

# GUIDE DE BONNES PRATIQUES EN CYTOGENETIQUE

GUIDE REDIGE SOUS L'EGIDE DE

L'ASSOCIATION DES CYTOGENETICIENS DE LANGUE FRANCAISE

Groupe Français de Cytogénétique Hématologique  
Groupe Français de Cytogénétique Oncologique

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>4</b>
<b>I. PARTIE COMMUNE</b> .....	<b>5</b>
<b>A. GENERALITES</b> .....	<b>5</b>
1. DOCUMENTATION.....	5
2. LOIS ET DECRETS DE REFERENCE.....	5
2.1. Textes "généraux".....	5
2.2. Diagnostic prénatal et caractéristiques génétiques d'une personne.....	5
3. DIPLOMES DE CYTOGENETIQUE.....	6
<b>B. COMPLEMENT GENERAL AU GBEA</b> .....	<b>6</b>
1. PERSONNEL.....	6
1.1. Biologistes.....	6
1.2. Personnel technique.....	6
1.3. Secrétariat.....	6
2. LOCAUX.....	6
3. MATERIEL TECHNIQUE.....	6
3.1. Matériel commun à tout laboratoire d'analyses médicales.....	6
3.2. Matériel spécifique à la cytogénétique.....	6
4. ECHANTILLONS BIOLOGIQUES.....	7
4.1. Prélèvements.....	7
4.2. Identification des prélèvements.....	7
4.3. Transport.....	7
4.4. Réception des prélèvements.....	8
5. REALISATION DE L'EXAMEN.....	8
5.1. Cytogénétique classique.....	8
5.2. Cytogénétique moléculaire.....	8
6. RESULTATS.....	9
6.1. La formulation des résultats.....	9
6.2. Les commentaires et la conclusion.....	10
7. DELAI DE REPONSE ET ECHECS.....	10
8. STOCKAGE ET ARCHIVAGE.....	10
<b>II. CYTOGENETIQUE CONSTITUTIONNELLE POST-NATALE</b> .....	<b>11</b>
<b>A. AUTORISATION D'EXERCICE</b> .....	<b>11</b>
<b>B. REALISATION DES EXAMENS</b> .....	<b>11</b>
1. INFORMATION.....	11
2. ECHANTILLONS.....	11
2.1. Prélèvement.....	11
2.2. Identification et indications.....	11
3. EXAMEN CYTOGENETIQUE.....	12
3.1. Culture :.....	12
3.2. Marquage en bandes :.....	12

3.3. Nombre de cellules examinées .....	12
4. CAS PARTICULIERS .....	12
4.1. Les mosaïques franches .....	12
4.2. Les très faibles mosaïques .....	12
4.3. Les transfusions sanguines .....	13
4.4. Les variants .....	13
4.5. Les sites fragiles .....	13
4.6. L'X fragile .....	13
4.7. Les syndromes d'instabilité chromosomique .....	13
4.8. Les fibroblastes .....	13
5. CARYOTYPE EN HAUTE RESOLUTION .....	13
5.1. L'analyse "ciblée" .....	14
5.2. L'analyse "complète" .....	14
6. HYBRIDATION IN SITU .....	14
6.1. Indications .....	14
7. RESULTATS .....	14
8. STOCKAGE ET ARCHIVAGE .....	15
<b>III. CYTOGENETIQUE PRENATALE .....</b>	<b>16</b>
<b>A. AUTORISATION D'EXERCICE .....</b>	<b>16</b>
<b>B. REALISATION DES EXAMENS .....</b>	<b>16</b>
1. RECEPTION DES ECHANTILLONS .....	16
2. TECHNIQUES CYTOGENETIQUES .....	16
2.1. Echantillon .....	16
2.2. Techniques .....	17
2.3. Mosaïques .....	18
2.4. Limites du diagnostic .....	18
2.5. Analyse par FISH .....	18
3. RESULTATS .....	18
<b>IV CYTOGENETIQUE HEMATOLOGIQUE .....</b>	<b>19</b>
<b>A. INTRODUCTION .....</b>	<b>19</b>
<b>B. CONDITIONS D'EXERCICE .....</b>	<b>19</b>
<b>C. REALISATION DES EXAMENS .....</b>	<b>19</b>
1. PRELEVEMENT, ACHEMINEMENT ET RECEPTION DES ECHANTILLONS .....	19
1.1. Prélèvement .....	19
1.2. Fiche de renseignements .....	19
1.3. Réception .....	20
2. EXAMEN CYTOGENETIQUE .....	20
2.1. Cytogénétique conventionnelle .....	20
2.2. Cytogénétique moléculaire .....	20
3. RESULTATS .....	21
3.1. La formulation des résultats .....	21
3.2. Les commentaires et la conclusion .....	21
3.3. Les points particuliers .....	21
4. DELAI DE REPONSE .....	21
5. ECHECS .....	22
6. PARTICULARITES SELON LA PATHOLOGIE .....	22
6.1. Analyse microscopique .....	22
6.2. Indication de la FISH .....	22
<b>V. CYTOGENETIQUE ONCOLOGIQUE .....</b>	<b>23</b>
<b>A. INTRODUCTION .....</b>	<b>23</b>

<b>B. CONDITIONS D'EXERCICE .....</b>	<b>23</b>
<b>C. REALISATION DES EXAMENS .....</b>	<b>23</b>
1. PRELEVEMENT, ACHEMINEMENT ET RECEPTION DES ECHANTILLONS .....	23
1.1 <i>Recueil des prélèvements:</i> .....	23
1.2 <i>Fiche de renseignements</i> .....	24
2. EXAMEN CYTOGENETIQUE.....	24
2.1 <i>Cytogénétique conventionnelle</i> .....	24
2.2 <i>Cytogénétique moléculaire</i> .....	24
3. RESULTATS.....	25
3.1 <i>Formulation des résultats</i> .....	25
3.2 <i>Commentaires et conclusion</i> .....	25
4. DELAIS DE REPONSE.....	25
5. ECHECS .....	25
<b>ANNEXE 1 .....</b>	<b>26</b>
<b>ANNEXE 2 .....</b>	<b>27</b>
<b>ANNEXE 3 .....</b>	<b>28</b>
<b>ANNEXE 4 .....</b>	<b>29</b>
<b>ANNEXE 5 .....</b>	<b>31</b>

## INTRODUCTION

La cytogénétique est la discipline médicale qui étudie les anomalies chromosomiques observées au cours des maladies génétiques constitutionnelles et des cancers. Elle est devenue un élément important dans l'approche diagnostique, dans l'évaluation du pronostic et du risque de récurrence de ces différentes pathologies. En raison de la très grande diversité des situations cliniques, elle s'est naturellement différenciée en composantes propres à chaque domaine d'activité : la cytogénétique constitutionnelle (prénatale et postnatale) et la cytogénétique oncologique (hémopathies malignes et tumeurs solides).

Ce guide de bonnes pratiques a pour objectif de présenter les conditions et les pratiques d'exercice utilisées de façon consensuelle par les cytogénéticiens pour aboutir au diagnostic d'anomalies chromosomiques. L'élaboration d'un tel document nous a paru nécessaire d'une part en raison de la demande de plus en plus fréquente d'examens de cytogénétique, et d'autre part en réponse aux progrès considérables réalisés dans la détection et la caractérisation des aberrations chromosomiques. Les recommandations proposées relèvent d'une expérience partagée par les cytogénéticiens et doivent être comprises avant tout comme une aide dans la prise en charge diagnostique et pronostique des affections chromosomiques. La réalisation technique de l'analyse cytogénétique et l'interprétation des résultats doivent tenir compte des indications cliniques, des tissus étudiés, en situations constitutionnelle ou oncologique, expliquant ainsi la nécessité de bien discerner la spécificité de chaque composante au sein de ce guide de bonnes pratiques. Les recommandations énoncées sont basées sur la mise en commun de l'expérience technique acquise et des données de la littérature au moment de la rédaction. Ce document devant être régulièrement réactualisé en raison de l'évolution rapide des technologies, de leur application diagnostique potentielle, son contenu doit donc être considéré comme un appoint utile et modulable et non comme une règle rigide.

Le plan de ce guide fait ainsi apparaître plusieurs chapitres : des généralités sur l'origine des documents et des textes de lois qui concernent la pratique de la cytogénétique médicale, puis un complément général au Guide de Bonne Exécution des Analyses de biologie appliqué au domaine de la cytogénétique et enfin les chapitres consacrés successivement aux différentes composantes, cytogénétique constitutionnelle postnatale et prénatale, et cytogénétique oncologique des hémopathies malignes et des tumeurs solides.

# I. PARTIE COMMUNE

## A. GENERALITES

### 1. DOCUMENTATION

Les groupes de travail ont consulté pour l'élaboration de ce guide de bonnes pratiques différents documents dont :

- ACMG ( American College of Medical Genetics).1999. Standards and Guidelines : Clinical genetics laboratories.ACMG,Rockville,Md. [www.faseb.org/genetics/acmg]
- CCMG ( Canadian College of Medical Geneticists).1997.[CCMG.medical.org]
- UKNEQAS ( UK National External Quality Assesment Scheme) in Clinical Cytogenetics Annual Report,1997.
- EUCROMIC quality assesment group. Quality Guidelines. Eur J Hum Genet 1997;5:342-350
- ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature).S .Karger, Basel, Mitelman F (ed),1995.

