

Les biobanques pour les débutants

C Dubourg

B Turlin

14 octobre 2010 – CHU de Rennes



Définition

- **Collection d'échantillons biologiques humains**

Réunion, à des fins scientifiques, de prélèvements biologiques effectués sur un groupe de personnes identifiées et sélectionnées en fonction des caractéristiques cliniques ou biologiques d'un ou plusieurs membres du groupe, ainsi que des dérivés de ces prélèvements

Article L. 1243-3 du code de la santé publique

Rôles des CRB

- **Activités**
 - **Prélever**
 - **Préparer**
 - **Stocker**
 - **Distribuer**

Définitions

- **Prélèvement**
 - Acte de prélever
 - Matériel résultant de cet acte

- **Préparation**
 - Transformer un prélèvement en fonction de :
 - l'utilisation prévue
 - le type de prélèvement
 - Échantillon = aliquote

Définitions

- **Stockage**
 - **Conservation des échantillons permettant de garder leurs propriétés**
 - par le froid
 - lyophilisation
 - etc...
- **Distribution**
 - **A visée sanitaire**
 - **A visée de recherche**

Définitions

- **Consentement**
 - **Document signé par le patient**
 - **Utilisation des ressources biologiques**
 - décrite dans le document
 - **Recherches académiques ou industrielles**
 - **Cas de la génétique constitutionnelle** (caractérisation de l'individu)
 - consentement spécifique nécessaire
 - précis sur l'objet de la recherche

Instances

[AFSSAPS](#) : Agence Française de Sécurité SANitaire des Produits de Santé

[ARS](#) : Agence Régionale de Santé

[CCTIRS](#) : Comité Consultatif sur le Traitement de l'Information en matière de Recherche dans le domaine de la Santé

[CNIL](#) : Commission Nationale de l'Informatique et Libertés

[CPP](#) : Comité de Protection des Personnes

ADN

C Dubourg

Tissus et liquides

B Turlin

Circuit « normal »



- **Prélèvement de tissu**
 - au bloc opératoire
 - par le chirurgien

Circuit « normal »



- **Transfert**
 - **personnel du bloc**
 - **en anatomie pathologique**
 - **limites**
 - **délai non contrôlé**

Circuit « normal »



- **Anatomie pathologique**
 - enregistrement
 - prise en charge par le médecin
 - limite
 - délai non contrôlé

Circuit « CRB »



- **Prélèvement de tissu**
 - au bloc opératoire
 - par le chirurgien

Circuit « CRB »



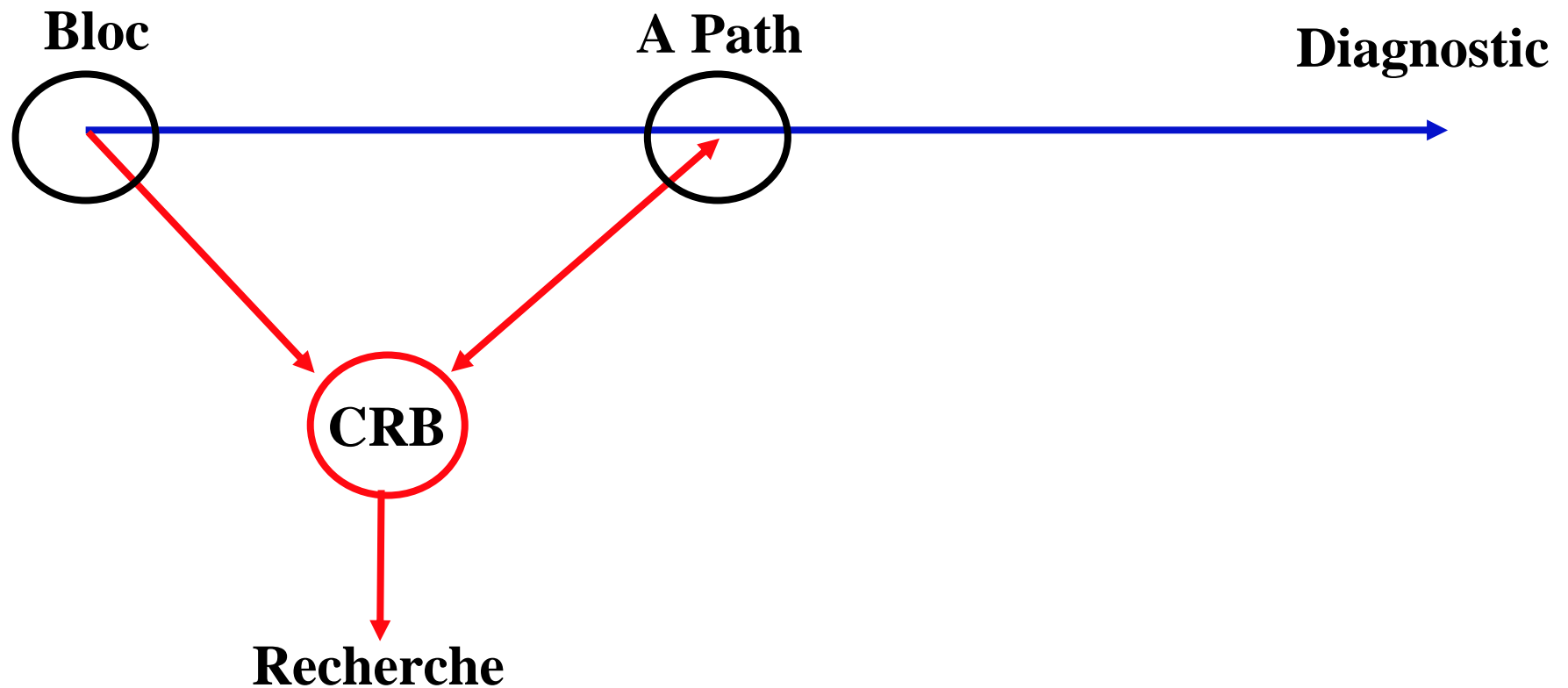
- **Appel**
 - par le bloc opératoire du technicien CRB
- **Intérêt**
 - limite et contrôle le délai
 - améliore la qualité

