initiale des échantillons avec la standardisation des conditions de prélèvement, de conservation et de stockage. Dans cette optique, des actions visant à proposer des recommandations préanalytiques en protéomique clinique ont été menées au sein de l'Institut national du cancer (INCa) et de la Société française de biologie clinique (SFBC). Des travaux communs ont permis de finaliser des recommandations pour les fluides biologiques suivants : plasma, sérum, urine et liquide céphalorachidien. Ces recommandations sont destinées à favoriser une homogénéisation des étapes de recueil, de conditionnement et de stockage des échantillons dans les centres de ressources biologiques et pour les projets de recherche de biomarqueurs utilisant les techniques récemment développées dans le domaine de l'analyse protéomique. Ces recommandations n'empêchent pas la possibilité d'utiliser des protocoles opératoires différents ; cependant, la conservation d'échantillons recueillis et stockés de manière homogène entre tous les centres permettra à moyen terme de constituer une banque biologique remarquable et indispensable pour des études multicentriques et de haut niveau dans le domaine de la protéomique en santé humaine.

Mots clés : *protéomique, préanalytique, sang, urine, liquide céphalorachidien*

Abstract. Research of new diagnosis or prognosis biomarkers is a major challenge for the management of patients with complex pathologies like cancer. Clinical proteomics is one of the recent approaches to identify these

⁶ Biobanque de Picardie, Saleux

⁷ Laboratoire de biochimie,
Faculté de médecine,
CHU de Saint-Etienne

⁸ Laboratoire de biochimie,
Hôpital Lapeyronie,
CHRU de Montpellier

⁹ iRSTV/EDyP, CEA Grenoble, Grenoble

¹⁰ Laboratoire de biochimie médicale,
CHU de Rouen 1

¹¹ Equipe biochimie métabolique
et nutritionnelle,
Faculté des sciences Gabriel,
Inserm U866, Dijon

¹² Service de biochimie et biologie
moléculaire,
Hôpital Lariboisière, Paris

¹³ UMR 5089, Toulouse

¹⁴ CLIPP, Dijon

* Ces recommandations reflètent
l'opinion des participants au projet
« Protéomique des fluides biologiques
et cancer » et n'engagent en aucun
cas la responsabilité de l'INCa.

Article reçu le 11 août 2009,
accepté le 31 août 2009

biomarkers in biological fluids. Over the last five years, many problems related to the variability and the quality control of these analyses have been observed. This was notably related to the different preanalytical status of each sample. A strong need for standardization of the critical preanalytical phases (collection, transport, processing, storage...) has been therefore recognized. With this goal in mind, working groups of the "Institut national du cancer" (INCa) and the "Société française de biologie clinique" (SFBC) proposed here preanalytical proteomics guidelines for the most common biological fluids: plasma, serum, urine and cerebrospinal fluid. To goal is to provide the basis for the harmonization of the procedures in clinical laboratories and biobanks to allow an optimal use of biological collections.

Key words: *proteomics, preanalytics, blood, urine, cerebrospinal fluid*

La recherche de nouveaux biomarqueurs permettant un diagnostic précoce, une indication pronostique ou une orientation thérapeutique est devenue un enjeu crucial dans la prise en charge des patients atteints de pathologies complexes et en particulier de cancers. Parmi les moyens d'accéder et de découvrir ces biomarqueurs, la protéomique clinique est une discipline récente qui pose encore de nombreux problèmes de reproductibilité, de mise en place de procédures opératoires et de contrôle qualité intéressant en particulier les étapes préanalytiques. Sa finalité est de révéler des profils protéiques ou peptidiques spécifiques d'un état pathologique et ceci principalement à partir de fluides biologiques [1]. Cet article concerne trois des principaux fluides biologiques étudiés aujourd'hui : le sang et ses produits dérivés (sérum et plasma), l'urine et le liquide céphalorachidien (LCR). Chacun de ces fluides, de par son origine, son volume disponible, et sa composition, demande des procédures préanalytiques spécifiques. Celles-ci peuvent inclure des techniques de pré-fractionnement (purification de différents sous-protéomes, élimination de protéines majoritaires...) qui sont importantes pour réduire la complexité du protéome de ces échantillons [2]. L'utilisation de méthodes analytiques de plus en plus performantes dont principalement celles utilisant la spectrométrie de masse [3], met en première ligne les questions d'assurance de qualité permettant un contrôle de l'intégrité initiale des échantillons par la

standardisation des conditions de prélèvement, de conservation et de stockage. Ce problème est d'autant plus important que les récentes publications dans le domaine démontrent la nécessité de travailler sur des nombres importants de patients par groupe pour augmenter la spécificité des panels de biomarqueurs mis en évidence, ainsi que leur pouvoir discriminant [4]. Ce point est donc aujourd'hui crucial pour définir les stratégies à mettre en œuvre dans les études de protéomique clinique à venir.

Dans le domaine de la biologie clinique, il existe une très grande diversité des recommandations concernant les étapes présidant aux dosages *in vitro*. Ces étapes, qualifiées de « préanalytiques », ont une influence majeure sur les résultats des dosages des différents paramètres biologiques et elles peuvent être une source importante d'erreur [5]. La protéomique clinique qui vise à quantifier des cibles protéiques multiples, en faible quantité, et avec des approches diverses (chromatographie, spectrométrie de masse, puces...) est d'autant plus sensible aux conditions préanalytiques [6, 7]. Le choix d'une procédure standardisée est cependant difficile, par la nature même de cette recherche protéomique sans *a priori*, pour laquelle les biomarqueurs trouvés peuvent être de nature très différente : peptidique, protéique multimérique, phosphorylée... Par ailleurs, les collections biologiques créées pour ces recherches peuvent être aussi utilisées dans des projets avec des technologies différentes (électrophorèse

bidimensionnelle, Maldi-Tof, analyse multiplexe...). Il faut donc trouver le « plus grand dénominateur préanalytique commun » pour qu'il soit partagé par le plus grand nombre de laboratoires et de centres de ressources biologiques (CRB). Ceci permettra à terme de réduire les différences dans les méthodes de récolte, de gestion et traitement des échantillons avant analyse et donc de réduire la variabilité des résultats générés.