### 2. LOIS ET DECRETS DE REFERENCE

Les laboratoires de cytogénétique comme tous les laboratoires d'analyses médicales, sont soumis à un certain nombre de lois et de décrets dont les principaux sont rappelés ici.

#### 2.1.Textes "généraux"

- Loi n° 75-626 du CSP du 11 juillet 1975 régissant l'exercice de la biologie médicale et nombreux décrets et arrêtés y afférant.
- Décret n° 76-1004 du 4 novembre 1976 (modifié par le décret n° 93-354 du 15 mars 1993) fixant les conditions d'autorisation des laboratoires d'analyses de biologie médicale.
- Décret n° 83-104 du 15 février 1983 (modifié par le décret n° 93-354 du 15 mars 1993) relatif au contrôle de bonne exécution des analyses de biologie médicale.
- Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale.
- Arrêtés des 23 janvier 1997 et 11 février 1999 modifiant l'arrêté du 3 avril 1995 fixant la nomenclature des actes de biologie médicale.

#### 2.2.Diagnostic prénatal et caractéristiques génétiques d'une personne

- Loi n° 94-653 du 29 juillet 1994 relative au respect du corps humain.
- Loi n° 94-654 du 29 juillet 1994 relative au don et à l'utilisation des éléments et produits du corps humain, à l'assistance médicale à la procréation et au diagnostic prénatal.
- Décret n° 95-559 du 6 mai 1995 (modifié par le décret n° 97-579 du 28 mai 1997) relatif aux analyses de cytogénétique et de biologie pratiquées en vue d'établir un diagnostic prénatal in utero.
- Arrêté du 30 septembre 1997 (modifié par l'arrêté du 12 novembre 1997) relatif au consentement de la femme enceinte à la réalisation des analyses mentionnées à l'article R162-16-1 du code de la santé publique.
- Décret n° 2000-570 du 23 juin 2000 fixant les conditions de prescription et de réalisation des examens des caractéristiques génétiques d'une personne et de son identification par empreintes génétiques à des fins médicales et modifiant le code de la santé publique.

### **3. DIPLOMES DE CYTOGENETIQUE**

Le praticien responsable doit être un médecin qualifié en Génétique médicale (DES de Génétique médicale ou équivalence) ou en Biologie médicale ou un pharmacien biologiste et être titulaire d'un Diplôme d'Etudes Spécialisées Complémentaires (DESC) de Cytogénétique humaine.

## **B. COMPLEMENT GENERAL AU GBEA**

L'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale s'impose à tous les laboratoires de biologie. Ce guide précise quelques points propres à la cytogénétique.

### **1. PERSONNEL**

La situation est très variable d'un laboratoire à l'autre, en fonction du type d'activité et de la structure du laboratoire.

#### **1.1. Biologistes**

Le biologiste doit répondre aux exigences des décrets de référence. Il est souhaitable que l'encadrement de chaque laboratoire, toutes activités confondues, comprenne au moins deux cytogénéticiens expérimentés. Ceci permettra de confronter les avis sur les dossiers difficiles et d'assurer une continuité pendant les périodes de congés.

#### **1.2. Personnel technique**

Le temps d'exécution d'une analyse diffère d'une pathologie à l'autre et d'un patient à l'autre et dépend de la structure du laboratoire. De ce fait, il n'a pas été possible d'obtenir un consensus sur le nombre moyen d'examens par technicien. Néanmoins, le nombre de techniciens doit être suffisant pour leur permettre l'acquisition et la maîtrise des nouvelles techniques par exemple dans le domaine de cytogénétique moléculaire tout en respectant les critères de qualité définis pour la réalisation des examens.

Il est rappelé que la fonction de technicien en cytogénétique nécessite une formation et un apprentissage d'au moins un an pour acquérir une compétence spécifique.

#### **1.3. Secrétariat**

Il doit assurer la prise des rendez-vous, l'enregistrement des examens, l'envoi des résultats, l'archivage et le bilan d'activité du laboratoire.

### **2. LOCAUX**

Les locaux doivent être conformes aux instructions du GBEA (arrêté du 26 novembre 1999) et pour le diagnostic prénatal au décret du 6 mai 1995. Il est souhaitable de disposer d'une salle réservée à la culture cellulaire et d'une pièce sombre pour l'observation en microscopie fluorescente. Un laboratoire photographique est utile. Il est nécessaire si le laboratoire n'est pas équipé d'appareil d'analyse informatisée du caryotype.

### **3. MATERIEL TECHNIQUE**

#### **3.1. Matériel commun à tout laboratoire d'analyses médicales**

Le matériel doit comporter les instruments indiqués par le GBEA.

#### **3.2. Matériel spécifique à la cytogénétique**

Pour les laboratoires autorisés à pratiquer des examens relevant de la cytogénétique, ce matériel doit être complété par au moins :

- deux incubateurs pour culture cellulaire (+/- à CO<sub>2</sub> selon le type de culture)

- une hotte à flux laminaire (classe sécurité microbiologique)
- une hotte pour manipulation des produits toxiques
- une centrifugeuse basse vitesse
- une centrifugeuse à micro-tubes pour la cytogénétique moléculaire
- des bains thermostatés à 37-60°± 0,1°C et 100°± 0,1°C
- deux réfrigérateurs 4°C, un congélateur -20°C
- deux photomicroscopes ou microscopes équipés d'un système d'acquisition et de traitement d'image avec imprimante, dont l'un permettant l'analyse en fluorescence.
- un équipement de laboratoire photographique (pour le développement, l'agrandissement, etc...) et/ou un équipement numérique permettant d'assurer la même qualité de reproduction et de conservation des documents. Il peut être utile d'avoir les deux équipements (par exemple pour les caryotypes en haute résolution).

En outre, pour certaines applications :

- une loupe binoculaire
- un microscope inversé

L'entretien et la maintenance du matériel et la protection du personnel contre les risques toxiques ou infectieux doivent se conformer au GBEA et faire l'objet de procédures écrites et d'un contrôle interne.

## 4. ECHANTILLONS BIOLOGIQUES

### 4.1. Prélèvements

Les prélèvements doivent être effectués selon les indications du GBEA. Une procédure précisant les conditions de prélèvement, de recueil et de conditionnement des échantillons doit être établie et mise à la disposition des préleveurs.

De plus, pour la Cytogénétique :

- Les échantillons doivent être recueillis stérilement.
- Le laboratoire doit être prévenu de l'envoi d'un échantillon, dans la mesure du possible avant son prélèvement, afin d'en optimiser les conditions de recueil.
- Les conditions de prélèvement sont décrites plus bas pour chacune des sous-spécialités.

### 4.2. Identification des prélèvements

L'étiquetage des tubes et flacons contenant les échantillons doit être effectué selon les recommandations du GBEA.

Les échantillons seront accompagnés d'une fiche de prescription donnant, en outre:

- le motif de la demande et le diagnostic suspecté
- les traitements récents éventuels susceptibles d'affecter la qualité de l'examen (radio- ou chimiothérapie, par exemple).
- l'identification du médecin prescripteur
- des renseignements cliniques spécifiques susceptibles de déterminer le choix des techniques à mettre en œuvre. Si ceux-ci ne peuvent pas être obtenus, le compte rendu du résultat devra le mentionner.

### 4.3. Transport

Les échantillons doivent être acheminés au laboratoire à température ambiante (pas de glace), le plus rapidement possible. En cas d'expédition, le mode d'acheminement choisi doit idéalement permettre une réception par le laboratoire dans les 24 heures.

#### **4.4. Réception des prélèvements**

Le cytogénéticien est responsable des échantillons biologiques acceptés dans son laboratoire. Il doit indiquer au clinicien une éventuelle non-conformité de l'échantillon et ses conséquences possibles sur le résultat. En particulier, sa quantité et sa qualité devront être suffisantes pour la réalisation de l'examen. En cas de refus d'un échantillon, celui-ci et son motif doivent être immédiatement portés à la connaissance du prescripteur.

En cas de prélèvement difficile ou nécessairement unique, le cytogénéticien peut être amené à accepter des échantillons non conformes. Le clinicien prescripteur doit en être informé et les réserves nécessaires doivent être mentionnées dans le résultat.

### **5. REALISATION DE L'EXAMEN**

Ainsi que le précise le GBEA, «c'est au biologiste qu'incombe le choix de méthodes optimisées et recommandées par les sociétés scientifiques nationales ou internationales de biologie ou, le cas échéant, validées par lui-même, à condition qu'elles permettent, dans la mesure du possible, le transfert des résultats.

#### **5.1. Cytogénétique classique**

##### **5.1.1. Culture**

La mise en culture se fera selon les méthodes ayant fait leurs preuves dans le laboratoire.

##### **5.1.2. Marquage en bandes**

Chaque laboratoire doit être capable de réaliser les techniques de base en cytogénétique : marquage en bandes R, G, Q, et C, coloration NORs.

