



ACLF

GUIDE DE BONNES PRATIQUES EN CYTOGENETIQUE

Version 1 - 2000

Version 2 - 2007

Version 3 - 2014

Ce guide a été réalisé par

L'Association des Cytogénéticiens de Langue Française

Le Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique

Le Groupe Français de Cytogénétique Oncologique

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	7
DEFINITIONS.....	7
DOMAINES DE COMPETENCE DE LA CYTOGENETIQUE MEDICALE	8
I. PARTIE COMMUNE A TOUS LES SECTEURS.....	9
A. ENVIRONNEMENT REGLEMENTAIRE	9
1.- LOIS ET DECRETS DE REFERENCE	9
2. AUTRES TEXTES CONSULTES.....	10
3. NORME NF EN 15189 et GBEA	10
4. AGREMENTS ET AUTORISATIONS.....	11
5. NOMENCLATURE DES ACTES DE CYTOGENETIQUE.....	13
5.1. Cytogénétique constitutionnelle	13
5.2. Cytogénétique acquise.....	14
5.3. Nomenclature des actes en BHN	15
B. CONDITIONS PRATIQUES DE REALISATION DES ACTES DE CYTOGENETIQUE	15
1. PERSONNEL	15
1.1. Biologistes/ Responsables.....	15
1.2. Personnel technique.....	16
1.3. Secrétariat.....	16
2. LOCAUX.....	16
3. MATERIEL TECHNIQUE.....	17
3.1. Matériel obligatoire spécifique à la cytogénétique	17
4. ECHANTILLONS BIOLOGIQUES.....	18
4.1. Prélèvements.....	18
4.2. Identification des prélèvements.....	18
4.3. Transport	19
4.4. Réception des prélèvements.....	19
5. REALISATION DE L'EXAMEN	20
5.1. Cytogénétique conventionnelle.....	20
5.2. Cytogénétique moléculaire.....	20
5.2.5 Règles d'utilisation des techniques de cytogénétique moléculaire.....	23
5. 3. Autres techniques.....	25
6. RESULTATS	25

6.1. La formulation des résultats	25
6.2. Les commentaires et la conclusion	27
7. DELAI DE REPONSE ET ECHECS	28
8. STOCKAGE ET ARCHIVAGE	28
8.1. Documents administratifs.....	28
8.2. Documents et matériels biologiques	28
9. EVALUATION DE LA QUALITE.....	29
9.1. Indicateurs de qualité	29
9.2. Evaluation externe de la qualité.....	30
II. CYTOGENETIQUE CONSTITUTIONNELLE POST-NATALE.....	31
1. INFORMATION.....	31
2. ECHANTILLONS.....	31
2.1. Prélèvement.....	31
2.2. Identification et indications	31
3. EXAMEN CYTOGENETIQUE.....	32
3.1. Culture :	32
3.2. Marquage en bandes :	32
3.3. Nombre de cellules examinées	32
3.4. Recommandations en cas d'anomalie de structure (à l'exception des translocations robertsoniennes).....	33
4. CAS PARTICULIERS.....	33
4.1. Découverte d'une mosaïque.....	33
4.2. Les transfusions sanguines.....	34
4.3. Les variants hétérochromatiques.....	35
4.5. Les sites fragiles	35
4.6. L'X fragile.....	35
4.7. Les syndromes d'instabilité chromosomique et les maladies cassantes.....	35
4.8. Les fibroblastes.....	36
5. CARYOTYPE EN HAUTE RESOLUTION.....	36
6. HYBRIDATION IN SITU et ACPA.....	36
7. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	37
8. RESULTATS	37
III. CYTOGENETIQUE CONSTITUTIONNELLE PRENATALE	38
A. CONDITIONS D'EXERCICE.....	38
B. REALISATION DES EXAMENS	38
1. RECEPTION DES ECHANTILLONS.....	38

2. TECHNIQUES CYTOGENETIQUES.....	39
2.1. Echantillon.....	39
2.2. Marquage en bandes	39
3. LIQUIDE AMNIOTIQUE (Conditions optimales) :	39
3.1. Analyse cytogénétique conventionnelle	39
4. VILLOSITES CHORIALES (Conditions optimales) :	40
5. SANG FOETAL (Conditions optimales) :	41
6. MOSAIQUE	42
6.1. Pseudo mosaïque versus mosaïque vraie	42
6.2. Cas particulier des mosaïques confinées au placenta	42
7. ANALYSE PAR FISH OU AUTRES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE (QF-PCR, QMPSF...)	42
8. RECOMMANDATIONS EN CAS D'ANOMALIE DE STRUCTURE.....	43
10. DISOMIE UNIPARENTALE.....	43
11. RESULTATS.....	43
IV. CYTOGENETIQUE HEMATOLOGIQUE.....	44
A. INTRODUCTION.....	44
B. CONDITIONS D'EXERCICE.....	44
C. REALISATION DES EXAMENS.....	45
1. PRELEVEMENT, ACHEMINEMENT ET RECEPTION DES ECHANTILLONS.....	45
1.1. Prélèvement.....	45
1.2. Fiche de renseignements.....	45
1.3. Réception.....	46
2. EXAMEN CYTOGENETIQUE.....	46
2.1. Cytogénétique conventionnelle.....	46
2.2. Cytogénétique moléculaire.....	47
3. RESULTATS	50
3.1. La formulation des résultats.....	50
3.2. Les commentaires et la conclusion	51
3.3. Les points particuliers	51
4. DELAI DE REPONSE.....	51
5. ECHECS.....	52
6. PARTICULARITES SELON LA PATHOLOGIE	52
6.1. Mise en culture.....	52
6.2. Indication de l'analyse cytogénétique conventionnelle et moléculaire	52

V. CYTOGENETIQUE ONCOLOGIQUE.....	54
A. INTRODUCTION.....	54
B. CONDITIONS D'EXERCICE	54
C. REALISATION DES EXAMENS.....	54
1. PRELEVEMENT, ACHEMINEMENT ET RECEPTION DES ECHANTILLONS.....	54
1.1 Recueil des prélèvements	54
1.2 Fiche de renseignements.....	55
2. EXAMEN CYTOGENETIQUE.....	55
2.1 Cytogénétique conventionnelle.....	56
2.2 Cytogénétique moléculaire.....	57
3. RESULTATS	58
3.1 Formulation des résultats.....	58
3.2 Commentaires et conclusion.....	58
4. DELAIS DE REPONSE	58
5. ECHECS.....	59
ANNEXES.....	60
ANNEXE 1 : EVALUATION DE LA RESOLUTION OBTENUE	60
A. EXEMPLE DE CRITERES UTILISES POUR EVALUER LA QUALITE DES BANDES G	60
B. MODELES DE RESOLUTION EN BANDES G ET R (DR MARGUERITE PRIEUR).....	61
ANNEXE 2 : INDICATIONS DU CARYOTYPE ET DE L'ACPA EN CYTOGENETIQUE	
CONSTITUTIONNELLE POSTNATALE	62
INDICATIONS DU CARYOTYPE CONSTITUTIONNEL EN PREMIERE INTENTION	62
INDICATIONS POUR LESQUELLES UNE ACPA DOIT ETRE ENVISAGEE EN PREMIERE	
INTENTION	63
ANNEXE 3 : EXCLUSION DES MOSAIQUES	64
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.....	64
ANNEXE 4 : STRATEGIE D'ETUDE D'UNE MOSAIQUE EN PRENATAL	67
CRITERES DE DIAGNOSTIC D'UNE MOSAIQUE SUR LES CELLULES AMNIOTIQUES.....	67
DEMARCHE DIAGNOSTIQUE.....	68
ANNEXE 5 : MISE EN CULTURE EN CYTOGENETIQUE HEMATOLOGIQUE.....	71
RECOMMANDATIONS POUR LA MISE EN CULTURE DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES	
SELON LE TYPE D'HEMOPATHIE.....	71
ANNEXE 6 : NIVEAU DE RESOLUTION SOUHAITABLE EN FONCTION DES INDICATIONS.....	73

ANNEXE 7 : LISTE NON EXHAUSTIVE DES EEQ EXISTANTS EN CYTOGENETIQUE 74

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.

