

<b>Procédures normalisées de fonctionnement du RCBT</b>			
<b>Congélation rapide des tissus</b>			
Numéro du PNF:	8.3.003	Version	f1.0
Remplace:		Date d'entrée en vigueur	09 Jan 08
Objet:	Congélation rapide des tissus	Catégorie:	Manipulation du matériel biologique

Écrit par:		Jean de Sousa-Hitzler		
	Signature	Nom	Titre	jmmaa
Approuvé par:		Peter Geary	CEO	09 Jan 08
	Signature	Nom	Titre	jmmaa

## LES RÉVISIONS

Numéro de PNF	Date d'entrée en vigueur	Auteur	Résumé des modifications
LP 002.001	2005	JdSH	PNF générique pour la collecte et le traitement du tissu tumoral
8.3.003	2008	JdSH	Révisé pour couvrir la congélation rapide des tissus seulement
8.3.003	2008	LC	Traduction
8.3.003	2009	AG	Mise à jour le format.

## 1.0 INTENTION

Les échantillons de tissus (excédents au besoin de la pathologie) sont collectés des patients qui ont passé par un processus de consentement éclairé et accepté de participer au programme de banque de tumeurs. La collection de tissus fraîchement congelés est une ressource importante pour des fins de recherche. Les tissus tumoraux sont convenables pour les études génomiques et protéomiques seulement si la congélation est réalisée rapidement et de manière appropriée. L'intention de ce document est de tracer les grandes lignes des procédures normalisées pour les banques du RCBT afin de suivre les étapes de la congélation rapide des tissus.

## 2.0 PORTÉE

Cette procédure normalisée de fonctionnement (PNF) décrit comment les tissus sont congelés rapidement. Cette PNF ne couvre pas les procédures de sécurité détaillées pour la manipulation du matériel biologique humain (MBH) et il est recommandé que le personnel suive les guides de biorisque des institutions.

## 3.0 RÉFÉRENCES À D'AUTRES POLITIQUES ET PNFS

1. Politique du RCBT: POL 005.001 Registres et documentation
2. Politique du RCBT: POL 002.001 Éthique
3. Politique du RCBT: POL 004.001 Vie privée et sécurité
4. Politique du RCBT: POL 007.001 Manipulation du matériel et de l'information
5. PNF générique du RCBT # QA 001.001: PNF générique du RCBT pour la collecte et le traitement du tissu tumoral
6. PNF du RCBT: 8.3.001 Collecte et transport du tissu
7. PNF du RCBT: 8.3.002 Collectage du tissu
8. PNF du RCBT: 8.1.002 Gestion des déchets du matériel à biorisque

## 4.0 RÔLES ET RESPONSABILITÉS

Cette politique s'adresse à tout le personnel des banques membres du RCBT qui est responsable de la congélation rapide des tissus collectés

<b>Personnel de la banque de tumeurs</b>	<b>Responsabilité/rôle</b>	<b>Site personnel spécifique et coordonnées de contact</b>
Technicien de laboratoire	Transport du tissu tumoral, du processus de collecte, de la congélation et de l'entreposage des tissus.	
Assistant pathologiste	Assiste la collecte et le transport du tissu. Peut communiquer avec le technicien du laboratoire	

## 5.0 MATÉRIEL, ÉQUIPEMENT ET FORMULAIRES

Le matériel, l'équipement et les formulaires inscrits dans la liste suivante ne sont que recommandés et peuvent être substitués par des produits alternatifs/équivalents plus appropriés aux tâches ou aux procédures spécifiques aux sites.

<b>Matériel et équipement</b>	<b>Matériel et équipement</b>
-------------------------------	-------------------------------

	(spécifiques au site)
Contenant avec glace (pour le transport du tissu congelé)	
Marqueurs, encre et crayons	
Pinces propres	
Scalpels propres pour découper le tissu	
Azote liquide	
2-Methylbutane (isopentane)	
Contenant pour isopentane	
Cryotubes étiquetés pour entreposage des tissus congelés (couvercle vissé)	
Étiquettes appropriées suffisantes (voir PNF # 8.1.001) pour cryotubes	
Vase cryogénique (Vase de Dewar) pour le transport de l'azote liquide	
Unité de récupération des aiguilles et des objets tranchants	
Gants jetables pour protéger le personnel manipulant le tissu	
Verres de sécurité pour le personnel manipulant les réservoirs d'azote liquide et les contenants pour l'entreposage.	
Gants isolants convenant à la manipulation des réservoirs d'azote liquide et des contenants pour l'entreposage.	
Recouvrement (underpad) propre pour la surface de travail	
Feuille de travail pour la collecte/transport (voir annexe formulaire pour échantillons)	

## 6.0 DÉFINITIONS

**Cryopréservation:** Un processus pour entreposer du matériel biologique à très basse température à long terme.

## 7.0 PROCÉDURES

Cette procédure a été développée pour s'assurer que les échantillons de tissus collectés de participants consentants seront congelés de manière sécuritaire et efficace de façon à éliminer les risques de contamination et la perte de l'intégrité moléculaire. Afin de faciliter l'utilisation des techniques génomiques et protéomiques, les tissus mis en banque qui ont été adéquatement congelés sont primordiaux pour obtenir des produits avec une haute intégrité et une excellente qualité.