Les étapes préanalytiques sur lesquelles se penche cet article vont de la collection des échantillons à leur analyse protéomique. On y retrouve en particulier le prélèvement lui-même, le transport, la préparation, le stockage des échantillons (*figure 1*). Nous ne nous intéresserons pas ici à d'autres variables préanalytiques qui peuvent également influencer les résultats, mais qui concernent le statut des patients au moment du prélèvement (alimentation, rythme nyctéméral, médication) ou les variations génétiques individuelles ou de population [8]. Pour chacune des phases préanalytiques, nous avons choisi des conditions bien définies sur la base de notre expérience, d'études et de publications dans le domaine. Ce document est destiné aux équipes cliniques, aux laboratoires de biologie médicale et aux centres de conservation (laboratoires, biothèques, CRB). L'objectif est de s'assurer que les collections d'échantillons sont comparables afin de permettre dans le futur leur utilisation croisée pour la recherche de biomarqueurs protéomiques dans le cadre d'études multicentriques.

Recommandations afférentes aux différents liquides biologiques

Échantillon sanguin

Une première interrogation dans la réalisation de programmes de recherche de nouveaux biomarqueurs sanguins réside dans le choix de l'utilisation d'échantillons de sérum ou de plasma. Beaucoup d'études protéomiques tendent à préférer le plasma dont la préparation est plus reproductible (avantage dans les études multicentriques), et qui évite le déroulement de la coagulation et de son cortège protéolytique [9]. Pour le plasma, le choix de l'EDTA comme anticoagulant pour la protéomique clinique semble préférable en terme de reproductibilité et de qualité des résultats obtenus [10]. Il est cependant possible, pour des raisons pratiques ou techniques précises, que certaines études préfèrent utiliser un autre type d'anticoagulant. Le sérum a lui comme avantage de ne pas nécessiter l'ajout d'un anticoagulant qui par sa présence peut altérer la nature du protéome. Il faut d'ailleurs remarquer que certaines protéines et différentes activités enzymatiques ne sont mesurées de façon satisfaisante que dans le sérum. Au final, on ne peut pas savoir *a priori* si la recherche d'un nouveau biomarqueur sera fructueuse dans le plasma plutôt que dans le sérum (et inversement). Le choix entre ces deux fluides peut cependant être dépendant de la pratique (analyses déjà effectuées dans

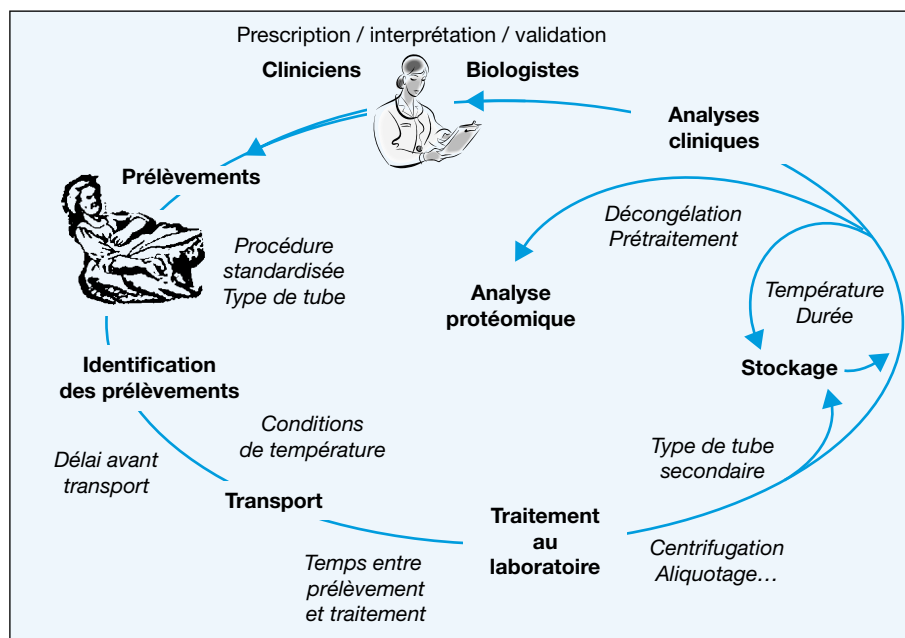


Figure 1. Représentation schématique du circuit de prélèvement clinique jusqu'à l'analyse protéomique. En italique sont mentionnées les phases préanalytiques qu'il est nécessaire de contrôler afin de garantir une homogénéité des échantillons biologiques.

le cadre étiologique de l'étude), de la faisabilité, des techniques d'analyses envisagées ou de la nature des candidats potentiels (protéine jouant un rôle dans la coagulation, protéases, fragments peptidiques...). Dans la création d'une banque biologique (biobanque) à des fins de recherche, nous conseillons, dans la mesure des moyens disponibles, de prévoir les deux types de fluides : plasma et sérum.

Une autre interrogation dans la préparation des échantillons sanguins pour l'analyse protéomique est l'utilisation ou non d'inhibiteurs de protéases et/ou de phosphatases. A ce jour, le rapport bénéfice/coût est encore à l'étude et il semble préférable de s'en abstenir pour le sang, sauf peut-être dans des cas bien précis où le type de biomarqueurs recherché est très ciblé (peptides, forme phosphorylée de protéines...).

