

Analyse Chromosomique sur puce à ADN (ACPA):

GUIDE DES BONNES PRATIQUES

Version 1.0 Novembre 2010

Version rédigée par le groupe qualité du réseau Achropuce :

J. ANDRIEUX

M. BERI

M. DOCO-FENZY

J.M. DUPONT

A. LABALME

C. METAY

C. ROORYCK-THAMBO

D. SANLAVILLE

Avec la participation de

B. KEREN

C. LE CAIGNEC

O. PICHON

Et l'ensemble des membres du réseau présent à la 4^o réunion du réseau du 15 juin 2010

INTRODUCTION

Définition

Domaines de compétence

1.- DOCUMENTATION

2. LOIS ET DECRETS DE REFERENCE

2.1. Textes généraux

2.2. Agréments et autorisations

2.2.1 Cytogénétique constitutionnelle

2.2.2 Génétique moléculaire

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

3. DIPLOMES DE CYTOGENETIQUE ou de GENETIQUE MOLECULAIRE

3.1. Diplômes de Cytogénétique

3.2. Diplômes de Génétique Moléculaire

4. ECHANTILLONS BIOLOGIQUES pour l'ACPA

4.1 Indication

4.2. Prélèvements

4.3. Transport

4.4. Réception des prélèvements

5. REALISATION DE L'EXAMEN de l'ACPA

5.1. ACPA

5.1.1. Extraction de l'ADN

5.1.1. 1 Spécifications tissulaires

5.1.1. 2 L'ADN à analyser

5.1.1. 3 L'ADN de référence

5.1.1. 4 Le Cot-DNA

5.1.1. 5 Les échantillons douteux

5.1.2. Marquage et purification

5.1.3. Hybridation et choix du modèle expérimental

5.1.4. Lavage et séchage

5.1.5. Lecture, saisie des données et analyse

5.1.5.1- Puces BACs/PACs

5.1.5.2 -Puces oligos: détailler Agilent / Affy / Illumina /

Nimbelgen

5.1.6. Interprétation, et Identification de la pathogénicité

5.2 Validations

5.2.1. Conditions d'application.

5.2.2. Types de Puces

5.2.3. Validation technique des Puces

5.3. Documentation (Dossiers)

5.3.1 Images ou tableaux représentatifs des résultats obtenus

5.3.2 Contenu du dossier patient

5.3.2.1 Données patient / puce :

5.3.2.2 Données techniques

5.3.2.3 Résultats bruts puce (scan lame)

5.3.2.4 Résultat patient interprétation :

5.3.3 Contenu du Compte rendu ou feuille de résultats

6. CONFIRMATION DES ANOMALIES

6.1 Identité du Clone

6.2 Identité de la sonde

6.3. Confirmation d'un résultat anormal

6.3.1 Confirmation par FISH :

6.3.2 Confirmation pour les Oligonucleotide array

6.3.3 Etudes parentales

7. DELAI DE REPONSE ET ECHECS

8 STOCKAGE ET ARCHIVAGE

9 CONTROLES QUALITE INTERNE et EXTERNE

Analyse Chromosomique sur puce à ADN (ACPA) :
GUIDE DES BONNES PRATIQUES
2010

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 de déséquilibres génomiques en utilisant les puces d'ADN génomique. Il s'agit d'une technique d'analyse globale du génome offrant un niveau de résolution bien supérieur à celui du caryotype pour la détection d'anomalies déséquilibrées et le terme de caryotype moléculaire est parfois employé. Le terme d'Analyse Chromosomique sur Puce à ADN (ACPA) est préféré à celui de caryotype moléculaire.

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

Il s'inscrit dans le cadre de la réglementation en vigueur **LOI n° 2009-879 du 21 juillet 2009 portant réforme de l'hôpital et relative aux patients, à la santé et aux territoires** (Loi HPST) JORF n°167 du 22 juillet 2009. Il s'inscrit dans la démarche d'accréditation (Iso 15189) maintenant obligatoire pour la biologie médicale (Ordonnance N°2010-49 du 13 Janvier 2010 relative à la Biologie Médicale)

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

Ce guide n'a pas pour but de privilégier une approche technologique particulière mais de préciser les points médico-techniques importants à suivre afin de pouvoir offrir aux prescripteurs et aux patients un examen de qualité.

Définition

L'Analyse Chromosomique sur Puce à ADN (ACPA) regroupe l'ensemble des techniques permettant une analyse globale du génome sur des micro-réseaux (array). Ces techniques sont basées sur les homologues de séquence ADN, permettant l'identification d'un déséquilibre en perte ou gain de tout ou partie d'une ou plusieurs régions génomiques.

