

<b>Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT TMAs à partir de blocs de tissus enrobés de paraffine</b>			
Numéro de PNF:	8.3.010	Version	f1.0
Remplace:	LP 002.001	Date d'entrée en vigueur	09 janv 2008
Objet:	TMAs à partir de blocs de tissus enrobés de paraffine	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	PDF générique du RCBT pour la collecte et le traitement des tissus
8.3.010	2008	JdSH	Révisée pour traiter spécifiquement de la création de TMAs à partir de blocs de tissus enrobés de paraffine
8.3.010 f1.0	2008	LC	Traduction française de 8.3.010 e1.0

## 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 pratiques 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 tissu 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 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: 8.3.005 Préservation des Tissus: Enrobage de paraffine
7. PNF du RCBT: 8.1.002 Gestion des déchets du matériel à biorisque
8. PNF du RCBT: 9.1.004 Requête et transfert de 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 TMAs à partir des blocs de tissus FFPE.

<b>Personnel de la banque de tumeurs</b>	<b>Responsabilité/rôle</b>	<b>Site personnel spécifique et coordonnées de contact</b>
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 choisis 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.

<b>Matériel et équipement</b>	<b>Matériel et équipement</b>
-------------------------------	-------------------------------

	(spécifiques au site)
Marqueurs, encre et crayons	
Microtome	
Bain d'eau chaude (fixé à 40-45°C)	
Lames de microtome	
Étaleur manuel 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 ET ABRÉVIATIONS

**Tissu «Formalin Fixed Paraffin-embedded» (FFPE):** Tissu qui a été fixé au formol et dans la paraffine

**H&E:** Hématoxyline et éosine

**Microtome:** Appareil utilisé pour couper des sections à partir d'un bloc placé sur lame.

**Micro-étalage de tissus-Tissue Micro Arrays (TMAs):** Des dizaines, des centaines ou des milliers de carottes de tissus FFPE ou de biopsies sont disposées sur un seul bloc de paraffine pour représenter le tissu à partir des archives pathologiques des résections chirurgicales. Les blocs sont sectionnés pour créer des sections de 2-4 µm qui sont par la suite fixées sur des lames de microscope chargées électrostatiquement. Cette performante technologie peut être utilisée pour augmenter la capacité d'analyse des protéines, de l'expression génique ou autre essais moléculaires sur un grand nombre d'échantillons de tissus. Les TMAs fournissent un moyen innovateur pour conserver le tissu puisque 1 à 3 carottes tissulaires sont suffisantes pour représenter un bloc de tissu FFPE entier. Les TMAs peuvent aussi bien être faits à partir des carottes de tissu dans l'OCT.

**Bloc receveur:** Bloc de paraffine vide dans lequel les carottes de tissus sont insérées pour créer le TMA.

**Bloc donneur:** Bloc contenant le tissu du patient à être carotté et déposé dans ce bloc.

## **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 potentiellement 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. Les étapes suivantes sont basées sur des procédures suivies par la Banque de cancer du sein du Manitoba et par le Réseau de recherche sur le cancer du Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ).

### **7.1 Production d'un TMA – collecte des blocs et information**

1. Traiter tous les tissus comme potentiellement infectieux.
2. Pour 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.
3. Avoir le matériel et l'équipement prêts.
4. Rassembler les lames H&E pour tous les cas que le pathologiste lira.
5. Déterminer pour chaque bloc si l'épaisseur du tissu dans le bloc est encore suffisante pour utiliser un bloc receveur TMA.
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**

1. Le pathologiste examine les lames/blocs de tissu et marque 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.
2. Les zones marquées sont appariées aux blocs de paraffine correspondants.
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**

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'étagage, etc. Une disposition standard pour un étagage 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.
2. Tous les cas sur l'étagage 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.
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.
4. Imprimer la feuille de travail. Ceci devient la carte de l'étagage.

#### **7.4 Production d'un TMA – bloc receveur**

1. Faire un grand bloc de paraffine vierge (25 mm x 37 mm) en utilisant une cassette de 15mm de profondeur ou plus.
2. Vérifier ce nouveau bloc pour les bulles d'air et s'assurer que le bloc est fermement attaché à la cassette.
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.
4. En utilisant un étaleur de tissu, mesurer et marquer doucement sur la surface du bloc receveur les quatre coins de l'étagage pour assurer un bon ajustement. Les bords de l'étagage devraient s'ajuster au moins à 4mm du bord du bloc receveur.
5. Créer le TMA en utilisant un étaleur de tissu manuel en suivant les procédures manufacturières.
6. À chaque carotte placée dans le bloc receveur, le numéro d'identification du bloc devrait être noté sur la carte de l'étagage. 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 l'ordre dans la boîte d'entreposage peut être utilisé pour vérifier la position du TMA.

#### **7.5 Production d'un TMA - Sectionnement**

1. Découper le bloc à être sectionné. Il peut être utile d'avoir un microtome dédié qui est utilisé avec une lame fixe pour bloquer l'orientation afin de couper tous les étalages

de tissu. Ceci permet de multiples sectionnements du même bloc sans perte de tissu durant l'alignement de la lame et du bloc.

2. Sectionner avec un nouveau couteau de microtome.
3. Couper les sections à 5 µm ou moins (2-3 µm).
4. 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".
5. 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.
6. Laisser sécher les lames toute la nuit à température de pièce et les faire cuire pendant 20 minutes à 50° C avant de les entreposer.

### **7.6 Entreposage des TMAs**

1. Plusieurs antigènes requièrent une protection plus importante contre l'oxydation et peuvent nécessiter l'utilisation de coupes de TMA fraîchement coupées.
2. Garder un récipient de paraffine fondue dans un incubateur à 60° C.
3. Tremper rapidement la lame séchée à l'air dans la paraffine une fois.
4. Placer la lame sur une surface plate et laisser refroidir.
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.
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. Enregistrer l'emplacement de l'entreposage.

### **7.7 Transfert des TMAs**

1. Noter que les TMAs contiennent du matériel biologique humain et le transfert des TMAs à des fins de recherche doit suivre les procédures décrites dans le PNF du RCBT 9.1.004 pour la requête et le transfert du matériel.

## **8.0 RÉFÉRENCES, 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](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](http://www.ndoc.org/about_ndc/reports/NBN_comment.asp)
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.
7. Guideline – Fresh Tissue Working Group of BIG and NCI breast cancer Cooperative Groups [http://ctep.cancer.gov/forms/guidelines\\_fresh\\_tissue.pdf](http://ctep.cancer.gov/forms/guidelines_fresh_tissue.pdf)
8. SOP No.1 (Draft 1). June 13, 2005. Tissue Microarray Construction. NCIC CTG. Ontario.
9. TMA Generation SOP. Manitoba Breast Tumor Bank.
10. Recommendations of FFPE Working Group of BIG and North American breast Cancer Groups. [http://ctep.cancer.gov/forms/draft\\_ffpe\\_tissue.pdf](http://ctep.cancer.gov/forms/draft_ffpe_tissue.pdf)
11. Yale Tissue Microarray Construction Protocols: Version 1.0, 1/2001. [http://www.yalepath.org/dept/research/YCCTMA/YTMA\\_protocol.pdf](http://www.yalepath.org/dept/research/YCCTMA/YTMA_protocol.pdf)