

Procédures normalisées de fonctionnement du RCBT			
Sectionnement des tissus enrobés de paraffine et d'OCT			
Numéro du PNF:	8.3.006	Version	f1.0
Remplace:		Date d'entrée en vigueur	09 Jan 08
Objet:	Sectionnement des tissus enrobés de paraffine et d'OCT	Catégorie:	Manipulation du matériel biologique

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

LES RÉVISIONS

Numéro de PNF	Date d'entrée en vigueur	Auteur	Résumé des modifications
LP 002.001	2005	LdSH	PNF générique pour la collecte et le traitement du tissu tumoral
8.3.006	2008	LdSH	Révisé pour traiter spécifiquement du sectionnement des tissus conservés en paraffine et dans l'OCT (et en tenant compte du contrôle de qualité)
8.3.006	2008	LC	Traduction
8.3.006	2009	AG	Mise à jour le format.

1.0 INTENTION

Les tissus tumoraux préservés et collectés en passant par un processus de consentement éclairé représentent une ressource précieuse pour des recherches spécifiques. Les tissus fixés dans la formaldéhyde et enrobés de paraffine (FFPE-«Formaldehyde fixed and paraffin embedded») et les tissus congelés dans l'OCT peuvent être sectionnés pour des études nécessitant une préservation histo-morphologique des spécimens. Pour les études impliquant de l'immunohistochimie (IHC) ou des hybridation *in situ* (ISH), les tranches de tissus non fixés, congelés dans l'OCT peuvent être mieux appropriées. Plusieurs études utilisent aussi des tranches pour extraire les acides nucléiques des spécimens. L'intention de ce document est de tracer les grandes lignes des procédures normalisées

pour les banques du RCBT afin de suivre le sectionnement des tissus préservés dans la paraffine ou l'OCT.

De plus, le contrôle de la qualité est fondamental pour le succès des opérations d'une banque de tissus offrant des spécimens de tissus à des fins de recherche. Les banques du RCBT doivent être confiantes de fournir des tranches de tissus de grande qualité de façon à rencontrer les besoins de recherche des investigateurs. Les procédures de contrôle doivent être mises en place pour surveiller et estimer la qualité et l'intégrité des tranches libérées pour une perspective de recherche.

2.0 PORTÉE

Cette procédure normalisée de fonctionnement (PNF) décrit comment les tissus préservés dans la paraffine et dans l'OCT doivent être sectionnés. Cette PNF trace également les grandes lignes de l'évaluation minimale qui doit être mise en place pour évaluer la qualité et l'intégrité des tranches de tissus paraffinés et congelés.

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. Procédure générique du RCBT: FS 002.001 PNF générique du RCBT pour la collecte et le traitement des tissus
6. PNF du RCBT: 8.3.003 Préservation des tissus: Congélation dans l'OCT
7. PNF du RCBT: 8.3.005 Préservation des Tissus: Enrobage de paraffine
8. PNF du RCBT: 5.1.001 Contrôle de qualité des échantillons de tissus
9. 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 du sectionnement du tissu préservé dans la paraffine ou dans des blocs d'OCT.

Personnel de la banque de tumeurs	Responsabilité/rôle	Site personnel spécifique et
--	----------------------------	-------------------------------------

		coordonnées de contact
Pathologiste	Dirige la caractérisation histopathologique	
Technicien de laboratoire /Technicien du laboratoire d'histopathologie	Peut être spécifiquement responsable du processus de l'enrobage des tissus dans la paraffine et dans l'OCT et du sectionnement des blocs de paraffine et d'OCT. Dirige et assiste avec les procédures d'assurance-qualité. Enregistre et documente les résultats.	

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.

Matériel et équipement	Matériel et équipement (spécifiques au site)
Marqueurs, encre et crayons	
Microscope	
Microtome	
Bain d'eau chaude (fixé à 40-45°C)	
Lames de microtome	
Pinceau à pointe fine	
Étiquettes appropriées pour lames	
Lames de verre étiquetées	
Support pour tenir les lames	
Support à glace	
Four (fixé à 50-52°C)	
Cryotome	
Lames étiquetées chargées électrostatiquement (comme les «Superfrost Plus»)	
Contenant avec glace sèche pour les blocs d'OCT	
Film pour sceller les boîtes de lames comme du «Parafilm»	
Boîtes d'entreposage et/ou d'expédition de lames	
Milieu de montage comme le «Cryomount »pour attacher les blocs d'OCT au cryotome	

6.0 DÉFINITIONS

BSA: Albumine de sérum bovin

«**Chuck**»: Partie du microtome utilisé pour tenir le bloc

Cryotome: Un appareil qui consiste en un microtome placé à l'intérieur d'un congélateur et utilisé pour sectionner les tissus congelés.