Il sert de document de référence lors de l'expertise de l'EEQ national organisé par l'ACLF.

DEFINITIONS

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 conventionnelle

met en œuvre des techniques de culture cellulaire et microscopiques (techniques de bandes) qui permettent l'établissement du caryotype

La Cytogénétique moléculaire

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

DOMAINES DE COMPETENCE DE LA CYTOGENETIQUE MEDICALE

Parmi les compétences requises pour l'exercice de la Biologie Médicales telles que décrites dans l'ordonnance 2010-49 du 13 Janvier 2010 relative à la Biologie Médicale, modifiée par la loi N° 2013-442 du 30 Mai 2013 portant réforme de la biologie médicale, le cytogénéticien doit particulièrement maîtriser les spécificités propres à l'analyse chromosomique.

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. ENVIRONNEMENT REGLEMENTAIRE

1.- LOIS ET DECRETS DE REFERENCE

- Loi n° 75-626 du 11 juillet 1975 relative aux laboratoires d'analyses de biologie médicale et à leurs directeurs et directeurs adjoints.
- Loi n° 94-653 du 29 juillet 1994 relative au respect du corps humain.
- Arrêté du 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.
- Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale (GBEA).
- 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.
- 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.
- Ordonnance N° 2010-49 du 13 Janvier 2010 relative à la biologie médicale ("Loi Ballereau")
- 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.
- Arrêté du 27 Mai 2013 définissant les règles de bonnes pratiques applicables à l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales
- Loi N° 2013-442 du 30 Mai 2013 portant réforme de la biologie médicale

-
- Décret N°2013-527 du 20 Juin 2013 relatif aux conditions de mise en œuvre de l'information de la parentèle dans le cadre d'un examen des caractéristiques génétiques à finalité médicale.

2. AUTRES TEXTES CONSULTÉS

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

- EUCROMIC quality assessment group. Quality Guidelines. Eur J Hum Genet 1997;5:342-350
- CCMG (Canadian College of Medical Geneticists), 1997 <http://ccmg.medical.org/>
- KNEQAS (UK National External Quality Assessment Schemes) in Clinical Cytogenetics Annual Report, 1997, mis à jour 2001.
- UKNEQAS (UK National External Quality Assessment Schemes) in Clinical Cytogenetics Annual Report, 1997, mis à jour 2001.
- Les bonnes pratiques pré et postanalytiques, Annales de Biologie Clinique, 2002
- ACMG (American College of Medical Genetics).2006. Standards and Guidelines: Clinical genetics laboratories. ACMG, Rockville, MD. <http://www.acmg.net>
- ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature). Karger, Basel, Shaffer LG, Tommerup N (eds),2005, 2009, 2013.
- ISO/IEC Guide 2 (2004) Standardization and related activities - General vocabulary.
- 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.

3. NORME NF EN 15189 et GBEA

D'après l'arrêté du 27 Mai 2013 définissant les règles de bonnes pratiques applicables à l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales chapitre B,

- “- soit le laboratoire de biologie médicale (LBM) n’est pas accrédité : le GBEA est alors le référentiel en vigueur,
- soit le LBM est accrédité sur des examens de génétique, la norme NF EN ISO 15189 est alors le référentiel en vigueur,
- soit le LBM est accrédité sur une portée différente de la génétique, alors le GBEA demeure opposable pour la réalisation des examens de génétique”.

4. AGREMENTS ET AUTORISATIONS

Les laboratoires de cytogénétique sont des laboratoires de biologie médicale dont les praticiens doivent répondre aux exigences de l’ordonnance “Ballereau” du 13 Janvier 2010 modifiée par la loi 2013-442 du 30 Mai 2013 pour pouvoir signer des résultats de Biologie Médicale. D’après l’article L6213-2, seuls peuvent signer les personnes qui remplissent “les conditions d’exercice de la biologie médicale dans un laboratoire de biologie médicale, ou une personne qui a exercé la biologie médicale dans les établissements publics de santé soit à temps plein, soit à temps partiel pendant une durée équivalente à deux ans à temps plein au cours des dix dernières années. Toutefois, lorsque cette personne n’a exercé la biologie médicale que dans un domaine de spécialisation déterminé, elle ne peut exercer la fonction de biologiste médical que dans ce domaine de spécialisation. Lorsque la reconnaissance de ce domaine de spécialisation ne résulte pas soit d’un diplôme ou d’un concours, soit d’une autorisation ou d’un agrément délivré par l’autorité compétente, la validation en est réalisée par le ministre chargé de la santé après avis de la commission mentionnée à l’article L. 6213-12” .

Pour la cytogénétique, il faut distinguer deux niveaux :

d’une part l’autorisation de la structure délivrée par l’ARS ;

et d’autre part l’agrément individuel des praticiens pour les analyses de génétique constitutionnelles postnatale délivré par l’ABM.

Critères d'agrément des biologistes par l'ABM pour les Analyses de cytogénétique, y compris les analyses de cytogénétique moléculaire

Statut : Médecin ou Pharmacien ou Personnalité scientifique avec activité de plus de 2 ans dans un laboratoire de biologie médicale avant 2010.

Diplômes de spécialité ou complémentaires : Toute formation spécifique dans le domaine susvisé, notamment Diplôme de spécialité (DES de biologie médicale, option biologie spécialisée, spécialité génétique ou DES de génétique médicale avec 2 semestres en cytogénétique), Diplôme complémentaire en l'absence du DES de biologie médicale - option spécialité génétique, ou du DES de génétique médicale (DESC de cytogénétique) ou tout diplôme garantissant une formation équivalente en cytogénétique

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.

Le décret 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**)

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

Cas particulier du prénatal : la Loi de Bioéthique de Juillet 2011 (INSTRUCTION N° DGOS/R3/PF/DGS/PP4/2011/425 du 14 Novembre 2011) a supprimé les agréments pour les analyses de cytogénétique prénatale. De façon transitoire, l'ARS délivre une autorisation aux laboratoires après avoir vérifié la présence de praticiens ayant les compétences requises. Les compétences nécessaires seront définies par un arrêté du Ministre de la Santé en cours d'élaboration.

Pour la pratique de la cytogénétique Onco-Hématologique, en accord avec les articles L6213-1, L.6213-2 et L6213-3 de la loi n° 2013-442 du 30 mai 2013 relative à la réforme de la biologie médicale, l'exercice peut être assuré par une personnalité scientifique, dans les conditions définies ci-dessus.

5. NOMENCLATURE DES ACTES DE CYTOGENETIQUE

5.1. 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 foetal.

5.1.1. Cytogénétique pré et postnatale

Caryotype constitutionnel prénatal

- 0040 Technique avec incubation sans changement de milieu
- (villosités choriales, placenta, sang foetal) 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).

5.1.2. Cytogénétique moléculaire

- 0903 Hybridation sur chromosomes métaphasiques:
- pour une sonde avec le contrôle interne compris B500
- 0904 Hybridation sur chromosomes métaphasiques:

Partie Commune

- 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.

5.2. Cytogénétique acquise

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

5.2.1 Caryotype onco-hématologique

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.

5.2.2. 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
- 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.

5.3. 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 RHN (Référentiel des actes Hors Nomenclature : 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 exclut les actes réalisés dans le cadre de protocoles de recherche 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 régulièrement mise à jour

B. CONDITIONS PRATIQUES DE REALISATION DES ACTES DE CYTOGENETIQUE

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.

Pour tous cependant, la norme 15189 impose la rédaction d'un organigramme, avec une définition des fonctions de chacun et un enregistrement des compétences.

