

Procédures des prélèvements pour étude de la répartition tissulaire des mutations hétéroplasmiques de l'ADN mitochondrial

Indications

- Sujets où une mutation pathogène de l'ADN mitochondriale a été identifiée
- Apparentés maternels de sujets où une mutation pathogène de l'ADN mitochondriale a été identifiée, chez lesquels est recherchée la présence de la mutation

Prélèvements

Ne pas oublier de faire signer un formulaire de consentement à l'étude de l'ADN

- Sang

1 tube de 5 ou 7 ml sur EDTA
Conservation à température ambiante

- Urines

Recueillir une miction dans un flacon à urine convenablement étiqueté
Conserver à température ambiante en attendant l'envoi.

- Cellules buccales

S'assurer que l'on est à plus d'une demie heure d'une prise alimentaire
Frotter fermement l'intérieur des joues (6 passages au minimum sur chaque joue) avec un écouvillon stérile en coton ou en dacron
Remettre l'écouvillon dans son étui avec un peu de sérum physiologique stérile. Bien étiqueter

Envoi

Envoyer le tout par *envoi rapide* (s'il y a un prélèvement urinaire) ou par *envoi normal* (en l'absence de prélèvement urinaire) *dans les 24 heures à l'adresse suivante :*

Dr Benoit RUCHETON
Service de Biochimie Métabolique
UF Cardiogénétique et myogénétique moléculaires et cellulaires
Bâtiment de la pharmacie
Hôpitaux Universitaires Pitié-Salpêtrière - Charles Foix
47-83 Boulevard de l'hôpital
75651 Paris cedex 13

Réalisation, traitement, conservation et transport des prélèvements musculaires en vue du diagnostic des maladies mitochondriales

Protocole de la biopsie musculaire **au lit du malade** : modalités particulières à respecter en vue des études suivantes : morphologie en microscopie optique ; analyse ultrastructurale ; analyse biochimique

Préparer :

- un b cher de 100 ml en plastique épais
- une plaque de polystyrène présentant un trou permettant de soutenir le b cher en plastique au dessus d'un récipient contenant de l'azote liquide (petite boîte en polystyrène ou thermos adapté)
- de l'isopentane (disponible en anatomie pathologique en général)
- de l'azote liquide
- de la carboglace avec des tubes préalablement marqués au nom du patient et indiquant le tissu prélevé
- des étiquettes au nom du patient

Lorsque le patient est prêt pour la biopsie : remplir le récipient d'azote liquide, remplir le b cher d'isopentane et mettre ce dernier à refroidir au contact avec l'azote liquide. Il se forme en 5 minutes environ une solidification de l'isopentane dans la partie inférieure du b cher.

Taille biopsie : un cylindre de 3 mm sur 5 mm

Le ou les fragments biopsiques destinés à **l'analyse morphologique en microscopie optique** doivent :

-  tre de forme cylindrique avec un côté nettement plus long et parallèle aux fibres musculaires (  peu près 1 à 2 mm de diamètre et 5-8 mm de longueur) ; l'orientation doit être reconnaissable
-  tre plongés dans l'isopentane refroidi par l'azote liquide pendant 20 secondes. Il est nécessaire d'agiter doucement le prélèvement dans l'isopentane pour obtenir une congélation complète. Le plus pratique est de prendre le prélèvement (pour le muscle :  ventuellement monté sur de la gomme adragante sur une rondelle de li ge) avec une pince (type Kosher par exemple). Il est important pour la morphologie que le fragment ne soit pas pincé (en dehors du strict minimum pour le maintenir)
-  tre ensuite transférés dans un tube sec conservé dans la glace pilée

Le fragment biopsique destiné à **l'analyse biochimique de la chaîne respiratoire** doit :

-  tre clairement identifié : un moyen sûr est de faire un petit éventail avec une étiquette au nom du patient pliée et repliée pour s'adapter à la taille du tube, et de poser dessus le fragment musculaire
-  tre immédiatement placé dans un tube à vis pour cryoconservation, le tout plongé immédiatement dans l'azote liquide

Au mieux, pour l'ensemble des analyses biochimiques, morphologiques et génétiques, il faudrait disposer de 4 fragments (au minimum de 2) dont l'un au moins a la forme cylindrique longue optimale (fragment pour l'analyse morphologique).

Comment transporter et faire voyager un prélèvement sans rompre la chaîne du refroidissement à -80 C ?

Stocker le tube contenant le prélèvement dans un congélateur à -80°C .