Tissu «Formalin Fixed Paraffin-embedded» (FFPE): Tissu qui a été fixé au formol et dans la paraffine

H&E: Hématoxyline and Éosine

IHC: Immunohistochimie

ISH: Hybridation *in situ*

FISH: Hybridation fluorescente *in situ*

Microtome: Appareil utilisé pour couper des tranches à partir d'un bloc placé sur lame.

OCT: Composé "Optimal Cutting Temperature" est le nom utilisé pour le milieu de congélation à base de polyéthylène glycol/sucrose. L'OCT préserve l'ultrastructure et protège les tissus de la dessiccation, de la dégradation, agit comme un isolant des variations thermales et minimise la formation des cristaux. Il est spécialement utile pour préserver les tissus fraîchement congelés qui peuvent être sectionnés.

Lames chargées électrostatiquement: Lames de microscope façonnées pour permettre la liaison électrostatique des tranches de tissus chargés négativement à la surface de la lame chargée positivement.

Préservation: Utilisation d'agents chimiques, d'altérations dans les conditions environnementales ou autres moyens durant le processus pour prévenir ou retarder la détérioration biologique ou physique du spécimen.

Qualité: Conformité d'un spécimen ou d'un procédé avec des spécifications pré-établies ou standards.

Assurance qualité (AQ): Toutes les actions planifiées et systématiques qui ont été établies pour assurer que le programme de banque de tumeurs soit performant et que les données soient générées, documentées (enregistrées) et reportées en conformité avec les exigences réglementaires applicables.

Contrôle de qualité (CQ): Le contrôle de la qualité est le système d'activités techniques qui mesure les attributs et performances d'un processus ou, par rapport à des standards définis, qui vérifie que les exigences établies ont été rencontrées.

QMS: Même chose que AQ plus haut

7.0 PROCÉDURES

Cette procédure a été développée pour s'assurer que les échantillons de tissus préservés pour la recherche sont sectionnés de manière sécuritaire et efficace tout en éliminant les risques de contamination et de perte d'intégrité moléculaire et structurale. Elle assure aussi le rationnement des blocs de tissus associés pour chaque cas à de multiples essais et projets et du bon usage de ces blocs. La conformité dans la procédure est importante pour obtenir des résultats comparables et les associer à des tests. Les étapes suivantes sont basées sur des procédures suivies par la Banque de cancer du sein du Manitoba et par le Groupe d'essais clinique de l'Institut national du cancer du Canada de l'Ontario.

Ces procédures tracent aussi les grandes lignes des étapes qui doivent être suivies pour s'assurer que les échantillons de tissus collectés et distribués sont d'un calibre morphologique et moléculaire suffisant pour rencontrer les besoins de recherche des investigateurs.

7.1 Sectionnement du tissu fixé au formol et enrobé de paraffine

1. Traiter tous les tissus comme potentiellement infectieux.
2. Le sectionnement est réalisé par le technicien de laboratoire ou d'histologie ou par du personnel formé à utiliser un microtome et à couper des tranches histologiques.
3. Avoir le matériel et l'équipement prêts. Avoir la quantité de lames nécessaires étiquetées et prêtes.
4. Pré-refroidir les blocs de paraffine, côté tissu vers le bas, sur un support de glace et d'eau. Ceci facilitera le sectionnement spécialement des tissus gras comme le sein. En utilisant un couteau d'acier pour microtome ou une lame jetable, couper des tranches de 4-5 microns pour des tranches histologiques et de 10-12 microns pour des fins d'extraction d'acides nucléiques.
5. Pour les tranches histologiques, étiqueter les lames en série.
6. Faire sécher les tranches de paraffine à 55°C pendant 1 heure.
7. Enlever les tranches du four et permettre le refroidissement à température de la pièce.

