

TABLE DES MATIERES

1	Suivi des révisions	1
2	Rédacteur - approbateur	1
3	Objectif et champ d'application.....	1
4	Prélèvements	2
4.1	Métabolomique	2
4.1.1	Plasma ou sérum	2
4.1.2	Urine	2
4.1.3	Eaux fécales	2
4.2	Protéomique	3
4.2.1	Prélèvements des échantillons biologiques (= matrices)	3
4.2.2	Extraction des protéines.....	3
5	Stockage des échantillons.....	3
6	Envoi des échantillons.....	4

1 SUIVI DES REVISIONS

Indice	Date	Objet de la révision
1	21/11/2022	Création instruction

2 REDACTEUR - APPROBATEUR

<i>Rédacteur</i>	<i>Approbateur</i>
<i>Nom : Josie Colombet</i>	<i>Nom : Estelle Pujos-Guillot / Michel Hébraud</i>
<i>Date : 21/11/2022</i>	<i>Date : 21/11/2022</i>

Avant d'utiliser cette instruction, vérifier qu'il s'agit bien de la dernière version en vigueur !

3 OBJECTIF ET CHAMP D'APPLICATION

Cette instruction, à destination des utilisateurs de la PFEM (PlateForme d'Exploration du Métabolisme), a pour objectif de délivrer des conseils pour le conditionnement et le stockage des échantillons avant envoi afin d'assurer les meilleures conditions en vue de la prestation à réaliser.

4 PRELEVEMENTS

4.1 Métabolomique

4.1.1 Plasma ou sérum

- ✓ Les conditions de prélèvement sont identiques que ce soit pour le type de matrice (plasma ou sérum) comme pour le type de prestation (analyse LC-MS ou analyse GC-MS).
- ✓ Choisir l'héparine comme anticoagulant.

<i>Analyses LC-MS ou GC-MS</i>			
	<i>Volume utile</i>	<i>Volume à expédier</i>	<i>Tubes</i>
Conditions de prélèvement	100 µL	200 µL	Tubes Eppendorf PP 1.5 mL

4.1.2 Urine

<i>Analyses LC-MS</i>			
	<i>Volume utile</i>	<i>Volume à expédier</i>	<i>Tubes</i>
Conditions de prélèvement	100 µL	200 µL + 50 µL	Tubes Eppendorf PP 1.5 mL

4.1.3 Eaux fécales

Ne pas envoyer les fèces ou contenus caecaux : la plateforme ne prend en charge que les extraits !

Méthode pour réaliser des extraits :

1. Peser les fèces ou contenus caecaux prélevés dans des tubes Eppendorf 1.5 mL en PP
2. Peser l'échantillon entre 100 et 300 mg (selon l'espèce animale)
3. Congeler les échantillons à -80°C
4. Lyophiliser ou broyer les échantillons congelés dans un broyeur à billes
5. Rajouter entre 1 mL et 3 mL d'eau MilliQ (1 mL pour 100 mg d'échantillon initial)
6. Transférer l'extrait dans des tubes d'ultracentrifugation
7. Centrifuger à 4°C pendant 2 h à 50 000 rpm soit 171500 g pour un rotor 70.1 Ti (Beckman)
8. Prélever le surnageant et l'aliquoter en 1 mL dans des tubes Eppendorf PP de 1.5 mL
9. Ajouter 2 µL de NaN₃ à Cc = 100 mg/mL (agent antimicrobien) par gramme d'eau fécale
10. Congeler à -80°C les eaux fécales avant envoi

Attention : l'étiquetage des échantillons doit résister à l'humidité !

En cas d'impossibilité de fournir les volumes préconisés, ne pas hésiter à contacter la plateforme.

