


Procédure normalisée de fonctionnement Sectionnement des tissus enrobés de paraffine et d'OCT (Optimal Cutting Temperature)			
Numéro de PNF:	08.03.006	Version:	f2.0
Remplace:	8.3.006 f1.1	Catégorie:	Manipulation et documentation du matériel – Tissu solide
Approuvée par:	Le groupe administratif du RCBT (GAR)	01 juin 2012	
	Par: Brent Schacter 	28 juin 2012	

1.0 INTENTION

Les tissus tumoraux qui sont 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 histomorphologique des spécimens. Pour les études impliquant de l'immunohistochimie (IHC) ou de l'hybridation *in situ* (ISH), les coupes de tissus non fixés, congelés dans l'OCT peuvent être mieux appropriées. Plusieurs études utilisent aussi des coupes tissulaires 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 coupes de tissus de grande qualité de façon à rencontrer les besoins de recherche des chercheurs. Les procédures de contrôle doivent être mises en place pour surveiller et estimer la qualité et l'intégrité des coupes disponibles dans 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 coupes de tissus paraffinés et congelés.

3.0 RÉFÉRENCES À D'AUTRES PNFs OU POLITIQUES DU RCBT

Remarque: Lors de l'adoption de cette PNF pour un usage local, s'il vous plaît faire référence au RCBT.

- 3.1 *Politique du RCBT: POL 5 Registres et documentation*
- 3.2 *Politique du RCBT: POL 2 Éthique*
- 3.3 *Politique du RCBT: POL 4 Vie privée et sécurité*
- 3.4 *Politique du RCBT: POL 7 Manipulation du matériel et de l'information*
- 3.5 *Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT: SOP 08.03.003 Congélation en tube du tissu*
- 3.6 *Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT: SOP 08.03.005 Préservation du tissu – Enrobage de paraffine*
- 3.7 *Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT: SOP 05.001 Évaluation de la qualité des spécimens tissulaires*
- 3.8 *Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT: SOP 08.01.002 Gestion des déchets à biorisques*

Sectionnement des tissus enrobés de paraffine et d'OCT

4.0 RÔLES ET RESPONSABILITÉS

Cette procédure 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
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 sur 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	
Séparateur de tissu à pointe fine	
Étiquettes appropriées pour lames	
Lames de verre étiquetées	
Support pour tenir les lames	
Support à glace	
Four	
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	
Composé "Optimal Cutting Temperature Compound" (OCT)	
Hématoxyline de Harris (filtré)	
Éosine	

6.0 DÉFINITIONS

Voir le glossaire du programme du RCBT: <http://www.ctrnet.ca/glossary>

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 ainsi que 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 cliniques 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

- 7.1.1 Traiter tous les tissus comme potentiellement infectieux.
- 7.1.2 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.
- 7.1.3 Avoir le matériel et l'équipement prêts. Avoir la quantité de lames nécessaires étiquetées et prêtes.
- 7.1.4 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 coupes histologiques, de 5-10 microns pour des fins d'extraction d'acides nucléiques et jusqu'à 20 microns pour des fins d'extractions de protéines.
- 7.1.5 Pour les coupes histologiques, étiqueter les lames en série.
- 7.1.6 Faire sécher les coupes de paraffine à 37° C toute la nuit, bien que cela dépende de l'objectif visé.
- 7.1.7 Enlever les coupes du four et permettre le refroidissement à température de la pièce.
- 7.1.8 Les coupes sont entreposées pour l'expédition dans des mallettes à lames ou entreposées dans des boîtes conçues pour tenir les lames à température de la pièce. Un entreposage de longue durée (habituellement de plus de trois jours) 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.
- 7.1.9 Pour les coupes à fins d'extraction d'acides nucléiques, permettre aux coupes 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. Pour les coupes destinées aux extractions d'ADN et d'ARN, tous les instruments doivent être pré-nettoyés et essuyés avec une solution exempte d'ARNase avant et entre le travail de chaque échantillon. Des gants doivent être portés. De l'eau de grade moléculaire doit être utilisé pour faire flotter les sections destinées à l'extraction d'ARN.

Sectionnement des tissus enrobés de paraffine et d'OCT

7.2 Sectionnement du tissu enrobé d'OCT

Le sectionnement du tissu peut être dangereux et comporte un risque biologique. Le personnel sectionnant le tissu doit recevoir la formation adéquate sur l'opération de l'équipement et utiliser des mesures de précautions nécessaires.

- 7.2.1. Les coupes tissulaires congelées sont effectuées 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.
- 7.2.2. Fixer l'épaisseur des tranches à 4-5 microns pour l'immunohistochimie ainsi que pour l'hybridation *in situ* ou l'hématoxyline et éosine. Pour l'extraction d'acides nucléiques, fixer à 5-10 microns et jusqu'à 20 microns pour les échantillons destinés à l'extraction de protéines. Puisque l'OCT peut interférer dans la manipulation ultérieure des acides nucléiques, il est recommandé que dans le cas où des acides nucléiques doivent être extraits, des précautions soient prises pour éviter la contamination de l'OCT de l'échantillon.
- 7.2.3. Les coupes tissulaires sont montées sur des lames pré-refroidies en retournant la lame avec un petit angle par-dessus la coupe comme s'il s'étendait sur le dos d'un couteau. La coupe sera attirée vers la lame électrostatiquement. Toutefois la lame doit être placée à -20° C après 30 minutes à la température de la pièce. La coupe tissulaire peut aussi être fixée immédiatement dans de l'éthanol 95% froid directement après l'adhérence électrostatique à la lame et être traitée immédiatement.
- 7.2.4. Pour l'extraction d'acides nucléiques, permettre simplement à la coupe 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 puis les échantillons peuvent être traités ou entreposés à -80° C.
- 7.2.5. Lorsque le sectionnement est terminé, 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. Pour les sectionnements destinés aux extractions d'ADN ou d'ARN, tous les instruments et l'équipement doivent être pré-nettoyés et essuyés avec une solution exempte d'ARNase. Nettoyer le cryotome avec de l'éthanol 70% à l'aide d'un tampon stérile (afin de prévenir la congélation) avant et entre chaque échantillon. Des gants doivent être portés. De l'eau de grade moléculaire doit être utilisé pour faire flotter les sections destinées à l'extraction d'ARN.
- 7.2.6. Les coupes tissulaires 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 évaluer une coupe tissulaire