8. Les tranches sont entreposées pour l'expédition dans des malles à lames ou entreposées dans des boîtes conçues pour tenir les lames à 4° C. Un entreposage de longue durée de lames non traitées FFPE devrait être évité puisqu'il pourrait résulter une perte d'antigènes. Bien que non établi, le scellage sous vide et la réfrigération pourrait aider à préserver certains antigènes instables.
9. Pour les tranches à fins d'extraction d'acides nucléiques, permettre aux tranches individuelles de s'enrouler naturellement et les placer directement dans un tube à microcentrifugeuse prêtes pour l'extraction des acides nucléiques. Le tampon d'extraction peut être ajouté directement dans le tube à microcentrifugeuse pour préserver l'intégrité moléculaire de l'échantillon.

7.2 Sectionnement du tissu enrobé d'OCT

1. Les tranches congelées sont coupées par du personnel formé à accomplir la tâche du sectionnement des tissus enrobés d'OCT dans un microtome. Les cryomoules de tissus congelés sont transférés au cryotome sur glace sèche.
2. Fixer l'épaisseur des tranches à 4-5 microns pour l'IHC ou l'ISH et 10-20 microns pour les échantillons d'extraction d'acides nucléiques.
3. Les tranches sont montées sur des lames pré-refroidies en retournant la lame avec un petit angle par-dessus la tranche comme s'il s'étendait sur le dos d'un couteau. La tranche sera attirée vers la lame électrostatiquement. La lame peut être brièvement réchauffée sur le dos d'une main gantée après avoir pris la tranche (pour faciliter l'adhésion de la tranche vers la lame). Cependant, la lame doit être refroidie immédiatement contre la surface métallique du cryostat pour recongeler le tissu. La tranche peut aussi être fixée immédiatement dans de l'éthanol 95% froid directement après l'adhérence électrostatique à la lame et être traitée immédiatement.
4. Pour l'extraction d'acides nucléiques, permettre simplement à la tranche de tissu de s'enrouler naturellement et la placer dans un tube à microcentrifugeuse pré-étiqueté et pré-refroidi. Les échantillons peuvent être entreposés à -80° C ou un tampon d'extraction approprié peut être ajouté immédiatement et les échantillons peuvent être traités ou entreposés à -80° C. Voir PNF # 8.3.011.
5. Quand le sectionnement est fait, sceller le tissu exposé avec une goutte d'OCT (facultatif) et enlever le bloc précautionneusement de la plaque du spécimen. Puis re-sceller le bloc dans un emballage de plastique et placer immédiatement sur glace sèche pour retourner dans le cryo-entreposage.
6. Les tranches congelées sur lames ne requérant pas une étape de fixation peuvent aller directement dans une boîte à lames en plastique pré-refroidie ou dans une mallette à lames avec Parafilm pour entreposage dans un congélateur à -80° C.

NOTE: Durant la procédure de sectionnement, éviter de permettre au bloc d'OCT de se réchauffer. En particulier, éviter les cycles de chauffage et de refroidissement.

7.3 Évaluation de la qualité – Considérations générales pour revoir une tranche.

1. Au minimum, l'évaluation doit consister en une revue morphologique des tranches de tissus.
2. Utiliser les commentaires des chercheurs sur la qualité de la tranche pour raffiner les pratiques et les guides de procédures du contrôle de qualité.

7.4 Évaluation de la qualité – points concernant la qualité des tranches.

