

Contrôles qualités sur des échantillons biologiques prélevés dans les 40 dernières années

SANVEE-EDOH L.

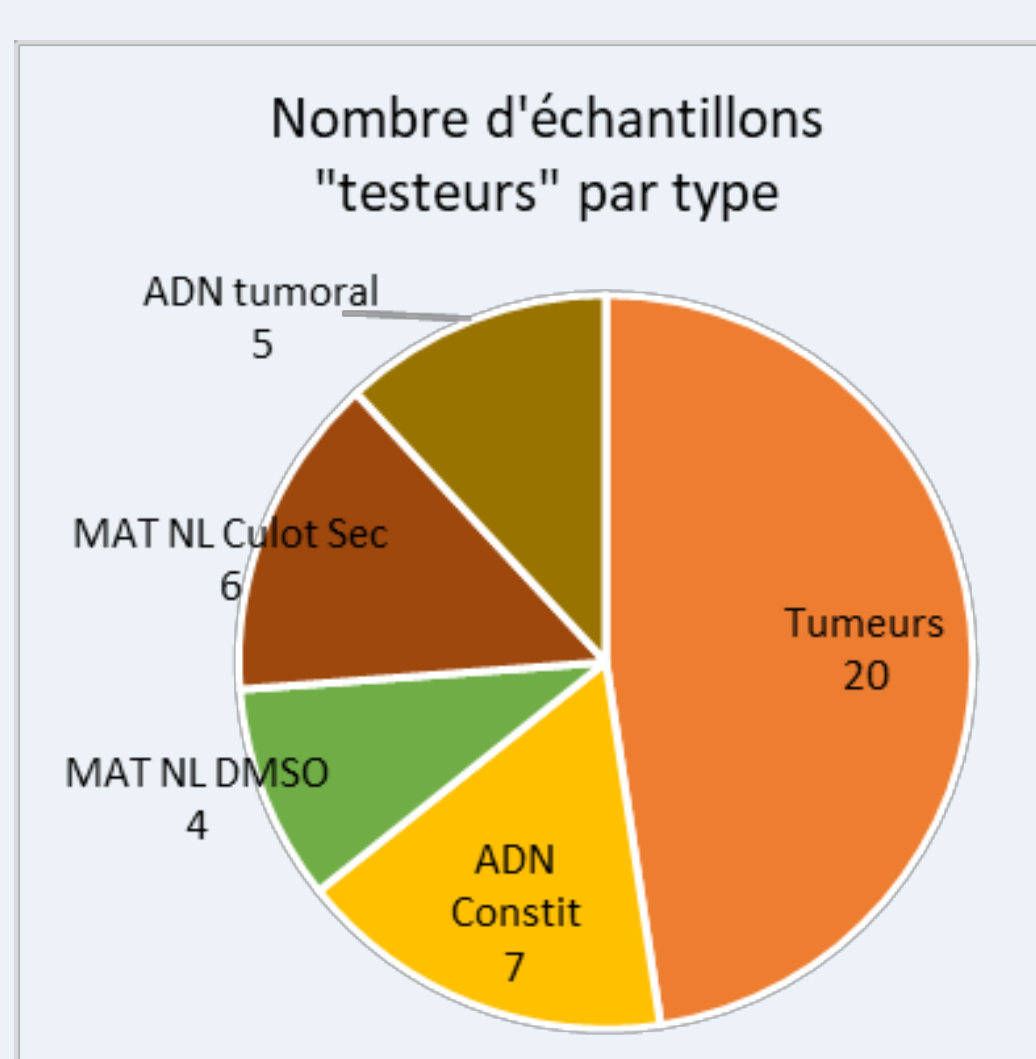
Plateforme de Gestion des Echantillons Biologiques du Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec, 69008 Lyon

Introduction

Parmi la collection institutionnelle du Centre Léon Bérard se trouvent près de 21 000 échantillons de cancers pédiatriques, notamment de neuroblastomes. Ces échantillons ont été requalifiés du soin vers la recherche et récoltés entre 1984 et 2024. Les informations sur leurs données associées et conditions de conservation sont en partie inconnues, il est donc crucial d'étudier leur qualité et leur potentiel d'utilisation. L'objectif est donc d'établir un état des lieux de qualité de ces divers échantillons au fil des ans, afin d'étudier leurs aptitudes à être mis à disposition pour la recherche. Pour cela, différents contrôles de qualité (CQ) des acides nucléiques, de la morphologie tissulaire et de la qualité des cellules sont nécessaires.