Conditions de prélèvement

La première recommandation qui est valable de façon globale pour tous les types d'échantillons est qu'il est impératif de ne pas modifier les conditions de prélèvement au cours d'une étude, ni entre la phase exploratoire et la phase de validation clinique d'une recherche. Lorsque cela est possible, il est recommandé d'effectuer des prélèvements spécifiques pour l'analyse protéomique, afin de faciliter le

circuit d'acheminement des échantillons et de raccourcir le temps entre le prélèvement et la congélation du fluide biologique. L'heure de prélèvement du sang a une incidence sur la concentration de certains marqueurs. Il faut donc prendre en compte ce paramètre sachant qu'il est recommandé d'effectuer le prélèvement à jeun. Le prélèvement sur tube sec (sérum) est celui fait généralement en premier [11] sauf lorsqu'une d'hémoculture est prévue. Les préconisations de prélèvement sont donc les suivantes :

- prévenir le service qui devra prendre en charge le prélèvement (indiquer le nombre d'échantillons et le type de conditionnement désiré) (figure 2A) ;
- pour l'obtention de sérum, utiliser un tube sec sans activateur de coagulation et sans gel séparateur, dont la nature peut perturber les analyses protéomiques ultérieures. Pour le plasma, utiliser un tube EDTA de type « *Spray coated K₂EDTA* » (figure 2B) ;
- réaliser une ponction veineuse directe à l'aiguille : prescrire les prélèvements à partir d'un cathéter périphérique et éviter les prélèvements sur voie veineuse centrale ou chambre implantable chez les patients perfusés. Laisser les tubes se remplir, c'est-à-dire patienter 2 secondes après que l'écoulement de sang dans le tube ne soit plus visible. Le garrot doit être à plus de 10 cm du point de ponction, posé moins de 3 minutes et avec une pression inférieure ou égale à 70 mmHg.

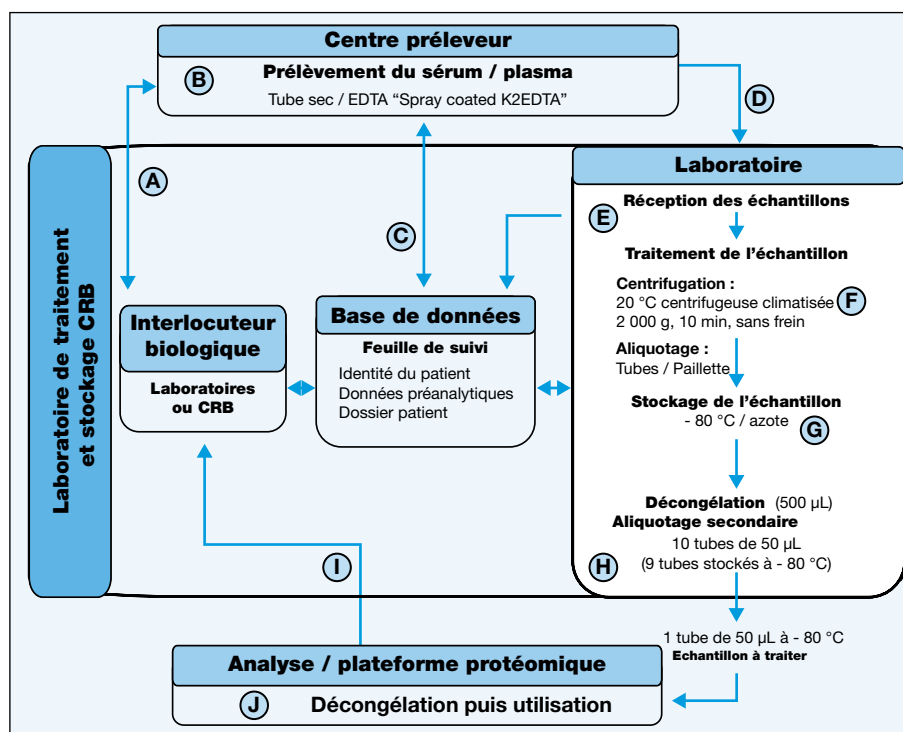


Figure 2. Circulation de l'information et des échantillons sanguins dans un programme d'analyse protéomique clinique. Les lettres (A, B, C...) réfèrent à la description des différentes phases préanalytiques dans le texte.

Parmi les informations biologiques qui peuvent s'avérer utiles pour l'utilisation ultérieure des échantillons dans une analyse protéomique, nous citerons sans être exhaustif : la concentration totale des protéines, de l'albumine, de la protéine C réactive (CRP) (dosage non ultrasensible ou équivalent pour détecter une réaction inflammatoire aiguë ou subaiguë), des immunoglobulines. Une fraction aliquote pourra être réservée pour ces dosages dès cette phase de prise en charge de l'échantillon par le laboratoire. Centrifuger les tubes dans une centrifugeuse climatisée à 20 °C à 2 000 g, 10 minutes, sans frein lors de la décélération de la centrifugeuse (*figure 1F*). Une deuxième centrifugation similaire pourra être prévue.

Cette étape de centrifugation crée classiquement deux fractions (culot et surnageant) dont le contenu va dépendre de la force, la durée et la température de centrifugation. Selon leurs coefficients de sédimentation respectifs, les cellules, fragments membranaires, débris et agrégats protéiques seront concentrés dans le culot ou maintenus en suspension. Cette étape a également pour conséquence la libération de différents composés cellulaires à partir des plaquettes, lymphocytes, globules rouges, en particulier si la procédure (centrifugation trop rapide) favorise l'éclatement des cellules.

Fractionner le sérum ou le plasma par unités de 500 µL en tube en polypropylène ou en paillettes ou cryotubes appropriées. Numéroter les tubes (code barres, étiquettes résistant à la congélation...) selon le protocole en vigueur (code, anonymisation...). Le tube de stockage utilisé doit être le même tout au long de l'étude.

Stockage et utilisation

Congeler l'ensemble des fractions à - 80 °C directement, ou si possible mettre l'ensemble des paillettes/tube à 4 °C avant la mise en congélation (maximum une heure) en vapeur d'azote (*figure 2G*). La conservation optimale pour assurer une bonne stabilité est en effet aujourd'hui pour le sang la conservation en azote liquide en système clos. La congélation en azote en évitant l'échange entre l'air et l'échantillon (paillettes...) est optimale, alors qu'il existe un risque de dérive des échantillons à - 80 °C au-delà de 18 mois.

