

GUIDE DE BONNES PRATIQUES EN CYTOGENETIQUE



Version 2 – 2007

Révision 1 – Avril 2008

Révision 2 – Juin 2010

Ce guide a été réalisé par

L'Association des Cytogénéticiens de Langue Française

Le Groupe Français de Cytogénétique Hématologique

Le Groupe Français de Cytogénétique Oncologique

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	4
Définitions	4
Domaines de compétence de la cytogénétique médicale	5
I. PARTIE COMMUNE A TOUS LES SECTEURS	6
A. GENERALITES	6
B. COMPLEMENT GENERAL AU GBEA	12
II. CYTOGENETIQUE CONSTITUTIONNELLE POST-NATALE	22
A. AUTORISATION D'EXERCICE	22
B. REALISATION DES EXAMENS	22
CYTOGENETIQUE CONSTITUTIONNELLE PRENATALE.....	31
A. AUTORISATION D'EXERCICE	31
B. REALISATION DES EXAMENS	31
CYTOGENETIQUE HEMATOLOGIQUE	38
A. INTRODUCTION	38
B. CONDITIONS D'EXERCICE	38
C. REALISATION DES EXAMENS	38
CYTOGENETIQUE ONCOLOGIQUE.....	44
A. INTRODUCTION	44
B. CONDITIONS D'EXERCICE	44
C. REALISATION DES EXAMENS	44
ANNEXES.....	49
ANNEXE 1	49
ANNEXE 2	51
ANNEXE 3	53
ANNEXE 4	55
ANNEXE 5	58
ANNEXE 6 :	60
ARBRES DECISIONNELS	61
QUAND REALISER UNE ENQUETE FAMILIALE ?	62

CONDUITE A TENIR DEVANT UN MARQUEUR CHROMOSOMIQUE	63
CONDUITE A TENIR DEVANT UNE ANOMALIE DE STRUCTURE	64
DIAGNOSTIC PRENATAL RAPIDE	68

INTRODUCTION

Ce guide de bonnes pratiques a pour objectif de présenter les conditions d'exercice et les pratiques techniques recommandées et nécessaires pour aboutir au diagnostic d'anomalies chromosomiques en tenant compte des indications cliniques, des tissus étudiés.

La présente version du guide, qui s'inscrit dans le contexte de la Loi du 11 juillet 1975 relative aux laboratoires d'analyses de biologie médicale et à leurs directeurs et directeurs adjoints, précise le guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale (GBEA, [arrêté du 26 novembre 1999](#))

Le guide des bonnes pratiques en cytogénétique, a été réactualisé en raison de l'évolution rapide des technologies, de leur application diagnostique potentielle et surtout de la nécessité d'établir des procédures consensuelles pour les contrôles de qualité externes à appliquer dans le cadre de l'accréditation des laboratoires.

Définitions

La Cytogénétique

a pour objet l'étude de la structure et du fonctionnement normal et pathologique des chromosomes (condensation, recombinaison, réparation, ségrégation, transmission) et de la chromatine (organisation et rôle dans la régulation de l'expression des gènes).

La Cytogénétique médicale

a pour but de détecter les anomalies chromosomiques constitutionnelles ou acquises grâce à des techniques microscopiques (techniques de bandes, techniques de cytogénétique moléculaire) ou de biologie moléculaire afin d'établir un diagnostic biologique et d'assurer un conseil génétique. Ces anomalies peuvent être de nombre (plus ou moins de 46 chromosomes), de structure (modification dans la succession de plusieurs locus) ou de réparation (cassures chromosomiques).

La Cytogénétique moléculaire

est un domaine de la cytogénétique développant des techniques, basées sur les homologues de séquence ADN, permettant l'identification spécifique de tout ou partie d'un ou de plusieurs chromosomes.

Domaines de compétence de la cytogénétique médicale

Pré-analytique:

Connaissance des manifestations phénotypiques associées aux anomalies chromosomiques afin d'orienter l'analyse cytogénétique.

Analytique

Choix de la meilleure technique pour répondre à la demande ;
Connaissance des limites de chaque technique.

Post-analytique

Connaissance de la mécanique chromosomique permettant de donner un conseil génétique adapté.

I. PARTIE COMMUNE A TOUS LES SECTEURS

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).2006. Standards and Guidelines: Clinical genetics laboratories. ACMG, Rockville, MD. <http://www.acmg.net>
- site de l'ACLF
- CCMG (Canadian College of Medical Geneticists), 1997 <http://ccmg.medical.org/>
- UKNEQAS (UK National External Quality Assessment Schemes) in Clinical Cytogenetics Annual Report, 1997, mis à jour 2001.
- EUCROMIC quality assessment group. Quality Guidelines. Eur J Hum Genet 1997;5:342-350
- ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature). Karger, Basel, Shaffer LG, Tommerup N (eds),2005.
- [ECA PWG for Cytogenetics and Society. Cytogenetic Guidelines and Quality Assurance. A common European framework for quality assessment for constitutional and acquired cytogenetic investigations.](#)
- ISO 17025 (2005): General requirements for the competence of testing and calibration Laboratories - Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais.
- ISO 15189 (2007). Medical Laboratories- particular requirements for quality and competence - Laboratoires d'analyses de biologie médicale - Exigences particulières concernant la qualité et la compétence.
- ISO/IEC Guide 2 (2004) Standardization and related activities - General vocabulary.

Chaque laboratoire doit disposer de procédures écrites décrivant les techniques utilisées au sein du laboratoire et les équipements nécessaires. Ces procédures

Partie Commune

doivent être compréhensibles par tous et doivent être mise à jour chaque année. Les anciennes versions des procédures seront gardées 5 ans.

2. LOIS ET DECRETS DE REFERENCE

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.

2.2. Agréments et autorisations

Les laboratoires de cytogénétique pratiquant les caryotypes constitutionnels (pré ou post natal) sont soumis à autorisation des ARH et les praticiens les exécutant doivent être agréés par l'Agence de la biomédecine.

(cf. [Guide Pratique des procédures d'autorisation et d'agrément sur le site de l'Agence de la Biomédecine](#))

Agréments des praticiens pratiquant la cytogénétique constitutionnelle

[La loi n°2004-800 du 6 août 2004](#) relative à la bioéthique donne compétence à l'Agence de la Biomédecine pour délivrer les agréments de praticiens pour les activités cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation, de diagnostic prénatal, de diagnostic préimplantatoire et de génétique ([art L1418-1](#) et suivants du code de la santé publique).

Les décrets [n° 2006-1661](#) du 22 décembre 2006 (AMP et Prénatal) et [n° 2008-321](#) du 04 Avril 2008 (Postnatal, Caractéristiques Génétiques des Personnes) prévoient que l'agrément des praticiens est délivré

- • pour une durée de 5 ans
- • la décision est notifiée au praticien dans un délai de 2 mois à compter de la réception d'un dossier de demande complet (une Non réponse vaut refus)

Partie Commune

La demande d'agrément est formulée selon un dossier type défini par le directeur général de l'Agence (disponible sur le site de [l'Agence](#))

Pour les praticiens d'hémato-cancérologie le décret du 22/12/06 précise que le statut du praticien peut-être une personnalité scientifique devant rendre les résultats avec une double signature.

Autorisation des structures pratiquant la cytogénétique constitutionnelle

L'autorité administrative compétente pour délivrer les autorisations est la commission exécutive de l'agence régionale de l'hospitalisation (ARH). Le CROS (comité régional de l'organisation sanitaire) intervient également pour délivrer un avis à l'ARH.