Ces techniques utilisant des micro-réseaux sont basées soit sur le principe de l'Hybridation Génomique Comparative (CGH) entre deux ADNs soit sur une approche d'analyse de SNP. Elles peuvent détecter des pertes ou gains de nombre de copie d'ADN (CNV : Copy Number Variation), et identifier ainsi des anomalies chromosomiques déséquilibrées. Cette technique ne peut pas détecter des réarrangements équilibrés, les anomalies de la ploïdie, ni les mutations ponctuelles. Les disomies uniparentales ne sont pas détectées par les techniques utilisant une approche basée sur la CGH mais peuvent l'être par la technique utilisant des SNPs.

Un taux bas de mosaïcisme (moins de 20 %) pour une anomalie déséquilibrée ou une aneuploïdie peut ne pas être détecté par l'ACPA. La limite de sensibilité devra être notée dans le compte rendu.

L'ACPA pourra être utilisé en complément des techniques de routine (caryotype et FISH ciblée), ou comme analyse de première intention. Différents types de puces peuvent être utilisées, pan-génomiques, avec différents niveaux de résolution, ou ciblées sur une région génomique.

La sensibilité de l'ACPA dépend en partie du nombre, de la distribution, de la taille des sondes et des critères biostatistiques utilisés pour l'analyse des données.

Domaines de compétence du caryotype moléculaire

Pré-analytique

- Gestion du prélèvement
- Connaissance des manifestations phénotypiques du patient afin d'interpréter les résultats.

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

Chaque laboratoire doit disposer de procédures écrites décrivant les techniques utilisées au sein du laboratoire et les équipements nécessaires. Ces procédures doivent être compréhensibles par tous et doivent être mises à jour chaque année. Les anciennes versions des procédures seront gardées 5 ans.

1.- DOCUMENTATION

Le groupe de travail a consulté pour l'élaboration de ce guide de bonnes pratiques différents documents dont :

- . Site de l'ACLF
- UKNEQAS (UK National External Quality Assessment Schemes) in Clinical Cytogenetics Annual Report, 1997, mis à jour 2001.
- EUCROMIC quality assessment group. Quality Guidelines. Eur J Hum Genet 1997;5:342-350
- ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature). .Karger, Basel, Shaffer LG, Tommerup N (eds), 2005 et 2009.
- ECA PWG for Cytogenetics and Society, Cytogenetic Guidelines and Quality Assurance. A common European framework for quality assessment for constitutional and acquired cytogenetic investigations.
- ISO 17025 L (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 L (2007). Medical Laboratories- particular requirements for quality and competence - Laboratoires d'analyses de biologie médicale - Exigences particulières concernant la qualité et la compétence.
- ISO/IEC Guide 2 (2004) Standardization and related activities - General vocabulary
- JR Vermeesch et al, Eur J Hum Genet, 2007, 15:1105-1114: Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis
- Van Ommen GJ et al., Nature Genetics 2005, 37: 333-4: frequency of new copy number variations in humans
- Shaffer LG, Beaudet AL, Brothman AR, Hirsch B, Levy B, Martin CL, Mascarello JT, Rao KW. Microarray analysis for constitutional cytogenetic abnormalities, of Genetics in Medicine, 2007, September, vol 9 N°9, p 654-662
- Lee, C., lafrate, A.J. and Brothman, A.R.: Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis constitutional disorders. Nat Genet, 2007, 39, S48-54.

2. LOIS ET DECRETS DE REFERENCE

2.1. Textes "généraux"

- Loi n°75-626 du CSP du 11 juillet 1975 régissant l'exercice de la biologie médicale et nombreux décrets et arrêtés y afférant.
 - Décret n° 76-1004 du 4 novembre 1976 (modifié par le décret n° 93-354 du 15 mars 1993) fixant les conditions d'autorisation des laboratoires d'analyses de biologie médicale).
 - Décret n° 83-104 du 15 février 1983 (modifié par le décret n° 93-354 du 15 mars 1993) relatif au contrôle de bonne exécution des analyses de biologie médicale.
- Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale.
- . LOI n° 2009-879 du 21 juillet 2009 portant réforme de l'hôpital et relative aux patients, à la santé et aux territoires (Loi HPST) JORF n°167 du 22 juillet 2009.
- Rapport au Président de la République relatif à l'ordonnance no 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale JO du 15 janvier 2010
 - Ordonnance no 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale. JO du 15 janvier 2010 («Ordonnance Ballereau»)

2.2. Agréments et autorisations

2.2.1 Cytogénétique constitutionnelle

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

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

De plus la réglementation confie un rôle de régulation et de contrôle en cette matière à cette Agence : élaboration de bonnes pratiques avec les professionnels ; suivi de l'activité avec un bilan annuel à rendre par chaque laboratoire ; veille technologique et propositions de modification de la réglementation si nécessaire.