Circuit « CRB »

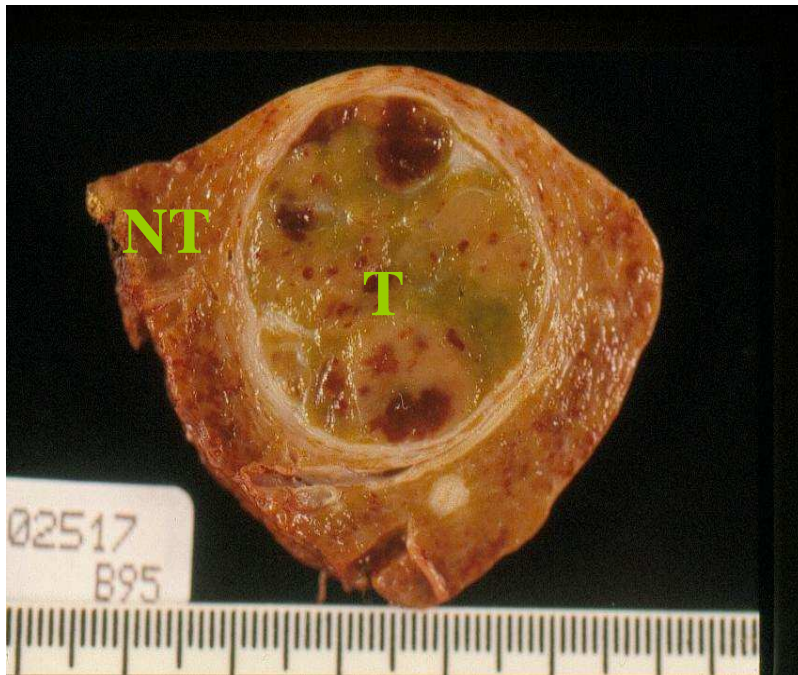


- **CRB**
 - prise en charge par le technicien
- **A pathologique**
 - enregistrement

Circuits



Préparation



- **Médecin AP**
 - **transmet tissu**
 - **tumoral**
 - **non tumoral**
 - **limite**
 - **diagnostic AP**

Congélation



- **Congélateur**
 - - 20° C
 - - 80° C
 - - 140° C
- **Azote liquide**
 - en vapeur
 - dans l'azote

Conditionnement



- **Cryotubes**
 - **identification**
 - étiquette
 - cryo marqueur
 - **éléments**
 - identité : code
 - visite ou date
 - caractéristiques
 - T ou NT

Prélèvement : liquide

- Sang
- Urine
- Etc...



Prélèvement



nu102007 www.fotosearch.com

- **Prélèvement**
 - par l'infirmière
- **Tubes**
 - « sec »
 - anticoagulant
 - citrate
 - EDTA
 - héparine

Transfert



- **Rapidité**
 - protocole
 - utilisation
- **Condition**
 - t° ambiante
 - sur glace
- **Moyens**
 - coursier
 - pneumatique

Préparation



- **Décantation**
(coagulation)
- **Centrifugation**
- **Aliquotage**

Préparation



- **Sérum**
 - après coagulation
- **Plasma**
 - sans coagulation
 - anti coagulant
 - EDTA
 - citrate
- **Culot de globules blancs**

