


Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine des sections de tissus			
Numéro de PNF:	08.03.007	Version:	f2.0
Remplace:	8.3.007 f1.0	Catégorie:	Manipulation et documentation du matériel – Tissu solide
Approuvé par:	Le groupe administratif du RCBT (GAR)	01 mai 2012	
	Par: Brent Schacter 	26 juin 2012	

1.0 INTENTION

Les échantillons de tissu sont prélevés de patients qui ont accepté de participer au programme de banque de tumeurs après avoir passé à travers le processus de consentement éclairé. Les tissus tumoraux sont alors conservés, représentant une valeur pour des projets de recherche spécifiques. Les tissus fixés au formol, enrobés de paraffine (FFPE) ou congelés dans l'OCT peuvent être sectionnés pour des études nécessitant la préservation de l'histomorphologie de l'échantillon. 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. Si plusieurs sections sont coupées d'un bloc de tissu, la coloration H&E peut être effectuée par intervalles pour assurer une bonne représentation de la tumeur.

2.0 PORTÉE

Cette procédure normalisée de fonctionnement (PNF) décrit comment les sections de tissus doivent être colorées.

3.0 RÉFÉRENCES À D'AUTRES PNFs ET 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: PNF 08.03.005 Préservation du tissu: Enrobage de paraffine*
- 3.6 *Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT: PNF 08.03.006 Sectionnement du tissu – Tissus enrobés de paraffine et d'OCT*
- 3.7 *Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT: PNF: 08.01.002 Gestion des déchets de matériel biologique*

4.0 RÔLES ET RESPONSABILITÉS

Cette procédure 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
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 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 résistants aux solvants	
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	
Flacon de Coplin pour coloration	

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

6.0 DÉFINITIONS

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

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 des tissus et de leurs 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.

Les étapes suivantes sont basées sur les procédures utilisées à la Banque de tumeurs du sein du Manitoba.

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

7.1.1 Traiter tous les tissus comme potentiellement infectieux.

Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine des sections de tissus

- 7.1.2 La coloration est effectuée par un technicien de laboratoire ou d'histologie ou encore par du personnel formé et désigné par la banque de tumeurs.
- 7.1.3 S'assurer d'avoir le matériel, les réactifs et l'équipement prêts.
- 7.1.4 Prendre les sections FFPE qui ont été coupées ou les lames entreposées.
- 7.1.5 Enlèvement de la cire

Réactif	Durée	ÉQUIPEMENT
Xylène/Toluène	2-4 minutes avec agitation occasionnelle	Support à lames Plat pour la coloration avec couvercle, sous une hotte
Xylène/Toluène	2-4 minutes avec agitation occasionnelle	Support à lames Plat pour la coloration avec couvercle, sous une hotte

7.1.6 Réhydratation

Réactifs	Durée	ÉQUIPEMENT
Éthanol 100%	2 minutes	Support à lames Plat pour la coloration
Éthanol 100%	2 minutes	Support à lames Plat pour la coloration
Éthanol 85%	2 minutes	Support à lames Plat pour la coloration
Éthanol 70%	2 minutes	Support à lames Plat pour la coloration
Lavage à l'eau sous faible débit	5 minutes	Support à lames

7.1.7 Coloration

Réactifs	Durée
Hématoxyline de Harris	4 minutes
Lavage à l'eau sous faible débit	5 minutes
Acide-alcool (HCL 1% dans éthanol 95%) (décoloration)	1-5 bains (nombre de fois nécessaires pour décolorer au degré requis)
Lavage à l'eau sous faible débit	8 minutes

Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine des sections de tissus

Lavage à l'ammoniaque	2 minutes
Lavage à l'eau sous faible débit	5 minutes
Éosine	2 minutes

7.1.8 Déshydratation

Réactifs	Durée
Éthanol 70%	5-10 bains
Éthanol 85-95%	10 bains
Éthanol 100%	2 minutes
Nettoyer dans du xylène/toluène	2 minutes
Nettoyer dans du xylène/toluène	2 minutes

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

7.1.10 Résultats de la coloration:

- Noyau (bleu foncé)
- Cytoplasme et tissu conjonctif (nuances de roses)

7.2 Coloration des sections de tissus enrobés d'OCT

7.2.1 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.

7.2.2 Coloration

Réactifs	Durée
Si utilisation de Éthanol 95%	1-2 minutes
Éthanol 70%	1-2 minutes
Lavage à l'eau sous faible débit	1-2 minutes
Hématoxyline de Harris	30 secondes
Lavage à l'eau sous faible débit	1-2 minutes
Acide-alcool (décoloration)	1-2 bains (nombre de fois nécessaires pour décolorer au degré requis)*
Lavage à l'eau sous faible débit	1-2 minutes
Eau ammoniacé	60 secondes
Lavage à l'eau sous faible débit	1-2 minutes
Éthanol 70%	1 minute
Éthanol 95%	1 minute

Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine des sections de tissus

Éosine (1%)	30 secondes
-------------	-------------

***Lors du trempage, procéder très doucement afin de minimiser la perte de sections.**

7.2.3 Déshydratation

Réactifs	Durée
Éthanol 70%	5 bains*
Éthanol 85%	10 bains*
Éthanol 100%	1 min
Éthanol 100%	1 min
Nettoyer dans du xylène/toluène	2 minutes
Nettoyer dans du xylène/toluène	2 minutes

*** Lors du trempage, procéder très doucement afin de minimiser la perte de sections.**

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

7.2.5 Résultats de la coloration:

- Noyau (bleu foncé)
- Cytoplasme et tissu conjonctif (nuances de roses)

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>
- 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.

9.0 ANNEXE

- 9.1 Annexe A - Concentrations

10.0 HISTORIQUE DES RÉVISIONS

Numéro de PNF	Date des modifications	Auteur (Initiales)	Résumé des révisions
8.3.007	Jan 2008	JdSH	version initiale
8.3.007 f1.0	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 7.0: Ajout: "Les étapes suivante..." • Section 7.1.5 & 7.1.6 Tableaux révisés pour inclure la colonne des équipements. • Section 7.2.2 - Tableau révisé. • Section 5: Ajout de l'éosine au tableau • Suppression de la première moitié de la section 7.2.2 (redondant)

CONCENTRATIONS

Eau ammoniacalé

Eau du robinet	1000 mls
Hydroxyde d'ammonium concentré	2-3 mls

Acide-Alcool

HCl 1% (concentré) dans éthanol 70%