NORME INTERNATIONALE

ISO 20166-2

Première édition
2018-12

Analyses de diagnostic moléculaire in vitro — Spécifications relatives aux processus préanalytiques pour les tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE) —

Partie 2: Protéines extraites

Molecular in vitro diagnostic examinations — Specifications for pre-examinations processes for formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue —

Part 2: Isolated proteins

Numéro de référence
ISO 20166-2:2018(F)

© ISO 2018



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2018

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Genève
Tél.: +41 22 749 01 11
Fax: +41 22 749 09 47
E-mail: copyright@iso.org
Web: www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos ..... **iv**
Introduction ..... **v**
1 Domaine d'application **1**
2 Références normatives **1**
3 Termes et définitions **1**
4 Considérations générales **5**
5 Hors du laboratoire **6**
5.1 Recueil des prélèvements 6
5.1.1 Généralités 6
5.1.2 Informations relatives au donneur/patient 6
5.1.3 Informations relatives au prélèvement 6
5.1.4 Traitement du prélèvement 7
5.2 Exigences de transport 7
6 Dans le laboratoire **8**
6.1 Informations relatives à la réception des prélèvements 8
6.2 Fixation au formol du prélèvement ou de l'échantillon 8
6.3 Évaluation de la pathologie du prélèvement et sélection du ou des échantillons 9
6.4 Post-fixation d'échantillons congelés 10
6.5 Traitement et inclusion en paraffine 11
6.6 Exigences relatives au stockage 11
6.7 Extraction des protéines totales 12
6.7.1 Généralités 12
6.7.2 Informations générales relatives aux protocoles d'extraction de protéines 12
6.7.3 Utilisation de kits commerciaux 12
6.7.4 Utilisation des protocoles propres aux laboratoires 13
6.8 Évaluation qualitative des protéines extraites 14
6.9 Stockage des protéines totales extraites 14
Annexe A (informative) **L'analyse de protéines démontre les variations de quantités de protéines pendant l'ischémie froide** **16**
Bibliographie **20**

© ISO 2018 – Tous droits réservés

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est attirée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: www.iso.org/iso/fr/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 212, *Laboratoires d'analyses de biologie médicale et systèmes de diagnostic in vitro*.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.

Une liste de toutes les parties de la série ISO 20166 se trouve sur le site web de l'ISO.

© ISO 2018 – Tous droits réservés

Introduction

Le diagnostic moléculaire in vitro, y compris la pathologie moléculaire, a permis de faire considérablement progresser la médecine. D'autres avancées sont attendues avec les nouvelles technologies d'analyse des acides nucléiques, des protéines et des métabolites dans les tissus humains et les fluides corporels. Toutefois, les profils et/ou l'intégrité de ces molécules peuvent varier considérablement au cours du prélèvement des échantillons primaires, du transport, du stockage et du traitement, et engendrer ainsi un résultat de diagnostic ou de recherche peu fiable, voire impossible, car l'analyse subséquente ne déterminera pas l'état du patient, mais un motif moléculaire artificiel généré pendant le processus préanalytique.

Bien que l'extraction de protéines ait initialement été considérée comme impossible en raison des activités de pontage du formaldéhyde, les techniques d'extraction de protéines de tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE) ont connu une amélioration considérable au cours des dernières années. L'inversion induite par la chaleur des pontages induits par le formaldéhyde a été démontrée comme étant une étape essentielle des protocoles d'extraction des protéines[5][6]. À l'heure actuelle, la plupart des chercheurs reconnaissent que les protéines extraites de tissus FFPE sont adaptées aux analyses protéomiques en aval[7].

Les profils protéiques, l'intégrité des protéines et les interactions protéine-protéine dans les tissus peuvent considérablement varier avant, pendant et après le prélèvement (par exemple, en raison de l'induction de gènes, de la régulation à la baisse de l'expression de gènes ou de la dégradation des protéines). Les quantités d'espèces protéiques peuvent varier différemment dans les tissus de différents donneurs/patients. L'expression des gènes peut être influencée par le traitement donné ou l'intervention réalisée (chirurgie, biopsie) ou par les médicaments administrés pour l'anesthésie, voire même pour le traitement d'une maladie concomitante, ainsi que par les différentes conditions environnementales après le prélèvement du tissu sur l'organisme.

En outre, les processus de fixation au formol et d'inclusion en paraffine conduisent à des modifications des molécules de protéines, ce qui peut avoir un impact sur la validité et la fiabilité des résultats d'essais analytiques.

Il est donc essentiel de prendre des mesures particulières afin de réduire le plus possible, au sein des tissus, les changements et modifications de profil protéique décrits, pour l'analyse ultérieure.