Conditionnement



- **Cryotubes**
 - **identification**
 - **étiquette**
 - **cryo marqueur**
 - **éléments**
 - **identité : code**
 - **visite**

Stockage



- **Surveillance**
 - Océasoft
- **Alarmes**
 - procédure
 - congélateur de secours
- **Organisation**
 - duplication
 - prévision sorties

Démarche qualité



- **Norme**
 - ISO 9001
 - AFNOR NF S96-900
- **Implication**
 - tout le personnel
 - qualicien

Enregistrement



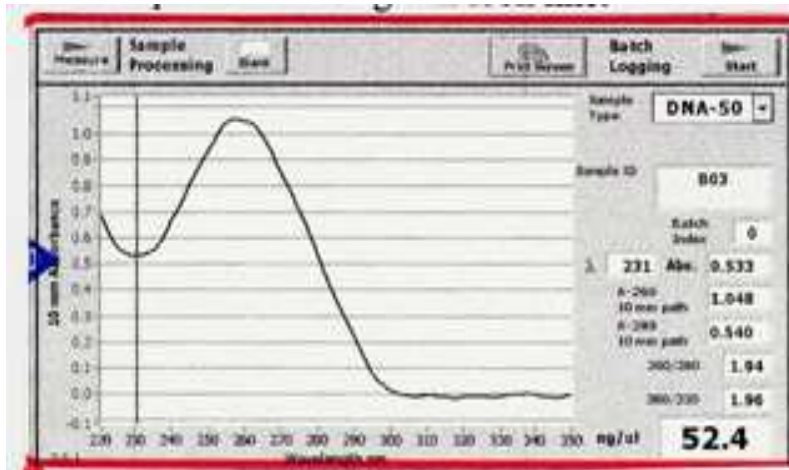
- **Logiciel**
 - HC CRB
- **Données**
 - patient
 - ressources
 - traçabilité

Distribution



- **Chercheur**
 - académique
 - industriel
- **Méthodes**
 - transporteur
 - risque biologique
 - catégorie b

Retour d'information



- **Données « qualité »**
 - qualité des extraits
 - ADN
 - ARN
 - protéines
- **Données scientifiques**
 - résultat des analyses

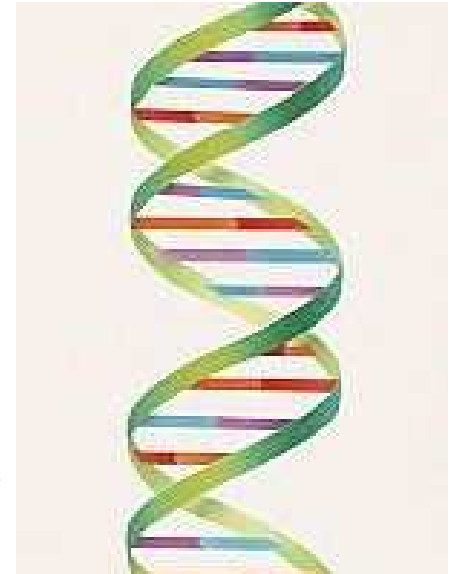
Au revoir !



- **CRB Santé de Rennes**
 - **Site A Pathologique**
 - B Turlin
 - **Site Hématologie**
 - C Pangault
 - **Site G Moléculaire**
 - V David
 - **Site B Cellulaire**
 - V Catros
 - **Site CRLCC**
 - F Godey