[Le décret du 22 décembre 2006](#) précise que l'Agence de la Biomédecine est consultée par les ARH et doit délivrer un avis sur les autorisations délivrées aux établissements et aux laboratoires pour l'exercice des activités cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation [AMP] et de diagnostic prénatal [DPN]. Le décret n° [2008-321](#) du 04 Avril 2008 met en place un dispositif similaire pour l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne (comprenant les analyses de cytogénétique postnatale).

Le dossier type de demande d'autorisation est défini par l'arrêté du [26 Février 2007](#).

2.3. Dispositif actuel sur les « caractéristiques génétiques » de la personne

- Loi [n° 94-653 du 29 juillet 1994](#) relative au respect du corps humain.
- 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.
- Décret [n° 2008-321 du 04 Avril 2008](#) relatif à l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne ou à son identification par empreinte génétique à des fins médicales.

2.4. Autres dispositions

- Arrêtés des [30 septembre](#) et [12 novembre](#) 1997 relatif au consentement de la femme enceinte à la réalisation des analyses en prénatal qui fixe la forme et le contenu du consentement à demander.

Partie Commune

- Arrêté du [23 juin 2009](#) fixant les règles de bonnes pratiques en matière de dépistage et de diagnostic prénatals avec utilisation des marqueurs sériques maternels de la trisomie 21
- Arrêté du [23 juin 2009](#) relatif à l'information, à la demande et au consentement de la femme enceinte à la réalisation d'une analyse portant sur les marqueurs sériques maternels et à la réalisation du prélèvement et des analyses en vue d'un diagnostic prénatal *in utero* prévues à l'article R. 2131-1 du code de la santé publique, modifié par l'arrêté du [19 Février 2010](#).
- L'article [L1131-1](#) du code de la Santé Publique précise les conditions d'information des membres de la famille en cas de découverte d'une anomalie génétique grave.

2. 4. Nomenclature des actes de cytogénétique

2. 4.1. Cytogénétique constitutionnelle

Arrêtés du [23 janvier 1997](#), du [11 février 1999](#) et du [25 Novembre 2004](#) modifiant l'arrêté du 3 avril 1985 fixant la nomenclature des actes de biologie médicale. Décision du [7 Septembre 2007](#) relative à la liste des actes et prestations pris en charge par l'assurance maladie.

Décision du [6 Juillet 2009](#) de l'Union nationale des Caisses d'assurance maladie relative à la liste des actes et prestations prises en charge par l'assurance maladie, modifiant les indications du caryotype fœtal.

2.4.1.1. Cytogénétique pré et postnatale

Caryotype constitutionnel prénatal

- 0040 Technique avec incubation sans changement de milieu
(villosités choriales, placenta, sang fœtal) B 850
- 0041 Technique avec culture
(liquide amniotique, culture de villosités choriales) B 1250

Caryotype constitutionnel postnatal

- 0901 Caryotype sanguin B800
- 0902 Caryotype sur fibroblastes B1200

Ces cotations sont applicables quel que soit le nombre de techniques de marquage en bandes (R, G, Q, C, NOR).

Partie Commune

2.4.1.2. Cytogénétique moléculaire

- 0903 Hybridation sur chromosomes métaphasiques:
pour une sonde avec le contrôle interne compris B500
- 0904 Hybridation sur chromosomes métaphasiques:
pour deux sondes ou plusieurs sondes B1000
- 0905 Hybridation sur noyaux interphasiques:
quel que soit le nombre de sondes utilisées B500

Les cotations des examens 0903, 0904 et 0905 ne sont pas cumulables entre elles.

2.4.2. Cytogénétique acquise

Décision du 24 Janvier 2007 relative à la liste des actes et prestations pris en charge par l'Assurance Maladie

2.4.2.1 Caryotype oncologique

- 0906 Caryotype sur sang périphérique ou prélèvement de moelle osseuse ou tout tissu présumé envahi par des cellules hématopoïétiques malignes (ganglion lymphatique, liquide d'épanchement, rate, foie, peau) B800
Une cotation par patient.
- 0907 Caryotype sur prélèvement de tumeur solide B1200

Cet acte est pris en charge dans les indications suivantes:

- tumeurs à petites cellules rondes (neuroblastome, sarcome d'Ewing, médulloblastomes);
- sarcomes;
- tumeurs embryonnaires et germinales;
- tumeurs du rein;
- tumeurs cérébrales.

Une cotation par patient.

2.4.2.2. Cytogénétique moléculaire

- 0903 Hybridation sur chromosomes métaphasiques:
pour une sonde avec le contrôle interne compris B500
- 0904 Hybridation sur chromosomes métaphasiques:
pour deux sondes ou plusieurs sondes B1000

Partie Commune

- 0905 Hybridation sur noyaux interphasiques:

quel que soit le nombre de sondes utilisées

B500

Les cotations des examens 0903, 0904 et 0905 ne sont pas cumulables entre elles.

2.4.3. Nomenclature des actes en BHN

Depuis le 1er Janvier 2009, une nomenclature harmonisée au niveau national des actes hors Nomenclature des Actes de Biologie Médicale (NABM), dite nomenclature de Montpellier (http://www.chu-montpellier.fr/publication/inter_pub/R300/rubrique.jsp) s'impose aux services hospitaliers. Cette nomenclature est destinée à valoriser les actes innovants utilisés en diagnostic (ce qui exclu les actes réalisés dans le cadre de protocoles de recherché ou pour lesquels aucun résultat signe n'est rendu au prescripteur) via les MIGAC (Missions d'Intérêt Général et d'Aide à la Contractualisation). Cette nomenclature est révisée régulièrement (une à deux fois par an) pour tenir compte des évolutions rapides de l'état de l'Art.

3. DIPLOMES DE CYTOGENETIQUE

Le praticien responsable doit avoir reçu l'agrément de l'agence de BioMédecine (<http://www.agence-biomedecine.fr>).

Cet agrément est délivré « automatiquement » si le praticien satisfait à **toutes** les conditions suivantes :

Statut	Médecin ou Pharmacien ou Personnalité scientifique
Diplômes de spécialité	Toute formation spécifique dans le domaine susvisé, notamment : - DES de biologie médicale, option génétique - DES de biologie médicale ou formation spécialisée équivalente - DES de génétique médicale
Diplômes complémentaires	DESC de cytogénétique (en l'absence du DES de biologie médicale option spécialité génétique) ou tout diplôme garantissant une formation en cytogénétique

Partie Commune

Expérience	12 mois dans un ou des laboratoire(s) autorisé(s) pour l'activité demandée avec une attestation de compétence circonstanciée du responsable agréé
------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Dans les autres cas, une commission d'agrément est réunie pour statuer.

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. Le présent 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/ Responsables

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 agréés dans les domaines d'activité du laboratoire.

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, dépend de la structure du laboratoire et de son équipement en automates. Le nombre moyen d'examen effectué par technicien doit être suffisant pour permettre une qualité et une fiabilité des résultats répondant aux critères définis par les Contrôles de Qualité Externes (CQE), le maintien des connaissances au moyen des formations continues et l'acquisition et la maîtrise des nouvelles techniques. Il est rappelé que la spécialisation de technicien en cytogénétique nécessite une formation et un apprentissage d'au moins un an pour acquérir une compétence spécifique. Il est de la responsabilité des responsables d'assurer la formation continue du personnel

Partie Commune

1.3. Secrétariat

Il doit assurer la prise des rendez-vous, l'enregistrement des examens, l'envoi des résultats, l'archivage des dossiers 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 aux dispositions de l'article [R2131-6](#) du Code de la Santé Publique.