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'examens effectué par technicien doit être suffisant pour permettre une qualité et une fiabilité des résultats répondant aux critères définis par les Evaluations Externes de la Qualité (EEQ), le maintien des connaissances au moyen des formations continues ainsi que 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 biologistes d'assurer la formation continue du personnel

1.3. Secrétariat

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

2. LOCAUX

Les locaux doivent être conformes aux instructions de la norme 15189 ou 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 paillasse 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 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)
- 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 si nécessaire
- 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

Partie Commune

L'entretien et la maintenance du matériel et la protection du personnel contre les risques toxiques ou infectieux doivent se conformer au GBEA ou à la norme 15189 et faire l'objet de procédures écrites et d'un contrôle annuel (élaboration d'un programme de surveillance, traçabilité de la maintenance, existence de procédures dégradées...)

4. ECHANTILLONS BIOLOGIQUES

4.1. Prélèvements

Les prélèvements doivent être effectués en se conformant à la norme 15189 ou au GBEA et à l'arrêté du 27 Mai 2013 définissant les règles des bonnes pratiques applicables à l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales pour les prélèvements constitutionnels.

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 !

4.2. Identification des prélèvements

L'étiquetage des tubes et flacons contenant les échantillons doit être effectué selon les recommandations de la norme 15189 ou du GBEA et est sous la responsabilité du préleveur.

Les échantillons seront accompagnés d'une fiche de prescription. Outre les obligations décrites dans la norme NF 15189, la fiche de prescription précise :

- Le motif de la demande et le diagnostic suspecté, ou s'il s'agit d'un suivi
- Les traitements récents éventuels susceptibles d'affecter la qualité de l'examen (radio-ou chimiothérapie, par exemple).
- L'identification du médecin prescripteur et l'adresse ou renvoyer les résultats (médecin, laboratoire...)
- 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. D'après l'arrêté du 27 Mai 2013 définissant les règles des bonnes pratiques applicables à l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales pour les prélèvements constitutionnels, "l'organisation de la phase préanalytique et du transport sont de la responsabilité du laboratoire qui réalise les prélèvements. Ce dernier doit être en mesure de transmettre les informations cliniques, familiales et biologiques ainsi que les documents spécifiques associés (attestation d'information, consentements...)".

Le délai d'acheminement est également traité dans le chapitre IV « Cytogénétique Hématologique ».

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 de la fiche de prescription (cf 4.2.) Les prélèvements doivent être accompagnés du formulaire de consentement dûment signé et de l'attestation de consultation, le cas échéant.

5. REALISATION DE L'EXAMEN

Ainsi que le précise l'arrêté du 27 Mai 2013 définissant les règles de bonnes pratiques applicables à l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales, "le choix des techniques repose sur des données de la littérature ou des publications des sociétés savantes..." "Les modifications de la prescription par le praticien agréé du laboratoire doivent... faire l'objet d'une discussion avec le prescripteur. De même, "tout refus d'exécution d'un examen doit faire l'objet d'une discussion avec le prescripteur". D'après l'ordonnance "Ballereau", "lorsqu'elles (les modifications) sont refusées par le prescripteur, les examens sont réalisés conformément à la prescription.

Ce chapitre constitue une base pour la validation des méthodes, explicitée dans la norme NF 15189 et exigée pour l'accréditation des laboratoires.

5.1. Cytogénétique conventionnelle

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 (ou DA-DAPI), et C, coloration NORs. Pour chaque examen, au moins un système de marquage en bandes (bandes R ou bandes G) est obligatoire pour le classement des caryotypes, avec un niveau de résolution adapté aux indications. L'activité de cytogénétique hématologique requiert la maîtrise de marquage en bande R et/ou G. L'annexe 1 montre un exemple des critères permettant d'apprécier le niveau de résolution des caryotypes.

5.2. Cytogénétique moléculaire

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

5.2.1. Conditions d'application.

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

5.2.2. Types de sondes

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

Certaines sondes sont commercialisées par des industriels d'autres sont fabriquées par les laboratoires.

Pour les sondes préparées au laboratoire : la sonde sera préparée en x quantité et se verra attribuer un numéro de lot unique (dont le format est à déterminer par le laboratoire). Le tube devra mentionner au minimum le nom de la sonde, le numéro de lot, et une date de fabrication.

La date de péremption des sondes est définie par le laboratoire en se basant sur son expérience. Pour les laboratoires qui débutent une activité de fabrication de sonde, il est recommandé d'utiliser une durée de péremption courte (un an par exemple) qui sera par la suite augmentée en fonction de l'expérience acquise.

Avant son utilisation en diagnostic, la sonde devra avoir été validée sur le plan technique.

5.2.3. Validation technique des sondes

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 :

Pour chaque nouvelle sonde réalisée au laboratoire, il est recommandé d'hybrider la sonde sur une préparation cytogénétique pour :

Partie Commune

- s'assurer d'un signal d'hybridation correct permettant une interprétation des signaux d'hybridation obtenus (intensité suffisante pour différencier le signal de la sonde du bruit de fond sans ambiguïté).
- vérifier la localisation de la sonde sur des métaphases ; la spécificité sera déterminée par toute technique permettant d'identifier le chromosome d'intérêt (bandes, co-hybridation avec une autre sonde spécifique permettant d'identifier le chromosome, hybridation sur une métaphase connue portant une anomalie de ce chromosome)
- noter la présence d'une éventuelle co-hybridation
- évaluer la reproductibilité d'hybridation de la sonde en comptant au moins t 20 métaphases et 100 noyaux pour une utilisation en interphase.

Une sonde donnant un signal d'hybridation correct, hybridant dans 100 % des métaphases et au moins 95 % des noyaux, bien localisée pourra être utilisée en diagnostic.

La présence d'une co-hybridation rend la sonde inutilisable en interphase, mais n'empêchera pas son utilisation sur métaphases moyennant une interprétation plus rigoureuse. Il est ainsi déconseillé d'utiliser ce type de sonde pour rechercher une duplication ou vérifier un gain mis en évidence en ACPA.

Pour chaque nouveau lot d'une sonde déjà réalisée préalablement et contrôlée dans le laboratoire, un contrôle plus sommaire sur 10 mitoses pourra être réalisé pour vérifier la qualité du signal d'hybridation et la localisation cytogénétique. La preuve de la vérification devra être conservée.

5.2.4 : Utilisation des sondes
5.2.4.1 Modalité de lecture

Une fiche de lecture reportant les conditions d'analyse et la qualité du signal doit être rédigée et conservée (soit dans le dossier du patient, soit sur un support facilement récupérable). Une double lecture des lames au microscope est recommandée en cas de difficulté d'interprétation.

5.2.4.2 Conditions d'interprétation du signal

- le résultat pourra être rendu si lors de l'analyse FISH, le signal d'hybridation sur le chromosome témoin (non censé être remanié) ou les deux chromosomes (en l'absence du remaniement recherché, par exemple suspicion de microdélétion 22q11.2) est correctement

localisé et d'une intensité permettant de différencier le signal de la sonde du bruit de fond sur au moins 10 mitoses.

- Pour les sondes couplées à une sonde témoin, l'hybridation de cette sonde témoin sur les deux chromosomes entérinera la validité de la sonde utilisée.

5.2.4.3 Cas particulier des sondes périmées

L'ADN est une molécule stable. Généralement le marquage de l'ADN fait appel à des liaisons covalentes également stables dans le temps. De ce fait, les sondes FISH sont des réactifs stables dans le temps (M Doco-Fenzy et al. : FISH probes expiration date in constitutional cytogenetic laboratories, European Human Genetics Conference, 2013, Paris – France) donc leur utilisation peut se faire en utilisant les mêmes critères de qualité que les sondes non périmées.

Une sonde commerciale ou fabriquée dans le laboratoire, conservée selon les recommandations du fournisseur, pourra être utilisée en diagnostic même après la date de péremption dans des conditions définies par le laboratoire.