Conditions techniques des prélèvements biologiques à visée génétique

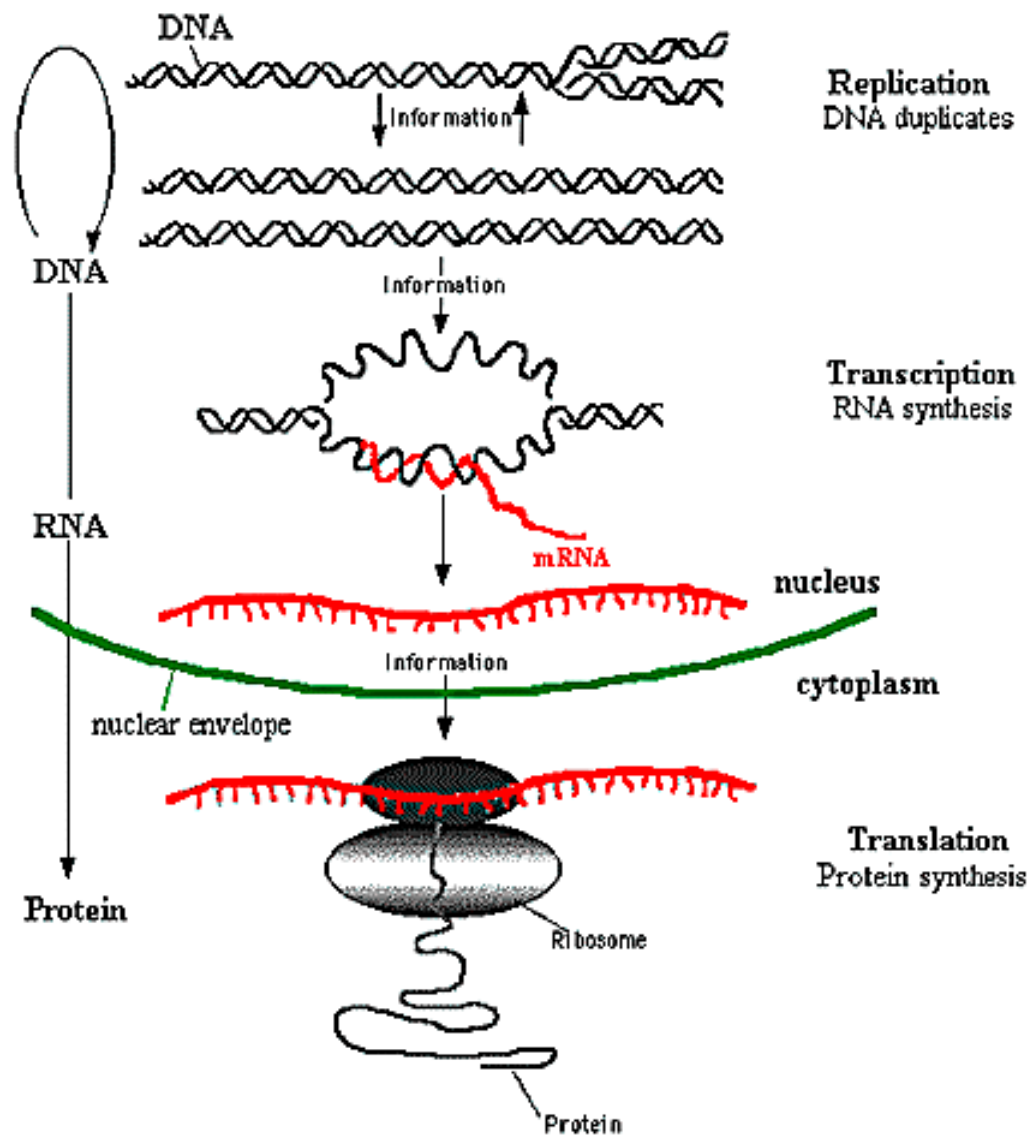
**14 octobre 2010 - Dr Christèle DUBOURG, Laboratoire de Génétique
Moléculaire, CHU de Rennes**



ADN :
Contenu
génomique

Expression au
niveau de
l'**ARN**

Expression au
niveau de la
protéine



The Central Dogma of Molecular Biology

Prélèvement de **sang veineux**



- Pas de préparation particulière du patient
- Consentement pour étude génétique

Prélèvement sur quel type de tube ?



Tube hépariné (bouchon vert) :
mise en lignée lymphoblastoïde
(5 ml)



Tube PAXgene blood RNA :
extraction ARN
(2,5 ml)

Tube EDTA (bouchon violet) :
extraction ADN
(2 x 5 ml)

Prélèvement sur papier buvard



Papier Buvard FTA® Whatman®: le seul papier buvard accrédité

Procédure de prélèvement sur tube PAXgene blood RNA

- Additif qui stabilise le profil de transcription de gènes in vivo en réduisant la dégradation d'ARN in vitro et en minimisant l'induction de gènes.
- Conçu pour la purification de l'ARN intracellulaire du sang humain total (leucocytes < 11 G/L).
- Conserver les tubes PAXgene blood RNA non utilisés à température ambiante (18 à 25°C).
- Remplissage insuffisant du tube \Rightarrow ratio sang/additif incorrect \Rightarrow performances du produit altérées, résultats d'analyse faussés
- Maintenir le tube à la verticale, au-dessous du bras du donneur
- Une fois le prélèvement effectué, inverser doucement le tube 8 à 10 fois.
- Placer le tube à la verticale et à température ambiante pdt 2 heures min avant mise au congélateur.
Stable à température ambiante durant 3 jours.