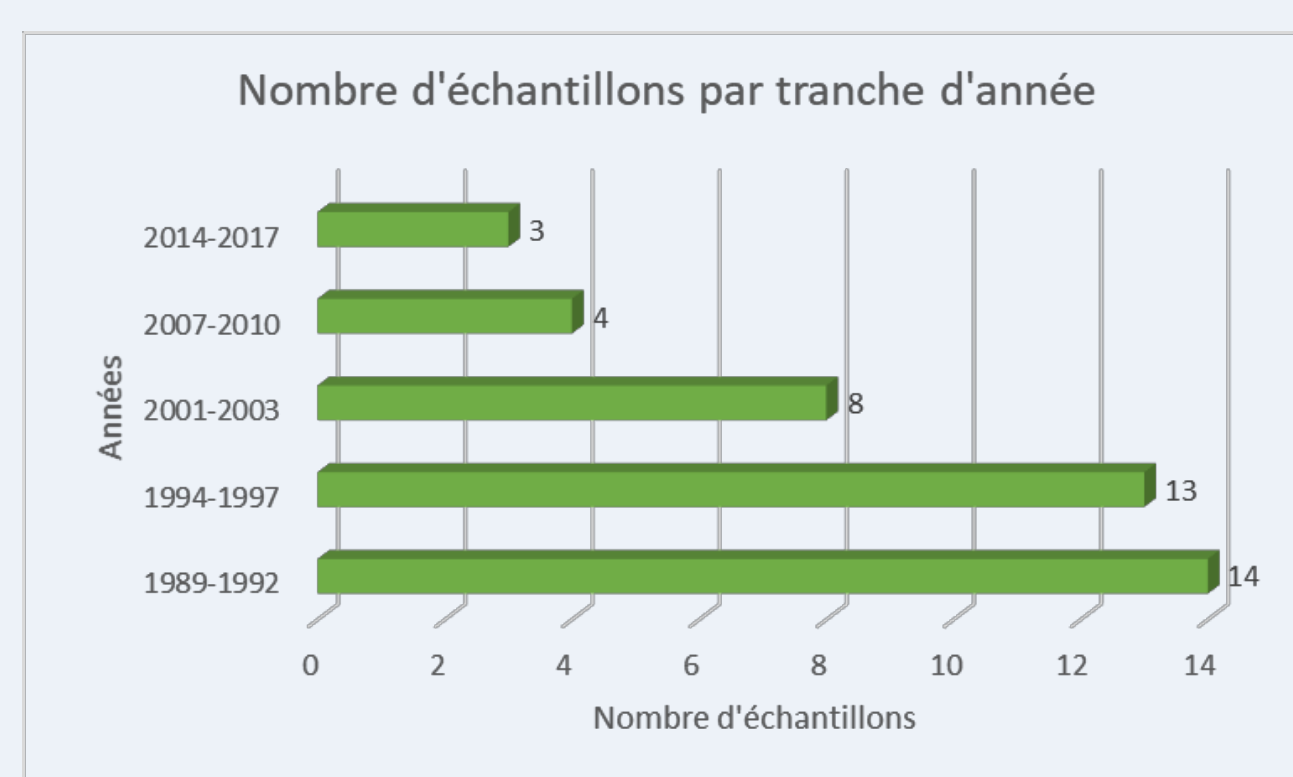
Matériels

Parmi la collection, une sélection de 42 échantillons (provenant de 18 patients) a été réalisée. Souhaités représentatifs de l'intégralité de la collection, ils ont été pris en fonction de leurs données associées :



*MAT NL = Matériel Normal
Ce sont des culots de cellules conservés secs ou en DMSO (cryoprotecteur), dont ont été extraits les ADN constit, des ADN normaux.
Les ADN tumoraux ont été extraits des tissus tumoraux, qualifiés par le terme Tumeurs dans le graphique.

- Type d'échantillon : ADN, tissus, culot cellulaire
- **Échantillons inutilisables** en recherche : **données incomplètes** (diagnostic et/ou date de prélèvement inconnus)
- **Échantillons sans intérêt scientifique** (matériel normal sans échantillon tumoral associé)
- Matériels avec données de CQ antérieures (Nanodrop)
- Date de prélèvement : 1989 - 2017



Méthodes

En fonction du type d'échantillon, les tests de qualité suivants ont été effectués :