Pour chaque examen, au moins un système de marquage en bandes (R, G ou Q) est obligatoire pour le classement des caryotypes, avec un niveau de résolution adapté aux indications

Chaque laboratoire doit avoir un système d'évaluation lui permettant d'apprécier le niveau de résolution de ses caryotypes [L'annexe 1 montre un exemple des critères utilisés pour les bandes G]. L'étude de quelques cellules en Giemsa simple est souvent utile.

#### **5.2. Cytogénétique moléculaire**

Tout laboratoire de cytogénétique doit être équipé pour la cytogénétique moléculaire ou avoir un correspondant susceptible de pratiquer ces techniques en cas de nécessité.

##### **5.2.1. Conditions d'application.**

En règle, la cytogénétique moléculaire est une technique complémentaire du caryotype, et ne doit être utilisée que comme telle, sauf indications particulières

##### **5.2.2. Types de sondes**

Les sondes utilisées pour l'hybridation in situ identifient soit des séquences répétées (bras long de l'Y, sondes alphas centromériques spécifiques ou non, sondes télomériques non spécifiques), soit des séquences uniques (sondes de locus ou régionales), ou encore un mélange de séquences uniques s'hybridant sur tout ou partie d'un chromosome (sondes de peinture globale ou partielle).

##### **5.2.3. Validation technique des sondes**

Pour chaque nouveau lot de sonde, il faut vérifier au laboratoire la spécificité et la sensibilité.

- Pour les sondes commercialisées, ceci est réalisé par les contrôles internes.
- Pour les sondes non commercialisées :



- Vérification de la spécificité : chaque nouveau lot de sondes de peinture ou spécifiques de régions chromosomiques devra être testé sur 10 mitoses normales ou 10 chromosomes normaux pour la région considérée ou porteurs d'une anomalie connue. La spécificité sera déterminée par toute technique permettant d'identifier le chromosome reconnu (bandes, co-hybridation avec une autre sonde spécifique permettant d'identifier le chromosome, hybridation sur une métaphase connue portant une anomalie de ce chromosome...).
- La preuve de la vérification devra être conservée.
- Vérification de la sensibilité sur 100 cibles chromosomiques (soit 25 métaphases si les chromatides sont bien individualisées dans la région reconnue par la sonde). En ce qui concerne l'utilisation de sondes sur noyaux interphasiques uniquement : la sensibilité doit être vérifiée sur 200 noyaux et 25 mitoses provenant d'au moins deux témoins l'un positif pour l'anomalie et l'autre négatif.

#### 5.2.4. Modalités de lecture

Une double lecture des lames au microscope avec fiche de lecture est recommandée.

#### 5.2.5. Documentation

Comme pour le caryotype, des images représentatives des résultats obtenus par FISH doivent être conservées.(un minimum de 2 à 5 métaphases ou noyaux)

#### 5.2.6. Réponse

Si une technique d'hybridation in situ fluorescente a été réalisée en complément de l'étude cytogénétique conventionnelle, la conclusion de l'étude pourra être incluse d'emblée dans le résultat cytogénétique ou faire l'objet d'un résultat complémentaire indépendant

#### 5.2.7. Autres techniques

L'évolution très rapide des connaissances et des techniques impose, dans chaque laboratoire, une réflexion et un effort de mise en place et de validation de nouvelles technologies ☐ multiFISH, CGH, PRINS, etc...

### 6. RESULTATS

La feuille de résultat doit se conformer aux instructions du GBEA.

Le résultat sera adressé au médecin prescripteur, en respectant la confidentialité.

#### 6.1. La formulation des résultats

La feuille de résultat doit préciser le tissu examiné et les cultures effectuées (temps, stimulants).

Pour la cytogénétique classique seront précisés :

- le(s) type(s) de marquage en bandes utilisé(s)
- le degré de résolution estimé [voir annexe 1]
- le nombre de mitoses examinées
- le nombre de caryotypes établis

Pour la cytogénétique moléculaire :

- l'identification et la nature des sondes
- le nombre de mitoses et/ou de noyaux examinés

La formule chromosomique (conventionnelle et/ou moléculaire) est donnée selon la nomenclature internationale (ISCN en vigueur) et est accompagnée de son interprétation compréhensible pour les non-spécialistes. La formule «☐ n'a pas été décelé d'anomalie dans les conditions de l'examen☐ est préférable au terme de caryotype normal.

Si différents tissus ont été examinés, les formules sont rédigées indépendamment.

## **6.2. Les commentaires et la conclusion**

La conclusion décrira en clair la ou les anomalies significatives.

Si un variant est signalé, son caractère non pathologique doit être clairement indiqué.

Si la qualité de l'examen est en dessous des standards fixés, ce fait doit être signalé et les limites du résultat expliquées.

## **7. DELAI DE REPONSE ET ECHECS**

Le délai de réponse et le pourcentage d'échecs doivent faire l'objet d'une procédure de contrôle de qualité interne, et dépend du domaine de cytogénétique considéré.

## **8. STOCKAGE ET ARCHIVAGE**

- Il est souhaitable que les lames examinées en cytogénétique conventionnelle soient conservées au moins 2 ans. Pour la cytogénétique moléculaire, le délai de conservation des lames est laissé à la discrétion du directeur du laboratoire.
- La durée de conservation des documents papiers (indications et résultats) et des documents photographiques ou électroniques (cytogénétique conventionnelle ou moléculaire) dépend du domaine d'activité considéré.
- La confidentialité doit être assurée. Les pièces ou les armoires doivent être fermées à clef.
- Les documents informatiques doivent être sauvegardés et un double doit être conservé dans un local différent.

## II. CYTOGENETIQUE CONSTITUTIONNELLE POST-NATALE

### A. AUTORISATION D'EXERCICE

Les autorisations d'exercice sont régies par le décret 2000-570 du 23 juin 2000 fixant les conditions de prescription et de réalisation des examens des caractéristiques génétiques d'une personne et de son identification par empreintes génétiques à des fins médicales et modifiant le code de la santé publique.

Les autorisations d'activité et l'agrément des praticiens sont délivrés après avis de la commission consultative nationale.

***Pour permettre une bonne régularité dans l'analyse du caryotype, le laboratoire devrait assurer au moins 200 examens par an.***

Les médecins biologistes, exerçant en libéral et ayant une dérogation à l'interdiction de cumul d'activité, peuvent assurer la consultation médicale antérieure au prélèvement et le conseil génétique résultant de l'examen.

### B. REALISATION DES EXAMENS

#### 1. INFORMATION

Le décret du 23 juin 2000 fixe les modalités d'information préalable des patients ou de leurs parents : il impose d'obtenir pour la réalisation d'un caryotype un consentement écrit du patient ou de son responsable légal.

#### 2. ECHANTILLONS

##### 2.1. Prélèvement

###### \* Sang :

Deux à 5 ml de sang seront prélevés stérilement sur héparine faiblement dosée (10 à 20 U/ml de sang).

###### \* Peau ou autre tissu :

Le fragment biopsié doit avoir un volume minimum de 2mm<sup>3</sup> et être mis extemporanément dans du milieu de culture (ou du sérum physiologique) stérile additionné d'antibiotiques.

##### 2.2. Identification et indications

Le prélèvement doit être accompagné, outre les renseignements habituels (voir partie commune), d'un courrier précisant:

- Le motif de prescription [voir annexe 2]
- Les antécédents familiaux, avec si possible un arbre généalogique

Il est souhaitable que les syndromes dysmorphiques soient évalués par un médecin ayant une connaissance spécifique des maladies chromosomiques, au cours d'une consultation ou, à défaut, à partir de photographies.

Des renseignements cliniques suffisants et appropriés sont indispensables pour guider la lecture du caryotype et poser l'indication de techniques complémentaires éventuellement utiles. Leur absence sera mentionnée sur la réponse si nécessaire.

En cas d'étude familiale, le caryotype des apparentés doit être étudié dans le même laboratoire sauf contraintes géographiques évidentes.

### 3. EXAMEN CYTOGENETIQUE

#### 3.1. Culture :

La mise en culture se fera selon les méthodes ayant fait leurs preuves dans le laboratoire. Sauf impossibilité matérielle, un minimum de deux cultures indépendantes est requis. Le choix du milieu de culture tiendra compte des indications. Après la mise en culture, le sang peut être conservé à 4 °C jusqu'à la certitude d'avoir obtenu une culture permettant la réalisation du caryotype.

#### 3.2. Marquage en bandes :

Deux systèmes de marquage (R et G) sont recommandés, avec un niveau de résolution adapté aux indications. Il est souhaitable que le laboratoire maîtrise, outre les techniques de base en cytogénétique, les techniques de haute résolution et d'analyse de la réplication.

#### 3.3. Nombre de cellules examinées

Le nombre de cellules à examiner varie en fonction de l'indication. Il doit faire l'objet d'une procédure écrite à l'intérieur de chaque laboratoire. La recherche d'une anomalie des gonosomes nécessite l'examen d'un nombre de cellules relativement important, par contre la recherche d'une translocation familiale connue peut se faire sur un nombre minimal de cellules. En moyenne, 16 cellules doivent être comptées et analysées, et au moins 3 caryotypes établis. Aucun résultat ne doit être rendu sans une analyse complète des bandes de chaque paire chromosomique. Des techniques complémentaires seront réalisées dans un deuxième temps si cela est nécessaire à l'interprétation (bandes C, Q, NOR...).

