

Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT			
Préservation des tissus: congélation dans OCT			
Numéro de PNF:	8.3.004	Version	f1.0
Remplace:	LP 002.001	Date d'entrée en vigueur	
Objet:	Congélation des tissus dans l'OCT	Catégorie	Manipulation et documentation du matériel

Préparée par:		Jean de Sousa-Hitzler		
	Signature	Nom	Titre	jjmmaa
Approuvée par:		Peter Geary	CEO	
	Signature	Nom	Titre	jjmmaa
Approuvée par:				
	Signature	Nom	Titre	jjmmaa

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 tumoraux
8.3.004	2008	JdSH	Réviser pour couvrir seulement la congélation des tissus par OCT
8.3.004 f1.0	2008	LC	Traduction française de 8.3.004 e1.0

1.0 INTENTION

Les échantillons de tissus (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 tumoraux conviennent aux études protéomiques et génomiques seulement s'ils ont été cryopréservés dans un temps et de manière appropriés. L'OCT est un composé adéquat pour préserver l'ultrastructure cellulaire (histologie) aussi bien que les acides nucléiques. L'intention de ce document est de tracer les grandes lignes des procédures normalisées pour les banques du RCBT afin de suivre la congélation des tissus dans l'OCT.

2.0 PORTÉE

Cette procédure normalisée de fonctionnement (PNF) décrit comment les tissus sont congelés dans l'OCT. 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: LP 002.001 PNF générique du RCBT pour la collecte et le traitement des tissus
6. PNF du RCBT: 8.3.001 Collecte et transport du tissu vers la pathologie
7. PNF du RCBT: 8.3.002 Cueillette des tissus
8. 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 de la congélation dans l'OCT des tissus collectés.

Personnel de la banque de tumeurs	Responsabilité/rôle	Site personnel spécifique et coordonnées de contact
Assistant pathologiste	Assister la résection et le transport du tissu. Peut communiquer avec le technicien du laboratoire.	
Technicien de laboratoire	Transport et traitement du tissu tumoral	

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)

Contenant avec glace sèche (pour le transport du tissu congelé)	
Marqueurs, encre et crayons	
Pinces propres	
Scalpels propres pour le découpage du tissu	
Milieu de congélation OCT (Optimal Cutting Temperature)	
Azote liquide	
2-Methylbutane (isopentane)	
Contenant pour isopentane	
Cryotubes étiquetés pour l'entreposage des tissus congelés (couvercle vissé)	
Cryomoules en plastique (comme le Tissue-Tek :#4557)	
Petits sacs «zip lock» étiquetés pour l'entreposage des cryomoules	
Suffisamment d'étiquettes appropriées (voir PNF # 8.1.001) pour cryotubes, moules et sacs de plastique.	
Contenant d'entreposage pour les cryomoules	
Glace sèche ou vase de Dewar pour le transport de l'azote liquide	
Unité de récupération pour les aiguilles/objets tranchants	
Gants jetables pour protéger le personnel qui manipule le tissu	
Verres de sécurité pour le personnel manipulant les réservoirs d'azote liquide et les contenants d'entreposage	
Gants isolants pour la manipulation des réservoirs d'azote liquide et des contenants d'entreposage.	
Recouvrements «underpads» propres pour couvrir la surface de travail	
Feuille de travail pour la collecte/traitement du tissu (Voir annexe 1 pour le formulaire pour un échantillon)	

6.0 DÉFINITIONS ET ABRÉVIATIONS

Cryopréservation: Un processus pour entreposer du matériel biologique à très basse température.

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.

7.0 PROCÉDURES

Cette procédure a été développée pour s'assurer que les échantillons de tissus obtenus des participants consentants sont traités de manière sécuritaire et efficace tout en éliminant les risques de contamination. Afin de faciliter l'utilisation des techniques innovatrices en génomique et en protéomique, la congélation adéquate des tissus mis en banque est primordiale pour obtenir des produits avec une haute qualité et intégrité.