- **Contrôles morphologiques des tissus** : coupe-congélation de 5 µm pour 20 échantillons tissulaires avec le *cryostat CM1950 (Leica Biosystems)*. Les lames colorées au bleu de toluidine sont lues par un médecin anatomopathologiste (tissus endommagés ou non, aspect des noyaux et des cellules, ...). Certains échantillons proviennent de la même tumeur, afin de comparer leur état.
- **Analyse de l'ADN (37 échantillons) et de l'ARN (25 échantillons)** par analyse au *Nanodrop 8000, Qubit Flex Fluorometer et TapeStation 4200*. Les produits dérivés ont été extraits à partir des échantillons de tumeurs (copeaux du cryostat) et de matériel normal conservé en culot sec. Le kit *AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit (Qiagen)* a été utilisé lors de cette étape.
- **Viabilité cellulaire** pour les 4 échantillons cellulaires conservés en DMSO à l'aide du *compteur de cellules Cellometer K2 (NEXCELOM BIOSCIENCE)*. Ce test est encore à réaliser.

Pour certains échantillons, il existe des données préexistantes d'extractions au Nanodrop. Elles seront comparées aux données d'une nouvelle extraction de ces mêmes échantillons. Pour les autres, ils ont été sélectionnés afin de permettre la comparaison de leurs produits dérivés (ADN/ARN) au sein d'un même prélèvement divisé en plusieurs morceaux.

Résultats

Résultats des extractions et limites

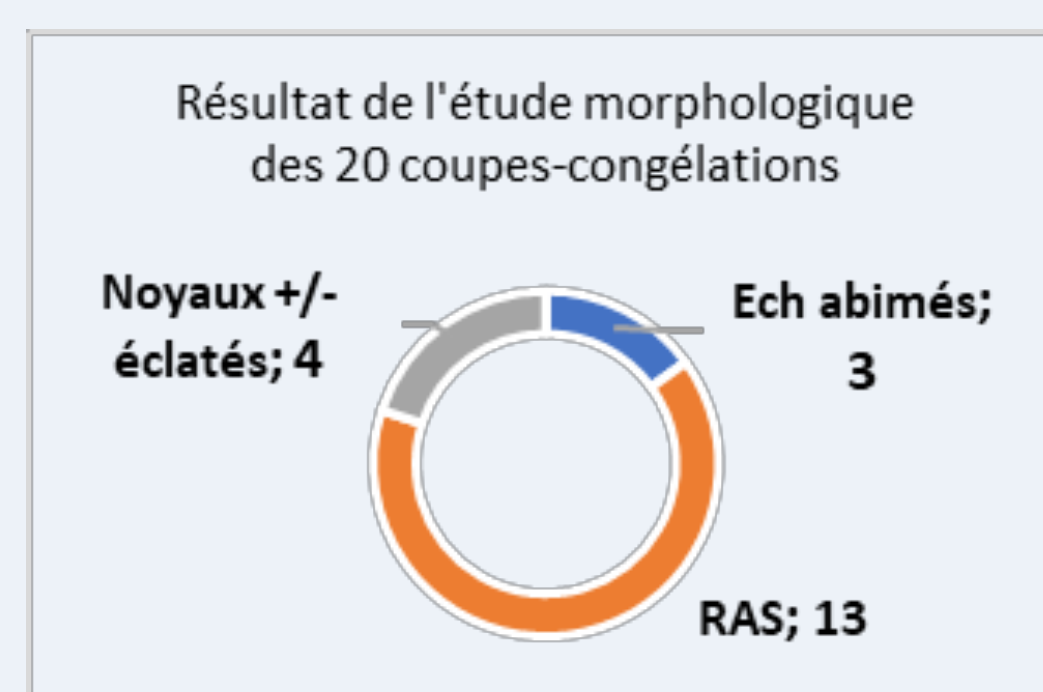
Paramètres	Limites	Nbre d'échs conformes /25	Paramètres	Limites	Nbre d'échs conformes /37
CQ ARN			CQ ADN		
Nanodrop [C]ARN (ng/µL)	> 10	17 / 68%	Qubit [C]ADN (ng/µL)	> 10	33 / 89%
Nanodrop R260/280	[2,0-2,2]	9 / 36%	Nanodrop [C]ADN (ng/µL)	> 50	33 / 89%
Nanodrop R260/230	[2,0-2,2]	0 / 0%	Nanodrop R260/280	[1,8-2]	28 / 76%
TapeStation RIN	> 3	11 / 44%	Nanodrop R260/230	[2,0-2,2]	13 / 35%
TapeStation DV200	> 30	16 / 64%	TapeStation DIN	> 5	35 / 95%
TapeStation 28s/18s	Etat des pics	- / -			

Les limites sont les valeurs standards permettant l'interprétation de l'intégrité et/ou l'exploitation des échantillons. Elles suivent les critères de la PGEB, eux-mêmes dictés par les demandes de mise à disposition qui lui sont adressées.