Certaines anomalies ne peuvent être dépistées que sur fibroblastes (tétrasomie 12p, certaines trisomies 8, etc..).

### 4. CAS PARTICULIERS

#### 4.1. Les mosaïques franches

Le résultat ne peut être rendu qu'après examen d'un nombre suffisant de cellules (annexe 3). Le nombre réel de cellules observées doit figurer sur la réponse et non le pourcentage seul.

La FISH peut être un examen complémentaire utile en cas de mosaïque. Dans le cas du syndrome de Turner, la recherche d'un clone comportant un fragment d'Y peut être faite par FISH ou par biologie moléculaire.

#### 4.2. Les très faibles mosaïques

L'observation d'une ou deux cellules anormales pose la question d'un accident in vitro ou d'un clone pathologique. D'après la nomenclature (ISCN 1995, p.78<sup>1</sup>) un clone se définit par la présence d'au moins 2 cellules comportant le même chromosome surnuméraire ou la même anomalie de structure, ou de 3 cellules ayant perdu le même chromosome. En pratique ces critères doivent être interprétés en fonction de l'indication clinique, du nombre de cellules examinées, de la nature de l'anomalie, de la situation sur la lame des cellules anormales et de la durée de la culture (important pour les fibroblastes). Si nécessaire, 50 ou mieux 100 cellules seront étudiées sur des lames issues de cultures indépendantes. Eventuellement un nouveau prélèvement sera réalisé ou un autre tissu examiné. Le comptage de 50 cellules permet d'éliminer à 99% une mosaïque de 10% (voir annexe 3).

---

<sup>1</sup> ISCN (1995): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Mitelman F (ed); S. Karger, Basel, 1995.

**Conduite à tenir en cas de :**

perte ou gain d'un gonosome

La perte ou le gain d'un chromosome sexuel dans quelques cellules est un phénomène physiologique qui est fonction de l'âge et n'a pas de signification particulière en l'absence de signes cliniques évoquant le syndrome de Turner ou une insuffisance ovarienne, et en l'absence d'ambiguïté sexuelle ou d'anomalie du spermogramme.

perte d'un autosome :

En l'absence de signes cliniques, la perte d'un autosome dans quelques cellules peut être considérée comme survenue in vitro et ne nécessite généralement pas de comptage supplémentaire.

gain d'un autosome :

Une attention particulière sera portée aux chromosomes 8, 9, 13, 18 et surtout 21 qui correspondent aux trisomies viables les plus fréquentes.

**4.3. Les transfusions sanguines**

Habituellement, le caryotype peut être effectué à partir de 3 jours après une transfusion car la plupart des lymphocytes du donneur sont éliminés au bout de ce laps de temps. Cependant ce délai doit être augmenté dans les cas de déficit immunitaire ou de transfusion massive.

**4.4. Les variants**

Les variants classiques qui portent sur les variations de taille et de position de l'hétérochromatine du 1, du 9 et du 16, des bras courts des acrocentriques et du bras long de l'Y ne nécessitent pas d'étude familiale. En cas de doute et pour les variants inhabituels, les techniques de caractérisation de l'hétérochromatine doivent être appliquées. L'étude du caryotype des parents pourra si nécessaire affirmer le caractère transmis du variant.

**4.5. Les sites fragiles**

Il faut distinguer les sites fragiles communs qui surviennent en culture et les sites fragiles rares qui sont transmis de façon dominante. Les sites fragiles rares autosomiques sont généralement considérés comme des variants sans signification pathologique.

**4.6. L'X fragile**

Son diagnostic se fait maintenant par biologie moléculaire, mais le caryotype métaphasique complet du cas index est utile pour rechercher une autre anomalie chromosomique éventuellement responsable du retard mental. En cas de fragilité de l'X confirmée, l'étude des autres membres de la famille se fera par biologie moléculaire seule.

**4.7. Les syndromes d'instabilité chromosomique**

Ces maladies rares requièrent la mise en œuvre de protocoles spécifiques et demandent une grande expérience pour l'interprétation des résultats.

**4.8. Les fibroblastes**

Tout laboratoire de cytogénétique constitutionnelle devrait avoir l'équipement et la compétence pour la culture de fibroblastes cutanés. En cas d'impossibilité matérielle, il est indispensable d'avoir un correspondant capable d'effectuer cette culture.

**5. CARYOTYPE EN HAUTE RESOLUTION**

Il doit s'accompagner d'un caryotype complet à un niveau de résolution standard.

On peut distinguer:

### **5.1. L'analyse "ciblée"**

Elle est réalisée dans les cas où un microremaniement spécifique est suspecté sur des arguments cliniques ou pour préciser les points de cassure d'un remaniement. Cette analyse peut être remplacée par une étude par FISH si les sondes adéquates sont disponibles.

### **5.2. L'analyse "complète"**

Pour que l'analyse en haute résolution soit considérée comme complète, il faut obtenir au moins deux paires analysables de chaque chromosome à un niveau de résolution >550 bandes

## **6. HYBRIDATION IN SITU**

L'hybridation fluorescente in situ (FISH) ne peut en aucun cas remplacer une étude complète du caryotype.

### **6.1. Indications**

Les techniques de cytogénétique moléculaire sont appliquées en fonction des informations cliniques et/ou des données cytogénétiques. La FISH peut être réalisée sur les métaphases ou sur les noyaux interphasiques.

#### **6.1.1. FISH métaphasique**

Elle peut être utilisée pour rechercher une information complémentaire sur une anomalie déjà repérée. Les peintures chromosomiques sont fréquemment utilisées. Elles permettent, par exemple

- la caractérisation des petits marqueurs ou d'un segment chromosomique non identifié
- la confirmation du caractère intrachromosomique d'un remaniement

L'examen d'un petit nombre de cellules (au moins cinq) est généralement suffisant dans ce cas pour apporter l'information recherchée. La peinture du chromosome normal peut servir de contrôle interne.

La FISH métaphasique peut aussi permettre des diagnostics très difficiles voir impossibles à faire par les techniques de cytogénétique habituelles. Des sondes comportant des séquences uniques sont alors utilisées. Au moins 10 cellules, et si possible 20, doivent être analysées. Cette technique permet ainsi de diagnostiquer

- les microdélétions/duplications spécifiques
- les remaniements cryptiques ou semi-cryptiques (en particulier sondes subtélomériques).

#### **6.1.2. FISH interphasique**

Elle est utilisée pour la mise en évidence d'aneuploïdies, homogènes ou en mosaïque, ou d'anomalies de structure, à l'aide de sondes centromériques ou régionales. La co-hybridation d'une sonde témoin dans les mêmes conditions opératoires peut être utile. Le nombre des noyaux à examiner dépend de l'indication et de la sonde utilisée).

## **7. RESULTATS**

Le décret du 23 juin 2000 précise que le résultat doit être adressé exclusivement au médecin prescripteur, en respectant la confidentialité.

En cas d'anomalie, un commentaire sur les conséquences médicales du résultat signalera la nécessité éventuelle d'examen complémentaires (en biologie moléculaire, par exemple), d'une étude familiale ou d'une consultation de génétique chromosomique.

## **8. STOCKAGE ET ARCHIVAGE**

Les documents papiers (indications et résultats) et les documents photographiques ou électroniques (cytogénétique conventionnelle ou moléculaire) devraient être conservés au moins 70 ans comme pour les archives de pédiatrie. La durée de trente ans proposée par le décret 2000-570 du 23 juin 2000 est un minimum.

### **III. CYTOGENETIQUE PRENATALE**

#### **A. AUTORISATION D'EXERCICE**

Le laboratoire de cytogénétique doit avoir reçu une autorisation ministérielle pour cette activité. Un ou plusieurs cytogénéticiens sont alors reconnus compétents et responsables du rendu des résultats de caryotypes fœtaux. Ils sont responsables du bilan annuel d'activité qui doit être adressé aux autorités de tutelle.

Les médecins ayant reçu une dérogation à l'interdiction de cumul d'activité pourront assurer la consultation médicale antérieure au prélèvement prévue par le décret du 28 Mai 1997.

En plus du travail commun à tous les laboratoires de cytogénétique, un secrétariat doit assurer le recueil du suivi des grossesses.

Pour permettre une bonne régularité dans l'analyse du caryotype fœtal, le laboratoire devrait assurer au moins 250 examens par an.

Il est nécessaire de disposer d'une pièce exclusivement réservée aux cultures cellulaires équipée d'une hotte à flux laminaire ou d'un matériel équivalent et d'une pièce spécialement affectée aux techniques de cytogénétique proprement dite ainsi que d'une pièce permettant l'accueil des familles et l'entretien avec les patientes. ( Art.R162.16.6 du Décret du 6 Mai 1995).