Les accès aux laboratoires doivent être réglementés. Il est souhaitable de disposer d'une pièce sombre pour l'observation en microscopie fluorescente, d'une pailleuse dédiée (au minimum) aux techniques de FISH et il est nécessaire d'avoir une salle réservée à la culture cellulaire avec système de traitement d'air adapté. Certaines techniques peuvent nécessiter un espace pré-PCR séparé du post-PCR. Il est souhaitable que les locaux soient climatisés

3. MATERIEL TECHNIQUE

3.1. Matériel commun à tout laboratoire d'analyses médicales

Le matériel doit comporter les instruments indiqués par les décrets de l'Agence de la Biomédecine.

3.2. Matériel obligatoire spécifique à la cytogénétique

[\(Arrêté du 11 Décembre 2000 fixant la liste des équipements des laboratoires d'analyses de biologie médicale nécessaires à la réalisation des examens des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales\)](#)

Pour les laboratoires autorisés à pratiquer des examens relevant de la cytogénétique, deux exemplaires des équipements indispensables (incubateurs, centrifugeuses etc.) doivent exister afin de pallier à leur défaillance éventuelle. Une stratégie de secours doit exister si l'équipement n'est pas dupliqué. La climatisation des locaux est fortement recommandée pour assurer une atmosphère avec le minimum de variations de température et de pression.

Le laboratoire disposera de :

- deux incubateurs pour culture cellulaire (+/- à CO₂ selon le type de culture) équipés d'une alarme si possible reliée à une centrale.
- une hotte à flux laminaire (classe sécurité microbiologique, chaque prélèvement étant susceptible d'être pathogène)

Partie Commune

- une hotte pour manipulation des produits toxiques
- une centrifugeuse basse vitesse
- une centrifugeuse à micro-tubes
- deux bains thermostatés
- 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 microscope inversé
- un équipement numérique analyseur d'images permettant d'assurer la reproduction et la conservation des documents (les logiciels d'acquisition sont à mettre à jour en fonction de leur évolution) ou à défaut un laboratoire photographique (quoique que cette solution soit obsolète)

En outre, pour certaines applications :

- une loupe binoculaire

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 annuels.

4. ECHANTILLONS BIOLOGIQUES

4.1. Prélèvements

Attention respecter le 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.

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, les échantillons doivent être recueillis stérilement et acheminés dans un délai compatible avec la survie des cellules.

Pour la cytogénétique constitutionnelle, le consentement de la personne et l'attestation de consultation du prescripteur sont obligatoires !

Partie Commune

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

Le transport doit répondre aux conditions ADR ([Accord européen relatif au transport international des marchandises Dangereuses par la Route](#)). 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.

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

Partie Commune

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.

Les prélèvements doivent être accompagnés du formulaire de consentement dûment signé et de l'attestation de consultation.

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. Les procédures techniques décrivant chaque étape doivent être écrites et être à disposition.

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. [L'annexe 1](#) montre un exemple des critères permettant d'apprécier le niveau de résolution des caryotypes. Chaque laboratoire doit participer aux CQE et doit appliquer des mesures correctives si nécessaire.

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

Partie Commune

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

Une procédure de validation des lots de sondes doit être écrite et tenue à disposition du laboratoire.

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

➤ Pour les sondes commercialisées :

La vérification de la sensibilité et de la spécificité est réalisée par contrôle de l'hybridation sur le chromosome homologue et/ou par l'analyse de l'hybridation d'une sonde témoin du chromosome testé.

➤ Pour les sondes non commercialisées :

Chaque nouvelle préparation de sonde de type peinture ou locus spécifique, devra être testée 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. En ce qui concerne l'utilisation de sondes sur noyaux interphasiques uniquement, la sensibilité doit être vérifiée sur 50 noyaux et 5 mitoses provenant d'au moins deux témoins l'un positif pour l'anomalie et l'autre négatif.

5.2.4. Modalités de lecture

Dans la mesure du possible une double lecture des lames au microscope est recommandée surtout en interphase avec établissement d'une fiche de lecture reportant les conditions d'analyse.

Partie Commune

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, voir section archivage)

5.2.6. Résultats

Si une technique d'hybridation in situ fluorescente a été réalisée avant l'analyse chromosomique le résultat de cette technique devra mentionner qu'il s'agit d'une analyse partielle ne renseignant que sur les loci des sondes utilisées et que sera réalisé ultérieurement le caryotype.

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

5. 3. 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 : CGH array, PCR quantitative, MLPA...

Un guide de Bonnes pratiques pour la CGH array est en préparation pour aider à la mise en place dans les laboratoires.

6. RESULTATS

La feuille de résultat doit se conformer aux instructions du GBEA, de l'Agence de la Biomédecine et répondre aux exigences des CQE et du 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.

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

L'information des collatéraux en cas d'anomalie génétique grave est réalisée selon les instructions de l'article [L131-1](#) du Code de la Santé Publique.

6.1. La formulation des résultats

Partie Commune

La feuille de Compte rendu (CR) des résultats doit préciser d'après la norme ISO 15189

- l'identification de l'analyse,
- l'identification du laboratoire ayant édité le CR,
- l'identification du patient,
- l'identification du prescripteur ainsi que son adresse,
- la date du prélèvement
- la date de réception par le laboratoire
- la date de réponse du CR.
- l'origine ou le type tissu examiné,
- les résultats de l'analyse, avec formule chromosomique selon [l'ISCN](#) en vigueur ;
- l'interprétation du résultat : il faut expliquer en clair les remaniements chromosomiques observés, préciser l'aspect équilibré ou déséquilibré pour les anomalies de structure et tout autre commentaire pertinent pour la compréhension de la formule.

6.1.1 Pour la cytogénétique prénatale

- Liquide amniotique :
 - les modalités de culture (in situ et/ou trypsination) ainsi que le nombre de chambres de culture utilisées.
- Nombre de clone lus si culture in situ
- Nombre de mitoses examinées
- Nombre de caryotypes classés

6.1.2 Pour la cytogénétique classique seront précisés :

- le(s) type(s) de marquage en bandes utilisé(s) -
- le degré de résolution global estimé

La résolution globale correspond à la résolution obtenue pour les deux meilleurs caryotypes [\[voir annexe 1\]](#)

- le nombre de mitoses examinées-
- le nombre de caryotypes établis

Partie Commune

6.1.3 Pour la cytogénétique moléculaire : -

- l'identification, la nature et le locus 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 « Il n'a pas été décelé d'anomalie dans les conditions de l'examen » est préférable au terme de « caryotype normal ».

De la même manière, la mention « caryotype masculin ou féminin » est préférable à la mention « sexe masculin ou féminin ».

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 ([cf annexe 6](#)), ce fait doit être signalé et les limites du résultat expliquées.

Un commentaire expliquera dans la mesure du possible les conséquences phénotypiques. Ce commentaire peut-être détaillé dans une lettre jointe au médecin prescripteur. Il précisera qu'un conseil génétique doit être proposé ou réalisé en cas d'anomalie constitutionnelle.

Il mentionnera l'absence de renseignements cliniques si nécessaire

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

8.1. Documents administratifs

Les comptes rendus d'analyses de biologie médicale et leur commentaire explicatif sont conservés par les laboratoires pendant une durée de trente ans (décret

Partie Commune

[2000-570 du 23 juin 2000](#) et art [R1131-20 du décret 2008-321 du 4 Avril 2008](#) relatif à l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne ou à son identification par empreintes génétiques à des fins médicales.

Concernant les mineurs, la durée de conservation serait de trente ans après la majorité de l'enfant (d'après un document publié par le service des Archives de l'APHP).