Une normalisation de l'ensemble du processus, allant du prélèvement des échantillons primaires jusqu'à l'analyse des protéines, est nécessaire. Des études ont été réalisées afin de définir les facteurs ayant un impact important. Le présent document se fonde sur ces travaux pour codifier et normaliser les étapes des processus dits de la phase préanalytique pour tissus FFPE au regard de l'analyse des protéines.

Dans le présent document, les formes verbales suivantes sont utilisées:

— «doit» indique une exigence;

— «il convient de/que» indique une recommandation;

— «peut/il est admis/permis» indique une autorisation;

— «peut/il est possible» indique une possibilité ou une capacité.

© ISO 2018 – Tous droits réservés

Analyses de diagnostic moléculaire in vitro — Spécifications relatives aux processus préanalytiques pour les tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE) —

Partie 2: Protéines extraites

1 Domaine d'application

Le présent document fournit des lignes directrices concernant la manipulation, la documentation, le stockage et le traitement de prélèvements de tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE) destinés à l'analyse des protéines extraites durant la phase préanalytique précédant la réalisation d'une analyse moléculaire.

Le présent document s'applique aux analyses de diagnostic moléculaire in vitro, y compris les analyses développées en laboratoire réalisées par des laboratoires de biologie médicale et des laboratoires de pathologie moléculaire. Il est également destiné à être utilisé par des clients de laboratoires, des développeurs et fabricants de l'industrie du diagnostic in vitro, ainsi que par des biobanques, des institutions et des organismes commerciaux spécialisés en recherche biomédicale, de même que des autorités de réglementation.

Le présent document n'est pas applicable pour l'analyse des protéines par immunohistochimie.

NOTE Des réglementations ou exigences internationales, nationales ou régionales peuvent également s'appliquer à des sujets spécifiques traités dans le présent document.

2 Références normatives

Les documents suivants cités dans le texte constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 15189:2012, *Laboratoires de biologie médicale — Exigences concernant la qualité et la compétence*

ISO 15190, *Laboratoires de médecine — Exigences pour la sécurité*

ISO/IEC 17020:2012, *Évaluation de la conformité — Exigences pour le fonctionnement de différents types d'organismes procédant à l'inspection*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions de l'ISO 15189, ainsi que les suivants, s'appliquent.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

— ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse https://www.iso.org/obp;

— IEC Electropedia: disponible à l'adresse http://www.electropedia.org/.

© ISO 2018 – Tous droits réservés

3.1
aliquote
partie d'une quantité plus importante d'un matériau homogène, prélevée avec une erreur d'échantillonnage supposée négligeable

Note 1 à l'article: Le terme s'applique généralement à des fluides. Les tissus sont hétérogènes et ne peuvent donc pas être aliquotés.

Note 2 à l'article: La définition est issue des Références [28], [29] et [30].

3.2
température ambiante
température non régulée de l'air environnant

3.3
analyte
composant indiqué dans le nom d'une grandeur mesurable

[SOURCE: ISO 17511:2003, 3.2, modifiée — l'EXEMPLE a été supprimé.]

3.4
performance analytique
l'exactitude, la précision et la sensibilité d'une analyse pour mesurer l'*analyte* (3.3) concerné

Note 1 à l'article: D'autres caractéristiques de performance d'analyse, telles que la robustesse ou la répétabilité, peuvent également s'appliquer.

3.5
ischémie froide
état d'un tissu suite à son prélèvement de l'organisme jusqu'à sa stabilisation ou sa fixation

3.6
diagnostic
identification d'un état de santé sain ou pathologique à partir de ses signes et/ou symptômes, dans laquelle le processus de diagnostic peut impliquer des *analyses* (3.7) et essais pour la classification de l'état d'un individu en catégories ou sous-classes distinctes, laquelle permet la prise de décisions médicales concernant le traitement et le pronostic à établir

3.7
analyse
phase analytique
ensemble des opérations destinées à déterminer la valeur ou les caractéristiques d'une propriété

Note 1 à l'article: Les processus débutent avec l'analyte extrait et comprennent toutes sortes d'essais paramétriques ou une manipulation chimique en vue de réaliser l'analyse quantitative ou qualitative.

[SOURCE: ISO 15189:2012, 3.7, modifiée — Les Notes à l'Article 1 à 3 ont été supprimées, la Note 1 à l'article a été ajoutée, le terme «examen» a été remplacé par «analyse» et «phase analytique» a été ajouté comme terme privilégié.]