#### **B. REALISATION DES EXAMENS**

##### **1. RECEPTION DES ECHANTILLONS**

En plus des renseignements habituels, les prélèvements fœtaux doivent être accompagnés

- de deux documents obligatoires :
  - l'attestation de consultation médicale de conseil génétique
  - le formulaire de consentement de la femme enceinte à la réalisation d'un prélèvement in utero en vue d'un diagnostic prénatal conformément à l'article R162.16.1 du décret 95.559 du 6 Mai 1995.
- d'une fiche de renseignements comportant :
  - l'indication
  - les antécédents personnels, familiaux, obstétricaux
  - la date des dernières règles et surtout du début de grossesse
- et selon l'indication :
  - du résultat de l'échographie et le nom de l'échographiste
  - du résultat des marqueurs sériques
  - en cas de remaniement chromosomique d'un des conjoints, du caryotype de celui-ci .

##### **2. TECHNIQUES CYTOGENETIQUES**

###### **2.1. Echantillon**

La quantité et l'aspect de l'échantillon doivent être notés.

La quantité de matériel cellulaire optimale à la réalisation d'un caryotype fœtal est de :

- 10 à 15 ml de liquide amniotique, répartis en 2 flacons stériles
- 0,5 à 1 ml de sang fœtal sur héparine. La pureté du sang fœtal doit avoir été contrôlée extemporanément par le médecin préleveur.
- 20 mg de villosités choriales.



Si l'échantillon est en quantité insuffisante et/ou mélangé à du sang ou à de la caduque en forte proportion, il sera nécessaire de le signaler et d'émettre des réserves, en fonction de la qualité de culture obtenue, sur le compte-rendu du résultat.

L'acheminement des prélèvements au laboratoire ne doit pas excéder 24 h dans la mesure du possible.

## 2.2. Techniques

### Culture à long terme

La culture se fera en double, si possible dans 2 incubateurs.

L'ensemencement doit se faire échantillon par échantillon.

S'il s'agit de villosités choriales, elles seront auparavant soigneusement disséquées pour être séparées aussi bien que possible du tissu maternel.

La culture sera maintenue jusqu'au compte-rendu écrit.

### Culture à court terme

S'il s'agit de villosités choriales, l'examen direct sera doublé, autant que possible, d'une culture à long terme. Dans certains cas, et en particulier dans les indications complémentaires à un diagnostic en biologie moléculaire de pathologies liées à l'X, il est possible de privilégier l'examen direct.

### Marquage en bandes

La résolution doit être adaptée à l'indication. Une résolution à 300 bandes est acceptable pour les examens standards.

### Analyse cytogénétique conventionnelle

Conditions optimales : les nombres optimaux sont de 15 à 20 cellules comptées et 4 à 5 caryotypes. La méthode in situ est à privilégier. La trypsination doit se faire à partir d'un flacon comportant au moins 12 colonies ; en dessous de 8 colonies exploitables, la validité du résultat doit être appréciée par le cytogénéticien responsable en fonction de l'indication.

Les nombres minimaux à respecter sont :

#### *Liquide amniotique :*

Méthode in situ :

- 12 mitoses comptées sur au moins 8 colonies différentes provenant de 2 cultures distinctes
- 3 caryotypes établis

Après trypsination :

- 12 cellules comptées provenant de 2 tubes de culture
- 3 caryotypes établis

#### *Villosités choriales :*

Technique double (directe + culture) - à privilégier - :

- 12 cellules au total dont au moins 6 sur culture
- 3 caryotypes établis

Préparation directe seule :

- 12 cellules comptées si possible
- 3 caryotypes établis

Culture seule :  
12 cellules comptées  
3 caryotypes établis

*Sang foetal* :  
12 mitoses comptées  
3 caryotypes établis

En dessous de ces nombres la réalisation d'un nouveau prélèvement sera discuté avec l'obstétricien en fonction des risques et de la clinique.

### **2.3. Mosaïques**

La découverte d'une mosaïque - 2 mitoses ayant la même anomalie chromosomique, de nombre ou de structure, provenant de flacons de culture indépendants - impose des investigations complémentaires.

Selon le type d'anomalie trouvée et le chromosome impliqué, soit l'examen sera complété par l'analyse d'autres mitoses provenant de flacons de culture distincts, soit des investigations supplémentaires seront envisagées.

Un protocole écrit de conduite à tenir en fonction des anomalies observées doit exister dans chaque laboratoire. Un résumé de l'article de Hsu paru dans Prenatal Diagnosis peut servir de base à ce protocole (Annexe 4).

Une mosaïque confinée au placenta et concernant des chromosomes soumis à empreinte doit faire discuter une disomie uniparentale qui sera éventuellement recherchée sur le liquide amniotique.

### **2.4. Limites du diagnostic**

Les conditions d'analyse d'un caryotype foetal peuvent ne pas mettre en évidence une mosaïque foetale vraie si le taux des cellules aneuploïdes est trop faible. Une anomalie fine de la structure des chromosomes peut être méconnue en raison du degré de résolution.

### **2.5. Analyse par FISH**

Elle peut être proposée en fonction des conditions d'indication et d'interprétation. En l'absence de signes échographiques, il est recommandé, avant l'interruption médicale de grossesse, d'attendre la confirmation par le caryotype du résultat de l'étude par FISH interphasique.

## **3. RESULTATS**

Le résultat des examens de cytogénétique prénatale ne peut être transmis à la patiente que par le médecin prescripteur ( Arrêté du 12 novembre 1997)

## IV CYTOGENETIQUE HEMATOLOGIQUE

### A. INTRODUCTION

Ce chapitre a été rédigé par les membres du Groupe Français de Cytogénétique Hématologique (GFCH) dans un but de formation interne et de facilitation de la transmission des informations.

Ce document est un recueil des conditions optimales pour réaliser l'exploration cytogénétique d'une hémopathie maligne. Son élaboration est basée sur les principes énoncés dans l'introduction générale de ce guide et doit être considéré, comme une référence modulable et non comme une règle rigide.

Le nombre d'examens réalisés par an et par technicien pour la cytogénétique hématologique est défini annuellement par la discipline (GFCH).en fonction de l'évaluation du contrôle de qualité des laboratoires. *Pour permettre une bonne régularité dans l'analyse du caryotype, le laboratoire devrait assurer au moins 200 examens par an.*

### B. CONDITIONS D'EXERCICE

Le Biologiste doit avoir, en plus des titres réglementaires pour l'exercice de la Cytogénétique, une formation en Hématologie biologique permettant d'assurer la bonne exécution des analyses et l'interprétation correcte de leurs résultats.

### C. REALISATION DES EXAMENS

#### 1. PRELEVEMENT, ACHEMINEMENT ET RECEPTION DES ECHANTILLONS

##### 1.1. Prélèvement

Les conditions de stérilité doivent être respectées.

- pour les échantillons tels que moelle osseuse, sang, liquides d'épanchement☐
- prélèvement avec une seringue héparinée (héparine sans conservateur toxique pour les cellules)
- recueil dans un tube ou flacon hépariné☐pour la moelle le recueil peut être effectué dans un flacon contenant du milieu de culture avec 10 à 20 UI/ml d'héparine sodique
- pour les échantillons solides tels que ganglions, rate,... l'échantillon doit être mis le plus rapidement possible (< 30 mn) dans du milieu de culture, à défaut un milieu tamponné tel que PBS, Hanks,... stériles

##### 1.2. Fiche de renseignements

L'échantillon doit parvenir le plus rapidement possible au laboratoire et être accompagné de la fiche de renseignements cliniques qui doivent impérativement être communiqués à ce moment :

- le ou les diagnostic(s) évoqué(s) ou connu de la maladie
- en cas de suivi, le stade de la maladie, les traitements reçus, le traitement actuel, éventuellement le protocole thérapeutique
- la référence de caryotypes antérieurs effectués dans d'autres laboratoires

Les résultats de l'hémogramme le plus récent avec la date, du myélogramme, de l'immunophénotypage et de l'examen anatomo-pathologique sont à transmettre dans les meilleurs délais.

### 1.3. Réception

La vérification de la conformité de l'échantillon doit porter sur :

- outre les données d'identification et d'hygiène et de sécurité
- la présence des renseignements cliniques
- le délai d'acheminement
- l'aspect anormal de l'échantillon (aspect laqué, dilué, caillots, volume insuffisant ...).

## 2. EXAMEN CYTOGENETIQUE

### 2.1. Cytogénétique conventionnelle

#### 2.1.1. Culture

La mise en culture est effectuée stérilement et le choix des conditions de culture tiendra compte des indications (cf annexe 5). La numération des cellules /ml de l'échantillon est souhaitable. La qualité d'un prélèvement pourra être appréciée par la réalisation d'un test de viabilité des cellules, notamment en cas de transport prolongé. L'ensemencement sera effectué en respectant les concentrations recommandées (dépendantes des pathologies). La culture est effectuée dans des étuves à 37°C avec ou sans CO2 5%.

Il est possible de synchroniser les cultures pour améliorer la qualité voire la quantité des métaphases analysées.

Compte tenu de l'évolution rapide des connaissances et des techniques, et du caractère unique du matériel conservé, les culots cytogénétiques (au minimum ceux de l'examen diagnostique) doivent pouvoir être conservés, même si le caryotype est normal, pour d'éventuels compléments d'étude nécessaires à la précision du diagnostic.