Ces échantillons sont les échantillons « mères » de grand volume pour une conservation à long terme. A l'opposé des tubes « fils » de faible volume (50 µL) sont à constituer à l'issue de la première décongélation et devront être utilisés rapidement (*figure 2H*). La conservation de ces tubes secondaires sera en effet de courte durée (inférieure à 24 mois) et ils seront préférentiellement utilisés pour l'étape d'identification des biomarqueurs. Un échantillon ne doit pas subir plus de deux cycles de décongélation-congélation entre le prélèvement et l'analyse.

L'utilisation des échantillons fait suite à une demande du laboratoire/d'analyse protéomique à l'interlocuteur responsable de la collection (CRB...) (*figure 2I*). Elle comprend la décongélation rapide des échantillons (*figure 2J*) toujours selon la même méthode (4 °C, 20 °C ou 37 °C), puis l'homogénéisation de l'échantillon toujours selon la même méthode (agitation douce par retournement, agitation mécanique, traitement par les ultrasons...).

La procédure de prélèvement décrite dans ces recommandations est conforme à celle proposée pour la plupart des analyses biologiques possibles sur du sérum ou du plasma qui sont réalisées avant tout fractionnement ou congélation. Ces dernières étapes ont en effet des conséquences notables sur la possibilité de réaliser un certain nombre d'examen biologiques.

Échantillon urinaire

L'urine est un fluide biologique produit par les reins en continu, stocké dans la vessie et éliminé périodiquement par l'urètre lors des mictions. L'examen des urines permet classiquement le diagnostic d'infection urinaire, mais également des maladies rénales et métaboliques. En cancérologie, l'examen cytologique des urines permet le suivi des patients atteints de tumeur de vessie, mais ce test manque de sensibilité. D'autres tests basés sur des techniques de PCR ou de RT-PCR à partir des cellules présentes dans l'urine ont également été proposés, soulignant l'intérêt diagnostique de l'étude des urines. Le contenu protéique de l'urine est très faible à l'état normal, et dérive principalement des protéines plasmatiques de bas poids moléculaire (filtrées par les glomérules et non réabsorbées par les segments tubulaires), des cellules épithéliales rénales ou urothéliales exfoliées, ou des exosomes sécrétés par les cellules du tractus urinaire. En pathologie, les variations qualitatives et quantitatives des composants protéiques de l'urine sont susceptibles de refléter les fonctions des organes uro-génitaux (reins, voies excrétrices supérieures, vessie, prostate), et plus généralement de l'organisme. Les échantillons urinaires, qui sont facilement accessibles, constituent ainsi des substrats de choix pour la recherche de biomarqueurs en protéomique clinique [12], tout comme en métabolomique.

Ces recommandations sont destinées à améliorer la standardisation des étapes de recueil, de conditionnement et de stockage des prélèvements pour l'ensemble des projets de recherche de biomarqueurs urinaires basés sur des approches protéomiques. En dehors des spécificités liées à certains protocoles, ces recommandations doivent permettre la constitution de collections multicentriques d'échantillons d'urines pouvant faire l'objet d'analyses protéomiques communes. Il faut noter que plusieurs

points concernant la prise en charge préanalytique des échantillons urinaires restent en discussion, les études en cours devant permettre de proposer des protocoles optimisés [13]. Dans tous les cas, les étapes préanalytiques doivent faire l'objet d'une saisie sur une fiche liée à l'échantillon (figure 5).

Conditions de prélèvement

Compte tenu des variations nyctémérales, il convient dans le cadre d'une étude de n'inclure qu'un seul type d'échantillon parmi les suivants :

- une miction isolée : première miction du matin (correspondant aux urines de la nuit), deuxième miction du matin (après élimination des urines de la nuit), ou miction au hasard au cours de la journée ;
- un recueil des urines sur 12 heures ou sur 24 heures (en contrôlant la croissance bactérienne).

Le volume recueilli doit être au mieux de 100 à 200 mL. Comme pour tout recueil d'urine, le prélèvement doit se faire après une toilette du méat urétral, en utilisant une compresse ou une serviette antiseptique. Le récipient doit être étiqueté, de la même façon que la feuille de suivi. Le reste de la miction est éliminé normalement. Le recueil sur 24 heures doit être réservé à des protocoles spécifiques nécessitant de grands volumes, pour des fractionnements multiples cherchant à mettre en évidence des peptides et/ou protéines de faible abondance. La température de conservation des urines pendant la collecte (ambiante ou 4 °C) doit être notée. Des conditions particulières de prélèvement peuvent exister, comme dans le cadre de travaux intéressant la pathologie prostatique où, après massage prostatique, seuls, les 20 mL initiaux de la miction sont généralement recueillis.

Le récipient de recueil doit être stérile, spécifiquement adapté au recueil des urines (contenant large, d'au moins 100 mL, avec bouchon vissant). Des études sont en cours pour déterminer la nature du récipient idéal (polypropylène ou autre). En règle générale, il convient d'utiliser un récipient sec. Spécifiquement, certains protocoles d'études peuvent nécessiter l'ajout d'inhibiteur(s) de protéases compatibles avec des études en spectrométrie de masse [14]. Ceci doit alors se faire de façon standardisée, avec des fractions aliquotes de(s) l'inhibiteur(s) prêtes à l'emploi ; le type d'inhibiteurs de protéases doit être consigné sur la feuille de suivi.

Transport au laboratoire

L'échantillon doit être transféré au laboratoire de façon à ce que la congélation puisse avoir lieu au plus tard 4 heures après le recueil. Dans l'intervalle, la température à laquelle l'échantillon doit être conservé reste en discussion : température ambiante ou 4 °C/glace fondante.

Traitement au laboratoire

Noter l'heure d'arrivée de l'échantillon sur la feuille de suivi et calculer le temps passé entre recueil et traitement. Vérifier si tous les *items* de la feuille de suivi (figure 5) ont été complétés ; le cas échéant joindre le service préleveur pour compléter les informations manquantes.