- 7.3.1 Au minimum, l'évaluation doit consister en une revue morphologique des coupes de tissus.
- 7.3.2 Utiliser les commentaires des chercheurs sur la qualité de la coupe pour raffiner les pratiques et les guides de procédures du contrôle de qualité.

7.4 Évaluation de la qualité – points concernant la qualité des coupes

- 7.4.1 S'assurer que du tissu représentatif reste dans le bloc après que des coupes soient préparées pour des analyses. Ne pas complètement épuiser les blocs de paraffine ou congelés.

Sectionnement des tissus enrobés de paraffine et d'OCT

- 7.4.2 S'assurer qu'il y a du matériel suffisant sur la coupe histologique pour l'essai visé sans compromettre le matériel représentatif du bloc de tissu.
 - 7.4.3 S'assurer que le tissu de chaque coupe est approprié pour le but de l'essai visé (ex : pour l'étude d'un cancer invasif, les cellules représentatives de ce type de cancer ont besoin de présenter une qualité suffisante sur toutes les coupes fournies pour l'étude).
 - 7.4.4 Si des coupes sont destinées pour des études moléculaires basées sur le PCR, s'assurer 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.
 - 7.4.5 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. Ceci est important pour certaines protéines dans des analyses comme l'immunohistochimie.
 - 7.4.6 S'assurer que l'épaisseur des coupes est compatible et appropriée pour l'étude visée.
 - 7.4.7 S'assurer que les coupes 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.
 - 7.4.8 S'assurer que les minces coupes soient placées sur les lames chargées électrostatiquement pour éviter la perte des coupes durant l'analyse.
 - 7.4.9 S'assurer que les coupes 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 recommandée pour assurer que les coupes représentatives d'un bloc sectionné conserve ses buts d'assurance-qualité. Exécuter ces étapes pendant que le bloc est sectionné pour une application de recherche.

- 7.5.1 Obtenir des coupes H&E à différentes profondeurs pour s'assurer que le tissu représentatif est présent.
- 7.5.2 Si aucun H&E n'est disponible à partir du dernier sectionnement du bloc, retenir une coupe "haute" pour revue H&E.
- 7.5.3 Si plusieurs coupes sont prises du bloc, retenir des coupes "intermédiaires" du bloc de tissu pour revue H&E.
- 7.5.4 Étiqueter les coupes de façon séquentielle. Indiquer également la date où la coupe est effectuée

8.0 RÉFÉRENCES, RÈGLEMENTS ET LIGNES DIRECTRICES

- 8.1 Déclaration d'Helsinki
<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>
- 8.2 Tri-Council Policy Statement 2; 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, December 2010.
<http://www.pre.ethics.gc.ca/eng/policy-politique/initiatives/tcps2-eptc2/Default/>
- 8.3 Human Tissue and Biological Samples for use in Research. Operational and Ethical Guidelines. Medical Research Council Ethics
<http://www.mrc.ac.uk/Utilities/Documentrecord/index.htm?d=MRC002420>

Sectionnement des tissus enrobés de paraffine et d'OCT

- 8.4 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/Search/search.asp?zoom_query=best+practices+for+repositories
- 8.5 US National Biospecimen Network Blueprint
<http://biospecimens.cancer.gov/resources/publications/reports/nbn.asp>
- 8.6 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.
- 8.7 Guideline – Fresh Tissue Working Group of BIG and NCI breast cancer Cooperative Groups
- 8.8 SOP No.3 (Draft 1). November 15, 2005. Standard Tissue Sectioning. NCIC CTG. Ontario.
- 8.9 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.
- 8.10 Recommendations of FFPE Working Group of BIG and North American breast Cancer Groups.
- 8.11 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.

9.0 ANNEXE

Aucune

10.0 HISTORIQUE DES RÉVISIONS

Numéro de PNF	Date des modifications	Auteur (Initiales)	Résumé des révisions
LP 002.001	2005	JdSH	PNF générique du RCBT pour la collecte et le traitement des tissus
8.3.006 f1.0	09-01-2008	JdSH	Révisée pour traiter spécifiquement du sectionnement des tissus préservés dans la paraffine et l'OCT (et comportant les questions d'assurance de qualité).
8.3.006 f.1.1	25-04-2009	JdSH	Étape 7.2 Ajout de l'avertissement de sécurité pour une formation adéquate et les risques biologiques avant 7.2.1.
8.3.006 f1.1	Juin 2012	CMG	<ul style="list-style-type: none"> • Grammaire et mise en page • Retrait des définitions • Historique des révisions déplacé au bas du document • Mise à jour des liens pour les références • Mise à jour des références aux PNFs • Section 2.0: Suppression du deuxième paragraphe • Section 7.1 -7.5: Révisions des sections pour détailler les procédures