#### 2.1.2. Analyse microscopique

Il est souhaitable voire indispensable à cette étape de l'examen de connaître le stade clinique du patient.

Au diagnostic □

- Il est recommandé (nécessaire en l'absence d'anomalie détectée) d'analyser au moins 20 mitoses et de classer 4 à 5 caryotypes voire plus selon les pathologies et les anomalies détectées.
- En cas d'anomalie non clonale, il est souhaitable de poursuivre, au moins au microscope, la recherche des métaphases anormales au-delà des 20 premières mitoses.
- Ces conditions sont identiques pour les phases de rechute ou d'acutisation.

Lors du suivi :

- les recommandations spécifiques nécessaires seront détaillées pour chaque pathologie.

#### 2.1.3. Interprétation de l'analyse cytogénétique

A ce stade, toutes les données hématologiques doivent être connues pour permettre l'interprétation de l'analyse cytogénétique et pour poser l'indication d'éventuelles investigations complémentaires.

### 2.2. Cytogénétique moléculaire

#### 2.2.1. Conditions générales

Les recommandations ont été énoncées dans le chapitre A5.3.

De plus, la sensibilité et le degré d'hybridation doivent être déterminés pour chaque type de préparation (étalement cytogénétique, frottis de sang ou de moelle, empreinte ganglionnaire

ou tumorale, coupe de tissus, cytopin...)

### 2.2.2. Modalités d'interprétation des techniques

Une double lecture des lames au microscope avec fiche de lecture est recommandée.

- Pour la FISH métaphasique☐

Pour la détection de translocations, délétions, duplications, insertions à l'aide de sondes spécifiques de régions chromosomiques l'interprétation des résultats doit tenir compte de l'efficacité de l'hybridation et faire l'objet d'un décompte conservé.

- Pour la FISH interphasique☐

Il est dans ce cas impératif de réaliser des témoins dans les mêmes conditions opératoires et de compter un nombre suffisant de noyaux ( 200 minimum voire 500 en cas de limite de signification). Ceci permet de déterminer le seuil de positivité (moyenne +/- 3 écarts types) au-dessus duquel l'anomalie est considérée comme significative.

## 3. RESULTATS

### 3.1. La formulation des résultats

Les formules sont rédigées indépendamment si des tissus différents ont été analysés.

Le résultat de la FISH, outre les recommandations formulées dans la partie commune paragraphes 5 et 6, doit spécifiquement préciser le matériel initial (suspension de cellules fixées, moelle, sang, ganglion, tumeur, cellules fixées...), la date du prélèvement et le seuil de sensibilité correspondant à la sonde utilisée en cas de résultat proche du seuil de positivité de la technique.

### 3.2. Les commentaires et la conclusion

La conclusion décrira en clair la ou les anomalies les plus informatives☐ nombre modal, complexité, évolution clonale, anomalie spécifique, anomalie non clonale compatible avec la pathologie suspectée...

Les anomalies non clonales et non spécifiques de la pathologie suspectée ne sont pas à évoquer systématiquement, ce point est laissé à l'appréciation de chacun en fonction des cas particuliers.

Une orientation diagnostique et pronostique pourra être proposée ainsi que des examens complémentaires appropriés (FISH, RT-PCR, ...)

Les limites de l'examen seront mentionnées si nécessaire☐ nombre de mitoses analysées inférieur à 20, qualité du marquage chromosomique insuffisante, richesse (pourcentage de cellules malignes dans l'échantillon correspondant à l'examen) et/ou conservation du prélèvement non satisfaisantes, biais de culture possible, ...

### 3.3. Les points particuliers

- Il est souhaitable de signaler un taux élevé de cassures chromosomiques.
- L'étude du caryotype constitutionnel est indiquée en cas de doute sur la nature acquise d'un remaniement.

## 4. DELAI DE REPONSE

Il est nécessaire de respecter un délai compatible avec la prise en charge thérapeutique du patient et le maintien de la qualité des examens. Un délai de 14 à 21 jours pour une réponse écrite pour 90% des examens est souhaitable selon la pathologie et le degré d'urgence.

## 5. ECHECS

Le taux d'échec est lié pour la plus grande part à la qualité des échantillons et est très variable selon les pathologies. L'évaluation du taux d'échec et la recherche de leur cause doivent être systématiquement menées afin d'appliquer les mesures nécessaires à les limiter

## 6. PARTICULARITES SELON LA PATHOLOGIE

A ce jour, compte tenu de l'état actuel des connaissances et en dehors des exigences de protocoles thérapeutiques spécifiques, les pratiques suivantes sont recommandées.

### 6.1. Analyse microscopique

Au diagnostic :

- LLC et myélome : il est souhaitable d'analyser au moins 40 métaphases

Lors du suivi :

- LMC : selon le consensus actuel, au moins 30 mitoses consécutives doivent être analysées pour un suivi de LMC sous interféron
- LA : La faible sensibilité des techniques de cytogénétique classique ne permet pas, de façon générale, une réelle évaluation de la maladie résiduelle. Si elle doit être réalisée, le nombre de mitoses à analyser est au minimum de 30 à 50 mitoses.

### 6.2. Indication de la FISH

L'évolution très rapide des technologies et des connaissances et la potentialité de la disponibilité croissante d'outils à visée diagnostique pour une meilleure prise en charge thérapeutique rendent difficile l'établissement d'une liste précise d'indications, amenée à être réactualisée plus rapidement que ce guide.

- A visée diagnostique, la FISH métaphasique est, en règle, utilisée comme un complément de l'analyse en cytogénétique conventionnelle :
  - pour l'identification précise de remaniements non élucidés en cytogénétique conventionnelle, de marqueurs ou d'anomalies complexes.
  - pour la recherche d'anomalies ciblées dans certains cas de discordance cytologique et/ou immunophénotypique et cytogénétique.
  - pour la mise en évidence, compte tenu de leur impact pronostique, de certaines anomalies non détectées ou détectables par l'analyse conventionnelle.
- Pour l'appréciation de la maladie résiduelle, aucune étude, à ce jour, n'a formellement prouvé que la FISH sur noyaux interphasiques pouvait être utilisée isolément. Cette technique est encore en cours d'évaluation.

## V. CYTOGENETIQUE ONCOLOGIQUE

### A. INTRODUCTION

Ce document concernant les analyses portant sur les tumeurs solides a été rédigé par les membres du Groupe Français de Cytogénétique Oncologique (GFCO). Il implique, sans les reprendre, l'application des prescriptions générales pour les examens de Cytogénétique, indiquées au paragraphe « Complément général au GBEA » du présent document. Il constitue un recueil des conditions minimales requises pour l'analyse cytogénétique des tumeurs solides.

Le nombre d'exams annuel par Biologiste est défini annuellement par le GFCO, en fonction de l'évaluation du contrôle de qualité des laboratoires.

### B. CONDITIONS D'EXERCICE

Le Biologiste doit avoir, en plus des titres réglementaires pour l'exercice de la Cytogénétique, une formation biologique en Onco-Hématologie permettant d'assurer la bonne exécution des analyses et l'interprétation correcte de leurs résultats.

### C. REALISATION DES EXAMENS

#### 1. PRELEVEMENT, ACHEMINEMENT ET RECEPTION DES ECHANTILLONS

Compte tenu du caractère en règle non renouvelable des prélèvements, le laboratoire doit être impérativement averti de l'envoi des échantillons.

##### 1.1 Recueil des prélèvements:

Les échantillons peuvent être des fragments biopsiques ou d'exérèse, ou des cyto-ponctions tumorales.

- - Fragments biopsiques ou d'exérèse:

Le recueil doit être immédiat, ou en tous cas dans les 30 min. après exérèse, dans des conditions stériles, en flacons contenant 10 ml de milieu de culture cellulaire additionné d'antibiotiques (le serum « physiologique » est à proscrire).

La taille minimale du fragment doit être un cube de 4 mm de côté (optimale à partir de 6 mm).

- - Cytoponctions:

Le produit de ponction est recueilli immédiatement en tubes contenant 10 ml de milieu de culture cellulaire et 100 u d'Héparine, ou en tubes EDTA contenant 10 ml de milieu, si l'échantillon est susceptible de faire aussi l'objet d'une analyse moléculaire.

La cellularité minimale devra être de  $10^6$  cellules nucléées (optimale à partir de  $5 \times 10^6$ ). La cellularité de l'échantillon sera évaluée par le préleveur, s'il s'agit d'un Cytologiste, ou par le Cytogénéticien.

Les échantillons seront acheminés au laboratoire dans la journée, ou en tous cas dans les 24 h, à température ambiante. Dans certaines indications, la durée de transport pourra être plus longue (consulter le laboratoire). Dans le cas où l'échantillon ne peut être acheminé dans la journée, une fraction de celui-ci devra être congelée immédiatement dans l'azote liquide, pour étude moléculaire éventuelle.

## 1.2 Fiche de renseignements

Les échantillons seront accompagnés d'une demande d'examen mentionnant, en plus des éléments d'identification prescrits dans le GBEA:

- la localisation du prélèvement
- la cellularité, en cas de cyto-ponction (si évaluée par le préleveur).