Un contrôle simple à la bandelette urinaire doit être effectué, pour recherche de leucocyturie, hématurie, protéinurie, glycosurie. Le résultat est noté sur la feuille de suivi. Vérifier qu'une fraction aliquote d'urine a bien été fournie pour la détermination de la protéinurie et de la créatininurie, qu'on pourra utiliser pour normaliser la dilution des urines. Faire également réaliser un examen cytologique urinaire par cytocentrifugation.

Transférer les urines dans des tubes secs de 50 mL à fond conique en polypropylène (pour faciliter l'élimination des

LABORATOIRE...	<i>Etiquette</i>
ETUDE.....	
Urine : feuille de suivi	
Service Clinique	
Prélèvement : Date : <input type="text"/> / <input type="text"/> /20 <input type="text"/> Heure : <input type="text"/>	
Urine de <input type="checkbox"/> 24H, <input type="checkbox"/> 24H00, 1 ^{ère} <input type="checkbox"/> ou 2 ^{ème} <input type="checkbox"/> miction matinale, miction aléatoire <input type="checkbox"/>	
Inhibiteurs de protéases : Non <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> si oui, lequel <input type="text"/>	
Aspect de l'urine : Clair <input type="checkbox"/> Trouble <input type="checkbox"/> Sanglant <input type="checkbox"/> Purulent <input type="checkbox"/>	
Envoi au laboratoire à température ambiante <input type="checkbox"/> ou sur GLACE <input type="checkbox"/>	
Attente avant transport : Non <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> durée <input type="text"/> h <input type="text"/> min sur glace <input type="checkbox"/> à 4°C (frigo) <input type="checkbox"/> à TA <input type="checkbox"/>	
Laboratoire	
Arrivée au laboratoire : sur glace <input type="checkbox"/> à 4°C <input type="checkbox"/> à TA <input type="checkbox"/>	
Date : <input type="text"/> / <input type="text"/> /20 <input type="text"/> Heure : <input type="text"/> h Temps entre prélèvement et traitement : <input type="text"/> h <input type="text"/> min	
Traitement au laboratoire	
Attente avant traitement : Non <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> sur glace <input type="checkbox"/> à 4°C <input type="checkbox"/> à TA <input type="checkbox"/>	
Centrifugation : Date : <input type="text"/> / <input type="text"/> /20 <input type="text"/> Heure : <input type="text"/>	
<input type="text"/> minutes à <input type="text"/> g à 4°C <input type="checkbox"/> à TA <input type="checkbox"/> Frein : non <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/>	
si 2 ^{ème} centrifugation : <input type="text"/> minutes à <input type="text"/> g à 4°C <input type="checkbox"/> à TA <input type="checkbox"/> Frein : non <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/>	
Si culot visible après centrifugation : aspect hématique ? <input type="checkbox"/> cellulaire ? <input type="checkbox"/>	
Aspect après centrifugation : Clair <input type="checkbox"/> Hémolysé <input type="checkbox"/> Trouble <input type="checkbox"/>	
Conservation : à -80°C <input type="checkbox"/> -20°C <input type="checkbox"/> Autre/Temporaire : <input type="text"/>	
<input type="text"/> tubes de <input type="text"/> mL <input type="text"/> tubes de <input type="text"/> mL <input type="text"/> tubes de <input type="text"/> mL	
Données biologiques de l'urine : BU (+) : leuco <input type="checkbox"/> GR <input type="checkbox"/> nitrites <input type="checkbox"/> glucose <input type="checkbox"/> protéines <input type="checkbox"/>	
Protéinurie : <input type="text"/> g/L Créatininurie : <input type="text"/> mmol/L	
Cytologie : cellules tumorales / atypiques oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> liquide inflammatoire oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/>	
Remarques :	
.....	
.....	

Figure 5. Exemple de fiche de suivi applicable aux échantillons d'urine prélevés pour analyse protéomique.

débris cellulaires). Centrifuger 10 minutes à 2 000 g, à température ambiante ou 4 °C sans frein lors de la décélération de la centrifugeuse. Le culot est éliminé ou conservé en fonction des spécificités de l'étude. Noter sur la feuille de suivi les conditions de centrifugation en reportant bien la vitesse de centrifugation (en g et non en rotation par minute (rpm)).

Noter l'aspect de l'urine après la centrifugation (*figure 5*). Le culot peut être conservé pour étude ultérieure éventuelle, par exemple de l'ADN par technique PCR.

Fractionner en tubes en polypropylène de 5 mL. Numéroter les tubes (code barres, étiquettes résistant à la congélation...) selon le protocole en vigueur (code, anonymisation...). Le tube de stockage utilisé doit être le même tout au long de l'étude.

Une deuxième centrifugation à grande vitesse (14 000–20 000 g, 10 minutes à 4 °C ou température ambiante) peut être envisagée afin d'éliminer des débris cellulaires éventuellement présents, ceci en fonction des possibilités du laboratoire et des techniques d'analyse protéomique utilisées pour les échantillons. Cette deuxième centrifugation nécessite un transfert du surnageant dans un nouveau tube avant stockage.

En cas d'impossibilité de centrifuger sur place, l'échantillon peut être congelé directement. La centrifugation sera réalisée ultérieurement dans le laboratoire d'analyse. Les informations relatives à cette étape doivent être notées sur la feuille de suivi de l'échantillon.

Stockage et utilisation

Congélation et conservation immédiate à - 80 °C. Les volumes utiles en protéomique urinaire rendent la congélation et le stockage en azote liquide peu pratiques. Éviter toute conservation temporaire à - 20 °C. Si elle est néanmoins inévitable, l'indiquer sur la feuille de suivi avec sa durée.

Décongélation toujours selon le même protocole. Afin de standardiser cette étape une décongélation dans la glace fondante 15 minutes est conseillée.