Acheminement, conservation (tubes héparinés, tubes EDTA)

Acheminement à température ambiante

- Tubes sur héparine pour mise en lignée lymphoblastoïde:

laisser à température ambiante jusqu'à traitement

- Tubes EDTA pour extraction d'ADN :

Conservation < 3 jours à 4°C pour un rendement optimal de qualité suffisante

Congélation possible mais qualité de l'ADN moins bonne et rendement inférieur

(OK pour de la recherche qualitative de mutations, non recommandé pour les études quantitatives ou les puces à ADN)

Extraction de l'ADN

A partir des leucocytes du sang circulant

- Manuelle

ou

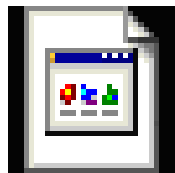
- Automatisée

- Méthode de référence : phénol/chloroforme
- De plus en plus, à l'aide de kits (QIAGEN®, MACHEREY-NAGEL®)



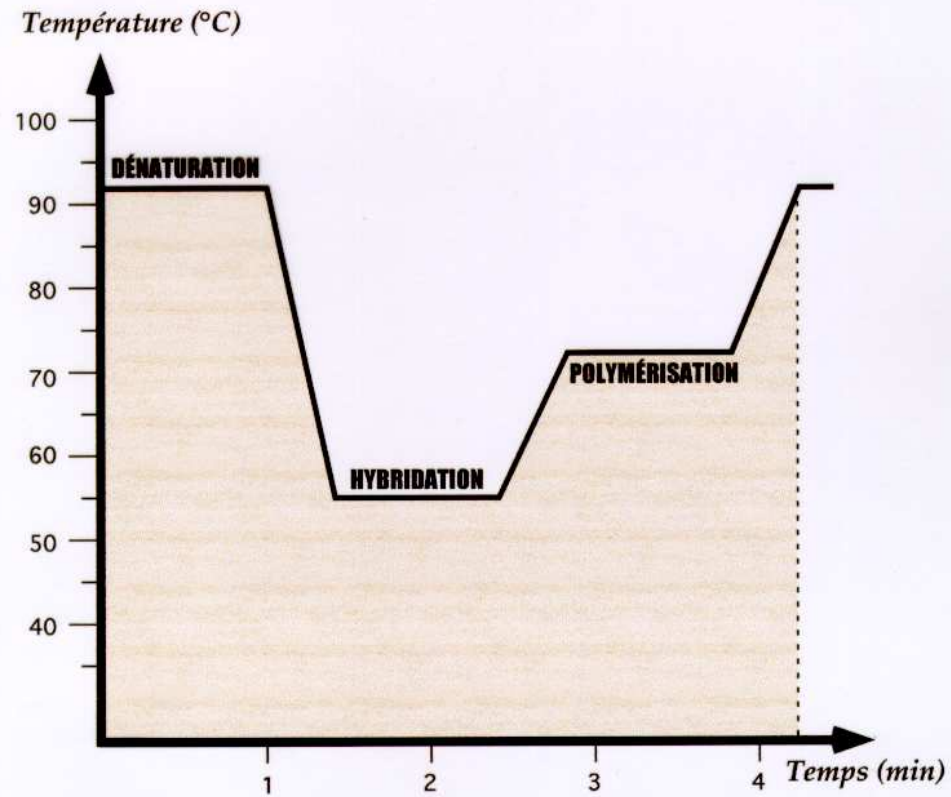
PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Amplification des acides nucléiques