Les comptes-rendus anatomo- ou cytopathologiques doivent être transmis au laboratoire dans les meilleurs délais.

## 2. EXAMEN CYTOGENETIQUE

Des procédures adaptées aux différents types d'échantillons et d'indications seront établies.

La congélation à l'arrivée d'une fraction de l'échantillon pour conservation en tumorothèque à  $-80^{\circ}\text{C}$  ou en azote liquide est recommandée, si ceci n'a pas été fait d'emblée, et si son volume le permet.

### 2.1 Cytogénétique conventionnelle

#### 2.1.1 Culture

- Cytoponctions☐

Numération de l'échantillon, et mise en culture en suspension à raison de  $5 \times 10^5$  à  $1 \times 10^6$  cellules nucléées par ml.

Récolte dans les 15 h (sous colchicine) à 48 h de culture.

- Fragments biopsiques et d'exérèse☐

Deux types de procédures sont applicables selon le caractère cohésif ou non du tissu tumoral:

- dissociation mécanique et culture en suspension  
récolte effectuée dans les 15 h (sous colchicine) à 48 h.
- dissociation enzymatique et culture en monocouche en flacon; deux flacons seront mis en culture si le volume de l'échantillon le permet  
récolte effectuée lors de la croissance primaire ou après le 1er passage.

#### 2.1.2 Analyse microscopique

- Nombre de mitoses à examiner, dans la mesure du possible: 12; établir au moins 5 caryotypes. En cas d'anomalies non clonales, il est recommandé de poursuivre, au moins au microscope, la recherche de métaphases anormales au-delà des 12 premières mitoses, afin de s'assurer de l'absence effective d'un clone.
- En cas d'index mitotique faible, le résultat peut être considéré contributif:
- . si une seule mitose remaniée a pu être observée, si le remaniement est compatible avec la pathologie suspectée.
- . si ont été observées 2 mitoses porteuses de la même anomalie, en cas de remaniement de structure ou gain de chromosome, ou 3 mitoses en cas de perte.
- L'établissement du caryotype constitutionnel est indiqué quand il existe, dans la totalité des mitoses, un doute sur la nature acquise d'un remaniement.

### 2.2 Cytogénétique moléculaire

La FISH est, en règle, une technique complémentaire du caryotype conventionnel. Sauf indications particulières (recherche d'amplifications géniques, délétions, trisomies), elle ne sera a priori mise en oeuvre qu'en 2ème intention. Une lecture par deux observateurs est recommandée. En cas de recherche de translocation, il sera tenu compte de la possibilité de l'examen par PCR pour la détection d'un transcrit de fusion, selon le diagnostic. Dans les



indications où la PCR est contributive et où cette analyse peut être réalisée, il ne sera pas nécessaire d'effectuer la FISH correspondante d'emblée.

### **2.2.1 Indications de la FISH**

Sur métaphases, en plus des indications générales:

- . identification d'un remaniement ou d'anomalies de nombre caractéristiques d'un type tumoral donné, dans des métaphases de mauvaise morphologie.
- . détection d'anomalies géniques caractéristiques (amplifications d'oncogènes).

Sur noyaux:

- . identification d'un remaniement ou d'anomalies de nombre caractéristiques en l'absence de métaphases.
- . détection d'anomalies géniques caractéristiques (amplifications d'oncogènes).
- . cet examen, dans des indications particulières, peut être effectué sur coupes de tissus congelés ou inclus en paraffine.

### **2.2.2 Nombre de mitoses ou de noyaux à analyser**

- Sur métaphases:
  - . résultat considéré comme positif si au moins une mitose montre l'anomalie caractéristique, en cas d'anomalie de structure, 2 mitoses en cas de gain de chromosome, ou 3 mitoses en cas de perte.
  - . nombre total à examiner: comme en analyse cytogénétique conventionnelle.
    - . prise d'au moins 2 images représentatives.
- Sur noyaux:
  - . examen de 200 noyaux.
  - . il sera pris un minimum de 5 images représentatives.

## **3. RESULTATS**

### **3.1 Formulation des résultats**

- La nature de l'échantillon étudié (ponction, biopsie, exérèse...), sa localisation, le temps de culture seront mentionnés.
- Les anomalies non clonales ne sont pas à évoquer systématiquement; ce point est laissé à l'appréciation du Cytogénéticien, en fonction de l'indication.

### **3.2 Commentaires et conclusion**

La conclusion décrira en clair l'anomalie ou les anomalies caractéristique(s) et indiquera le diagnostic évoqué. Il sera mentionné les limites de l'informativité de l'examen (qualité du marquage chromosomique insuffisante, faible cellularité tumorale, absence d'anomalie décelée...).

## **4. DELAIS DE REPONSE**

Délai de première réponse écrite inférieur à 21 jours pour les cultures en suspension, inférieur à 4 semaines pour les cultures en flacon.

## **5. ECHECS**

Le taux d'échecs est lié pour une part à la qualité des échantillons et aux indications. La surveillance du taux d'échecs et la recherche de leur cause doivent être systématiquement menées, afin d'appliquer les mesures nécessaires pour les limiter.

## **ANNEXE 1**

### **EXEMPLE DE CRITERES UTILISES POUR EVALUER LA QUALITE DES BANDES G**

<b>Qualité du marquage</b>	<b>Bandes identifiées et valeur ISCN correspondante.</b>
Pas de bandes	Très peu de bandes rendant impossible un classement non équivoque
Médiocre	Environ 150 bandes par set haploïde. Pas de fins détails, mais chaque chromosome est identifié sur la base des bandes servant de bornes. Par exemple le 4 est distingué du 5 ou le 8 du 9.
Assez bonne	Environ 400 bps. Deux bandes sombres distinctes sur le 8p et sur le 9p, et trois bandes sombres distinctes au milieu du 5q (5q14, 5q21, 5q23 )
Bonne	Environ 550 bps. Quatre bandes sombres distinctes sur le 18q et trois sur le 11q. 7q33 et 7q35 sont séparées et 22q13.2 doit être visible.
Excellente	Environ 850 bps. 6q16 doit être subdivisée. 6q24, 6q25.2 et 6q26 apparaissent comme 3 bandes distinctes. 11p14.1 est séparée de 11p14.3. 15q12 est distincte et il y a deux bandes sombres distinctes sur le 20p.

**[modifié d'après : The Journal of the Association of Genetic Technologists 24 (4) p118, 1998]**

## **ANNEXE 2**

### **INDICATIONS DU CARYOTYPE CONSTITUTIONNEL**

#### **Patient avec :**

- phénotype évocateur d'un syndrome chromosomique connu : trisomies 21, 13, 18, délétions 4p, 5p, syndromes de Turner (45,X), de Klinefelter (47,XXY)
- ambiguïté sexuelle
- hypotonie néonatale avec dysmorphie
- retard des acquisitions/retard mental et troubles du comportement
- retard mental et dysmorphie
- retard mental et malformations congénitales multiples
- retard de croissance intra-utérin et dysmorphie/anomalie neurologique
- petite taille chez la fille
- retard ou absence de puberté
- suspicion d'un syndrome avec microdélétion/duplication spécifique
- suspicion de syndrome d'instabilité chromosomique
- maladie récessive liée à l'X chez la fille
- aménorrhée primaire ou secondaire, ménopause précoce
- azoospermie ou oligospermie sévère

#### **Couple avec :**

- diagnostic prénatal d'une anomalie chromosomique ou d'un variant inhabituel
- avortements spontanés à répétition
- enfant décédé suspect d'anomalie chromosomique
- stérilité du couple
- bilan avant assistance médicale à la procréation

#### **Antécédents familiaux :**

- d'anomalie chromosomique connue
- d'apparenté suspect d'anomalie chromosomique, mais non disponible pour l'analyse
- récurrence d'une association mort foetale / malformations dans des branches collatérales

#### **Divers :**

- vérification ou complément d'un diagnostic prénatal
- vérification ou complément d'un diagnostic postnatal
- recherche d'anomalie chromosomique limitée aux fibroblastes
- enfant mort-né

## ANNEXE 3

D'après: Exclusion of Chromosomal Mosaicism: Tables of 90%, 95%, and 99% Confidence Limits and Comments on Use. HOOK E. B. *Am J Hum Genet* 29; 94-97. 1977

POURCENTAGE DE MOSAÏQUE EXCLU AVEC UN DEGRÉ DE CONFIANCE DE 0.90, 0.95, ET DE 0.99 SI L'ON EXAMINE LE NOMBRE SPECIFIE DE CELLULES ET SI ELLES ONT TOUTES UN CARYOTYPE IDENTIQUE

