



UNIVERSITÄTS KLINIKUM HEIDELBERG

Heidelberg University Hospital | Im Neuenheimer Feld 400 | 69120 Heidelberg

Procédure – séquençage de cfDNA sur LCR

Cette procédure décrit le standard de prélèvement et de préparation initiale des échantillons de sang et LCR destinés au séquençage d'ADN libre circulant (cfDNA).

En cas de questions/problèmes/remarques, merci de nous contacter via l'adresse mail suivante :

liquidbiopsy.NEU@med.uni-heidelberg.de

Merci !

L'équipe Liquid Biopsy, Universitätsklinikum Heidelberg

Im Neuenheimer Feld 400
69120 Heidelberg

Germany

Tel. +49 6221 56-34696

Fax +49 6221 56-7554

liquidbiopsy.NEU@med.uni-heidelberg.de

www.klinikum.uni-heidelberg.de

Publication 13.05.2025

Auteurs de la procédure :

PD Dr. med. Tobias Kessler

Sebastian Schulz

Adresse mail: tobias.kessler@med.uni-heidelberg.de
sebastian.schulz@med.uni-heidelberg.de

Téléphone : +49 6221 56-7504
+49 151 20715505

Matériel:

Matériel
Centrifugeuse (réfrigérée) pour tubes de 15 ml (1.800xg)
Centrifugeuse (réfrigérée) pour tubes de 2 ml (15.000xg)
Falcon 15 mL
Eppendorff LoBind-Tube 2 mL
Eppendorff LoBind-Tube 1.5 mL
Pipettes Pasteur
Pipette P1000 avec pointes à filtre

Principes de base :

- **Une préparation rapide des échantillons est essentielle.**

Les cellules contenues (en différentes quantités) dans les différents fluides corporels se lysent après prélèvement, et libèrent leur ADN dans le fluide. Cet ADN cellulaire/génomique contamine et dilue l'ADN libre circulant (cfDNA) et est très difficile voire impossible à distinguer de ce dernier. Ceci entraîne une diminution de la proportion en cfDNA et fausse le résultat de séquençage. La préparation rapide est donc essentielle, surtout dans les fluides riches en cellules (sang, ...), mais aussi dans les fluides pauvres en cellules (LCR, ...). De plus, avec le temps l'ADN est dégradé (par des nucléases présentes dans le fluide, ...), ce qui fausse également les résultats.

- **En cas de stockage prolongé avant centrifugation, les échantillons devraient être stockés dans des tubes à cfDNA (p. ex Streck/Roche™).**

Si la préparation des échantillons de LCR n'est pas immédiatement possible (échantillon arrivant en fin d'après-midi ou le weekend), ceux-ci doivent être stockés à température ambiante dans des tubes spéciaux à cfDNA (Streck cell-free BCT) (stocker le sang dans le frigo s'il n'est pas transféré dans un tube Streck). Ceci ralentit la lyse cellulaire et la dégradation de l'ADN libre circulant.

Il reste cependant idéal de séparer le surnageant du culot cellulaire dès que possible afin d'éviter la contamination de l'échantillon avec de l'ADN génomique de leucocytes. Après centrifugation, le surnageant peut être stocké dans un tube classique (Falcon).

Procédure :

Remarque : les échantillons doivent être identifiés à tout moment avec les informations du patient et la nature du prélèvement.

Etape 1: stockage du sang EDTA

1. Retourner le tube EDTA 10x pour l'homogénéiser.
2. **Ouvrir le tube EDTA et en transférer tout le contenu dans un tube Falcon (15 mL).**
3. Congeler à -80 °C.

Etape 2: Séparer le LCR en ses constituants

1. Refroidir les centrifugeuses à 22°C.
 2. **Première centrifugation** du LCR dans le tube Streck Cell-Free DNA (ou Falcon si bas de tube cfDNA disponible) **à 1.800xg pendant 10 min à 22°C.**
 3. Transfert du surnageant avec une pipette Pasteur dans des tubes Eppendorf 2 mL Lo-Bind (donc pour un échantillon de 5 mL, 2x 2 mL et 1x 1 mL)
- *Faire attention à ne pas déranger le culot cellulaire, habituellement peu/pas visible. Pendant cette manipulation, moins de 500 µL devraient être perdus avec le culot cellulaire.
4. **Deuxième centrifugation** du surnageant extrait à l'étape 3 dans les tubes Eppendorf LoBind 2 mL **à 16.000xg pendant 10 min à 22°C.**
 5. Transfert du surnageant des tous les Eppendorfs après 2e centrifugation dans 1-2 tubes Falcon 15 mL avec une Pipette P1000. Le culot cellulaire qui se sera formé dans le fond des Eppendorfs ne doit en aucun cas être transféré avec. Il ne sera généralement pas visible.

*Le premier tube devrait contenir maximum 5 mL de surnageant de LCR (étiqueter CSF1). En cas d'excédent, il sera transféré dans un deuxième tube (étiqueter CSF Backup).

Etape 3 : Stockage des échantillons jusqu'à l'envoi

LCR et sang :

- Stockage courte durée (1 jour): - 20°C
 - Compte tenu du temps de transport après envoi, les échantillons devraient toujours être congelés à -80°C avant envoi
- Stockage plus long : - 80°C

Etape 4 : Envoi des échantillons et inscription

Envoi des échantillons et documents au « Liquid Biopsy Lab Hirntumor » de l'hôpital universitaire de Heidelberg.

Echantillons : (doit être envoyé sur carboglace si pas de tube Streck utilisé, préférentiellement sur carboglace si tube Streck utilisé)

- Surnageant du LCR (sans cellules)
- Sang en Falcon

Documents :

- Formulaire de demande rempli

Destinataire :

Universitätsklinik Heidelberg, Kopfklinik
Liquid Biopsy Lab Hirntumore
Im Neuenheimer Feld 400
69120 Heidelberg

Nr de téléphone : +49 6221 56-35603 (Sandy Walter) oder +49 6221 56-38265 (Andrea Dormann)

Après envoi, merci de signaler l'envoi (SANS nom de patient) à notre adresse mail centrale : liquidbiopsy.NEU@med.uni-heidelberg.de
Vous serez prévenu de l'arrivée et de l'analyse de vos échantillons via cette adresse mail.