## 7.1 Congélation rapide des tissus tumoraux (\*Voir annexe 2 pour protocole alternatif équivalent)

1. Traiter tous les tissus comme potentiellement infectieux.
2. La congélation doit être effectuée par un technicien de laboratoire ou du personnel formé et désigné par la banque de tumeurs.
3. Avoir le matériel et l'équipement prêts. Avoir la quantité de cryotubes nécessaires étiquetés et prêts.
4. À moins d'avoir l'intention d'utiliser une autre méthode de préservation, le tissu tumoral frais doit être congelé le plus rapidement possible. De façon optimale, le tissu doit être congelé dans les 30 minutes suivant la résection.
5. Ne pas congeler le tissu directement sur la glace.
6. S'assurer que le tissu prélevé ne se dessèche jamais ou ne soit contaminé avec les tissus environnants ou avec d'autres échantillons. Utiliser des scalpels et des pinces propres entre les échantillons afin d'éviter la contamination croisée entre les échantillons ou entre la tumeur et le tissu normal.
7. Les tissus rapidement congelés sont appropriés à la préparation d'ADN, d'ARN et de protéines. Ne pas placer l'échantillon en contact avec du formol à aucun moment du processus. Ne pas ajouter de sérum à l'échantillon.
8. Refroidir l'isopentane en suspendant le contenant d'isopentane dans l'azote liquide. L'isopentane est suffisamment refroidi quand des "perles" se forment et que la solution devient trouble.
9. ~~Avec des pinces propres, placer le spécimen à être congelé dans un cryotube vide avec couvercle à visser.~~
10. ~~Fermer le cryotube.~~
11. ~~Placer le cryotube avec le spécimen dans le contenant d'isopentane refroidi.~~
12. Le spécimen doit être congelé à l'intérieur de 30 secondes.

L'étape de la congélation avec l'isopentane peut être optionnelle. ~~Placer le spécimen tissulaire dans un cryotube vide, fermer le cryotube et immédiatement le submerger dans l'azote liquide.~~ Placer le spécimen tissulaire dans un cryomould contenant de l'OCT. S'assurer que le spécimen est recouvert entièrement d'OCT. Submerger immédiatement le cryomould dans l'isopentane préalablement refroidi. La solution d'isopentane est contenue dans un contenant de métal qui est entouré d'azote liquide afin de refroidir le plus rapidement le spécimen tissulaire. Le spécimen doit être congelé dans les 30 à 60 secondes suivantes. Ceci n'est pas recommandé si l'échantillon est trop volumineux parce que la période de congélation trop longue endommagera la morphologie. En ce qui concerne les dimensions des échantillons que nous obtenons de la pathologie. Pour la prostate actuellement, la pathologie garde une tranche de la prostate et nous donne une tranche pour la recherche et ainsi de suite... Moi, j'indique les dimensions de la tranche de prostate attribuée pour la recherche. Celle-ci sera alors sub-divisée par la suite en 4

selon la grosseur de la tranche. Je ne note pas la dimension de chaque bloc, mais plutôt de la tranche qui a servi à faire ces blocs. Je ne sais pas si tu me comprends ? Habituellement, la pathologie nous donne entre 16 et 24 blocs pour un patient et mesurer tous ces blocs prendrait énormément de temps donc, nous mesurons les tranches...

Aussi, j'aimerais te mentionner une autre méthode de congélation avec de l'isopentane. En pathologie à l'hôpital Saint-Luc, lorsqu'il y a une congélation, les techniciennes plongent le spécimen tissulaire qui est entouré d'OCT dans de l'isopentane. L'isopentane est contenu dans un contenant en verre. Celui-ci est entouré non pas d'azote liquide, mais de glace sèche.

13. À la suite de cette congélation rapide, transférer l'échantillon au contenant d'entreposage d'azote liquide (préférentiellement) ou dans un congélateur à -80° C.
14. Les échantillons doivent être placés sur glace sèche lors du transport vers le congélateur ou dans les installations d'entreposage dans l'azote liquide.
15. Pour l'entreposage dans l'azote liquide, il est recommandé que les échantillons soient placés dans la phase vapeur de l'azote liquide.
16. Enregistrer l'emplacement de l'entreposage.
17. Enregistrer le moment de l'entreposage sur la feuille de travail pour la collecte et le traitement du tissu (voir annexe 1). Déterminer le temps écoulé entre la résection et la congélation et enregistrer ces informations le plus précisément possible. Au minimum, enregistrer le temps approximatif (au 15 minutes près) à partir de la résection jusqu'à ce que le tissu soit congelé (ex : à l'intérieur de 30 minutes, entre 30 et 45 minutes etc.).