Pour l'interphase, il est préférable de passer une lame témoin en parallèle pour juger de la qualité du signal d'hybridation obtenu avec toutes les sondes présentes dans le mix réactionnel.

5.2.5 Règles d'utilisation des techniques de cytogénétique moléculaire

Les peintures chromosomiques

Elles doivent être utilisées en cas d'anomalie de structure pour rechercher le nombre de partenaires impliqués dans le remaniement. L'utilisation de sondes loci spécifiques complémentaires peut s'avérer nécessaire à l'interprétation.

L'examen d'un petit nombre de cellules (au moins cinq) est généralement suffisant dans ce cas pour apporter l'information recherchée.

Les sondes " séquence unique "

Elles permettent d'étudier un locus spécifique, et sont utilisées en fonction soit d'indications cliniques soit d'indications cytogénétiques.

- Au moins 10 mitoses, et si possible 20, doivent être analysées.

- En cas de recherche de duplication, compléter l'étude par l'analyse d'au moins 25 noyaux.

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.

- 100 noyaux si possible, le nombre total doit être adapté à l'indication.

Les règles spécifiques à l'activité FISH en cytogénétique hématologique sont précisées dans le chapitre IV.

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 par sonde utilisée, voir section archivage). En cytogénétique hématologique, ce nombre peut être réduit (cf chapitre IV).

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.

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 : ACPA, PCR quantitative, MLPA...

Un guide de Bonnes pratiques pour l'ACPA est également disponible.

6. RESULTATS

Pour l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales, la feuille de résultat et les modalités de rendu au prescripteur doivent se conformer à l'arrêté du 27 Mai 2013 définissant les règles de bonnes pratiques.

L'information des collatéraux en cas d'anomalie génétique grave est réalisée selon les instructions du décret N° 2013-527 du 20 Juin 2013 relatif aux conditions de mise en œuvre de l'information de la parentèle dans le cadre d'un examen des caractéristiques génétiques à finalité médicale. Le patient doit être informé en amont de la réalisation de l'examen qu'en fonction du résultat de l'analyse il peut être amené à obligatoirement informer sa parentèle (directement ou via le médecin prescripteur) sous peine d'engager sa responsabilité sur un plan juridique.

6.1. La formulation des résultats

La feuille de Compte rendu (CR) des résultats doit préciser d'après la norme ISO 15189 et l'arrêté du 27 Mai 2013 définissant les règles de bonnes pratiques applicables à l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales :

- 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

Partie Commune

- la date de réponse du CR ; si elle n'est pas sur le compte rendu, elle doit pouvoir être accessible facilement en cas de besoin.
- L'indication de l'analyse (arrêté du 27 Mai 2013 définissant les règles des bonnes pratiques applicables à l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales pour les prélèvements constitutionnels)
- l'origine ou le type de tissu examiné,
- les résultats de l'analyse, avec formule chromosomique selon l'ISCN en vigueur et le niveau de résolution obtenu ;

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

- l'interprétation du résultat : il faut expliquer en clair les remaniements chromosomiques observés, préciser l'aspect équilibré ou déséquilibré pour les anomalies de structure, les conséquences éventuelles de l'anomalie pour le patient et tout autre commentaire pertinent pour la compréhension de la formule. Le commentaire doit mentionner si besoin la nécessité d'une enquête familiale (cf arbre décisionnel) et d'un conseil génétique.
- les limites de la technique utilisée, les éventuels examens complémentaires en cours pour la même indication
- La signature du biologiste.

De plus, devront apparaître sur le compte rendu :

6.1.1 Pour la cytogénétique conventionnelle :

Les modalités de culture (in situ et/ou trypsination) ainsi que le nombre de chambres de culture utilisées pour le prénatal

- le(s) type(s) de marquage en bandes utilisé(s) -
- le nombre de clone examinés en cas de culture in situ
- le nombre de mitoses examinées
- le nombre de caryotypes établis

6.1.2 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 ”.

La décision d'indiquer ou non le sexe dans le compte rendu est laissée à l'appréciation du laboratoire. En cas de décision positive, la mention “ caryotype masculin ou féminin ” est préférable à la mention “ sexe masculin ou féminin ”.

Si différents tissus ou types cellulaires ont été examinés, l'ensemble de ces informations devront être données pour chacun (formule chromosomique, nombre de cellules examinées, nombre de caryotypes, résolution...), éventuellement sur le même compte rendu.

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 et une enquête familiale si nécessaire doivent être proposés ou réalisés 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 ou d'une évaluation régulière (indicateurs qualité), et dépendent 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 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 !), il est donc recommandé 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. Pour la cytogénétique hématologique, le délai de conservation conseillé, mais non soumis à obligation légale, est de 10 ans.

8.2.2. Lames

Conservation des Lames ayant servi au diagnostic:

- 1 an en prénatal,
- jusqu'au rendu du résultat en postnatal
- durée laissée à l'appréciation du cytogénéticien responsable pour l'activité de cytogénétique hématologique.

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.

En cytogénétique hématologique, la durée de conservation des culots est laissée à l'appréciation du cytogénéticien responsable.

9. EVALUATION DE LA QUALITE

9.1. Indicateurs de qualité

Le laboratoire doit mettre en place des indicateurs de suivi de la qualité globale de l'activité.

Il est recommandé a minima de suivre les indicateurs suivants :

- le pourcentage de dossiers répondus avec un niveau de résolution insuffisant
- le pourcentage de dossiers répondus avec un nombre de mitoses insuffisant
- le pourcentage d'échec
- le pourcentage de dossiers répondus hors délai

En cytogénétique hématologique, le GFCH a défini des entités / groupes pathologiques et recommande le suivi des indicateurs suivants :

- le pourcentage d'anomalie,

- le pourcentage d'échec
- le délai médian de réponse des résultats

9.2. Evaluation externe de la qualité

Selon l'article L.6221-9 du code la santé publique et l'ordonnance No 2010-49 du 13 janvier 2010 ratifiée par la loi No 2013-442 du 30 mai 2013 portant réforme de la biologie médicale, les laboratoires doivent participer à une Evaluation Externe de la Qualité (EEQ) et assurent l'application de mesures correctives si elles ont été préconisées par le comité d'experts. Une liste non exhaustive des EEQ disponibles en cytogénétique est fournie en Annexe 7

II. CYTOGENETIQUE CONSTITUTIONNELLE POST-NATALE

1. INFORMATION

Les modalités d'information préalable des patients et de leurs parents doivent se conformer aux décrets d'application en cours (arrêté du 20 Juin 2013)

2. ECHANTILLONS

2.1. Prélèvement

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

Peau ou autre tissu : Le fragment biopsié doit avoir un volume minimum de 2 mm³ et être mis si possible extemporanément dans du milieu de transport préalablement défini par le laboratoire (par exemple milieu de culture ou 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 la 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 autant que possible dans le même laboratoire sauf contraintes géographiques évidentes. Dans le cas contraire, le laboratoire ayant réalisé

Cytogénétique Constitutionnelle Postnatale

l'examen initial doit transmettre au laboratoire qui lui en fait la demande le compte rendu (Arrêté du 27 Mai 2013 définissant les règles de bonnes pratiques applicables à l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales) et les images du cas index.

3. EXAMEN CYTOGENETIQUE

3.1. Culture :

La mise en culture se fera selon les procédures écrites et disponibles au laboratoire.

L'ensemencement doit se faire échantillon par échantillon.

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). La mise en évidence de certaines anomalies de structure est facilitée par l'examen des deux types de marquage. Il est souhaitable que le laboratoire maîtrise, outre les techniques de base en cytogénétique, les techniques d'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.

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 analysées au minimum, et au moins 3 caryotypes établis.

L'analyse d'une cellule comprend au minimum le décompte du nombre de chromosomes et l'identification des gonosomes.