7.1 Congélation du tissu dans l'OCT

1. Traiter tous les tissus comme potentiellement infectieux.
2. La congélation doit être effectuée par un technicien de laboratoire ou du personnel formé et désigné par la banque de tumeurs.
3. Avoir le matériel et l'équipement prêts. Avoir la quantité nécessaire de cryotubes et de cryomoules étiquetés et prêts.
4. À moins d'avoir l'intention d'utiliser une autre méthode de préservation, le tissu tumoral frais doit être congelé le plus rapidement possible. De façon optimale, le tissu doit être congelé dans les 30 minutes suivant la résection.
5. Ne pas congeler le tissu directement sur la glace.
6. S'assurer que le tissu prélevé ne se dessèche jamais ou ne soit contaminé avec les tissus environnants ou avec d'autres échantillons. Utiliser des scalpels et des pinces propres entre les échantillons afin d'éviter la contamination croisée entre les échantillons ou entre la tumeur et le tissu normal.
7. Les tissus rapidement congelés sont appropriés à la préparation d'ADN et d'ARN. Il est spécifiquement utile de préserver le tissu frais à l'intention de l'histopathologie quand l'information morphologique est importante. Ne pas placer l'échantillon en contact avec du formol à aucun moment du processus. Ne pas ajouter de sérum à l'échantillon.
8. Refroidir l'isopentane en suspendant le contenant (50ml) d'isopentane dans l'azote liquide. L'isopentane est suffisamment refroidi quand des "perles" se forment et que la solution devient trouble
9. Placer quelques gouttes du composé OCT dans le cryomoule en plastique pré-étiqueté.
10. Avec des pinces propres, placer le spécimen à être congelé dans l'OCT, dans le moule. Si pertinent pour le type de spécimen tumoral, orienter le tissu dans le cryomoule.
11. Ajouter plus d'OCT pour couvrir le tissu et remplir le moule.
12. Utiliser des pinces ou une pipette de transfert pour orienter le tissu et enlever les bulles d'air.

13. Éviter d'introduire des bulles d'air dans l'OCT. Enlever toutes bulles d'air qui pourraient se retrouver autour du tissu.
14. Placer le cryomoule dans un petit récipient, contenant de l'isopentane pré-refroidi.
15. Submerger le moule dans l'isopentane jusqu'à ce que l'OCT soit complètement congelé (blanc et solide).
16. Le cryomoule ou le cryotube contenant le tissu et l'OCT peut être congelé directement dans l'azote liquide sans l'étape de l'isopentane. Tenir le tube ou le cryotube avec des pinces et immerger doucement le moule dans l'azote liquide contenu dans un contenant de transport permettant la congélation à partir du bas du cryotube ou du tube.
17. Enlever le moule de l'azote liquide.
18. Placer le moule dans un petit sac «zip-lock» étiqueté et placer le sac scellé sur glace sèche.
19. Transporter les sacs ou les tubes sur glace sèche et entreposer à -80° C ou à une température plus basse.
20. Enregistrer l'emplacement de l'entreposage.
21. Enregistrer le moment de l'entreposage sur la feuille de travail pour la collecte et le traitement du tissu (voir annexe 1). Déterminer le temps écoulé entre la résection et la congélation et enregistrer ces informations le plus précisément possible. Au minimum, enregistrer le temps approximatif (au 15 minutes près) à partir de la résection jusqu'à ce que le tissu soit congelé (ex : à l'intérieur de 30minutes, entre 30 et 45 minutes etc.).

8.0 RÉFÉRENCES APPLICABLES, RÈGLEMENTS ET LIGNES DIRECTRICES

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. National Bioethics Advisory Commission: Research involving human biological materials: Ethical issues and policy guidance, Vol. I: Report and recommendations of the National Bioethics Advisory Committee. August 1999.
<http://bioethics.georgetown.edu/nbac/hbm.pdf>
6. US National Biospecimen Network Blueprint
http://www.ndoc.org/about_ndc/reports/NBN_comment.asp
7. 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. Guideline – Fresh Tissue Working Group of BIG and NCI breast cancer Cooperative Groups http://ctep.cancer.gov/forms/guidelines_fresh_tissue.pdf
9. SOP-PRO-Tissue-freezing.02, Oct 3, 2006. Freezing of Prostate Tissues. Procure Quebec Prostate Cancer Biobank.

ANNEXE 1.

La feuille de travail de la collecte des échantillons peut être élaborée par les personnes aux sites spécifiques pour accéder à l'information pertinente ce site.

Ce qui suit peut être utilisé comme guide pour retenir les informations à être enregistrées

Collecte et transport des tissus

Lieu de collecte	
Date de résection de la tumeur	
Heure de la résection de la tumeur	
Date de la réception de l'échantillon au laboratoire de pathologie	
Heure de la réception de l'échantillon au laboratoire de pathologie	
Nom de la personne qui a transporté le tissu	
L'échantillon a-t-il été transporté sur glace?	OUI NON
Pathologiste (Nom)	
Notes de collecte additionnelles:	

Information sur l'échantillon

Étiquette (Identifiant unique)	Type de tissu	Le tissu normal correspondant était-il disponible et a-t-il été pris?	Taille de la tumeur	Observation sur le tissu

Cueillette du tissu

Décongelé par: Nom du technicien

Heure et date de la cueillette: Très important d'enregistrer cette information

Indiquer si le tissu a été pris par:

1. Collecte de tissu fraîchement congelé.

Étiquette (identifiant)	Congelé dans tube par :	Date de la congélation	Heure de la congélation	Taille de l'échantillon	Emplacement de l'entreposage