Agréments des praticiens pratiquant la cytogénétique constitutionnelle

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

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

- pour une durée de 5 ans
- la décision est notifiée au praticien dans un délai de 2 mois à compter de la réception d'un dossier de demande complet (une non réponse vaut refus)
- La demande d'agrément est formulée selon un dossier type défini par le directeur général de l'Agence (disponible sur le site de l'Agence)

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

Autorisation des structures pratiquant la cytogénétique constitutionnelle

L'autorité administrative compétente pour délivrer les autorisations est la commission exécutive de l'Agence Régionale Sanitaire (ARS) Le CROS (comité régional de l'organisation sanitaire) intervient également pour délivrer un avis à l'ARS.

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

Le dossier type de demande d'autorisation est défini par l'arrêté du 26 Février 2007.

2.2.2 Génétique moléculaire

Pour les généticiens moléculaires, cf recommandations de l'ANPGM

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

- Loi n°94-653 du 29 juillet 1994 relative au respect du corps humain.
- Décret n° 2000-570 du 23 juin 2000 fixant les conditions de prescription et de réalisation des examens des caractéristiques génétiques d'une personne et de son identification par empreintes génétiques à des fins médicales et modifiant le code de la santé publique.

Autres dispositions

- Arrêtés du 17 Février 2010 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.
- 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.

3. DIPLOMES DE CYTOGENETIQUE ou de GENETIQUE MOLECULAIRE

3.1. Diplômes de Cytogénétique

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

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

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

3.2. Diplômes de Génétique Moléculaire

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

4. ECHANTILLONS BIOLOGIQUES pour la CGH-array

4.1 Indication

Il revient au prescripteur de décider si l'analyse en CGH-array est indiquée mais le responsable du laboratoire garde la maîtrise du type de puce à utiliser en fonction de l'indication et des procédures en vigueur dans le laboratoire. Il pourra également être amené à en discuter avec le clinicien.

Le clinicien sera tenu informé des limites du test.

L'analyse des parents est recommandée quand un remaniement est identifié en ACPA, soit pour exclure un remaniement parental équilibré, soit une délétion ou duplication d'origine parentale. Ces tests sont également nécessaires quand les

gains et pertes identifiés sont situés dans des régions du génome dont la signification clinique n'est pas connue. Dans ces cas les études parentales sont indiquées pour différencier les variants familiaux ou polymorphismes de la population, des remaniements *de novo* potentiellement délétères.

4.2. Prélèvements

La technique d'ACPA peut être réalisée après l'extraction de l'ADN de chacun des échantillons contenant de l'ADN (sang périphérique, sang de cordon, fibroblastes cutanés, liquide amniotique, culot cellulaire fixé, tissus inclus en paraffine). Le laboratoire doit établir le pré-requis pour chaque type tissulaire.

Le laboratoire doit établir le mode de prélèvement optimum pour chaque tissu, la quantité minimum de tissu requise pour chaque type tissulaire, le type d'anticoagulant pour le sang et les consignes pour le prélèvement ainsi que pour la demande d'analyse.

Attention respecter le Décret n°2000-570 du 23 juin 2000 fixant les conditions de prescription et de réalisation des examens des caractéristiques génétiques d'une personne et de son identification par empreintes génétiques à des fins médicales et modifiant le code de la santé publique.

Les prélèvements doivent être effectués selon les indications du GBEA et suivant une démarche qui sera accréditée. Une procédure précisant les conditions de prélèvement, de recueil et de conditionnement des échantillons doit être établie et mise à la disposition des préleveurs. De plus, les échantillons doivent être recueillis stérilement et acheminés dans un délai compatible avec la survie des cellules en cas de demande d'un caryotype pour réaliser une analyse en FISH.

Le consentement de la personne et l'attestation de consultation du prescripteur sont obligatoires !