Pour le diagnostic prénatal, aucune durée « officielle » de conservation n'a été retrouvée dans les textes officiels consultés (ce qui ne veut pas dire qu'une telle information n'existe pas !), nous recommandons donc de garder les documents administratifs pour une durée égale de trente ans.

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.

8.2. Documents et matériels biologiques

8.2.1. Images

3 Caryotypes et au moins 1 exemplaire de toute image complémentaire ayant contribué au diagnostic, sous n'importe quel support permettant une réanalyse pendant 30 ans.

8.2.2. Lames

Conservation des Lames ayant servi au diagnostic:

- 1 an en prénatal,
- jusqu'au rendu du résultat en postnatal

8.2.3. Matériel Biologique

Tous matériels permettant une analyse complémentaire et inutilisés à l'issue de l'analyse : par exemple culot cellulaire, lames blanches, ADN etc..

Les durées de conservation minimales recommandées sont de

- 9 mois en prénatal à compter de la date du prélèvement
- 5 ans en postnatal pour un enfant (moins de 15 ans et 3 mois : définition légale) et pour tous les retards mentaux et syndrome malformatifs.

Dans les autres situations cliniques, la conservation de matériel n'est pas indispensable et sa mise en place laissée à l'appréciation du laboratoire.

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 pour les structures sont délivrées par les ARH. L'agrément des praticiens est sous la dépendance de l'Agence de Biomédecine (décrets d'applications en attente ; dans la période intermédiaire, l'agrément est toujours délivré par la DGS).

Les médecins biologistes peuvent assurer la consultation médicale antérieure au prélèvement et le conseil génétique résultant de l'examen. Les pharmaciens biologistes ne peuvent assurer la consultation préalable à l'examen mais peuvent assurer le conseil génétique associé au résultat rendu par leur laboratoire.

B. REALISATION DES EXAMENS

Il est souhaitable que les laboratoires participent à un Contrôle de Qualité Externe (CQE) et assurent l'application de mesures correctives si elles ont été préconisées par le comité d'experts.

1. INFORMATION

Les modalités d'information préalable des patients et de leurs parents doivent se conformer aux décrets d'application en cours et dépendant de l'Agence de la Biomédecine (<http://www.agence-biomedecine.fr/fr/index.aspx>)

2. ECHANTILLONS

2.1. Prélèvement *

Sang : 1 à 3ml de sang seront prélevés stérilement sur héparine de Sodium ou de Lithium faiblement dosée (10 à 20 U/ml de sang). *

Cytogénétique Constitutionnelle Postnatale

Peau ou autre tissu : Le fragment biopsié doit avoir un volume minimum de 2 mm³ et être mis extemporanément dans du milieu de culture stérile additionné d'antibiotiques (ou du sérum physiologique stérile).

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 procédures écrites et disponibles au laboratoire.

3.2. Marquage en bandes :

Un marquage en bandes (R ou/et G) est obligatoire, avec un niveau de résolution adapté aux indications ([cf annexe 6](#)). Il est souhaitable que le laboratoire maîtrise, outre les techniques de base en cytogénétique, les techniques de haute résolution et d'analyse de l'inactivation du chromosome X, ou identifie un laboratoire correspondant maîtrisant ces techniques.

Si cela est nécessaire à l'interprétation, les techniques complémentaires de cytogénétique (bandes C, Q, NOR...) ainsi que les techniques de cytogénétique moléculaire seront mentionnées sur la feuille de résultat. Elles peuvent être réalisées dans un deuxième temps.

Cytogénétique Constitutionnelle Postnatale

3.3. Nombre de cellules examinées

Le nombre de cellules à examiner doit faire l'objet d'une procédure écrite à l'intérieur de chaque laboratoire.

15 cellules doivent être comptées au minimum, et au moins 3 caryotypes établis.

La recherche d'une translocation familiale connue peut se faire sur un nombre minimal de cellules mais avec mention sur la feuille de résultat que l'étude n'a recherché que la présence de l'anomalie familiale. La recherche d'une anomalie des gonosomes sera décrite dans le paragraphe suivant (4.2).

3.4. Recommandations en cas d'anomalie de structure (à l'exception des translocations robertsoniennes).

Il est recommandé en cas d'anomalie de novo de confirmer le nombre et les partenaires impliqués par des peintures chromosomiques éventuellement associées à des sondes loci-spécifiques.

Dans le cadre d'une anomalie familiale, le nombre et les partenaires impliqués doivent avoir été vérifiés sur un porteur de l'anomalie familiale. Si existent des signes cliniques, les techniques de cytogénétique moléculaire doivent confirmer qu'il s'agit, à ce niveau de résolution, d'un remaniement semblable à celui du parent porteur sain.

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](#)). La réponse doit reprendre le nombre exact de cellules observées et associer un commentaire explicitant chacune des lignées observées.

Ex : mos 45,X[15]/46,XX[5]

Caryotype féminin montrant sur les 20 cellules observées 15 cellules avec monosomie X (75% des cellules étudiées)

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.

Cytogénétique Constitutionnelle Postnatale

D'après la nomenclature ISCN 2009, 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, au moins 50 cellules seront étudiées en cytogénétique conventionnelle ou en FISH. 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](#)).

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. Dans ces indications, l'étude d'un minimum de 50 cellules est requise, l'extension de l'étude peut se faire par FISH sur 100 cellules avec des sondes spécifiques des chromosomes sexuels. Selon les indications, une mosaïque avec moins de 5% de cellules variantes et posant des difficultés d'interprétation, pourra ne pas être mentionnée sur la feuille de résultat.

Dans le cas du syndrome de Turner, la recherche d'un clone comportant un fragment d'Y doit être faite par FISH sur 100 cellules ou par biologie moléculaire.

➤ **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**

Suivant les indications, une attention particulière sera portée aux chromosomes 8, 9, 13, 18, 22 et surtout 21 qui correspondent aux trisomies viables les plus fréquentes.

Cytogénétique Constitutionnelle Postnatale

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 et peuvent ne pas être reportés sur la feuille de résultat. En cas de doute et pour les variants inhabituels, les techniques de caractérisation de l'hétérochromatine doivent être appliquées et seront alors mentionnées sur la feuille de résultat avec l'interprétation nécessaire. L'étude du caryotype des parents pourra si besoin 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 et peuvent alors ne pas être mentionnés sur la feuille de résultat.

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 et les maladies cassantes

Les recherches de maladies cassantes concernent le diagnostic cytogénétique de la Maladie de Fanconi, de l'Ataxie-Télangiectasie, des Syndromes de Bloom et de Nijmegen. D'autres pathologies peuvent être concernées dans le cadre de recherches translationnelles.

Les demandes sont coordonnées dans le cadre du Réseau INCa « Maladies cassantes de l'ADN » et recensées dans la base CYMCA (CYtogénétique des

Cytogénétique Constitutionnelle Postnatale

Maladies Cassantes), développée au sein de l'application CEMARA (CENtre de Maladies Rares) (<https://cemara.org/presentation/show.jsp>).

En 2010, 29 laboratoires répartis au niveau national participent au réseau CYMCA (annexe 1). Il est recommandé que les demandes de recherche de maladies cassantes soient adressées à l'un de ces laboratoires.

Contacts :

Dr. Jérôme Couturier, Institut Curie, Paris (jerome.couturier@curie.net)

Dr. Jean Soulier, Hôpital Saint-Louis, Paris (jean.soulier@sls.aphp.fr)

Pr. Dominique Stoppa-Lyonnet, Institut Curie, Paris (dominique.stoppa-lyonnet@curie.net)

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. On rappelle que certaines anomalies chromosomiques sont préférentiellement dépistées sur des cultures de fibroblastes. (ex : i(12p) et syndrome de Pallister Killian).