La recherche d'une anomalie des gonosomes sera décrite dans le paragraphe suivant (4.2).

En cas de recherche ciblée d'une mosaïque en rapport avec un phénotype particulier (par exemple suspicion de syndrome de Turner), au moins 50 cellules seront étudiées en

Cytogénétique Constitutionnelle Postnatale

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).

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 à l'état équilibré. Si existent des signes cliniques, une ACPA est recommandée afin de rechercher un déséquilibre génomique aux points de cassure ou ailleurs dans le génome.

4. CAS PARTICULIERS

4.1. Découverte d'une mosaïque

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)

L'observation d'une ou deux cellules anormales pose la question d'un accident in vitro ou d'un clone pathologique. D'après la nomenclature ISCN 2013 (page 88), 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).

Cytogénétique Constitutionnelle Postnatale

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 (Russell LM, Strike P, Browne CE, Jacobs PA. X chromosome loss and ageing. *Cytogenet Genome Res* 2007;116(3):181-5).

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. Une attention particulière à la structure de l'Y devra cependant être apportée en cas de découverte d'une ou deux cellules 45,X chez un homme.

Dans le cas d'une monosomie X apparemment homogène, la recherche d'un second clone est nécessaire (50 cellules analysées en cytogénétique conventionnelle ou en FISH). Une attention particulière sera apportée à la recherche d'un fragment d'Y. soit par FISH sur 100 cellules soit 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.

4.2. 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.

Cytogénétique Constitutionnelle Postnatale

4.3. Les variants hétérochromatiques

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.

En cas d'image évocatrice sur un caryotype d'une cassure en Xq27, et en fonction de l'indication clinique, il faut savoir évoquer la nécessité d'une recherche d'un syndrome de l'X fragile par biologie moléculaire.

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 Maladies Cassantes), développée au sein

Cytogénétique Constitutionnelle Postnatale

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. Alain Berheim, Institut Gustave Roussy, Villejuif (bernheim@igr.fr)

Pr. 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

Aujourd'hui, le caryotype haute résolution (850 bandes) doit être remplacé par l'ACPA pour rechercher un déséquilibre génomique de petite taille.

6. HYBRIDATION IN SITU et ACPA

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

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.

L'ACPA remplace aujourd'hui le caryotype haute résolution qui ne doit plus être utilisé dans le cadre de l'exploration des retards mentaux. Son utilisation doit se conformer au Guide de Bonnes Pratiques de l'Analyse Chromosomique sur Puces à ADN.

Cytogénétique Constitutionnelle Postnatale

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'anomalie chromosomique complexe et ou difficile à caractériser.

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 le décret N°2013-527 du 20 Juin 2013

Le résultat ne doit être communiqué au patient que par le prescripteur (décret 2008-321 et Arrêté du 27 Mai 2013).

Dans le cas où le prélèvement est transmis par un laboratoire partenaire, la loi de Biologie impose au laboratoire réalisant l'examen de transmettre le résultat au laboratoire préleveur qui est chargé de le communiquer au prescripteur.

Cette transmission est rendue possible par le remplacement du décret du 23 juin 2000-570 précisant que le résultat devait être exclusivement adressé au médecin prescripteur par le décret 2008-321 relatif à l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne ou à son identification par empreintes génétiques à des fins médicales.

On pourra cependant, à volonté du laboratoire, rappeler au biologiste destinataire par une mention sur le résultat qu'il ne doit en aucun cas le transmettre directement au patient.

III. CYTOGENETIQUE CONSTITUTIONNELLE PRENATALE

A. CONDITIONS D'EXERCICE

- Pour obtenir l'autorisation de diagnostic prénatal mentionnée à l'article R2131-5-5, l'établissement public de santé ou le laboratoire d'analyse de biologie médicale doit en outre disposer d'une pièce destinée aux entretiens avec les familles concernées par le diagnostic prénatal (Art. R2131-6 du Code de la Santé Publique).

B. REALISATION DES EXAMENS

1. RECEPTION DES ECHANTILLONS

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

- de l'identification du médecin prescripteur
- 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'échographiste ;
 - le résultat des marqueurs sériques ;

Cytogénétique Constitutionnelle Prénatale

- en cas de remaniement chromosomique d'un des conjoints ou lors d'une grossesse précédente, du compte rendu de 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.

2.2. Marquage en bandes

Un marquage en bandes (R ou/et G) est obligatoire, avec un niveau de résolution adapté aux indications (Cf Annexe 6).

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.

Cytogénétique Constitutionnelle Prénatale

L'ensemencement doit se faire échantillon par échantillon.

Milieus 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 analysées sur au moins 12 colonies différentes provenant de 2 cultures distinctes
- 3 caryotypes établis

L'analyse d'une cellule comprend au minimum le décompte du nombre de chromosomes et l'identification des gonosomes.

Après trypsination :

- 15 cellules analysées provenant de 2 boîtes de culture
- 3 caryotypes établis

4. VILLOSITES CHORIALES (Conditions optimales) :

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

Le choix de la technique rapide est laissé au choix du cytogénéticien : FISH, PCR ou caryotype conventionnel 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.

Cytogénétique Constitutionnelle Prénatale

Analyse directe :

- 12 cellules analysées et 3 caryotypes établis
- ou
- 100 noyaux en FISH

Culture :

- 12 cellules analysées
- 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

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.

5. SANG FOETAL (Conditions optimales) :

- 15 mitoses analysées
- 3 caryotypes établis

6. MOSAIQUE

6.1. Pseudo mosaïque versus mosaïque vraie

La découverte d'une mitose présentant une anomalie peut imposer des investigations complémentaires afin de distinguer entre pseudo mosaïque et mosaïque vraie. 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 pseudo mosaïque ne doit pas figurer dans le compte rendu final

Quand elle concerne des chromosomes soumis à empreinte, la découverte d'une mosaïque doit faire discuter la recherche d'une disomie uniparentale.

6.2. Cas particulier des mosaïques confinées au placenta

Lors d'une biopsie de trophoblaste, une mosaïque confinée au placenta (MCP) doit être évoquée soit devant la découverte d'une mosaïque soit devant une discordance entre le direct et la culture.

Un contrôle sur liquide amniotique doit être discuté.

Quand elle concerne des chromosomes soumis à empreinte, la découverte d'une mosaïque doit faire discuter la recherche d'une disomie uniparentale.

7. 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

Cytogénétique Constitutionnelle Prénatale

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.

8. 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. En cas de signe d'appel échographique associé, une ACPA doit être discutée.

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

11. RESULTATS

Le résultat doit être rendu autant que possible dans un délai de 14 jours après le prélèvement (en dehors des analyses complémentaires éventuellement déclenchées).

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 Evaluations Externes de la Qualité proposés annuellement par le GFCH permettent d'évaluer les pratiques professionnelles et la qualité des laboratoires participants. Le GFCH recommande également la réalisation de comparaisons interlaboratoires.

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.

L'exercice de la cytogénétique hématologique n'est pas soumis à agrément mais régit selon les modalités décrites dans la loi n°442-2013 du 30 mai 2013 relative à la réforme de la biologie médicale.

Pour la pratique de la cytogénétique hématologique, en accord avec les conditions précisées dans les articles L6213-1, L6213-2 et L6213-3 de cette loi, l'exercice peut être assuré par une personnalité scientifique.

C. REALISATION DES EXAMENS

1. PRELEVEMENT, ACHEMINEMENT ET RECEPTION DES ECHANTILLONS

1.1. Prélèvement

Les conditions de stérilité doivent être respectées.

Pour les échantillons tels que moelle osseuse, sang, liquides d'épanchement :

- prélèvement avec une seringue héparinée (héparine sans conservateur toxique pour les cellules)
- recueil dans un tube ou flacon hépariné ; pour la moelle le recueil peut être effectué dans un flacon contenant du milieu de culture avec 10 à 20 UI/ml d'héparine sodique

Pour les échantillons solides tels que ganglions, rate..., l'échantillon doit être mis dans du milieu de culture, à défaut dans un milieu de transport (tamponné stérile tel que PBS, Hanks « milieu de transport »), afin de préserver la viabilité cellulaire.