3.8
formol
solution aqueuse saturée en formaldéhyde qui, à 100 %, contient 37 % de formaldéhyde en masse (correspondant à 40 % en volume)

3.9
fixation au formol
traitement d'un échantillon avec une *solution de formol tamponnée standard* (3.21) à des fins de stabilisation

© ISO 2018 – Tous droits réservés

3.10
macroscopie
analyse macroscopique
contrôle de prélèvements pathologiques à l'œil nu, au cours de leur traitement à des fins d'analyse microscopique ultérieure, en vue d'obtenir des informations de diagnostic

3.11
inclusion en paraffine
processus dans lequel un *échantillon* (3.19) de tissu est placé dans de la paraffine en vue d'obtenir une matrice rigide environnante permettant le découpage de fines coupes microscopiques

3.12
processus préanalytique
phase préanalytique
flux de travail préanalytique
processus commençant chronologiquement par la prescription des analyses par le clinicien, comprenant la demande d'analyse, la préparation et l'identification du patient, le prélèvement de l'échantillon primaire, son acheminement jusqu'au laboratoire et au sein du laboratoire médical ou de pathologie, l'extraction des analytes, et finissant au début de l'analyse

Note 1 à l'article: La phase préanalytique comprend des processus de préparation, par exemple des protocoles d'extraction des protéines, qui influencent le résultat prévu de l'analyse.

[SOURCE: ISO 15189:2012, 3.15, modifiée — «Flux de travail préanalytique» a été ajouté comme terme privilégié, la Note 1 à l'article a été ajoutée et la définition a été complétée.]

3.13
échantillon primaire
prélèvement
spécimen
partie discrète d'un liquide corporel, d'une haleine, d'un cheveu ou d'un tissu prélevé à des fins d'examens, d'étude ou d'analyse (3.7) d'une ou plusieurs grandeurs ou propriétés pour déterminer le caractère de l'ensemble

[SOURCE: ISO 15189:2012, 3.16, modifiée — Les Notes à l'Article 1 à 3 ont été supprimées.]

3.14
protéine
type de macromolécules biologiques composées d'une ou plusieurs chaînes avec une séquence définie d'acides aminés reliés par des liaisons peptidiques

3.15
profil protéique
quantités de molécules de *protéines* (3.14) individuelles qui sont présentes dans un échantillon et qui peuvent être mesurées en l'absence de toute perte, inhibition et interférence

3.16
espèce protéique
quantités d'une protéine clairement définie d'un point de vue chimique, correspondant à un spot sur une image d'électrophorèse bidimensionnelle sur gel à haute performance

Note 1 à l'article: La définition est issue de la Référence [7].

3.17
modification post-traductionnelle
modifications chimiques d'une structure protéique primaire, souvent cruciales pour conférer une activité biologique à une protéine

Note 1 à l'article: La définition est issue de la Référence [8].

© ISO 2018 – Tous droits réservés

3.18
température de laboratoire
pour les besoins du présent document, température dans la plage de 18 °C à 25 °C

Note 1 à l'article: Des réglementations locales ou nationales peuvent stipuler des définitions différentes.

3.19
échantillon
une ou plusieurs parties prélevées à partir d'un *échantillon primaire* (3.13)

[SOURCE: ISO 15189:2012, 3.24, modifiée — L'EXEMPLE a été supprimé.]

3.20
stabilité
capacité d'un échantillon, lorsqu'il est entreposé dans des conditions spécifiées, à conserver une valeur de propriété spécifiée dans des limites spécifiées pendant une période de temps spécifiée

Note 1 à l'article: L'analyte pour les besoins du présent document est composé de protéines extraites.

[SOURCE: Guide ISO 30:2015, 2.1.15, modifiée — L'expression «matériau de référence» a été remplacée par «échantillon», «caractéristique» a été remplacée par «capacité» et la Note 1 à l'article a été modifiée.]

3.21
solution de formol tamponnée standard
formol neutre tamponné
NBF
solution de *formol* (3.8) à 10 % dans l'eau, avec une fraction massique de 3,7 % (correspondant à une fraction volumique de 4 %) de formaldéhyde, tamponnée entre un pH 6,8 et un pH 7,2

Note 1 à l'article: Les solutions de formol tamponnées standard contiennent souvent de petites quantités de méthanol pour inhiber l'oxydation et la polymérisation du formaldéhyde.

3.22
stockage
interruption prolongée du *flux de travail préanalytique* (3.12) d'un échantillon, d'un analyte, respectivement, ou de leurs dérivés, tels que des coupes colorées ou des blocs de tissus, dans des conditions appropriées afin de préserver leurs propriétés

Note 1 à l'article: Le stockage à long terme a généralement lieu dans les sites d'archivage des laboratoires ou dans les biobanques.