L'« état des pics » correspond au nombre de nucléotides des sous-unités ribosomiques 18S et 28S. Ils donnent avec le DV200 une bonne indication de la dégradation des ARN.

Coupes au cryostat

Les coupes-congélations présentent des résultats satisfaisants. Parmi les échantillons dégradés, 4 et 5 sur les 7 échantillons présentent respectivement pour le DV200 et le DIN de bonnes valeurs vis-à-vis des standards.



Comparaison aux résultats antérieurs

Des données sur de l'ADN (valeurs de concentration et du rapport 260/280) mesurées au Nanodrop étaient disponibles pour 7 échantillons (datant de 2003, 2007, 2010 et 2017). Ces paramètres ont été re-mesurés et comparés.

Ainsi, on observe des variations de la concentration et des rapports, mais ils sont tous semblables et dans les valeurs standards acceptables, respectivement supérieures à 50 ng/µL et comprises entre [1,8-2].

Viabilité

L'étape de viabilité cellulaire n'a pas encore pu être effectuée. Ces résultats seront donc complétés ultérieurement.

Remerciements

Madame Dominique COGNE, technicienne de la PGEB en charge du poste extraction des produits dérivés
Madame Alexandra MEURGEY, médecin anatomopathologiste

Conclusion / Discussion

L'étude morphologique montre une bonne qualité globale des échantillons tissulaires. Sept échantillons sur les vingt présentent des défauts (tissus ou noyaux endommagés) à la lecture de l'anatomopathologiste. Un seul parmi eux présente des valeurs standards le rendant inexploitable.

Suite aux **extractions**, on obtient une bonne qualité globale de l'intégrité de l'ADN (DIN). Mais ce sont les ARN qui indiquent le mieux le niveau de qualité et de dégradation des échantillons. Plus le RNA Integrity Number (RIN) est proche de 10, mieux c'est. Dans cette étude, on a considéré qu'un RIN supérieur à 3 était acceptable.

La concentration dépend en réalité de la quantité disponible de l'échantillon. Selon les techniques utilisées en recherche, de faibles quantités de produits dérivés peuvent être suffisantes.

L'âge des échantillons ne semble pas avoir eu d'impact notable sur leur qualité. On n'observe pas davantage de dégradation dans les échantillons les plus vieux par rapport aux plus récents. Seulement 2 échantillons (de 1992 et 2014) sur 37 montrent un DIN inférieur à 5.

Les dégradations sont échantillons-dépendantes, attestant d'une hétérogénéité des tumeurs. Des morceaux d'une même tumeur, conservés côte à côte dans des cryotubes différents ont été comparés. On observe des différences de RIN entre ces morceaux « sœurs ». Les DIN, moins soumis à la dégradation, restent semblables et on n'observe pas de différence entre les échantillons conservés en azote ou dans des congélateurs conservant à -80°C.

La dégradation peut être due à un manquement lors de la phase pré-analytique (prélèvement, transport, ...), des conditions de conservation inadéquates (plusieurs sorties, variations de T°, ...) ou lors de la préparation de l'échantillon.

Pour conclure, la majorité des échantillons sont utilisables en l'état dans le cadre de la recherche. Mais ils le sont sous réserve que les CQ valident les différents paramètres (concentrations, DIN, RIN, DV200, ...) en fonction de la méthode utilisée et de l'objectif à atteindre. La majorité des échantillons de cette collection ne sont pas uniques. Il sera donc également plus pertinent pour la PGEB de fournir les différents morceaux d'un échantillon afin de s'assurer qu'au moins un est exploitable.

Références

Michalska-Falkowska A, Niklinski J, Juhl H, Sulewska A, Kisluk J, Charkiewicz R, et al. Applied Molecular-Based Quality Control of Biobanked Samples for Multi-Omics Approach. *Cancers*. 24 juill 2023;15(14):3742.
[yris.ozyme.fr/fr](https://doi.org/10.3390/cancers15143742): Quantification et analyse de la pureté des acides nucléiques
Pansare K, Pillai D, Parab S, Singh SR, Kannan S, Ludbe M, et al. Quality assessment of cryopreserved biospecimens reveals presence of intact biomolecules. *J Biophotonics*. déc 2019;12(12):e201960048
Cianfone A, Savoia F, Parasole R, Mirabelli P. Pediatric biobanks to enhance clinical and translational research for children. *Eur J Pediatr*. 2023;182(4):1459-68.