Tous les prélèvements doivent être acheminés au laboratoire le plus rapidement possible, idéalement dans les 24h.

Cependant, le délai maximum toléré pour l'acheminement des échantillons provenant de correspondants éloignés peut s'étendre à 48h (voire 72h pour les cas particuliers). Chaque laboratoire doit définir les conditions d'acceptation des prélèvements avec ses correspondants.

1.2. Fiche de renseignements

L'échantillon doit être accompagné de la fiche de renseignements cliniques. Ceux-ci doivent préciser le ou les diagnostic(s) évoqué(s) ou le diagnostic connu de la maladie.

En complément, peuvent être renseignés les données suivantes :

- le stade de la maladie, les traitements reçus ou en cours, l'inclusion dans un protocole thérapeutique, les résultats de l'hémogramme le plus récent en mentionnant la date,
- l'existence de caryotypes antérieurs effectués dans d'autres laboratoires.

1.3. Réception

Il faut vérifier la conformité de l'échantillon (identitovigilance, contenant, contenu, délai d'acheminement, feuille de demande...) et tout critère de non-conformité pré-analytique défini par le laboratoire.

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 fortement recommandée. La qualité d'un prélèvement pourra être appréciée par la réalisation d'un test de viabilité des cellules, notamment en cas de transport prolongé. L'ensemencement sera effectué en respectant les concentrations recommandées (dépendantes des pathologies). La culture est effectuée dans des étuves à 37°C avec ou sans CO2 5%.

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

2.1.2. Analyse

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

2.1.2.1 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, le nombre minimum de mitoses à analyser doit permettre d'établir la clonalité du ou des clone(s) anormal (aux)-
- En cas d'anomalie non clonale, et selon sa nature et le contexte clinique, il peut être souhaitable de confirmer ou d'infirmer une éventuelle clonalité, en poursuivant, soit au microscope, la recherche de métaphases supplémentaires, soit en réalisant une étude en cytogénétique moléculaire avec une sonde spécifique de l'anomalie suspectée.

Cytogénétique Hématologique

2.1.2.2 Lors du suivi

Pour la recherche d'une anomalie préalablement décelée, et en fonction du contexte clinique, il est possible d'augmenter la sensibilité de l'analyse en augmentant le nombre de métaphases à analyser, et/ou en réalisant une recherche par cytogénétique moléculaire.

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 (FISH, Biologie moléculaire...).

Il est de la responsabilité du cytogénéticien d'évaluer la nature des données pertinentes nécessaires à cette interprétation.

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'études nécessaires à la précision du diagnostic.

Le délai de conservation des culots, lames blanches et lames dénaturées est laissé à l'appréciation du cytogénéticien responsable.

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 type de préparation (matrice) selon le mode opératoire du laboratoire :

- étalement cytogénétique,
- frottis de sang ou de moelle, empreinte ganglionnaire ou tumorale, cytopspin,
- coupe issue de tissus cryopréservés ou paraffinés.

Cytogénétique Hématologique

2.2.2. Modalités d'interprétation des techniques

Une fiche de lecture reportant les conditions d'analyse et la qualité du signal doit être rédigée et conservée. Une double lecture des lames au microscope est recommandée en cas de difficulté d'interprétation. En cas d'automatisation de lecture, une vérification des images informatisées peut suffire.

➤ 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.

Le nombre de mitoses observé en FISH peut être inférieur à 10, parfois contraint par le faible potentiel mitotique observé dans certaines hémopathies. De plus, le nombre de mitoses observé en FISH peut être adapté aux données du caryotype : confirmation de l'anomalie récurrente détectée sur le caryotype, précision d'une anomalie, preuve de l'existence d'un clone...

➤ Pour la FISH interphasique:

Le comptage dépend de l'automatisation ou non du laboratoire, des difficultés d'interprétation, de l'exiguïté et/ou du caractère critique du matériel (voir également partie commune chapitre 5.2) :

1- Nombre de lecteurs :

En l'absence d'automate, sont conseillés :

- En l'absence de difficulté d'interprétation : 1 lecteur,
- En cas de difficulté d'interprétation : 2 lecteurs

b) En cas d'automatisation, sont conseillés :

- En l'absence de difficulté d'interprétation : vérification des images par une personne
- En cas de difficulté : lecture au microscope associée

2- Nombres de noyaux lus :

Il est impératif de compter un nombre suffisant de noyaux selon les circonstances suivantes :

Cytogénétique Hématologique

- En cas de résultat négatif (absence d'anomalie aux loci étudiés), il est préférable de lire au moins 200 noyaux au total.
- En cas d'anomalie détectée, le nombre total de noyaux peut être réduit en fonction de la représentativité du clone : si l'anomalie est détectée dans 50 noyaux sur 100, le comptage de 200 noyaux n'est pas obligatoire.
- En cas de lecture sur population cellulaire purifiée (ex tri de plasmocytes ou autres cas), un nombre total de 100 cellules analysées est suffisant.
- En cas de préparation pauvre obtenue à partir d'un échantillon précieux, un nombre inférieur de noyaux peut suffire, surtout en cas de détection de l'anomalie.

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

La vérification de la localisation et de l'intensité du (des) signal(aux) de la (des) sonde(s) sur métaphase est recommandée (si techniquement possible) et constitue un contrôle qualité interne de l'échantillon.

2.2.3. Archivage et stockage

Pour la FISH métaphasique, il est recommandé de conserver au moins une mitose par clone anormal et une mitose normale, si cette dernière est détectée. Le choix du support est libre.

Pour la FISH interphasique, il est souhaitable de conserver au minimum une image de chaque sonde hybridée. Le choix du support est libre.

Dans la mesure du possible, les lames hybridées sont conservées pendant une durée de 2 ans.

2.2.4. Détermination du seuil de positivité d'une sonde (sensibilité analytique)

L'établissement du seuil de positivité sur culots de cytogénétique nécessite plusieurs témoins (dont 2 de sexe masculin afin d'éviter une hybridation croisée avec une séquence du chromosome Y) de prélèvements sanguins et/ou médullaires, qu'il est possible de pooler. Deux techniques FISH au minimum sont réalisées pour une lecture d'un total de 2000 noyaux recommandée. Une double lecture, dans ce cas précis d'établissement du seuil, est indispensable. Le calcul du seuil s'effectue soit par la formule : moyenne + 3DS (Déviation Standard) ou selon la loi binomiale (fonction CRITBINOM dans Excel, cf référence ci-dessous). Le seuil devra être déterminé par type de sonde et par matrice cellulaire :

Cytogénétique Hématologique

- culot de cytogénétique,
- frottis-empreinte-cytospin,
- coupe issue de tissu.

La sensibilité diagnostique de chaque sonde est estimée avec 5 cas positifs en FISH avec cytogénétique ou biologie moléculaire concordante, pour les anomalies les plus fréquentes. Dans le cas d'anomalie rare, un seul cas peut suffire.

La spécificité diagnostique de chaque sonde est estimée avec 1 à 2 témoins (ou cas normaux) avec FISH négative.

Références :

- Statistical Treatment of Fluorescence *in Situ* Hybridization Validation Data to Generate Normal Reference Ranges Using Excel Functions. Allison L. Ciolino, Mary E. Tang,* and Ron Bryant. *J Mol Diagn.* 2009 July; *11(4)*: 330–333.
- *Pathologie Biologie, Recommandations pour le diagnostic des hémopathies malignes, 2004*

3. RESULTATS

3.1. La formulation des résultats

Les formules sont rédigées indépendamment si des tissus différents ont été analysés (Cf Recommandations du document : Guide nomenclature ISCN 2013 disponible sur le site de l'ACLF).

