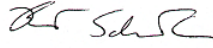


TMA à partir de tissu enrobé de paraffine

Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT Micro-étalage tissulaire (TMA) à partir de tissu enrobé de paraffine			
Numéro de PNF:	08.03.010	Version:	f2.0
Remplace:	8.3.010 f1.0	Catégorie:	Manipulation et documentation du matériel – Tissu solide
Approuvée par:	Le groupe administratif du RCBT	01 juin 2012	
	Par: Brent Schacter 	28 juin 2012	

1.0 INTENTION

Les tissus fixés dans la formaldéhyde et enrobés de paraffine (FFPE-«Formaldehyde fixed and paraffin embedded») peuvent être sectionnés pour des études nécessitant une préservation histomorphologique. La conservation de la ressource que représentent les tissus est importante pour maximiser le nombre d'études qui peuvent être réalisées. Les micro-étalages tissulaires (TMAs-«Tissue Micro Arrays») représentent une méthode de conservation pratique des échantillons de tissus en plus de fournir un bon rapport coût-efficacité. Ils sont utilisés pour les études moléculaires et immunohistochimiques et représentent un outil précieux pour l'évaluation du matériel biologique de patients. L'intention de ce document est de tracer les procédures normalisées pour les banques du RCBT afin de suivre la création des TMAs à partir des blocs de tissus enrobés de paraffine.

2.0 PORTÉE

Cette procédure normalisée de fonctionnement (PNF) décrit comment les TMAs doivent être construits à partir des blocs de tissus FFPE. 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 biorisques des institutions.

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: PNF 08.03.005 Préservation du tissu: Enrobage de paraffine*
- 3.6 *Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT: PNF 08.01.002 Gestion des déchets du matériel à biorisques*
- 3.7 *Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT: PNF 09.004 Requête et attribution du matériel*

4.0 RÔLES ET RESPONSABILITÉS

Cette politique s'adresse à tout le personnel des banques membres du RCBT qui est responsable de la création des TMA à partir des blocs de tissus FFPE.

Personnel de la banque de tumeurs	Responsabilité/rôle
Technicien de laboratoire /Technicien du laboratoire d'histopathologie	Responsable d'organiser les blocs, de créer un modèle et de construire le MTA.
Pathologiste	Lire les lames et les sections de blocs choisies pour être carottées.

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	
Microtome	
Bain d'eau chaude (fixé à 40-45°C)	
Lames de microtome	
Manuel d'instructions pour l'étaleur de tissu	
Poinçons avec stylets (0.6- 2 mm en diamètre)	
Récipient pour tenir les blocs	
Pont pour bloc donneur	
Support pour tenir les lames	
Outil pour ajuster l'étaleur	
Four (fixé à 50-52°C)	
Étiquettes appropriées pour les lames	
Lames étiquetées chargées électrostatiquement (comme les «Superfrost Plus»)	
Support pour tenir les blocs à être carottés	
Support pour tenir les blocs qui ont été carottés	
Boîte d'entreposage et/ou d'expédition de lames	

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 sont préservés pour les multiples projets de recherche et sont sectionnés de manière sécuritaire et efficace tout en éliminant les risques de contamination et de perte d'intégrité moléculaire et structurale. L'utilisation des TMAs fournit l'avantage de peut permettre le développement de la standardisation des tests.

La conformité dans la procédure est importante pour obtenir des résultats comparables et les associer à des tests.

7.1 Production d'un TMA – Collecte des blocs et de l'information

- 7.1.1 Traiter tous les tissus comme potentiellement infectieux.
- 7.1.2 Afin d'éliminer le gaspillage de la ressource que représente le tissu, la production d'un TMA est effectuée uniquement par des techniciens expérimentés de laboratoire ou d'histologie ou du personnel formé et désigné par la banque de tumeurs.
- 7.1.3 Avoir le matériel et l'équipement prêts.
- 7.1.4 Rassembler les lames H&E pour tous les cas que le pathologiste aura à lire.
- 7.1.5 Déterminer pour chaque bloc si l'épaisseur du tissu dans le bloc est encore suffisante pour utiliser un bloc receveur TMA.
- 7.1.6 Recueillir l'information nécessaire pour l'étude du cas et du diagnostic à partir des données archivées.

7.2 Production d'un TMA – Révision des blocs

- 7.2.1 Le pathologiste doit examiner les lames/blocs de tissu et marquer les zones qui sont appropriées pour représenter la tumeur dont le bloc est associé à l'étude. Un fin marqueur feutre à l'épreuve de l'eau est utilisé pour marquer les lames.
- 7.2.2 Les zones marquées sont appariées aux blocs de paraffine correspondants.
- 7.2.3 Ces mêmes zones sont alors marquées sur le bloc de paraffine en utilisant un marqueur feutre médium, en prenant soin de ne pas endommager la surface du bloc par l'application d'une pression excessive. Ceci marque la zone où la carotte devra être prélevée du bloc donneur.

7.3 Production d'un TMA – Création d'un modèle

- 7.3.1 Utiliser un logiciel tableur comme Microsoft Excel pour cartographier le modèle du TMA. Concevoir une carte pour bien accommoder la variété de cas, le nombre d'échantillons, l'appariement avec le tissu normal, le but de l'étalage, etc. Une disposition standard pour un étalage avec des carottes de 0.6mm devrait comprendre une grille de 10 X 6 carottes qui peut être répétée plusieurs fois (secteurs) pour entrer dans l'espace disponible dans le bloc receveur.
- 7.3.2 Tous les cas sur l'étalage devraient être positionnés au hasard pour éviter le biais provenant des artefacts de coloration IHC et ceux introduits par des connaissances antérieures de paramètres de cas.
- 7.3.3 Une bonne pratique est d'insérer des carottes reconnaissables à des positions indicatrices. Par exemple, utiliser des carottes d'un tissu de foie coloré au mercurochrome au début (1 carotte) et à la fin (3 carottes) des carottes expérimentales pour sécuriser l'orientation et assurer l'identification correcte du cas.