5. CARYOTYPE EN HAUTE RESOLUTION

Il doit s'accompagner d'un caryotype complet à un niveau de résolution standard (résolution de 550 bandes)

On peut distinguer:

5.1. L'analyse « complète »

Pour que l'analyse soit en haute résolution, il faut obtenir au moins deux paires analysables de chaque chromosome à un niveau de résolution de 850 bandes ([voir annexe 1](#))

5.2. 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.

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.

6.2. FISH métaphasique

Les peintures chromosomiques

Elles doivent être utilisées en cas d'anomalie familiale pour rechercher le nombre de partenaires impliqués dans le remaniement sur un membre de la famille porteur du remaniement et sur tout sujet présentant des signes cliniques inexplicables. L'utilisation de sondes loci spécifiques complémentaires peut s'avérer nécessaire à l'interprétation. En cas d'anomalie *de novo*, le même principe doit être appliqué. Si le laboratoire ne possède pas la technologie, il doit pouvoir faire appel à un laboratoire correspondant.

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.

Les sondes « séquence unique »

Elles sont à contrôler sur un chromosome normal en s'assurant de son hybridation dans la région d'intérêt. Il est préférable de vérifier la séquence des sondes non commerciales utilisées par biologie moléculaire.

Cytogénétique Constitutionnelle Postnatale

➤ Critères Analyse Métaphasique

- **Au moins 10 cellules, et si possible 20, doivent être analysées.**
- **En cas de recherche de duplication, compléter par l'étude par l'analyse d'au moins 25 noyaux.**
- **Réaliser 2 images par type de sondes.**

6. 3. 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. Elle peut être complémentaire à l'analyse cytogénétique en cas de recherche d'anomalies des chromosomes sexuels.

➤ Critères Analyse Interphasique:

- **100 noyaux si possible, avec 2 lecteurs en double aveugle.**
- **Réaliser 2 images par type de sonde**

7. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

Les techniques telles que qPCR, MLPA, QMPSF etc... peuvent s'avérer nécessaires. Dans ce cas, l'agrément de Génétique Moléculaire est nécessaire, soit l'agrément «non limité», soit l'agrément limité aux «analyses de Biologie Moléculaire appliquées à la cytogénétique»

8. RESULTATS

Sauf urgence (comme une suspicion de trisomie 21 ou une ambiguïté sexuelle), le délai de réponse habituel du laboratoire ne devrait pas dépasser 21 jours. Ce délai peut être plus important en cas d'anomale chromosomique complexe et ou difficile à caractériser.

Cytogénétique Constitutionnelle Postnatale

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'examens complémentaires (en biologie moléculaire, par exemple), d'une étude familiale ou d'une consultation de génétique chromosomique. L'information des membres de la famille doit se faire selon les recommandations apportées par l'article [L131-1](#) du code de la Santé Publique.

III. **CYTOGENETIQUE CONSTITUTIONNELLE PRENATALE**

A. AUTORISATION D'EXERCICE

Les autorisations pour les structures et les agréments pour les praticiens sont règlementés par décret (cf I.A.2.1). L'agrément des praticiens est sous la dépendance de l'Agence de la Biomédecine, l'autorisation de la structure sous la dépendance de l'ARH

Le laboratoire est responsable du bilan annuel d'activité qui doit être adressé aux autorités de tutelle (Agence de la Biomédecine) ainsi que du recueil du suivi des grossesses.

Le laboratoire doit suivre les règles de bonne pratique édictées par le ministre de la Santé après avis de l'Agence de la Biomédecine, de l'AFSSAPS, de la HAS (article [R2131-1-1](#) du Code de la Santé Publique).

B. REALISATION DES EXAMENS

Il est souhaitable que les laboratoires participent à un CQE et assurent l'application de mesures correctives si elles ont été préconisées par le comité d'experts.

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
- d'une pièce spécialement affectée aux techniques de cytogénétique proprement dites
- d'une pièce permettant l'accueil des familles et l'entretien avec les patientes. ([Art. R2131-6](#) du Code de la Santé Publique).

1. RECEPTION DES ECHANTILLONS

En plus des renseignements habituels, les prélèvements foëtaux doivent être accompagnés :

- de l'identification du médecin prescripteur

Cytogénétique Constitutionnelle Prénatale

- de deux documents obligatoires : l'attestation de consultation médicale de conseil génétique et 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 [R2131-2](#) du Code de la Santé Publique. Le modèle type de consentement est défini dans l'arrêté du [19 Février 2010](#).
- d'une fiche de renseignements comportant :
 - l'indication
 - les antécédents personnels, familiaux, obstétricaux- la date des dernières règles ou du début de grossesse
- et selon l'indication :
 - le compte rendu de l'échographie et le nom de l'échographe ;
 - le 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 liquide amniotique optimale pour la réalisation d'un caryotype fœtal est de :

- ≥ 15 ml de liquide amniotique
- ≥ 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 chorales.

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.

Le délai global d'acheminement et de mise en culture des prélèvements ne doit pas excéder 24 h dans la mesure du possible.

Cytogénétique Constitutionnelle Prénatale

2.2. Marquage en bandes

Un marquage en bandes (R ou/et G) est obligatoire, avec un niveau de résolution adapté aux indications. Une résolution à 400 bandes est le minimum acceptable pour les examens standards.

3. LIQUIDE AMNIOTIQUE (Conditions optimales) :

3.1. Analyse cytogénétique conventionnelle

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.

La culture se fera en double (**MINIMUM 2 BOITES DE CULTURE** ensemencées avec 2 milieux différents de façon à éviter les contaminations manuelles, **dans 2 incubateurs différents**). La culture sera maintenue jusqu'au compte-rendu écrit.

L'ensemencement doit se faire échantillon par échantillon.

***Milieux différents** = milieux reconstitués à partir de deux flacons source différents livrés par un fournisseur. Si le flacon source est aliquoté au laboratoire, deux aliquots du même flacon source ne peuvent être considérés comme des milieux différents.*

Méthode in situ :

- 12 mitoses comptées sur au moins 12 colonies différentes provenant de 2 cultures distinctes

- 3 caryotypes établis

Après trypsination :

- 15 cellules comptées provenant de 2 boites de culture

- 3 caryotypes établis

La résolution doit être au minimum de 400 bandes pour permettre une analyse structurale des chromosomes et le résultat rendu dans un délai de 14 jours. Si la qualité obtenue ne le permet pas, le rapport doit le mentionner.

Cytogénétique Constitutionnelle Prénatale**4. VILLOSITES CHORIALES (Conditions optimales) :**

L'analyse en deux temps associant un examen direct et une culture à long terme est souhaitable.

L'examen direct est laissé au choix du cytogénéticien : FISH, PCR ou caryotype direct.

Dans le cas où la quantité du matériel reçu ne permettrait pas les deux analyses, la culture à long terme doit être privilégiée.

S'il existe une indication de diagnostic en biologie moléculaire, l'ADN doit être obtenu directement à partir des villosités et le laboratoire doit vérifier l'origine fœtale du prélèvement.

Analyse directe :

- **12 cellules comptées si possible et 3 caryotypes établis**
- ou**
- **100 noyaux en double lecture en FISH**

Culture :

- **12 cellules comptées**
- **3 caryotypes établis**

Technique double (caryotype direct + culture) :

- **Au moins 20 cellules au total dont au moins 6 sur culture**
- **2 x 3 caryotypes établis**

Technique double (FISH/PCR + culture) :

- **20 métaphases au total issues de deux boîtes de culture**
- **3 caryotypes établis**

Cytogénétique Constitutionnelle Prénatale

En cas de rapport préliminaire, le rapport doit indiquer que l'examen ne sera complet qu'après l'obtention des résultats de la culture à long terme (et dans un délai de 14 jours). Une résolution à 400 bandes est le minimum acceptable pour les examens standards pour permettre une analyse structurale des chromosomes. Si la qualité obtenue ne le permet pas, le rapport doit le mentionner.