Pcr.exe

Le Cycle de la réaction de PCR



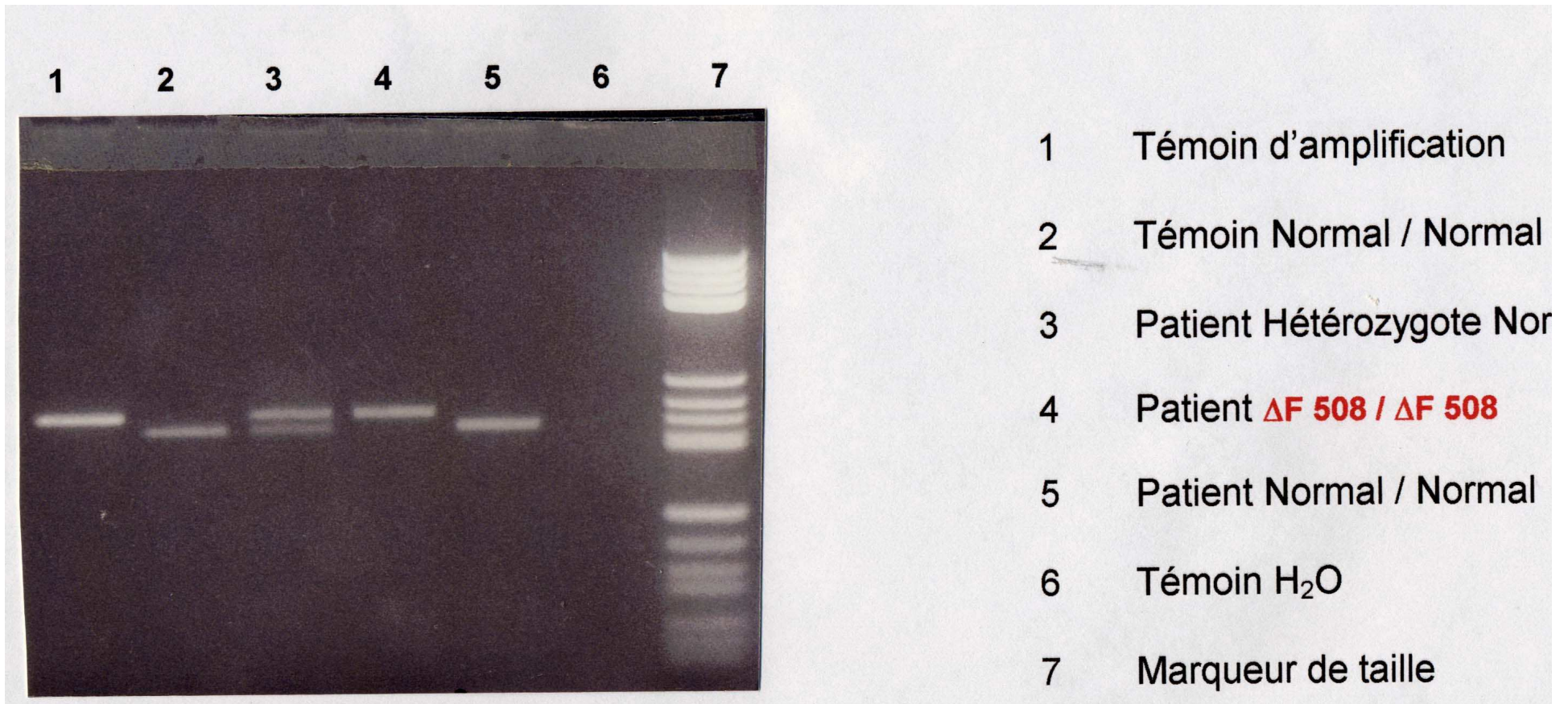
PCR : Problèmes de contamination

- Donne des **faux positifs**.
- Dû à la **sensibilité +++** de la technique ($\times 10^6$)
- **Contamination par aérosols** de produits PCR
Après amplification : 200 copies/pL or 1 aérosol = 1 pL
- Nécessité de **contrôle négatif** (sans ADN cible)
- **Organisation du laboratoire** (pièces pré-PCR, PCR, post-PCR)
avec matériel dédié et circulation mono-directionnelle

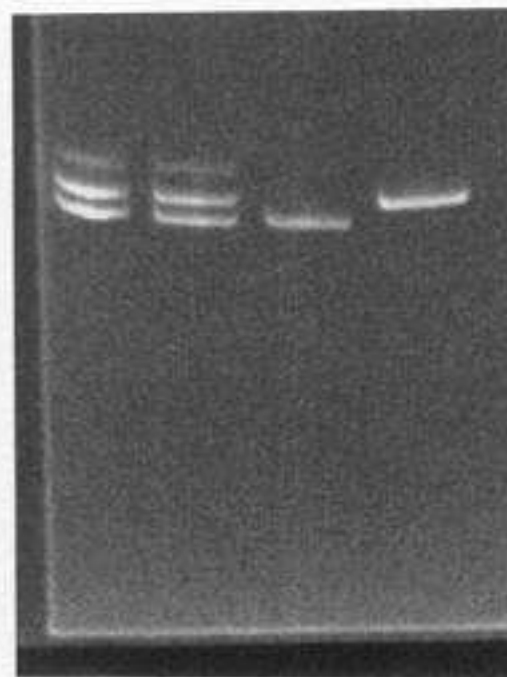
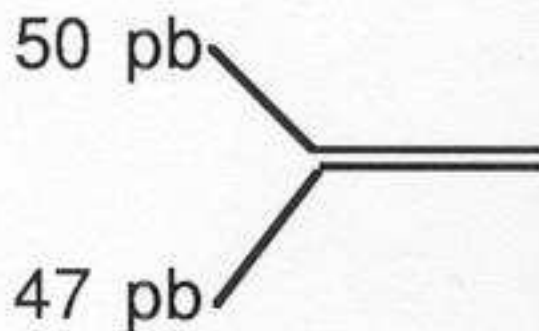
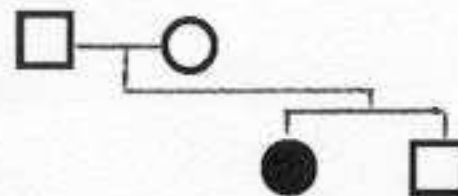
PCR : Problème de la présence d'inhibiteurs