1. Être certain que du tissu représentatif reste dans le bloc après que des tranches soient coupées pour des essais. Ne pas complètement épuiser les blocs de paraffine ou congelés.
2. Être certain qu'il y a du matériel suffisant sur la tranche histologique pour l'essai visé sans compromettre le matériel représentatif du bloc de tissu.
3. S'assurer que le tissu de chaque tranche est approprié pour le but de l'essai visé (ex : pour l'étude d'un cancer invasif, les cellules représentatives du cancer invasif ont besoin de présenter une qualité suffisante sur toutes les tranches fournies pour l'étude).
4. Si des tranches sont destinées pour des études moléculaires basées sur le PCR, être certain que toutes les tentatives sont faites pour éliminer ou minimiser la contamination d'acides nucléiques à partir de l'équipement ou de d'autres échantillons.
5. S'assurer que le type de fixation, la durée du processus et les températures utilisées durant la fixation et les procédures de sectionnement minimisent la dissimulation d'antigènes ou la détérioration des composés moléculaires.
6. S'assurer que l'épaisseur des tranches est compatible et appropriée pour l'étude visée.
7. S'assurer que les tranches ne soient pas striées ou déchirées par le couteau du microtome parce que ceci faussera l'observation microscopique et peut entraîner une coloration irrégulière ou biaiser les résultats des tests.
8. S'assurer que les minces tranches soient placées sur les lames chargées électrostatiquement pour éviter la perte de tranche durant le test.
9. S'assurer que les tranches paraffinées et congelées sont entreposées et livrées sous les conditions et les températures appropriées.

7.5 Évaluation de la qualité – convention générale de sectionnement pour sauvegarder l'assurance-qualité

L'utilisation de ce schéma est recommandé pour assurer que les tranches représentatives d'un bloc sectionné a gardé ses buts d'assurance-qualité. Exécuter ces étapes pendant que le bloc est sectionné pour une application de recherche.

1. Obtenir des tranches H&E à différentes profondeurs pour s'assurer que le tissu représentatif est présent.
2. Si aucun H&E n'est disponible à partir du dernier sectionnement du bloc, retenir une tranche "haute" pour revue H&E.
3. Si plusieurs tranches sont prises du bloc, retenir des tranches "intermédiaires" du bloc de tissu pour revue H&E. Il est recommandé de le faire à toutes les 30 tranches.
4. Couper et retenir une tranche "fond" à partir du bloc de tissu pour une revue tranche H&E. Cette tranche devient le "haut" pour une utilisation subséquente de ce bloc.
5. Étiqueter les tranches en série, commençant par 1. Indiquer également la date où la tranche est coupée.
6. Si le bloc de tissu est volumineux, des tranches pour l'assurance-qualité doivent être prises plus fréquemment pour assurer qu'elles sont représentatives du matériel fourni à la recherche. La fréquence est laissée à la discrétion du technicien et doit être jugée en accord avec la taille et la nature du bloc de tissu ou des besoins spécifiques de la recherche.

7.6 Évaluation de la qualité – Évaluation sur 3 niveaux des lames H&E.

Ces étapes assurent que le tissu tumoral apparaît suffisant, représentatif sur les lames et que le tissu semble adéquatement fixé.

1. Utiliser le système de code suivant pour évaluer la coloration H&E des lames à partir de 3 niveaux :
 - 01: ne contient pas suffisamment de cancer représentatif
 - 02: pas de cancer représentatif présent
 - 03: insuffisance de tissu pour un test
 - 04: pas de tumeur primaire présente
 - 05: contient suffisamment de cellules représentatives tumorales et d'épithélium normales pour des contrôles
2. Enregistrer toutes les évaluations.
3. Ne pas retirer les tranches correspondantes si elles ne rencontrent pas les critères des chercheurs ou de l'étude.

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
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. US National Biospecimen Network Blueprint
http://www.ndoc.org/about_ndc/reports/NBN_comment.asp
6. Jewell, S. et al. 2002, Analysis of the Molecular Quality of Human Tissues, an experience from the Cooperative Human Tissue Network. Am. J. Clin. Pathol. 118:733-741.
7. Guideline – Fresh Tissue Working Group of BIG and NCI breast cancer Cooperative Groups http://ctep.cancer.gov/forms/guidelines_fresh_tissue.pdf
8. SOP No.3 (Draft 1). November 15, 2005. Standard Tissue Sectioning. NCIC CTG. Ontario.
9. Snell L. and P. H. Watson. 2006, Breast Tissue Banking: Collection, Handling, Storage and Release of Tissue for Breast Cancer Research. Methods Mol Med. 120:3-24.
10. Recommendations of FFPE Working Group of BIG and North American breast Cancer Groups. http://ctep.cancer.gov/forms/draft_ffpe_tissue.pdf
11. Dressler, L.G. et al. 1999, Policy guidelines for the utilization of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections: the UNC SPORE experience. Breast Cancer Research and Treatment, 58: 31-39.