5. SANG FŒTAL (Conditions optimales) :

20 mitoses comptées

3 caryotypes établis

6. MOSAIQUES

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 la recherche d'une disomie uniparentale.

7. LIMITES DU DIAGNOSTIC

Les conditions d'analyse d'un caryotype fœtal peuvent ne pas mettre en évidence une mosaïque fœtale vraie si le taux des cellules aneuploïdes est trop faible ([voir annexe 3](#)). Une anomalie fine de la structure des chromosomes peut être méconnue en fonction du degré de résolution obtenu.

Cytogénétique Constitutionnelle Prénatale

8. ANALYSE PAR FISH OU AUTRES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE (QF-PCR, QMPSF...)

Elles peuvent être proposées en fonction des conditions d'indication et d'interprétation. La feuille de résultats doit indiquer qu'il s'agit de résultats partiels ne donnant un renseignement que sur les loci testés, que ce type d'analyse ne remplace en aucun cas le caryotype qui sera fait obligatoirement par ailleurs.

Il est à noter que les techniques QF-PCR et QMPSF ou MLPA sont soumises à l'agrément de Génétique Moléculaire (agrément non limité ou limité aux analyses de biologie moléculaire appliquées à la cytogénétique)

Ces techniques rapides doivent systématiquement être associées à un caryotype.

Critères d'Analyse en FISH Interphasique:

- 100 noyaux si possible, avec 2 lecteurs en double aveugle

- Réaliser 2 images par type de sondes

9. RECOMMANDATIONS EN CAS D'ANOMALIE DE STRUCTURE.

Il est recommandé en cas d'anomalie de novo de confirmer le nombre et les partenaires impliqués par des peintures chromosomiques éventuellement associées à des sondes loci-spécifiques.

Dans le cadre d'une anomalie familiale, le nombre et les partenaires impliqués doivent avoir été vérifié sur un porteur de l'anomalie familiale. Si existent des signes échographiques ou cliniques, les techniques de cytogénétique moléculaire doivent confirmer qu'il s'agit, à ce niveau de résolution, d'un remaniement semblable à celui du parent porteur.

10. DISOMIE UNIPARENTALE

Les techniques de biologie moléculaire recherchant une éventuelle disomie uniparentale sont à considérer selon les données de la littérature. Ces techniques complémentaires sont à considérer quand un chromosome soumis à empreinte

Cytogénétique Constitutionnelle Prénatale

parentale est impliqué dans un remaniement de structure, dans une anomalie de nombre en mosaïque (éventuellement confinée au placenta).

11. RESULTATS

Le résultat des examens de cytogénétique prénatale ne peut être transmis à la patiente que par le médecin prescripteur ([Décret N°2000-570 du 23 Juin 2000](#)).

IV. CYTOGENETIQUE HEMATOLOGIQUE

A. INTRODUCTION

Ce chapitre a été rédigé par les membres du Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique (GFCH).

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

Les contrôles de qualité externe proposés annuellement par le GFCH permettent d'évaluer les pratiques professionnelles et la qualité des laboratoires participants.

B. CONDITIONS D'EXERCICE

Le responsable du laboratoire doit avoir, en plus des titres réglementaires pour l'exercice de la Cytogénétique, des connaissances en Hématologie permettant d'assurer l'interprétation correcte des 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

Cytogénétique Hématologique

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 dans un milieu tamponné stérile tel que PBS, Hanks,...., afin de préserver la viabilité cellulaire.

1.2. Fiche de renseignements

L'échantillon doit parvenir le plus rapidement possible au laboratoire et être accompagné de la fiche de renseignements cliniques. Ceux-ci doivent comprendre :

- le ou les diagnostic(s) évoqué(s) ou le diagnostic 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 et le résultat de caryotypes antérieurs effectués dans d'autres laboratoires

Les résultats de l'hémogramme le plus récent mentionnant la date, ainsi que ceux du myélogramme, de l'immuno-phénotypage et de l'examen anatomo-pathologique doivent également être transmis.

1.3. Réception

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

- outre les données d'identification, des indications sur un risque contagieux particulier éventuel
- 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 du type d'hémopathie (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

Cytogénétique Hématologique

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.

2.1.2. Analyse

Le nombre de mitoses à analyser peut varier en fonction du stade de la maladie.

- Au diagnostic, il est nécessaire, en l'absence d'anomalie détectée, d'analyser (comptage et identification des chromosomes) au moins 20 mitoses et de classer 4 à 5 caryotypes. En cas d'anomalie, il est également recommandé d'analyser 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 confirmer ou d'infirmer une éventuelle clonalité, soit en poursuivant, au moins au microscope, la recherche des métaphases anormales au-delà des 20 premières mitoses (au moins doublement du nombre initial en cas de négativité), soit de réaliser une étude en cytogénétique moléculaire avec une sonde spécifique de l'anomalie suspectée.

Lors du suivi (contrôle de rémission, suspicion de rechute,...)

- Pour la recherche d'une anomalie préalablement décelée , il est recommandé soit d'analyser au moins 30 mitoses quand l'analyse ne peut être faite qu'en cytogénétique conventionnelle, soit de réaliser une analyse ciblée en cytogénétique moléculaire, d'emblée ou en complément d'une analyse conventionnelle de 20 mitoses qui n'a pas mis en évidence l'anomalie recherchée.
- En cas d'absence d'anomalie détectée auparavant, cette analyse n'est pas indiquée en cas de rémission cytologique complète mais les conditions sont identiques à celles du diagnostic en cas de suspicion de rechute.

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.

Cytogénétique Hématologique

2.1.4. Conservation des culots cytogénétiques

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.

2.2. Cytogénétique moléculaire

2.2.1. Conditions générales

Les recommandations ont été énoncées dans le chapitre I-B.5.2.

De plus, la sensibilité et la qualité d'hybridation doivent être évaluées pour chaque préparation (étalement cytogénétique, frottis de sang ou de moelle, empreinte ganglionnaire ou tumorale, coupe de tissus, cytopspin...).

2.2.2. Modalités d'interprétation des techniques

Une lecture des lames au microscope par deux observateurs différents 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 compter un nombre suffisant de noyaux (100 par lecteur au minimum) voire 200 ou plus en cas de limite de signification) (voir partie commune chapitre 5.2).

Il est important de pouvoir confronter les résultats de la FISH interphasique avec ceux de la FISH métaphasique pour une interprétation correcte des résultats.

3. RESULTATS

3.1. La formulation des résultats

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

Cytogénétique Hématologique

Le résultat de la FISH, outre les recommandations formulées dans la partie commune paragraphes 5 et 6 du chapitre B, doit spécifiquement préciser le matériel initial (suspension de cellules fixées, moelle, sang, ganglion, tumeur, cellules fixées...) et la date du prélèvement.

Pour les cellules interphasiques, il convient de mentionner le seuil de sensibilité propre 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. Selon la pathologie et le degré d'urgence, un délai moyen optimal inférieur ou égal à 7 jours pour les leucémies aiguës et les lymphomes de Burkitt, inférieur ou égal à 14 jours

Cytogénétique Hématologique

pour les pathologies myéloïdes chroniques et inférieur à 30 jours pour les pathologies lymphoïdes chroniques est préconisé.

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

6.1. Mise en culture

Voir tableau annexe 5

6.2. Indication de l'analyse cytogénétique conventionnelle et moléculaire

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.