Nombre de cellules (n)	Degré de confiance	de	confiance	Nombre de cellules (n)	Degré de confiance	de	confiance
	0.90	-	0.99		-	-	0.99
≤ 4		0.95		36	7%	8%	13%
5	38%			37	7%	8%	12%
6	32%	41%		38	6%	8%	12%
7	29%	35%		39	6%	8%	12%
8	26%	32%	46%	40	6%	8%	11%
9	23%	29%	41%	41	6%	8%	11%
10	21%	26%	37%	42	6%	7%	11%
11	19%	24%	35%	43	6%	7%	11%
12	18%	23%	32%	44	6%	7%	10%
13	17%	21%	30%	45	5%	7%	10%
14	16%	20%	29%	46	5%	7%	10%
15	15%	19%	27%	47	5%	7%	10%
16	14%	18%	26%	48	5%	7%	10%
17	13%	17%	24%	49	5%	6%	9%
18	13%	16%	23%	50-55	5%	6%	9%
19	12%	15%	22%	56	5%	6%	8%
20	11%	14%	21%	57-58	4%	6%	8%
21	11%	14%	20%	59-63	4%	5%	8%
22	10%	13%	19%	64-73	4%	5%	7%
23	10%	13%	19%	74	4%	4%	7%
24	10%	12%	18%	75	4%	4%	6%
25	9%	12%	17%	76-89	3%	4%	6%
26	9%	11%	17%	90-98	3%	4%	5%
27	9%	11%	16%	99-112	3%	3%	5%
28	8%	11%	16%	113	3%	3%	4%
29	8%	10%	15%	114-148	2%	3%	4%
30	8%	10%	15%	149-151	2%	2%	4%
31	8%	10%	14%	152-227	2%	2%	3%
32	7%	9%	14%	228-229	2%	2%	2%
33	7%	9%	14%	230-298	1%	2%	2%
34	7%	9%	13%	299-458	1%	1%	2%
35	7%	9%	13%	≥459	1%	1%	1%

Nota bene - Si n est le nombre de cellules comptées sans biais, alors le pourcentage de mosaïque (ou un pourcentage plus grand) qui est exclu avec le degré de confiance voulu apparaît dans la colonne appropriée. Par exemple, si 52 cellules sont examinées sans détecter de mosaïque, alors le plus bas niveau de mosaïque, exclu avec 95% de confiance, est de 6%. D'autre part, puisque 50% est le plus grand pourcentage de mosaïque possible, l'examen de 52 cellules sans détection de mosaïque exclut, avec un degré de confiance d'au moins 95%, un pourcentage de mosaïque compris entre 50% et 6% inclus. Il n'exclut pas un niveau de mosaïque de 5% ou moins avec un degré de confiance de 95%. Pour déterminer quel nombre de cellules il faut compter pour exclure un niveau donné de mosaïque, par exemple 10% ou plus, il faut choisir la plus basse valeur de n pour laquelle 10% apparaît dans la colonne appropriée. Dans ce cas, il faut compter 22 cellules pour un degré de confiance à 90%, 29 cellules pour un degré de confiance à 95%, 44 cellules pour un degré de confiance à 99%.

## ANNEXE 4

### Critères de diagnostic d'une mosaïque sur les cellules amniotiques d'après L.Y.F. HSU et al

#### Références :

Proposed guidelines for diagnosis of chromosomal mosaicism in amniocytes based on data derived from chromosome mosaicism and pseudomosaicism studies.

Hsu L.Y.F. et al *Prenat. Diagn*,12, 555-573, 1992

Revised guidelines for the diagnosis of mosaicism in amniocytes

Hsu L.Y.F., Benn P.A. *Prenat Diagn*,19,1081-1082, 1999

**Critère minimum** : une ou plusieurs cellules ou colonies avec une même anomalie dans deux récipients de culture différents.

#### Principe

- L'étude de 24 cellules (colonies) permet le diagnostic d'une mosaïque à 12% (risque 5%).
- 20 cellules issues d'un flacon (technique par trypsination) peuvent représenter 1 à 20 colonies. Si 60% des cellules dérivent de colonies différentes, 40 cellules représentent 24 colonies.
- Il est recommandé de récolter les cellules de flacons comportant au moins 12 colonies.

**Le diagnostic d'une mosaïque** se fait en deux étapes, l'étape de routine et une étude complémentaire de niveau modéré ou approfondi. Dans quelques cas, l'étude complémentaire n'est pas nécessaire. Le nombre de cellules supplémentaires à examiner dépend de la viabilité de l'anomalie détectée sur une cellule (colonie).(voir le tableau)

#### Première étape, en routine

- Un minimum de 3 flacons ou récipients de culture par spécimen.
- 16 à 20 cellules de deux sources différentes sont examinées, issues de 10 à 16 colonies différentes.

#### Deuxième étape : étude complémentaire

##### Niveau modéré

- technique par trypsination : si une cellule est anormale dans le premier flacon, examiner 10 cellules supplémentaires dans le deuxième flacon (soit 20 cellules) s'il contient au moins 12 colonies. Sinon, utiliser le troisième flacon.

- technique in situ : examiner 12 colonies supplémentaires de sources différentes en excluant le récipient où la colonie anormale a été détectée.

##### Niveau approfondi

- technique par trypsination : si une cellule est anormale dans le premier flacon, examiner 10 cellules supplémentaires dans le deuxième flacon (soit 20 cellules) plus 20 cellules dans le troisième flacon.

- technique in situ : examiner 24 colonies supplémentaires de sources différentes en excluant le récipient où la colonie anormale a été détectée.

#### Etude complémentaire non nécessaire

Vérifier dans toutes les cellules que l'anomalie en question n'est pas présente

Technique par trypsination	Technique in situ
<b>ETUDE COMPLEMENTAIRE APPROFONDIE</b>  <b>Trisomies</b> 2, 5, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 21, 22 (une ou plusieurs cellules) <b>Anomalie déséquilibrée de la structure</b> (plusieurs cellules) <b>Chromosome marqueur</b> (plusieurs cellules)	<b>ETUDE COMPLEMENTAIRE APPROFONDIE</b>  <b>Trisomies</b> 2, 5, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 21, 22 (une ou plusieurs colonies) <b>Anomalie déséquilibrée de la structure</b> (plusieurs colonies) <b>Chromosome marqueur</b> (plusieurs colonies)
étude complémentaire modérée  <b>Polygonosomies</b> (une ou plusieurs cellules) <b>Trisomies</b> 1, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 17, 19 (une ou plusieurs cellules) <b>45, X</b> (plusieurs cellules) <b>Monosomie pour un autosome</b> (plusieurs cellules) <b>Chromosome marqueur</b> (une cellule) <b>Anomalie équilibrée de la structure</b> (plusieurs cellules)	étude complémentaire modérée  <b>Polygonosomies</b> (une ou plusieurs colonies) <b>Trisomies</b> 1, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 17, 19 (une ou plusieurs colonies) <b>45, X</b> (une ou plusieurs colonies) <b>Monosomie pour un autosome</b> (une ou plusieurs colonies) <b>Chromosome marqueur</b> (une colonie) <b>Anomalie équilibrée de la structure</b> (plusieurs colonies) <b>Anomalie déséquilibrée de la structure</b> (une colonie)
pas d'étude complémentaire  <b>45,X</b> (une cellule) <b>Anomalie déséquilibrée de la structure</b> (une cellule) <b>Anomalie équilibrée de la structure</b> (une cellule) <b>Cassure centromérique avec perte d'un bras</b> (une cellule)	pas d'étude complémentaire  <b>Anomalie équilibrée de la structure</b> (une colonie) <b>Cassure centromérique avec perte d'un bras</b> (une colonie) Toutes les anomalies d'une cellule unique

**Guide modifié pour l'exploration d'une suspicion de mosaïque amniotique (Hsu LYF et al 1999)**

**ANNEXE 5****Recommandations pour la mise en culture des échantillons biologiques selon la pathologie**

La nature du tissu à analyser ainsi que les conditions de culture par type de pathologie sont indiquées dans le tableau ci après, donné à titre indicatif.

Ces données déterminent des conditions optimales le plus souvent recommandées définies à ce jour pour détecter les anomalies à rechercher. Elles n'excluent pas d'autres possibilités, validées par le laboratoire, fonction des impératifs cliniques, organisationnels, ...

Pathologie	Leucémie aiguë	Syndromes myéloprolifératifs (LMC, ...)	Syndrome myélodysplasique
Echantillon	moelle sang blastique	moelle en cas d'impossibilité, sang si : $\geq 50\ 000$ GB et myélémie $\geq 30\%$	moelle
Nombre de cellules/ml de culture	0,5 à $2.10^6$	0,5 à $2.10^6$	0,5 à $2.10^6$
Mitogènes	non	non	non
Durée de la culture	LAL : 24 h et/ou 17h sous colchicine ou 48h selon les équipes LAM : 24h et/ ou 48 h LAM3 : jamais < 24 h	24h ou 48 h	24h et/ou 48 h

Pathologie	Syndromes lymphoprolifératifs Différenciés (LLC, SLVL, ...)	Myélome	Lymphomes
Echantillon	sang	moelle	Ganglion *
Nombre de cellules/ml de culture	$1.10^6$	$1.10^6$	$5$ à $10.10^6$ ou $0,5$ à $2.10^6$ selon les équipes
Mitogènes	TPA, TPA+LPS, TPA+IL2, TPA+PHA si ganglion ou rate : TPA+IL2	non	non
Durée	72 ou 96 h	72 h	17 h (exposition à la colchicine)

\*si moelle, culture avec mitogènes

Avant de compter, remise en suspension soigneuse des cellules, ce d'autant plus que certaines ont une tendance importante à s'agréger (myélome).