4.2 Protéomique

4.2.1 Prélèvements des échantillons biologiques (= matrices)

- ✓ Matrices : sérum/plasma (sérum à privilégier si possible), salive, organes entiers d'origine animale ou végétale, biopsies, cultures/extraits cellulaires, contenus digestifs, liquides environnementaux (eau, nuage), prélèvements industriels (alimentaire, pharmaceutique).
- ✓ Les prélèvements seront effectués selon les bonnes pratiques en vigueur dans le laboratoire demandeur, spécialiste de la matrice biologique à étudier. Il est impératif que ces prélèvements soient effectués dans des conditions évitant au maximum les contaminations par des kératines, néfastes à l'analyse. Ainsi, l'usage de blouses ou surblouses en PP [pas de coton], gants, charlottes, tubes de prélèvements sous blister, etc sont fortement recommandés.

4.2.2 Extraction des protéines

- ✓ Si les protéines sont extraites par le demandeur, à partir des matrices biologiques citées dans le §4.2.1, les échantillons protéiques devront être obtenus en évitant au maximum les contaminations par des kératines (blouses ou surblouse en PP [pas de coton], gants, charlottes, usage de tubes sous blister, etc).
- ✓ Si les protéines sont extraites par la PFEM, à partir des matrices biologiques citées dans le §4.2.1, le demandeur discutera ou fournira le protocole à la PFEM afin d'optimiser cette étape. En l'absence de protocole bien établi, une étape de mise au point de celui-ci sera effectuée par la PFEM et/ou le demandeur selon accord préalable.

4.2.3 Concentration des protéines

- ✓ Dans le cadre du workflow de préparation des échantillons protéique pour leur analyse, la PFEM peut prendre en charge l'étape de concentration des échantillons protéiques sur gels SDS-PAGE. Cette étape sera réalisée selon un protocole établi (I-DOC-).
- ✓ Si cette étape préalable de concentration des échantillons protéiques est réalisée par le demandeur, le protocole (I-DOC ?) lui sera transmis afin d'être effectué dans les meilleures conditions requises pour leur analyse. Le demandeur indiquera obligatoirement la quantité de protéines déposée dans les puits des gels pour chaque échantillon (minimum 5 µg, maximum 50 µg).

5 STOCKAGE DES ECHANTILLONS

Conserver les échantillons destinés aux analyses métabolomiques et/ou protéomiques (matrice, extraits protéiques « bruts » ou concentrés dans une bande de gel SDS-PAGE) à -80°C jusqu'à leur envoi à la PFEM. Pour les échantillons concentrés sous forme de bandes de gel SDS-PAGE, une conservation à -20°C est aussi possible.

6 ENVOI DES ECHANTILLONS

- ✓ Programmer un envoi en carboglace ou avec blocs réfrigérés (échantillons protéomiques : bandes de gel SDS-PAGE). A privilégier une expédition le lundi ou le mardi pour une réception avant le week-end.
- ✓ Adresses d'expédition ci-dessous :

Composante	Protéomique	Métabolomique
Adresse d'envoi	INRAE – Centre Clermont-Auvergne Rhône-Alpes – Site de Theix UR 0370 QuaPA Plate-Forme d'Exploration du Métabolisme 63122 Saint-Genès-Champanelle	INRAE – Centre Clermont-Auvergne Rhône-Alpes – Site de Theix UMR 1019 Nutrition Humaine Plateforme d'exploration du Métabolisme 63122 Saint-Genès-Champanelle
Contact	Chambon Christophe : 04 73 62 44 64 Viala Didier : 04 70 62 42 52 Ferreira Claude : 04 73 62 44 95	Joly Charlotte : 04 73 62 47 63 Migné Carole : 04 73 62 44 56 Durand Stéphanie : 04 73 62 41 55

- ✓ Envoyer les tubes Eppendorf en boîte de rangement pour microtubes
 - Si les échantillons ne sont pas conditionnés en tubes Eppendorf 1.5mL, ***faire attention au choix des étiquettes placées sur les tubes : elles doivent résister à l'humidité afin qu'à réception des échantillons, l'étiquetage soit toujours lisible et collé sur les échantillons.***
- ✓ Préparer un plan des boîtes afin d'identifier rapidement les échantillons expédiés.
- ✓ Renseigner la fiche E-DOC-27 fournie par la plateforme et la joindre aux échantillons
- ✓ Prévenir la plateforme de l'envoi des échantillons