En 2004, le GFCH a établi et publié des recommandations pour la prise en charge cytogénétique des hémopathies [Pathologie Biologie 52 (2004) 265–266].

En 2006, des représentants des cliniciens et des biologistes impliqués dans le diagnostic des hémopathies malignes ont élaboré un guide de bonnes pratiques et de juste prescription qui est accessible dans les Actualités (item « Référentiels ») du site internet de la Société Française d'Hématologie (<http://sfh.hematologie.net>).

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 incomplètement 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 non détectables par l'analyse conventionnelle (anomalies cryptiques)

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'examens 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 cytoponctions tumorales.

Cytogénétique Oncologique

➤ 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 sérum « 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 1×10^6 cellules nucléées (optimale à partir de 5×10^6). 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 pourrait 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

Cytogénétique Oncologique

La congélation à l'arrivée d'une fraction de l'échantillon pour conservation en tumorothèque à -80°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

➤ Cyto-Ponctions :

Numération de l'échantillon, et mise en culture en suspension à raison de 5×10^5 à 1×10^6 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.

Cytogénétique Oncologique

L'établissement du caryotype constitutionnel est indiqué quand il existe, dans la totalité des mitoses, un doute quant à 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 œuvre 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 RT-PCR pour la détection d'un transcrite de fusion, selon le diagnostic. Dans les indications où la RT-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.

Cytogénétique Oncologique

➤ Sur noyaux:

Examen de 30 à 200 noyaux, selon l'indication et le résultat.

Il sera archivé un minimum de 3 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.

ANNEXES

ANNEXE 1

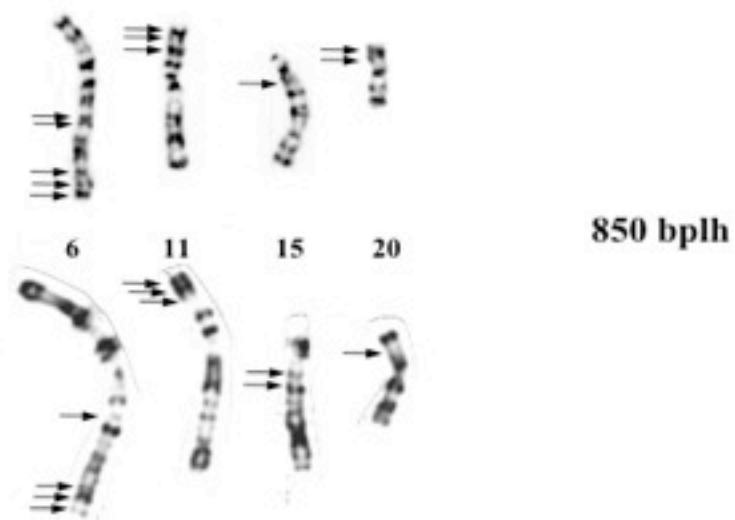
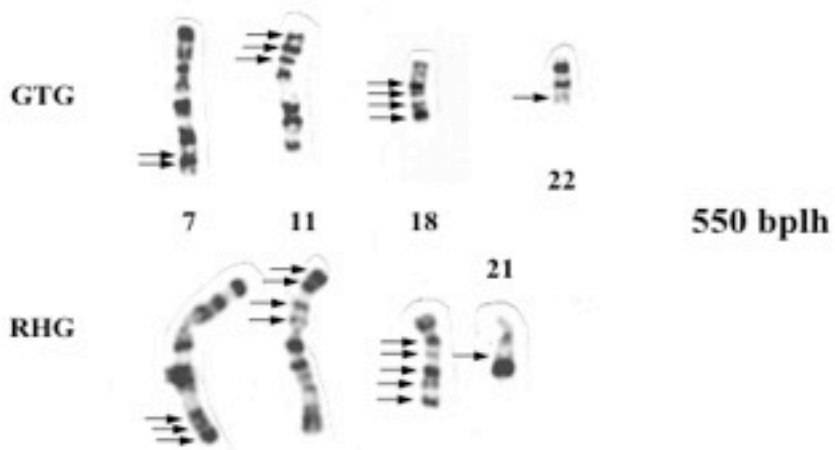
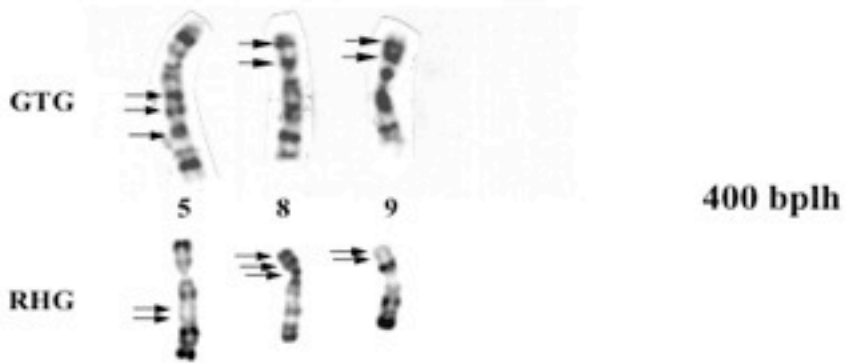
A. EXEMPLE DE CRITERES UTILISES POUR EVALUER LA QUALITE DES BANDES G

Qualité du marquage	Valeur ISCN correspondante	Bandes identifiées
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]

Annexes

B. MODELES DE RESOLUTION EN BANDES G ET R (DR MARGUERITE PRIEUR)



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 micro délétion/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 fœtale / malformations dans des branches collatérales

Annexes

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

Annexes
ANNEXE 3
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

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

Nombre de cellules (n)	Degré de confiance			Nombre de cellules (n)	Degré de confiance		
	0.90	0.95	0.99		0.90	0.95	0.99
< 4				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%

Annexes

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

CRITERES 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.**
- **15 à 20 cellules de deux sources différentes sont examinées, issues de 10 à 16 colonies différentes.**

Annexes**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 à la première étape que l'anomalie en question n'est pas présente

Annexes
Attitude en fonction des chromosomes concernés

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

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

Annexes
ANNEXE 5
RECOMMANDATIONS POUR LA MISE EN CULTURE DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES SELON LE TYPE D'HEMOPATHIE

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 correspondent aux conditions optimales le plus souvent recommandées pour détecter les anomalies à rechercher. Elles n'excluent pas d'autres possibilités, validées par le laboratoire.

Pathologie	Leucémie aiguë	Syndromes myéloprolifératifs (LMC,)	Syndrome myélodysplasique
Echantillon	moelle sang blastique	moelle en cas d'impossibilité, sang si myélémie suffisante	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 voire moelle, sang
Nombre de cellules/ml de culture §	1.10 ⁶	1.10 ⁶	0,5 à 10.10 ⁶ selon les équipes

Annexes

Mitogènes	oui	non	selon l'histologie et le diagnostic évoqué, voire avec et sans mitogène en cas de doute diagnostique
Durée	72 ou 96 h	72 h	17 h (exposition à la colchicine), 24 h et/ou 72 h si mitogènes

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

Annexes

ANNEXE 6 :**NIVEAU DE RESOLUTION SOUHAITABLE EN FONCTION DES INDICATIONS****Postnatal : 550 bandes**

Un minimum de 400 bandes est requis, sinon un deuxième prélèvement est recommandé sauf en cas d'anomalie de nombre concordante avec la clinique (ex : trisomie 21).