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.

Cytogénétique Hématologique

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/ou 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 pourront être mentionnées, par exemple : le nombre de mitoses analysées inférieur à 20 ; la qualité du marquage chromosomique ; la richesse du prélèvement ; le pourcentage de cellules malignes dans l'échantillon correspondant à l'examen pouvant conduire à un biais de culture; les non conformités pouvant s'avérer critiques pour l'obtention d'un résultat contributif....

3.3. Les points particuliers

Il est souhaitable de signaler un taux élevé de cassures chromosomiques (soit 3-4 mitoses sur 20 analysées).

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, les délais de réponse sont variables. Pour une analyse au diagnostic, selon les pathologies suivantes, les délais moyens optimaux suivants sont souhaitables :

- inférieur ou égal à 7 jours pour les leucémies aiguës et les lymphomes de Burkitt,
- inférieur ou égal à 14 jours pour les leucémies myéloïdes chroniques,
- inférieur ou égal à 21 jours pour les pathologies myéloïdes chroniques,

Cytogénétique Hématologique

- inférieur ou égal à 28 jours pour les pathologies lymphoïdes chroniques

5. ECHECS

En dehors des causes identifiées et connues (prélèvement non stérile, délai d'acheminement dépassé, contamination), le taux d'échec est lié pour la plus grande part à la qualité des échantillons (cellularité et capacité proliférative) et est très variable selon les pathologies. L'évaluation du taux d'échec et la recherche de leur cause doivent être menées afin de pouvoir mettre en place si possible les mesures correctives et préventives, nécessaires à leur limitation.

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 (www.sfh.org).

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

Cytogénétique Hématologique

- 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 cyto-ponctions 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 coté (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 tumorotheque 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.

Cytogénétique Oncologique

- Si ont été observées 2 mitoses porteuses de la même anomalie, en cas de remaniement de structure ou gain de chromosome, ou 3 mitoses en cas de perte.

L'établissement du caryotype constitutionnel est indiqué quand il existe, dans la totalité des mitoses, un doute 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.

Cytogénétique Oncologique

2.2.2 Nombre de mitoses ou de noyaux à analyser

➤ Sur métaphases:

Résultat considéré comme positif si au moins une mitose montre l'anomalie caractéristique, en cas d'anomalie de structure, 2 mitoses en cas de gain de chromosome, ou 3 mitoses en cas de perte.

Nombre total à examiner: comme en analyse cytogénétique conventionnelle.

Prise d'au moins 2 images représentatives.

➤ Sur noyaux:

Examen de 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 : EVALUATION DE LA RESOLUTION OBTENUE

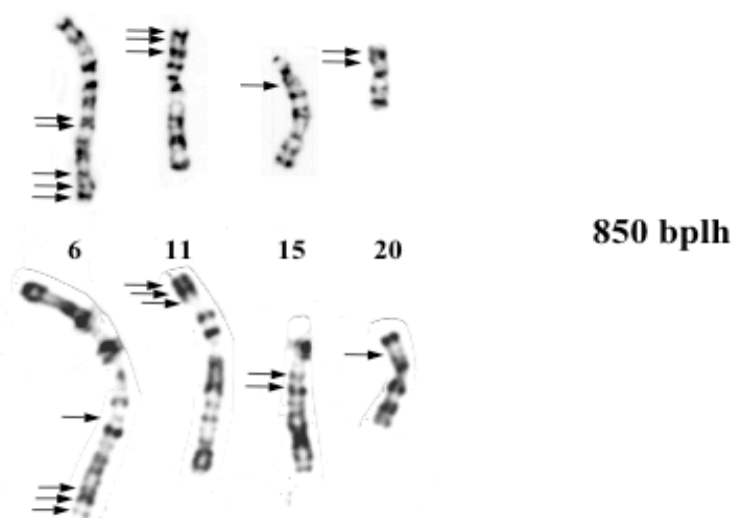
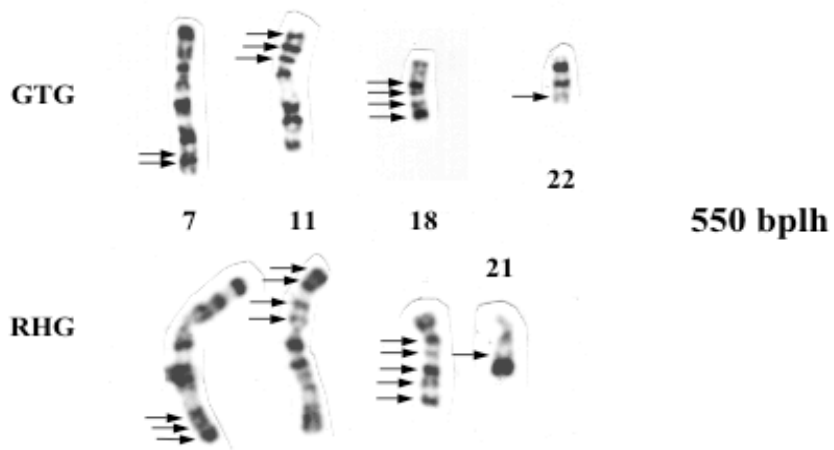
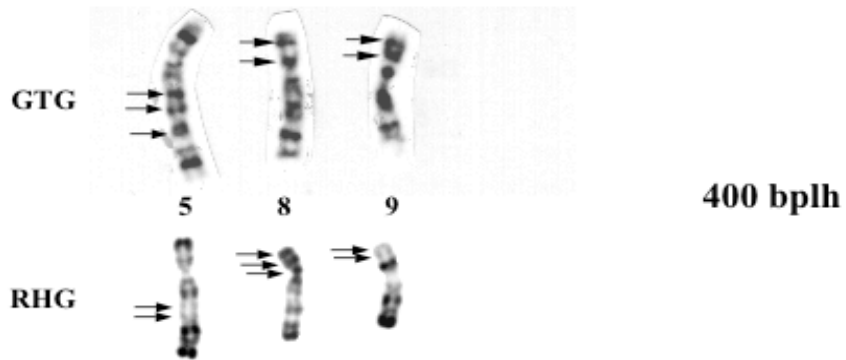
A. EXEMPLE DE CRITERES UTILISES POUR EVALUER LA QUALITE DES BANDES

G

Qualité du marquage	Valeur correspondante	ISCN	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]

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



ANNEXE 2 : INDICATIONS DU CARYOTYPE ET DE L'ACPA EN CYTOGENETIQUE CONSTITUTIONNELLE POSTNATALE

INDICATIONS DU CARYOTYPE CONSTITUTIONNEL EN PREMIERE INTENTION

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
- 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

INDICATIONS POUR LESQUELLES UNE ACPA DOIT ETRE ENVISAGEE EN PREMIERE INTENTION

- 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

Annexes

ANNEXE 3 : EXCLUSION DES MOSAIQUES

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%

Annexes

19	12%	15%	22%		56	5%	6%	8%
20	11%	14%	21%		57-58	4%	6%	8%
21	11%	14%	20%		59-63	4%	5%	8%
22	10%	13%	19%		64-73	4%	5%	7%
23	10%	13%	19%		74	4%	4%	7%
24	10%	12%	18%		75	4%	4%	6%
25	9%	12%	17%		76-89	3%	4%	6%
26	9%	11%	17%		90-98	3%	4%	5%
27	9%	11%	16%		99-112	3%	3%	5%
28	8%	11%	16%		113	3%	3%	4%
29	8%	10%	15%		114-148	2%	3%	4%
30	8%	10%	15%		149-151	2%	2%	4%
31	8%	10%	14%		152-227	2%	2%	3%
32	7%	9%	14%		228-229	2%	2%	2%
33	7%	9%	14%		230-298	1%	2%	2%
34	7%	9%	13%		299-458	1%	1%	2%
35	7%	9%	13%		>459	1%	1%	1%

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

Annexes

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 : STRATEGIE D'ETUDE D'UNE MOSAIQUE EN PRENATAL

CRITERES DE DIAGNOSTIC D'UNE MOSAIQUE 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

D'après Hsu, une mosaïque vraie est définie par la présence de la même anomalie chromosomique dans 2 flacons de culture différents.