- Donne des **faux négatifs**.
- Certains sont connus (hème, DMSO, héparine, SDS, colorants, phénols...).
- D'autres inconnus (dans LCR, urines)
- Nécessité de **contrôle positif** ajouté dans l'échantillon (autre cible ou même cible modifiée)
- Pour lever l'inhibition :
 - * Diluer l'échantillon
 - * Purifier l'ADN

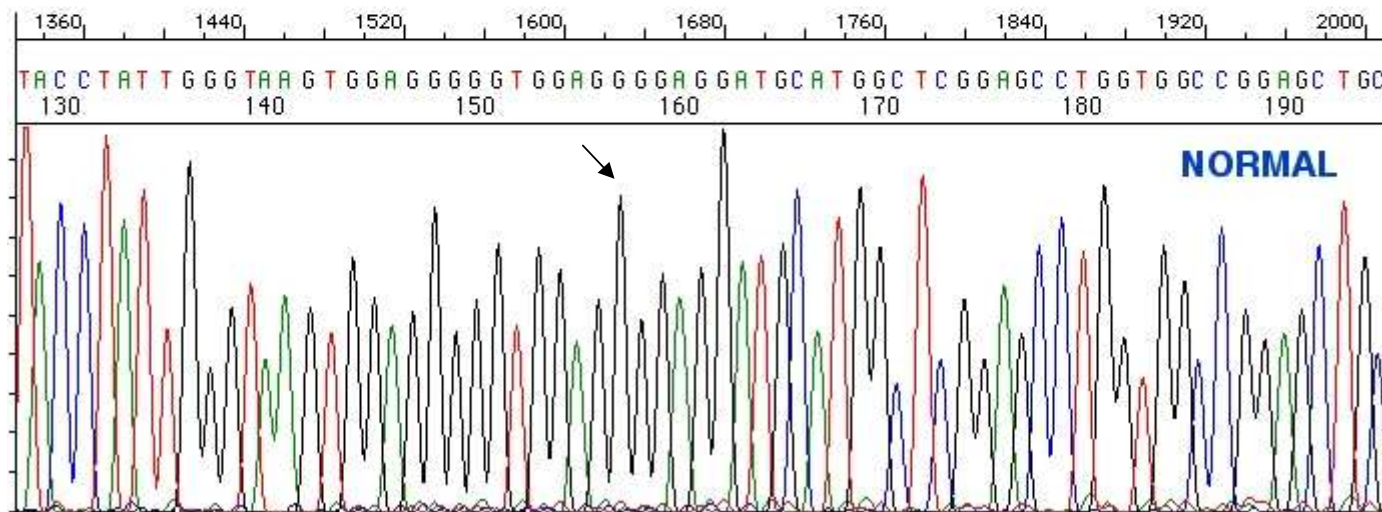
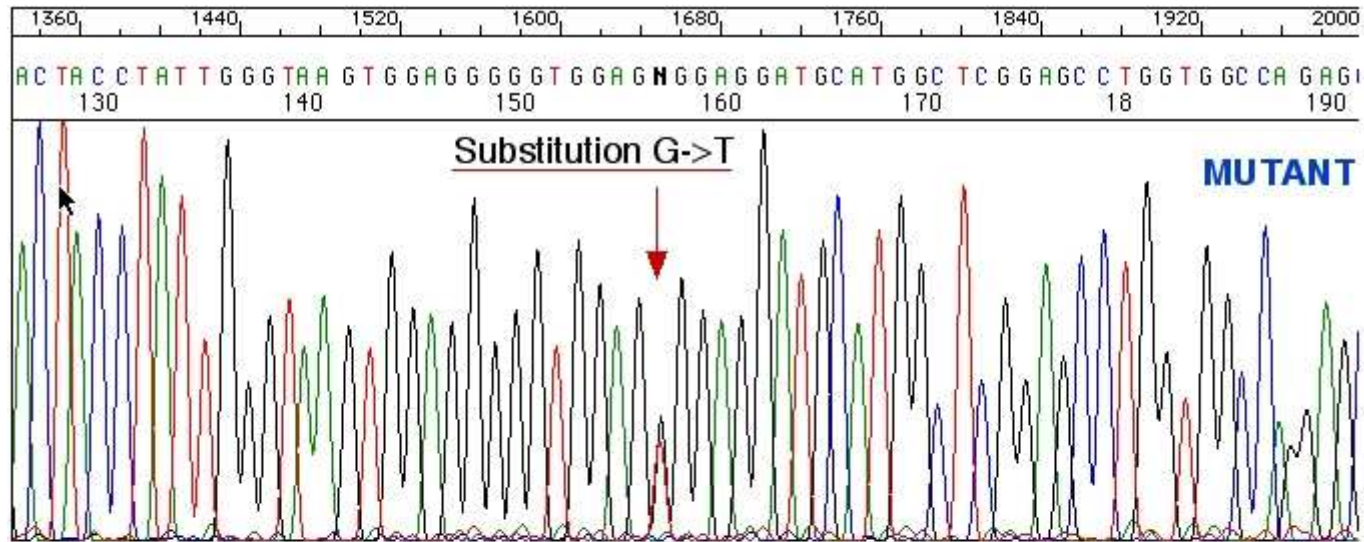
Exemple N°1 d'application : PCR-restriction