Agitation brève par Vortex®, puis centrifugation 5 minutes à 1 000 g, avant d'utiliser ou de répartir l'urine dans des tubes secondaires.

Liquide céphalorachidien

Le liquide céphalorachidien (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 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 le diagnostic d'urgence de méningite mais il est aussi utilisé pour celui d'autres affections du système nerveux central : méningo-encéphalite, tumeur, maladie neurodégénérative... En cancérologie, l'étude du LCR est réalisée dans de nombreuses explorations de cancer primitif (lymphome, 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 (protéinorachie, glycorachie) manque de spécificité. Le LCR est ainsi un liquide de choix pour la recherche de nouveaux biomarqueurs protéomiques [15].

Conditions de prélèvement

Le prélèvement du LCR se fait classiquement par ponction lombaire lors d'une hospitalisation, généralement en fin de matinée, sous contrôle médical. Ce document ne détaille pas cette procédure (se référer à des documents médicaux spécialisés). Il s'agit d'un geste plus invasif qu'une simple prise de sang et qui a des contre-indications précises (trouble de l'hémostase, hypertension intracrânienne avec signes focaux ou imagerie montrant une lésion expansive). Dans certains cas, en particulier chez le sujet jeune, des céphalées post-ponction lombaire peuvent survenir, dont la fréquence peut être diminuée par l'utilisation d'aiguilles de petit diamètre avec un orifice latéral (type Whitacre®). Pour le prélèvement, les recommandations suivantes peuvent être faites :

- prélever le volume nécessaire (dans les tubes adéquats en fonction des pratiques cliniques locales) pour les explorations cliniques (biochimie, bactériologie-cytologie...). Il est généralement déconseillé d'utiliser les trois premières gouttes provenant de la ponction lombaire, afin de minimiser la contamination sanguine du LCR. En tout état de cause, il convient de ne pas utiliser ces gouttes pour l'analyse protéomique ;

- pour l'analyse protéomique, prélever au moins 3 mL (~30 gouttes) qui doivent être collectés directement à partir de l'aiguille de ponction dans un tube en polypropylène. Il semble préférable d'utiliser des tubes en polypropylène à fond conique (type tube 15 mL avec bouchon à vis) afin de faciliter la séparation du culot et du surnageant lors de la centrifugation. Un transvasement même rapide suite à un prélèvement dans un tube d'une autre nature risque de modifier significativement les analyses

ultérieures. Ce point est particulièrement important : en effet, l'adsorption de peptides [16], tels que le peptide amyloïde utile pour le diagnostic des démences [17] au verre ou au plastique apparaît importante, probablement en raison de la faible concentration protéique du LCR, et perturbe notablement l'analyse protéomique ;
 – placer l'échantillon de LCR à +4 °C en attente du transport et reporter toutes les informations préanalytiques (caractère traumatique de la ponction, aspect du liquide...) sur la feuille de suivi de l'échantillon (figure 6).

Transport au laboratoire

Transmettre l'échantillon au laboratoire le plus rapidement possible, de préférence à 4 °C (bloc réfrigérant ou sac de glace fondante) afin de minimiser l'activité des protéases et une éventuelle prolifération bactérienne. Noter cette information sur la feuille de suivi. Le temps maximal entre prélèvement et traitement au laboratoire doit être de 4 heures.

LABORATOIRE...	<i>Etiquette</i>
ETUDE.....	
LCR : feuille de suivi	
Service Clinique	
Prélèvement : Date : / / 20 Heure :	
Type d'aiguille pour la ponction lombaire : Ponction lombaire (PL) traumatique : <input type="checkbox"/> Autre remarque sur la PL :	
Aspect du LCR : Clair <input type="checkbox"/> Trouble <input type="checkbox"/> Sanglant <input type="checkbox"/> Purulent <input type="checkbox"/>	
Envoi au laboratoire sur GLACE <input type="checkbox"/>	
Attente avant transport : Non <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> durée : h min à 4°C <input type="checkbox"/> à TA <input type="checkbox"/>	
Laboratoire	
Arrivée au laboratoire : sur glace <input type="checkbox"/> à 4°C <input type="checkbox"/> à TA <input type="checkbox"/> Date : / / 20 Heure :	
Traitement au laboratoire	
Attente avant traitement : Non <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> sur glace <input type="checkbox"/> à 4°C <input type="checkbox"/> à TA <input type="checkbox"/>	
Centrifugation : Date : / / 20 Heure :	
minutes à g à 4°C <input type="checkbox"/> à TA <input type="checkbox"/> Frein : non <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/>	
si 2 ^{ème} centrifugation : minutes à g à 4°C <input type="checkbox"/> à TA <input type="checkbox"/> Frein : non <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/>	
Si culot visible après centrifugation : aspect hématique ? <input type="checkbox"/> leucocytaire ? <input type="checkbox"/>	
Aspect après centrifugation : Clair <input type="checkbox"/> Hémolysé <input type="checkbox"/> Trouble <input type="checkbox"/> Xanthochromique <input type="checkbox"/>	
Conservation : à -80°C <input type="checkbox"/> -20°C <input type="checkbox"/> Autre/Temporaire :	
tubes de µL tubes de µL tubes de µL	
Données biologiques du LCR	
Protéinorachie : g/L Autre :	
Cytologie : présence de GR : non <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> si cytologie faite : GR/mm ³ GR/mm ³	
Remarques :	
.....	
.....	

Figure 6. Exemple de fiche de suivi applicable aux échantillons de liquide céphalorachidien prélevés pour analyse protéomique.

Traitement au laboratoire

Noter l'heure d'arrivée de l'échantillon 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 ; le cas échéant joindre le service préleveur pour compléter les informations manquantes.

Vérifier qu'une fraction aliquote de LCR a bien été fournie pour mesurer la protéinorachie et effectuer l'examen cytologique. En effet, ces informations minimales sont nécessaires pour une première évaluation de la qualité et des caractéristiques de l'échantillon. Selon les programmes de recherche, l'analyse d'autres paramètres (électrophorèse des protéines, bêta-2 microglobuline, peptide amyloïde...) pourra être réalisée.