TMA à partir de tissu enrobé de paraffine

7.3.4 Imprimer la feuille de travail. Ceci devient la carte de l'étalage.

7.4 Production d'un TMA – Bloc receveur

- 7.4.1 Faire un grand bloc de paraffine vierge (25 mm x 37 mm) en utilisant une cassette de 15mm de profondeur ou plus.
- 7.4.2 Vérifier ce nouveau bloc pour les bulles d'air et s'assurer que le bloc est fermement attaché à la cassette.
- 7.4.3 Rassembler tous les blocs à être carottés et les placer en rangées ordonnées sur le support. L'ordre des blocs sur le support devrait représenter l'ordre des carottes dans le TMA.
- 7.4.4 En utilisant un étaleur de tissu, mesurer et marquer doucement sur la surface du bloc receveur les quatre coins de l'étalage pour assurer un bon ajustement. Les bords de l'étalage devraient s'ajuster au moins à 4mm du bord du bloc receveur.
- 7.4.5 Créer le TMA en utilisant le manuel d'instructions de l'étaleur de tissu en suivant le protocole décrit.
- 7.4.6 À chaque carotte placée dans le bloc receveur, le numéro d'identification du bloc devrait être noté sur la carte de l'étalage. Le numéro doit être pris directement à partir du bloc FFPE pour s'assurer que la carte est une représentation exacte du bloc actuel et non la carte d'un bloc pré-planifié. Après que le bloc FFPE ait été utilisé, retourner le bloc dans la boîte dans le même ordre que celui utilisé pour produire le bloc receveur. Ce système évitera la confusion comme le numéro du bloc et ainsi l'ordre dans la boîte d'entreposage peut être utilisé pour vérifier la position du TMA.

7.5 Production d'un TMA - Sectionnement

- 7.5.1 Sectionner avec un nouveau couteau de microtome.
- 7.5.2 Couper les sections à 5 µm ou moins (2-3 µm).
- 7.5.3 Laisser flotter les sections dans un bain d'eau distillée. Fixer la température du bain d'eau à pas plus que 5° C sous la température de fonte de la paraffine utilisée dans la construction de l'étalage. Pour éviter l'inversion des sections sur la lame de microscope, s'assurer que les sections flottent "face en dessus".
- 7.5.4 Enlever les sections après 5-20 secondes dans le bain d'eau et monter sur des lames chargées électrostatiquement (ex. les Superfrost plus). Faire attention à l'orientation de l'étalage à cette étape.
- 7.5.5 Laisser sécher les lames toute la nuit à température de pièce et les fixer pendant 20 minutes à 50° C avant de les entreposer.

7.6 Entreposage des TMAs

- 7.6.1 Plusieurs antigènes requièrent une protection plus importante contre l'oxydation et peuvent nécessiter l'utilisation de coupes de TMA fraîchement coupées.
- 7.6.2 Garder un récipient de paraffine fondue dans un incubateur à 60° C.
- 7.6.3 Tremper une fois et rapidement la lame séchée à l'air dans la paraffine.
- 7.6.4 Placer la lame sur une surface plate et laisser refroidir.
- 7.6.5 Les lames peuvent être entreposées dans des boîtes avec support à température de pièce pour de grandes périodes de temps. Limiter l'exposition à des variations de température et d'humidité.

TMA à partir de tissu enrobé de paraffine

- 7.6.6 Les lames non-paraffinées et non-protégées peuvent être gardées à 4° C jusqu'à 2 mois dans une boîte standard pour microlames et sont suffisantes pour plusieurs antigènes.
- 7.6.7 Enregistrer l'emplacement de l'entreposage.

7.7 Attribution des TMAs

- 7.7.1 Les TMAs contiennent du matériel biologique humain et leur attribution à des fins de recherche doit suivre les procédures décrites dans le PNF du RCBT 09.004: *Requête et attribution du matériel*.

8.0 RÉFÉRENCES, RÈGLEMENT 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 Milanes-Yearsley, M. et al. Tissue Micro-Array: A cost and Time-Effective Method for Correlative Studies by Regional and National Cancer Study Groups. *Mod Pathol* 2002;15(12):1366-1373.
- 8.7 Guideline – Fresh Tissue Working Group of BIG and NCI breast cancer Cooperative Groups
- 8.8 SOP No.1 (Draft 1). June 13, 2005. Tissue Microarray Construction. NCIC CTG. Ontario.
- 8.9 TMA Generation SOP. Manitoba Breast Tumour Bank.
- 8.10 Recommendations of FFPE Working Group of BIG and North American breast Cancer Groups.
- 8.11 Yale Tissue Microarray Construction Protocols: Version 1.0, 1/2001.
http://www.yalepath.org/dept/research/YCCTMA/YTMA_protocol.pdf

9.0 ANNEXE

Aucune

10.0 HISTORIQUE DES RÉVISIONS

Numéros des PNFs	Dates des modifications	Auteurs	Résumé des modifications
FS 002.001	2005	JdSH	PNF générique du RCBT pour la collecte et le traitement des tissus
8.3.010	2008	JM JdSH	Révisée pour traiter spécifiquement de la création d'un TMA à partir de blocs de tissus enrobés de paraffine
8.3.010 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 7.5.1-Révision de la section 7.5.3.