Prénatal (Liquide amniotique et Villosités choriales) : 400 bandes minimum

ARBRES DECISIONNELS

Classification des situations cliniques utilisée dans tous les arbres décisionnels

- **Groupe 1** : évoquant une anomalie chromosomique autosomique déséquilibrée
 - **Post natal** : retard mental, syndrome dysmorphique, syndrome malformatif, hypotonie, ...
 - **Prénatal** : ensemble des indications autres qu'antécédents familiaux et détermination du sexe foetal
- **Groupe 2** : évoquant une anomalie chromosomique autosomique équilibrée
 - Troubles de la reproduction à type de stérilité primaire ou secondaire, fausses couches à répétition, antécédent d'un enfant mort-né sans caryotype, anomalie du spermogramme, ...
- **Groupe 3** : enquête familiale où l'anomalie chromosomique est connue dans la famille
- **Groupe 4** : évoquant une anomalie gonosomique
 - Ambigüité sexuelle
 - Aménorrhée primaire ou secondaire, ménopause précoce, retard de croissance, dysmorphie évoquant un syndrome de Turner
 - Anomalie du spermogramme

QUAND REALISER UNE ENQUETE FAMILIALE ?

Un caryotype des parents et/ou une enquête familiale sont indispensables devant :

- un remaniement chromosomique de structure qui ne correspond pas à un polymorphisme connu
- un marqueur surnuméraire
- une récurrence de trisomie à la recherche d'un dérivé du chromosome concerné chez le sujet index

ATTENTION : pas de caryotype chez un mineur asymptomatique

Un caryotype des parents et/ou une enquête familiale ne sont pas indispensables en cas de :

1) polymorphisme répertorié comme tel :

- Variants satellitaires
- Inversions communes
 - inv(1)(p11q12)
 - inv(2)(p11.2q13)
 - inv(3)(p11~13q11~12)
 - inv(5)(p13q13)
 - inv(9)(p11q12)
 - inv(10)(p11.2q21.2)
 - inv(16)(p11q13)
 - inv(Y)(p11.2q11.2)
- Sites fragiles communs

2) Monosomie / Trisomie libre

CONDUITE A TENIR DEVANT UN MARQUEUR CHROMOSOMIQUE**Identification minimale du marqueur**

- Rechercher au moins l'implication des chromosomes suivants : 15, 14/22, 12, 18, 9 et gonosomes
- Si l'identification est impossible, discuter l'intérêt d'une CGH array

Caryotype des parents et/ou enquête familiale indispensable

Attention : pas de caryotype chez un mineur asymptomatique

Conseil génétique

- Penser à discuter du risque de Disomie Uniparentale en cas de marqueur dérivé d'un chromosome soumis à empreinte.

CONDUITE A TENIR DEVANT UNE ANOMALIE DE STRUCTURE

1) Translocation Robertsonienne équilibrée

Prévoir enquête familiale

Attention : pas de caryotype chez un mineur asymptomatique

Conseil génétique

- évoquer la possibilité d'un diagnostic prénatal en cas de grossesse

Translocation robertsonienne impliquant les chromosomes 14 et 15

- Discuter la pertinence d'une recherche de disomie uniparentale en fonction du phénotype

2) Translocation Robertsonienne déséquilibrée

Prévoir enquête familiale

Attention : pas de caryotype chez un mineur asymptomatique

Conseil génétique

3) Inversions péracentriques communes

Aucune action complémentaire en cas de

- Polymorphisme de l'hétérochromatine : inv(1)(p11q12), inv(9)(p11q12), inv(16)(p11q13)
- Inversion commune : inv(2)(p11.2q13), inv(3)(p11~13q11~12), inv(5)(p13q13), inv(10)(p11.2q21.2), inv(Y)(p11.2q11.2)

4) Remaniement de structure apparemment équilibré au caryotype

Groupe 1

Caryotype des parents

Contrôle de l'anomalie en cytogénétique moléculaire

- Peinture des chromosomes impliqués chez le patient (et du parent porteur en cas d'anomalie héritée)
- Sonde locus spécifique en fonction des points de cassure et/ou des signes cliniques évocateurs chez le patient et/ou le parent porteur

Arbres décisionnels

Discuter l'intérêt d'une recherche de Disomie Uniparentale si un chromosome soumis à empreinte est impliqué

Discuter l'intérêt d'une CGH array

Prévoir enquête familiale et conseil génétique

Attention : pas de caryotype chez un mineur asymptomatique

Groupes 2 et 4

Peinture des chromosomes impliqués

Enquête familiale

Attention : pas de caryotype chez un mineur asymptomatique

Conseil génétique

- Evoquer la possibilité d'un diagnostic prénatal en cas de grossesse

Groupe 3

Attention : pas de caryotype chez un mineur asymptomatique

Contrôle de l'anomalie en cytogénétique moléculaire

- Peinture des chromosomes impliqués chez le sujet index si non fait chez un autre membre de la famille à phénotype normal

Conseil génétique

- Evoquer la possibilité d'un diagnostic prénatal en cas de grossesse

5) Anomalie de structure apparemment déséquilibrée

Contrôle de l'anomalie en cytogénétique moléculaire

- Peinture du/des chromosome(s) impliqué(s)
- Sonde(s) télomérique(s) en cas de remaniement terminal

Caryotype des parents

Anomalie héritée

- Contrôle par peinture chez le parent porteur

Arbres décisionnels

- Vérifier la concordance avec le résultat du cas index et compléter si besoin l'identification chez le cas index à la recherche d'une anomalie cryptique associée
- Prévoir enquête familiale et conseil génétique

Attention : pas de caryotype chez un mineur asymptomatique

Anomalie de novo

Contrôler si possible le déséquilibre par une technique moléculaire

Conseil génétique

6) Anomalie de structure d'un gonosome

Appliquer l'arbre décisionnel des anomalies de structure avec les adaptations suivantes

Si un chromosome X est impliqué

Rechercher un mosaïcisme pour toute anomalie de structure autre qu'une t(X;autosome)

En cas d'anneau de l'X

- Rechercher la présence du locus XIST sur l'anneau en FISH

Si un chromosome Y est impliqué

Rechercher un mosaïcisme pour toute anomalie de structure autre qu'une t(Y;autosome)

En cas d'implication du bras long

- Discuter intérêt étude de la région AZF

En cas d'ambiguïté sexuelle

- Tester la présence du locus SRY en FISH

Arbres décisionnels

7) Hommes XX, Femmes XY

Tester la présence du locus SRY en FISH

Hommes XX SRY+, Femmes XY SRY -

Caryotype des parents

Conseil génétique

Hommes XX SRY-, Femmes XY SRY+

2e prélèvement de contrôle

± caryotype des parents si besoin

Conseil génétique

DIAGNOSTIC PRENATAL RAPIDE

1) Interprétation

- Penser au risque de discordance foëto-placentaire pour les prélèvements villositaires
- Penser au risque de polymorphisme des sondes centromériques en FISH
- Penser au risque de contamination maternelle pour les résultats XX

2) Prélèvement de villosité choriale

Culture cellulaire pour caryotype

Technique rapide associée obligatoire

- Caryotype direct ou
- FISH (ou équivalent) ou
- PCRq (ou équivalent)

3) Prélèvement de liquide amniotique

Culture cellulaire pour caryotype associé

Technique rapide associée facultative

- FISH (ou équivalent) ou
- PCRq (ou équivalent)

3) Compte rendu

Insérer dans le compte rendu un commentaire sur

- La quantité du prélèvement
- La qualité du prélèvement

En cas de diagnostic d'une aneuploïdie en FISH et qPCR, indiquer «compatible avec» ou «en faveur de» plutôt que trisomie ou monosomie

- Chaque laboratoire déterminera ses critères de décision en terme de seuil pour la lecture de la FISH