Centrifuger le LCR dans le tube original de prélèvement, 10 minutes à 1 000 g, à 4 °C, sans frein lors de la décélération de la centrifugeuse. En tout état de cause, noter sur la feuille de suivi les conditions de centrifugation en reportant bien la vitesse de centrifugation (en g et non en rpm).

Noter l'aspect du LCR après la centrifugation et la présence ou non d'un culot cellulaire (voir feuille de suivi). Rechercher avec attention la présence d'une hémolyse ou d'une xanthochromie, signes de contamination de l'échantillon par du sang. Éviter une centrifugation supérieure à 1 000 g qui risque de faire éclater les cellules éventuellement présentes.

Fractionner par 500 µL dans des tubes en polypropylène. Veiller à prélever le LCR sans remettre en suspension un culot éventuel (ne pas utiliser les derniers 50 µL de LCR du fond de tube car trop proche du culot).

Numéroter les tubes (code barres, étiquettes résistant à la congélation...) selon le protocole en vigueur (code, anonymisation...). Le tube de stockage utilisé doit être le même tout au long de l'étude. Un tube à faible absorption protéique en polypropylène de type Eppendorff[®] est conseillé pour le stockage.

Une deuxième centrifugation à grande vitesse (14 000–20 000 g, 10 minutes à 4 °C ou température ambiante) peut être envisagée afin d'éliminer des débris cellulaires éventuellement présents, ceci en fonction des possibilités du laboratoire et des techniques d'analyse protéomique utilisées pour les échantillons. Cette deuxième centrifugation nécessite un transfert du surnageant dans un nouveau tube avant stockage.

Stockage et utilisation

La conservation immédiate à - 80 °C est conseillée. Éviter toute conservation temporaire à - 20 °C qui semble altérer la composition protéique du LCR (comme cela a été

Plasma	Sérum	Urine	LCR
<p>Prélèvement</p> <p>Intraveineux par ponction veineuse directe. Inverser doucement le tube 8 fois</p>	<p>Intraveineux par ponction veineuse directe. Garder si possible en position verticale à 4 °C (environ 60 min.)</p>	<p>Inclure qu'un seul type d'échantillon (miction du matin, aléatoire, ou urines de 12 h ou de 24 h).</p>	<p>Prélever au moins 3 mL directement dans le tube. Ne pas prendre les 3 premières gouttes.</p>
<p>Utilisation d'un tube EDTA : "Spray coated K2EDTA"</p>	<p>Utilisation d'un tube sec sans activateur de la coagulation ni séparateur</p>	<p>Contenant stérile large, d'au moins 100 mL, avec bouchon vissant.</p>	<p>Tube en polypropylène (type conique 15 mL)</p>
<p>Transport à température ambiante, délais < 4 h.</p>	<p>Transport à température ambiante, délais < 4 h.</p>	<p>Transport à 4 °C ou à température ambiante, délais < 4 h.</p>	<p>Mettre à 4 °C et prévoir le transport à 4 °C au laboratoire, délais < 4 h.</p>
<p>Traitement</p> <p>Centrifuger le tube dans une centrifugeuse climatisée à 20 °C à 2 000 g, 10 min., sans frein.</p>	<p>Centrifuger le tube dans une centrifugeuse climatisée à 20 °C à 2 000 g, 10 min., sans frein.</p>	<p>Transfert sur tubes secs de 50 mL, à fond conique en polypropylène, centrifugation 10 min. à 2 000 g, à température ambiante ou 4 °C, sans frein</p>	<p>Centrifuger le LCR dans le tube original de prélèvement Centrifugation 10 minutes à 1 000 g, à 4 °C, sans frein</p>
<p>Stockage</p> <p>Aliquoter le plasma par 500 µL dans des tube en polypropylène ou des paillettes ou cryotubes appropriées.</p>	<p>Aliquoter le sérum par 500 µL dans tube en polypropylène ou des paillettes ou cryotubes appropriées.</p>	<p>Aliquoter en tubes de 5 mL en polypropylène.</p>	<p>Aliquoter par 500 µL dans des tubes en polypropylène, à faible adsorption protéique.</p>
<p>Congeler à - 80 °C directement, ou conserver à 4 °C avant la mise en congélation (maximum 1 h) en vapeur d'azote.</p>	<p>Congeler à - 80 °C directement, ou conserver à 4 °C avant la mise en congélation (maximum 1 h) en vapeur d'azote.</p>	<p>Congélation et conservation immédiate à - 80 °C préférable.</p>	<p>Conservation immédiate à - 80 °C ou dans l'azote. Eviter toute conservation temporaire à - 20 °C.</p>
<p>Utilisation</p> <p>Décongélation rapide (4 °C, 20 °C ou 37 °C) puis homogénéisation (sonication/vortex/retournement)</p>	<p>Décongélation rapide (4 °C, 20 °C ou 37 °C) puis homogénéisation (sonication/ vortex/ retournement)</p>	<p>Décongélation dans la glace fondante 15 min. Vortexer brièvement, centrifuger 5 min. à 1 000 g</p>	<p>Décongélation dans la glace fondante 15 min. Centrifuger 5 min. à 1 000 g</p>

Figure 7. Résumé synthétique des recommandations préanalytiques pour la collection d'échantillons sanguins, urinaires et du liquide céphalorachidien (LCR) dans la perspective de programme de recherche en protéomique clinique.

montré notamment pour la protéine Tau [17]). Si elle est néanmoins inévitable, l'indiquer sur la feuille de suivi en mentionnant sa durée.

Le cycle de décongélation-congélation pour utilisation ou fractionnement secondaire doit toujours respecter le même protocole dans une étude déterminée. Afin de standardiser cette étape, une décongélation dans la glace 15 minutes est conseillée.

Avant utilisation, afin de se débarrasser de débris éventuels, il est conseillé de centrifuger l'échantillon 5 minutes à 1 000 g après décongélation, avant d'utiliser ou de répartir le LCR dans des tubes secondaires.