3.23
appareil de préparation des tissus
instrument automatisé où la fixation, la déshydratation, le nettoyage et l'infiltration de paraffine des tissus sont opérés

3.24
validation
confirmation, par des preuves tangibles, que les exigences pour une utilisation spécifique ou une application prévue ont été satisfaites

Note 1 à l'article: Le terme «validé» est utilisé pour désigner l'état correspondant.

[SOURCE: ISO 9000:2015, 3.8.13, modifiée — Les Notes à l'Article 1 et 3 ont été supprimées.]

3.25
ischémie chaude
situation avant que le tissu soit prélevé de l'organisme, mais dans laquelle il est privé de son apport sanguin normal

© ISO 2018 – Tous droits réservés

3.26
flux de travail
série d'activités nécessaires à la réalisation d'une tâche

3.27
homogène
de structure et de composition uniformes

4 Considérations générales

Pour les instructions générales relatives aux systèmes de management de la qualité de laboratoire de biologie médicale et portant en particulier sur le prélèvement, la réception et la manipulation d'échantillons primaires (y compris la prévention des contaminations croisées), voir l'ISO 15189:2012, 4.2, 5.4.4, 5.4.6 ou l'ISO/IEC 17020:2012, Article 8 et 7.2. Les exigences relatives aux équipements de laboratoire, aux réactifs et aux consommables conformément à l'ISO 15189:2012, 5.3 doivent être respectées; l'ISO 15189:2012, 5.5.1.2 et 5.5.1.3 et l'ISO/IEC 17020:2012, 6.2 peuvent également s'appliquer.

Toutes les étapes d'un flux de travail de diagnostic peuvent influencer le résultat final de l'analyse. Par conséquent, le flux de travail complet, y compris la stabilité des biomolécules et les conditions de stockage des échantillons, doit être vérifié et validé. Les étapes du flux de travail qui ne peuvent pas toujours être contrôlées (par exemple, l'ischémie chaude) doivent être documentées. Une évaluation des risques des étapes non contrôlables du flux de travail, incluant leur impact potentiel sur la performance analytique, doit être réalisée et des mesures d'atténuation doivent être mises en place pour obtenir la performance analytique requise.

Avant le développement et la mise en œuvre d'une analyse, il convient d'étudier la stabilité de la ou des protéines spécifiques concernées et leurs modifications post-traductionnelles (si elles sont importantes pour l'analyse) durant l'ensemble du processus préanalytique (par exemple en réalisant une expérience ou une étude cinétique; voir également l'Annexe A et la Référence [9]).

Avant que les tissus ne soient fixés dans une solution de formol tamponnée standard, les quantités, les conformations et l'état des liaisons des protéines peuvent changer, par exemple par dégradation et synthèse modifiée des protéines suite à l'induction de gènes, la régulation à la baisse de l'expression de gènes, la dégradation de l'ARN, et des changements des voies biochimiques et d'état énergétique. Ces effets dépendent de la durée des ischémies chaude et froide et de la température ambiante avant la fixation au formol. De plus, les effets décrits peuvent varier dans les tissus de différents donneurs/patients.

En général, plus les durées d'ischémies chaude et froide sont longues et plus la température ambiante est élevée avant la fixation du prélèvement tissulaire, plus le risque est élevé de voir se produire des modifications du profil protéique.

NOTE Une ischémie froide prolongée entraîne des modifications des quantités de protéines (par exemple, de la cytokératine 18) et de phosphoprotéines (par exemple, phospho-p42/44)[9][10]. La conservation du prélèvement sur un bain de glace atténue cet effet[11]. Les quantités de protéines ainsi que les modifications des protéines peuvent également varier en fonction de l'origine et du type du tissu, de la maladie sous-jacente, de l'intervention chirurgicale, du traitement et des médicaments administrés pour l'anesthésie ou pour le traitement d'une maladie concomitante, ainsi qu'en fonction des différentes conditions environnementales après le prélèvement du tissu sur l'organisme.

Comme une normalisation de l'ischémie chaude n'est pas facilement réalisable, sa durée doit être documentée. Lorsqu'il n'est pas possible d'éviter l'ischémie froide, sa durée doit être documentée et les températures aux abords du récipient du prélèvement doivent être consignées. Lorsque le prélèvement est transporté vers un autre établissement pour la fixation au formol, la durée du transport doit être documentée et il convient de documenter également les conditions ambiantes.

De plus, la fixation au formol elle-même, ainsi que la durée et la température du stockage subséquent des tissus FFPE, entraînent des modifications des biomolécules et conduisent à une performance sous-optimale des protéines extraites des tissus FFPE[12]. Il convient de tenir compte de ce fait dans le

© ISO 2018 – Tous droits réservés