Au moment de l'envoi, mettre le tube contenant le prélèvement dans un petit sac en plastique contenant de la carboglace. Enfourer le tout sous une quantité suffisante de carboglace (au moins un volume de $15 \times 15 \times 15 \text{ cm}^3$) dans une boîte en polystyrène expansé. Comblé les vides dans la boîte avec du papier. Sceller la boîte avec de l'adhésif. **Attention, utiliser un contenant qui respire (polystyrène) et n'est pas totalement hermétique, sinon risque d'explosion.**

Avertir le laboratoire receveur, envoyer le prélèvement en début de semaine de façon à ce qu'il soit réceptionné et transféré dans un congélateur ou une cuve à azote liquide dès son arrivée.

Envoyer par transport express type chronopost avec livraison en mains propres.

	Fragment pour morphologie	Fragment pour analyse ultrastructurale	Fragment pour analyse biochimique	Fragment pour analyse génétique
Nombre de fragments	1 ou 2, longitudinal (dans le sens des fibres)	1, longitudinal (dans le sens des fibres)	1	1
Prétraitement	Congelé dans l'isopentane refroidi par l'azote liquide		Mis immédiatement dans un tube plastique à vis qui est immédiatement plongé dans l'azote liquide	Mis immédiatement dans un tube plastique à vis qui est immédiatement plongé dans l'azote liquide
Contenant	Mis dans un tube ou flacon sec	Tube ou flacon contenant de la glutaraldéhyde 2,5 %	Tube plastique à vis pour cryoconservation	Tube plastique à vis pour cryoconservation
Conservation et transport	Dans glace pilée	Dans glace pilée	Dans azote liquide, à défaut carboglace ¹	Dans azote liquide, à défaut carboglace ¹

¹ Le prélèvement doit voyager dans la carboglace : le meilleur système est de mettre le tube contenant le prélèvement dans un petit sac en plastique, lui même rempli de fragments de carboglace, et d'enfourer le tout sous une quantité suffisante de carboglace (au moins un volume de $15 \times 15 \times 15 \text{ cm}^3$) dans une boîte isotherme en polystyrène expansé.

Le transport doit être express (type chronopost avec livraison en main propre).

ENVOI DE PRELEVEMENTS (BIOPSIES) POUR ANALYSE BIOCHIMIQUE DE LA CHAÎNE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE ET ANALYSE DE L'ADN

Dans tous les cas, prévenir le laboratoire 01-42-17-76-55 avant l'envoi des prélèvements de façon à s'assurer que quelqu'un pourra les réceptionner. Envoyer de préférence les prélèvements en début de semaine (jusqu'au mercredi) pour éviter qu'ils ne se perdent tout un week end ;

Précautions pour transporter et faire voyager un prélèvement sans rompre la chaîne du refroidissement à -80°C

Au moment de l'envoi, mettre le tube contenant le prélèvement dans un petit sac en plastique contenant de la carboglace. Enfourer le tout sous une quantité suffisante de carboglace (au moins un volume de $15 \times 15 \times 15 \text{ cm}^3$) dans une boîte en polystyrène expansé. Comblé les vides dans la boîte avec du papier. Sceller la boîte avec de l'adhésif. **Attention, utiliser un contenant qui respire (polystyrène) et n'est pas totalement hermétique, sinon risque d'explosion.**

Le libellé exact de l'adresse est :

Dr Benoit RUCHETON
Service de Biochimie Métabolique
UF Cardiogénétique et myogénétique moléculaires et cellulaires
Bâtiment de la pharmacie
Hôpitaux Universitaires Pitié-Salpêtrière - Charles Foix
47-83 Boulevard de l'hôpital
75651 Paris cedex 13

Foie : Le fragment biopsique destiné à **l'analyse biochimique de la chaîne respiratoire** doit :

- être clairement identifié : un moyen sûr est de faire un petit éventail avec une étiquette au nom du patient pliée en deux sur partie collante et repliée en éventail pour s'adapter à la taille du tube, et de poser dessus la carotte de biopsie hépatique
- être immédiatement placé dans un tube à vis pour cryoconservation (tube Nunc), le tout plongé immédiatement dans l'azote liquide

L'étiquette pliée à l'avance permet l'identification certaine de l'échantillon mais également de ne pas perdre celui-ci qui pourrait aller se coller sous le bouchon. Stocker le tube contenant le prélèvement dans un congélateur à -80°C en attendant son envoi au laboratoire d'accueil.

LES PRELEVEMENTS DOIVENT ETRE ACCOMPAGNES :

- D'une lettre de renseignements cliniques et biologiques
- D'un bon de commande de l'hôpital
- D'une lettre de consentement du patient pour l'étude de l'ADN.