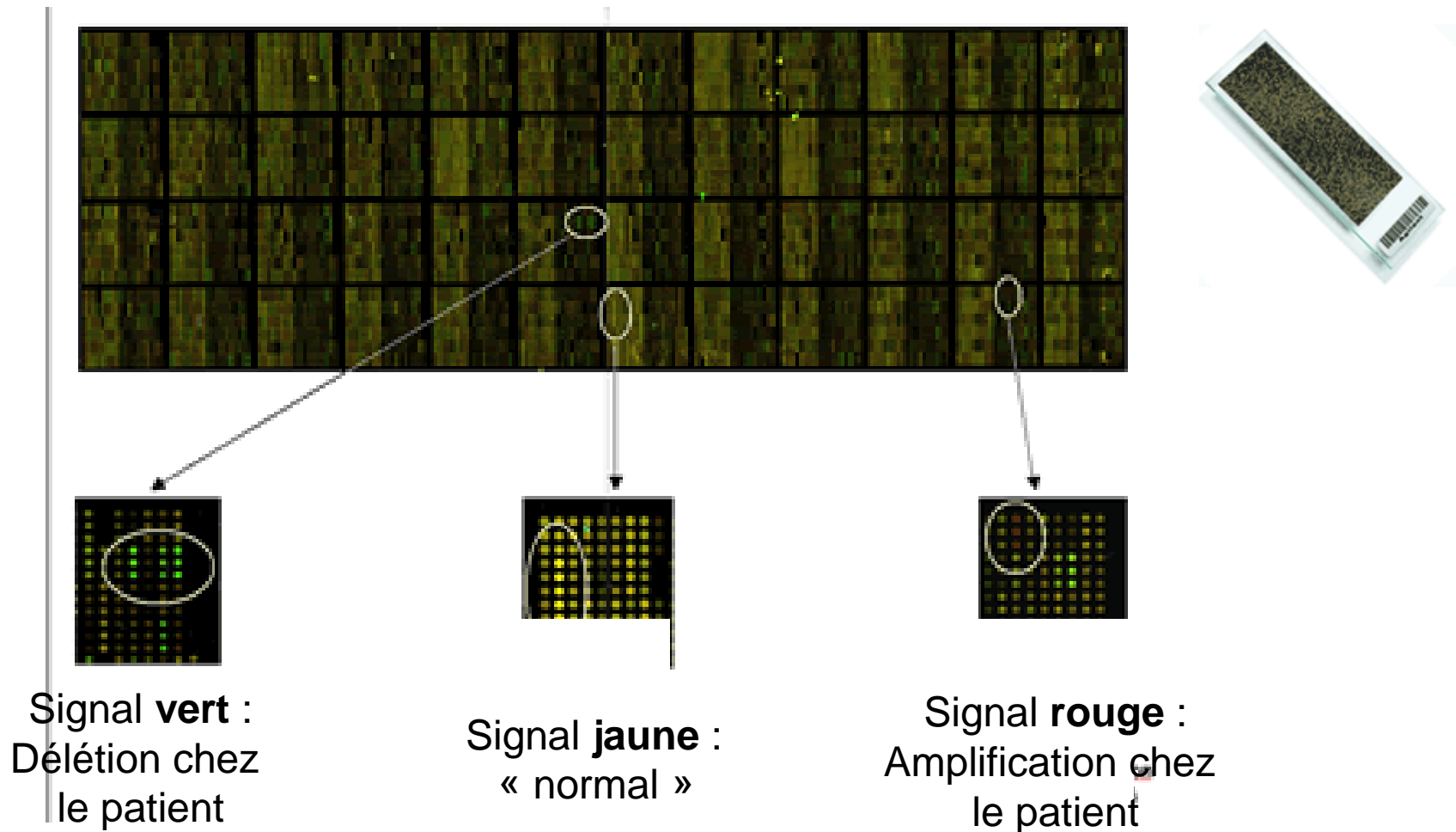
Exemple N°2 d'application : PCR-hétéroduplex



Exemple N°3 d'application : le séquençage



Exemple N°4 d'application : les « puces à ADN » »



CGH-array : hybridation génomique comparative sur puce à ADN

Résultat de CGH-array : délétion 4q21.23q22.3 (11 Mb)