## 8.0 RÉFÉRENCES APPLICABLES, RÈGLEMENTS ET GUIDES

1. Declaration of Helsinki. <http://ohsr.od.nih.gov/helsinki.php3>  
<http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>
2. Tri-Council Policy Statement; Ethical Conduct for Research Involving Humans; Medical Research Council of Canada; Natural Sciences and Engineering Council of Canada; Social Sciences and Humanities Research Council of Canada, August 1998. <http://www.pre.ethics.gc.ca/english/policystatement/policystatement.cfm>
3. Human Tissue and Biological Samples for use in Research. Operational and Ethical Guidelines. Medical Research Council Ethics Series.  
[http://www.mrc.ac.uk/pdf-tissue\\_guide\\_fin.pdf](http://www.mrc.ac.uk/pdf-tissue_guide_fin.pdf)
4. Best Practices for Repositories I. Collection, Storage and Retrieval of Human Biological Materials for Research. International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER). <http://www.isber.org>
5. National Bioethics Advisory Commission: Research involving human biological materials: Ethical issues and policy guidance, Vol. I: Report and

recommendations of the National Bioethics Advisory Committee. August 1999.  
<http://bioethics.georgetown.edu/nbac/hbm.pdf>

6. US National Biospecimen Network Blueprint  
[http://www.ndoc.org/about\\_ndc/reports/NBN\\_comment.asp](http://www.ndoc.org/about_ndc/reports/NBN_comment.asp)
7. Jewell, S. et al. Analysis of the Molecular Quality of Human Tissues, an experience from the Cooperative Human Tissue Network. *Am. J. Clin. Pathol.* 2002;118:733-741.
8. Guideline – Fresh Tissue Working Group of BIG and NCI breast cancer Cooperative Groups [http://ctep.cancer.gov/forms/guidelines\\_fresh\\_tissue.pdf](http://ctep.cancer.gov/forms/guidelines_fresh_tissue.pdf)

## ANNEXE 1.

La feuille de travail de la collecte des échantillons peut être élaborée par les sites spécifiques pour accéder à l'information pertinente au site.

Ce qui suit peut être utilisé comme guide pour retenir les informations à être enregistrées

### Collecte et transport des tissus

Lieu de collecte	
Date de résection de la tumeur	
Heure de la résection de la tumeur	
Date de la réception de l'échantillon au laboratoire de pathologie	
Heure de la réception de l'échantillon au laboratoire de pathologie	
Nom de la personne qui a transporté le tissu	
L'échantillon a-t-il été transporté sur glace?	OUI            NON
Pathologiste (Nom)	
Notes de collecte additionnelles:	

### Information sur l'échantillon

Étiquette (Identifiant unique)	Type de tissu	Le tissu normal correspondant était-il disponible et a-t-il été pris?	Taille de la tumeur	Observation sur le tissu

### Cueillette du tissu

**Décongelé par:** Nom du technicien

**Heure et date du collectage:** Très important d'enregistrer cette information

Indiquer si le tissu a été pris par:

#### 1. Collecte de tissu fraîchement congelé.

Étiquette (identifiant)	Congelé dans tube par :	Date de la congélation	Heure de la congélation	Taille de l'échantillon	Emplacement de l'entreposage



9. Placer le spécimen tissulaire dans un cryomoule contenant de l'OCT. S'assurer que le spécimen est recouvert entièrement d'OCT. Submerger immédiatement le cryomoule dans l'isopentane préalablement refroidi. La solution d'isopentane est contenue dans un contenant de métal qui est entouré d'azote liquide afin de refroidir le plus rapidement le spécimen tissulaire. Le spécimen doit être congelé dans les 30 à 60 secondes suivantes. Ceci n'est pas recommandé si l'échantillon est trop volumineux parce que la période de congélation trop longue endommagera la morphologie.
10. À la suite de cette congélation rapide, transférer l'échantillon au contenant d'entreposage d'azote liquide (préférentiellement) ou dans un congélateur à -80° C.
11. Les échantillons doivent être placés sur glace sèche lors du transport vers le congélateur ou dans les installations d'entreposage dans l'azote liquide.
12. Pour l'entreposage dans l'azote liquide, il est recommandé que les échantillons soient placés dans la phase vapeur de l'azote liquide.
13. Enregistrer l'emplacement de l'entreposage.
14. Enregistrer le moment de l'entreposage sur la feuille de travail pour la collecte et le traitement du tissu (voir annexe 1). Déterminer le temps écoulé entre la résection et la congélation et enregistrer ces informations le plus précisément possible. Au minimum, enregistrer le temps approximatif (au 15 minutes près) à partir de la résection jusqu'à ce que le tissu soit congelé (ex : à l'intérieur de 30 minutes, entre 30 et 45 minutes etc.).