La découverte d'une cellule avec une anomalie chromosomique nécessite, selon l'anomalie retrouvée, une étude extensive de 12 ou 24 cellules dans les autres flacons de culture. Si l'anomalie n'est pas retrouvée, alors il sera possible d'exclure une mosaïque vraie et de conclure à une pseudo-mosaïque.

Le compte des cellules se fait de la façon suivante :

- 1 clone in situ correspond à 1 cellule
- L'étude après trypsine part du principe que 60% des mitoses examinées sont étudiées à partir de clones différents. Par conséquent, 1 mitose = 0,6 cellule avec un maximum de cellules étudiées correspondant au nombre de clones initial dans le flacon.

Annexes

DEMARCHE DIAGNOSTIQUE

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. **(voir le tableau)**

Première étape, en routine

- Un minimum de 2 flacons ou récipients de culture par spécimen.
- 12 clones in situ ou 15 mitoses après trypsine, issus de deux sources différentes sont examinés

Deuxième étape : étude complémentaire (en fonction de l'anomalie, cf tableau ci-dessous)

➤ Niveau modéré

Rechercher 12 cellules complémentaires dans les autres cultures

➤ Niveau approfondi

Rechercher 24 cellules complémentaires dans les autres cultures.

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

Technique par trypsination	Technique in situ
<p><u>ETUDE COMPLEMENTAIRE APPROFONDIE</u></p> <p>Trisomies 2, 5, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 21, 22 (une ou plusieurs cellules)</p> <p>Anomalie déséquilibrée de la structure (plusieurs cellules)</p> <p>Chromosome marqueur (plusieurs cellules)</p>	<p><u>ETUDE COMPLEMENTAIRE APPROFONDIE</u></p> <p>Trisomies 2, 5, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 21, 22 (une ou plusieurs colonies)</p> <p>Anomalie déséquilibrée de la structure (plusieurs colonies)</p> <p>Chromosome marqueur (plusieurs colonies)</p>
<p><u>ETUDE COMPLEMENTAIRE MODEREE</u></p> <p>Polygonosomies (une ou plusieurs cellules)</p> <p>Trisomies 1, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 17, 19 (une ou plusieurs cellules)</p> <p>45, X (plusieurs cellules)</p> <p>Monosomie pour un autosome (plusieurs cellules)</p> <p>Chromosome marqueur (une cellule)</p> <p>Anomalie équilibrée de la structure (plusieurs cellules)</p>	<p><u>ETUDE COMPLEMENTAIRE MODEREE</u></p> <p>Polygonosomies (une ou plusieurs colonies)</p> <p>Trisomies 1, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 17, 19 (une ou plusieurs colonies)</p> <p>45, X (une ou plusieurs colonies)</p> <p>Monosomie pour un autosome (une ou plusieurs colonies)</p> <p>Chromosome marqueur (une colonie)</p> <p>Anomalie équilibrée de la structure (plusieurs colonies)</p> <p>Anomalie déséquilibrée de la structure (une colonie)</p>

Annexes

<u>PAS DETUDE COMPLEMENTAIRE</u>	<u>PAS DETUDE COMPLEMENTAIRE</u>
Anomalie équilibrée de la structure (une colonie)	45,X (une cellule)
Cassure centromérique avec perte d'un bras (une colonie)	Anomalie déséquilibrée de la structure (une cellule)
Toutes les anomalies d'une cellule unique	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

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

ANNEXE 5 : MISE EN CULTURE EN CYTOGENETIQUE HEMATOLOGIQUE

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 et LMC	Syndrome myélodysplasique
Echantillon	moelle sang blastique	moelle en cas d'impossibilité, sang si myélémie suffisante	moelle
Prélèvement	Héparine, avec ou sans milieu	idem	idem
Mode de conservation avant culture (si délai)	Température ambiante ou +4°C avec ou sans milieu	idem	idem
Nombre de cellules /ml de culture	0,5 à 3.10 ⁶	0,5 à 2.10 ⁶	0,5 à 2.10 ⁶
Facteurs de croissance (G-CSF)	possible pour LAM	possible	possible
Durée de la culture	LAL : J1 avec ou sans colchicine, voire J2 LAM : J1 à J2 , voire J3 LAM3 : jamais < J1	J1 à J2 voire J3	J1 à J2 voire J3

Annexes

Pathologie	Syndromes lymphoprolifératifs Différenciés (LLC, WD...)	Myélome	Lymphomes
Echantillon	Sang, moelle	moelle	Ganglion voire moelle, sang, autres tissus ou liquides de ponction
Prélèvement	Héparine, avec ou sans milieu	idem	Milieu de transport/culture, sérum Physio, tampon, PBS
Mode de conservation avant mise en culture (si délai)	Température ambiante ou +4°C avec ou sans milieu	idem	idem
Nombre de cellules/ml de culture §	1 à 2.10 ⁶	1 à 2.10 ⁶	0,5 à 15.10 ⁶ ou pas de numération (tissus exigus)*
Mitogènes	DSP30/IL2 (au moins une culture) ; TPA/IL2, LPS	non	selon l'histologie et le diagnostic évoqué, voire avec et sans mitogène (idem LLC) en cas de doute diagnostique, PHA si lymphome T
Durée de culture	J2 à J4	J2 à J4	J1 (exposition à la colchicine), J1 à J4

§ A noter que la proportion de plasmocytes ou de cellules lymphomateuses dans le prélèvement est déterminante pour la pertinence de l'examen.

* La culture « directe » de quelques heures peut être employée dans les cas de type Burkitt ou lymphomes agressifs et les LAL dans des cas particuliers.

ANNEXE 6 : NIVEAU DE RESOLUTION SOUHAITABLE EN FONCTION DES INDICATIONS

Postnatal : il est souhaitable d'arriver à une résolution de 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) ou une ACPA réalisée par ailleurs.

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

Si la qualité obtenue ne permet pas d'obtenir la résolution minimale requise, le rapport doit le mentionner.

ANNEXE 7 : LISTE NON EXHAUSTIVE DES EEQ EXISTANTS EN CYTOGENETIQUE

Organisme: Association des Cytogénéticiens de Langue Française, ACLF (voir www.eacjf.org)

Nom du ou des contrôles : EEQ prénatal et postnatal rétrospectifs et prospectifs, EEQ Hématologie prospectif

Nombre de niveau(x) : 2 dossiers contrôle par matrice (1 dossier pour l'hématologie)

Fréquence de passage des contrôles : 1 par an

Organisme: CAP Survey

Nom du ou des contrôles : ACMG/CAP Cytogenetics CY

Nombre de niveau(x) : 5 métaphases par test

Fréquence de passage des contrôles : 3 par an

Organisme : CEQA ([www. CEQA -cyto.eu](http://www.CEQA-cyto.eu))

Nom du ou des contrôles : CEQA EQA : constitutionnel et hématologie

Nombre de niveau(x) : 2 cas par matrice

Fréquence de passage des contrôles : 1 par an

Organisme : UK NEQAS

Nom du ou des contrôles : Constitutional

Nombre de niveau(x) : 2 à 4 cas, Amniotic Fluid, CVS, Blood/Urgent Blood or Solid Tissue, plus Fanconi Anaemia (Pilot EQA), on line (www.ukneqas.org.uk)

Fréquence de passage des contrôles : 2 par an

Partenariat entre deux laboratoires

Nom du ou des contrôles : Contrôle inter-laboratoire

Nombre de niveau(x) à définir par accord entre les laboratoires participants

Fréquence de passage des contrôles : à définir par accord entre les laboratoires participants