

Procédures normalisées de fonctionnement du RCBT			
Coloration à l'hématoxyline & éosine des sections de tissu			
Numéro du PNF:	8.3.007	Version	f1.0
Remplace:		Date d'entrée en vigueur	09 Jan 08
Objet:	Coloration à l'hématoxyline & éosine des sections de tissu	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
8.3.007	2008	LC	Traduction
8.3.007	2009	AG	Mise à jour le format.

1.0 INTENTION

Les échantillons de tissu (excédents au besoin de la pathologie) sont collectés de patients qui ont passé à travers le processus de consentement éclairé et accepté de participer au programme de banque de tumeurs. Les collections de tissus fraîchement congelés représentent une ressource importante pour la recherche. Les tissus fixés au formol, enrobés de paraffine (FFPE) et congelés (OCT) peuvent être sectionnés pour des études nécessitant la préservation de l'histo-morphologie du spécimen. La coloration des sections avec l'hématoxyline et l'éosine (H&E) est employée universellement pour l'examen microscopique des tissus. Elle facilite l'interprétation de la pathologie, de l'identification du tissu, de l'étude de la composition du tissu et du grade précis de la tumeur.

2.0 PORTÉE

Cette procédure normalisée de fonctionnement (PNF) décrit comment les sections de tissus doivent être colorées. 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: 8.3.005 Préservation du tissu: enrobage de paraffine
7. PNF du RCBT: 8.3.006 Sectionnement des tissus enrobés de paraffine et d'OCT
8. PNF du RCBT: 8.1.002 Gestion des déchets du matériel à biorisque

4.0 RÔLES ET RESPONSABILITÉ

Cette politique s'adresse à tout le personnel des banques membres du RCBT qui est responsable du sectionnement et de la coloration des tissus préservés dans des blocs de paraffine ou d'OCT.

Personnel de la banque de tumeurs	Responsabilité/rôle	Site personnel spécifique et coordonnées de contact
Technicien de laboratoire	Peut être responsable de la coloration des sections de tissus sur lames	
Technicien du laboratoire d'histologie	Peut être spécifiquement responsable du processus FFPE des tissus, du sectionnement des échantillons de paraffine et congelés(OCT) et de la coloration des sections de tissus	

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	
Éosine	
Hématoxyline de Harris (filtré)	
Xylène/Toluène	
Eau	
Éthanol	
HCl	
Flacon de Coplin pour coloration	
Portoir à lames pour coloration et séchage des lames	
Pinces	
Milieu de montage comme le Permount	
Lamelles	

Voir annexe 1 pour les détails sur la préparation des réactifs utilisés durant la procédure de coloration.

6.0 DÉFINITIONS

Tissu fixé au formol et enrobé de paraffine-«Formalin Fixed Paraffin-embedded Tissue» (FFPE): Tissu qui a été fixé au formol et par enrobage à la paraffine.

Hématoxyline: **Composé cristallin** Colorant brun tirant sur le jaune qui est extrait du cœur de l'arbre *Haematoxylum campechianum* (Formule:C₁₆ H₁₄O₆). Il est utilisé comme colorant biologique. (**Solution violette**)

Éosine: Le colorant biologique tirant sur le rouge éosine (C₂₀H₆O₅Br₄Na₂) est le plus commun contre-colorant à l'hématoxyline utilisé dans la méthode H&E.

OCT: Le 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 le tissu de la dessiccation, de la dégradation, agit comme un isolant pour les variations thermales et minimise la formation des cristaux. Il est spécialement utile pour préserver le tissu frais qui doit être sectionné.

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.

Coloration: Une procédure dans laquelle un colorant ou une combinaison de colorants et de réactifs sont utilisés pour colorer les constituants des cellules et des tissus.

7.0 PROCÉDURES

Cette procédure est destinée à s'assurer que les sections de tissus sont colorées de manière cohérente et constante. Comme il a été mentionné plus haut, les sections colorées représentent une précieuse ressource pour l'étude de la morphologie et de la structure du tissu. L'examen microscopique des sections colorées facilite l'identification de tissu et de ses composants. La constance dans la procédure est importante pour obtenir des résultats comparables et reliés aux tests. Les durées spécifiées pour les étapes dans le protocole peuvent être modifiées pour convenir aux réactifs spécifiques qui pourraient varier légèrement en force et en composition.