La procédure de prélèvement et de traitement de l'échantillon décrite dans ces recommandations est conforme à celle proposée pour la plupart des analyses biologiques possibles sur du LCR. Elle est en particulier adaptée au dosage des marqueurs des démences.

Conclusion

L'identification de nouveaux biomarqueurs en protéomique clinique est conditionnée par la qualité et les performances des outils technologiques utilisés, mais également par la qualité biologique et clinique des échantillons et l'obtention d'une puissance statistique suffisante pour ces recherches multi-paramétriques. En effet, un grand nombre d'échantillons biologiques de qualité est indispensable, ce qui implique souvent la nécessité d'effectuer des recrutements multicentriques. Une problématique importante est donc de minimiser les risques de biais préanalytiques. Les procédures préanalytiques issues de ce travail et résumées dans la figure 7, visent justement à harmoniser les procédures pour le recueil de fluides biologiques. Cet effort de standardisation et d'harmonisation est important pour la constitution de banques d'échantillons de haute qualité dans le domaine de la protéomique

clinique. D'expérience, nous savons cependant que dans le cadre d'une collection, même réalisée en suivant des procédures bien établies, certains échantillons devront être exclus en raison de non-conformité. Il est très important de repérer ces échantillons grâce aux fiches de suivi (figures 3 à 6) et d'en tenir compte dans la sélection des échantillons pour les phases de recherche ou de validation. Dans l'avenir, il sera très utile de pouvoir disposer d'indicateurs de la qualité préanalytique des échantillons [18]. Certains marqueurs ont déjà été proposés [9, 18] ; ils devront démontrer leur intérêt en pratique quotidienne afin de faire partie des outils d'assurance qualité des procédures opératoires utilisées pour la collection des échantillons biologiques.

Remerciements. Les auteurs remercient l'INCa (Institut national du cancer) et la Société française de biologie clinique (SFBC) pour leur soutien dans la réalisation de ce travail.

Références

1. Lehmann S, Dupuy AM, Peoc'h K, Roche S, Baudin B, Quillard M, *et al.* Present possibilities and future development of clinical proteomics. *Ann Biol Clin (Paris)* 2007 ; 65 : 463-71.
2. Roche S, Tiers L, Provansal M, Seveno M, Piva MT, Jouin P, *et al.* Depletion of one, six, twelve or twenty major blood proteins before proteomic analysis : the more the better ? *J Proteomics* 2009 ; 72 : 945-51.
3. Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science* 2006 ; 312 : 212-7.
4. Banks RE. Preanalytical influences in clinical proteomic studies : raising awareness of fundamental issues in sample banking. *Clin Chem* 2008 ; 54 : 6-7.
5. Lippi G, Guidi GC, Mattiuzzi C, Plebani M. Preanalytical variability : the dark side of the moon in laboratory testing. *Clin Chem Lab Med* 2006 ; 44 : 358-65.
6. Rai AJ, Vitzthum F. Effects of preanalytical variables on peptide and protein measurements in human serum and plasma : implications for clinical proteomics. *Expert Rev Proteomics* 2006 ; 3 : 409-26.
7. Lambert D, Berrahmoune H, Herbeth B, Siest G, Visvikis-Siest S. Preanalytical variations of proteic biomarkers. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 9-12.
8. Henny J, Petitclerc C, Fuentes-Arderiu X, Petersen PH, Queraltó JM, Schiele F, *et al.* Revising the concept of reference values : a necessity. *Ann Biol Clin (Paris)* 2001 ; 59 : 383-92.
9. Banks RE, Stanley AJ, Cairns DA, Barrett JH, Clarke P, Thompson D, *et al.* Influences of blood sample processing on low-molecular-weight proteome identified by surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry. *Clin Chem* 2005 ; 51 : 1637-49.
10. Rai AJ, Gelfand CA, Haywood BC, Warunek DJ, Yi J, Schuchard MD, *et al.* HUPO plasma proteome project specimen collection and handling : towards the standardization of parameters for plasma proteome samples. *Proteomics* 2005 ; 5 : 3262-77.
11. National Committee on Clinical Laboratory Standards. *Document H3-A4*. Wayne, PA : Publication, 1998.
12. Decramer S, Gonzalez de Peredo A, Breuil B, Mischak H, Monsarrat B, Bascands JL, *et al.* Urine in clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2008 ; 7 : 1850-62.
13. Vlahou A, Schanstra J, Frokiaer J, El Nahas M, Spasovski G, Mischak H, *et al.* Establishment of a European network for urine and kidney proteomics. *J Proteomics* 2008 ; 71 : 490-2.
14. Quintana LF, Campistol JM, Alcolea MP, Banon-Maneus E, Sol-Gonzalez A, Cutillas PR. Application of label-free quantitative peptidomics for the identification of urinary biomarkers of kidney chronic allograft dysfunction. *Mol Cell Proteomics* 2009 ; 8 : 1658-73.
15. Roche S, Gabelle A, Lehmann S. Clinical proteomics of the cerebrospinal fluid : towards the discovery of new biomarkers. *Proteomics : Clinical application* 2008 ; 2 : 428-36.
16. Kraut A, Marcellin M, Adrait A, Kuhn L, Louwagie M, Kieffer-Jaquinod S, *et al.* Peptide storage : are you getting the best return on your investment ? Defining optimal storage conditions for proteomics samples. *J Proteome Res* 2009 ; 8 : 3778-85.
17. Gabelle A, Roche S, Lehmann S. CSF biomarkers : Proteomics investigations and clinical applications in neurodegenerative disorders. *Rev Neurol (Paris)* 2008 ; 165 : 213-22.
18. Betsou F, Roussel B, Guillaume N, Lefrere JJ. Long-term stability of coagulation variables : protein S as a biomarker for preanalytical storage-related variations in human plasma. *Thromb Haemost* 2009 ; 101 : 1172-5.