7.1 Coloration des sections de tissus fixés au formol et enrobés de paraffine

1. Traiter tous les tissus comme potentiellement infectieux.
2. La coloration est effectuée par un technicien de laboratoire ou d'histologie ou par du personnel formé et désigné par la banque de tumeurs.
3. Avoir le matériel, les réactifs et l'équipement prêts.
4. Prendre les sections FFPE qui ont été coupées ou des lames entreposées.
5. **Enlèvement de la cire**

Réactif	Durée
Xylène/Toluène	4 à 5 minutes avec agitation occasionnelle
Xylène/Toluène	4 à 5 minutes avec agitation occasionnelle

6. Réhydratation

Réactifs	Durée
100% Ethanol	3 minutes
100% Ethanol	3 minutes
85% Ethanol	3 minutes
70% Ethanol	3 minutes
Lavage à l'eau	4 minutes

7. Coloration

Réactifs	Durée
Hématoxyline de Harris	4 5 minutes

Lavage à l'eau courante	5 minutes
Acide- Alcool (décoloration)	1-7 bains (nombre de fois nécessaires pour décolorer au degré requis)
Lavage à l'eau courante	8 minutes
Lavage à l'ammoniaque	2 minutes
Éosine	2 minutes
Lavage à l'eau	Rinçage rapide

8. Déshydratation

Réactifs	Durée
Ethanol 70%	3 minutes
Ethanol 85%	3 minutes
Ethanol 100%	3 minutes
Nettoyer dans du xylène/toluène	3 minutes
Nettoyer dans du xylène/toluène	3 minutes

9. Recouvrir les lames avec le milieu de montage comme le Permount.

10. Résultats de la coloration:

Noyau (bleu foncé)

Cytoplasme et tissu conjonctif (nuances de roses)

7.2 Coloration des sections de tissus enrobés d'OCT *(Voir annexe 2 pour protocole alternatif équivalent)

1. La principale différence entre le protocole décrit précédemment pour les sections FFPE et celui-ci est que le tissu a tendance à décoller de la lame plus facilement durant la coloration. L'utilisation de lames adhésives pourrait diminuer ce problème. De plus, la coloration à l'éosine diminue alors que la coloration du noyau s'accroît.

2. Coloration

Réactifs	Durée
Formaline 10%	1-2 minutes
Lavage à l'eau	10-20 bains
Hématoxylin de Harris	1 minute

Lavage à l'eau	10-20 bains
Acide-Alcool (décoloration)	1 –10 bains (nombre de fois nécessaires pour décolorer au degré requis)
Eau ammoniacé	10 –20 bains
Eau courante	10 –20 bains
Éosine (1%)	30 secondes
Lavage à l'eau	Rinçage rapide

3. Déshydratation

Réactifs	Durée
Éthanol 70%	10 bains
Éthanol 85%	10 bains
Ethanol 100%	10 bains
Nettoyer dans du xylène/toluène	10 bains
Nettoyer dans du xylène/toluène	10 bains

4. Recouvrir les lames avec le milieu de montage comme le Permout.
5. Résultats de la coloration:
 - Noyau (bleu foncé)
 - Cytoplasme et tissu conjonctif (nuances de roses)

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

Annexe 1.

Eau ammoniacuée

Eau distillée 1000 mls
 Hydroxide d'ammonium concentré 2-3 mls

Acide-Alcool

1% HCl (concentré) dans éthanol 70%

Annexe 2

7.2 Coloration des sections de tissus enrobés d'OCT

1. La principale différence entre le protocole décrit précédemment pour les sections FFPE et celui-ci est que le tissu a tendance à décoller de la lame plus facilement durant la coloration. L'utilisation de lames adhésives pourrait diminuer ce problème. De plus, la coloration à l'éosine diminue alors que la coloration du noyau s'accroît.

2. Coloration

Réactifs	Durée
2 acétone/1 EtoH	10 minutes
Lavage à l'eau	10-20 bains
Hématoxylin de Harris	8 minutes
Lavage à l'eau	5 min
Acide-Alcool 1% (décoloration)	30 secondes de trempage dans de l'acide 1 % d'alcool Eau courante 1 minute
Eau ammoniacuée	30 secondes à 1 minute
Alcool 95%	10 trempages
Éosine (1%)	30 secondes
Lavage à l'eau	Rinçage rapide

3. Déshydratation

Réactifs	Durée
----------	-------

Éthanol 95%	5 minutes
Éthanol 100%	5 minutes
Ethanol 100% (nouveau)	5 minutes
Laisse sécher à l'air	5 minutes
Nettoyer dans du xylène/toluène	5 minutes
Nettoyer dans du xylène/toluène	5 minutes

4. Recouvrir les lames avec le milieu de montage comme l'Acrytol.

5. Résultats de la coloration:

Noyau (bleu foncé)

Cytoplasme et tissu conjonctif (nuances de roses)