Identification des prélèvements

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

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

- Le motif de la demande et le diagnostic suspecté
- L'identification du médecin prescripteur
- Des renseignements cliniques spécifiques susceptibles de déterminer le choix des techniques à mettre en oeuvre. Si ceux-ci ne peuvent pas être obtenus, le compte rendu du résultat devra le mentionner.

4.3. Transport

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

4.4. Réception des prélèvements

Le cytogénéticien ou biologiste moléculaire 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 ou biologiste moléculaire peut être amené à accepter des échantillons non conformes. Le clinicien prescripteur doit en être informé et les réserves nécessaires doivent être mentionnées dans le résultat.

Les échantillons seront accompagnés d'une fiche de prescription mentionnant le motif de la demande et le diagnostic suspecté, l'identification du médecin prescripteur, des renseignements cliniques spécifiques (dans la mesure du possible) susceptibles de déterminer le choix des techniques à mettre en oeuvre et permettant une interprétation optimale des résultats. Si ceux-ci ne peuvent pas être obtenus, le compte rendu du résultat devra le mentionner.

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

5. REALISATION DE L'EXAMEN d'ACPA

Ainsi que le précise le GBEA, «c'est au biologiste qu'incombe le choix de méthodes optimisées et recommandées par les sociétés scientifiques nationales ou internationales de biologie ou, le cas échéant, validées par lui-même. Les procédures techniques décrivant chaque étape doivent être écrites et être à disposition.

5.1. L'ACPA

Le laboratoire doit décrire les procédures dans le livre des techniques, et ou le manuel qualité pour l'extraction et le marquage, la quantification (fluoromètre, spectrophotomètre), l'obtention de la quantité adéquate et de la bonne concentration d'ADN sur gel, la technique de fragmentation (sonication, digestion), le marquage en fluorescence et la quantité d'ADN marqué après purification. Le laboratoire doit enregistrer tous ces paramètres pour chaque patient.

Le point important est de garder globalement une homogénéité pour les différentes analyses (sur une même série d'analyses).

5.1.1. Extraction de l'ADN

5.1.1. 1 Spécifications tissulaires

La technique d'ACPA peut être réalisée après l'extraction de l'ADN de chacun des échantillons contenant de l'ADN (sang périphérique, sang de cordon, fibroblastes cutanés, liquide amniotique, culot cellulaire fixé, tissus inclus en paraffine). Néanmoins le rapport signal sur bruit sera différent pour chacun des types tissulaires.

Le laboratoire devra déterminer les critères d'évaluation pour déterminer les seuils normaux et anormaux pour chaque type tissulaire, reconnaissant que la sensibilité de l'analyse, peut être différente pour chacun.

Le laboratoire doit établir le type de tissu approprié pour chaque type de puce et réciproquement, la quantité minimale d'ADN requise pour chaque type tissulaire.

5.1.1. 2 L'ADN à analyser

Le mode d'extraction optimum en fonction du type tissulaire doit être établi et documenté par le laboratoire. La quantité minimum d'ADN requise pour faire l'analyse doit être déterminée. Elle doit être déterminée en fonction du nombre de test effectués une fois ou deux (si le protocole expérimental prévoit une inversion de fluorescence (dye-swap)).

L'extraction se fera selon les méthodes ayant fait leurs preuves dans le laboratoire, et selon la méthode recommandée par le fournisseur de la puce pour l'ACPA. Elle sera adaptée au type de tissu (sang, biopsie tissulaire, culture cellulaire, Liquide amniotique etc...).

La qualité de cette extraction pourra être testée sur gel de migration et la quantité sera évaluée sur un analyseur permettant l'analyse de très petits volumes (1ul) (type nanodrop, bioanalyseur, fluoromètre...). La qualité de cet ADN sera contrôlée suivant un protocole établi, avant toute hybridation. Si la qualité est insuffisante, la technique sera arrêtée.

En cas de prélèvement unique (exemple décès du patient), la technique pourra être réalisée même si la qualité est insuffisante mais la qualité de l'ADN et les limites d'interprétation seront alors rapportées dans le compte rendu final.

5.1.1. 3 L'ADN de référence. (puces SNP non concernées)

L'ADN de référence sera choisi en fonction du protocole expérimental. Le type d'ADN ou de contrôle doit être référencé. Il est recommandé que le laboratoire établisse des échantillons contrôle masculins et féminins, et les règles de bon usage pour les utiliser. Ils seront utilisés en opposition de sexe ou non. Le laboratoire doit préciser si il utilise un ADN témoin unique ou en pool, de type masculin ou féminin.

Les limites de chaque option du protocole expérimental dont le choix de l'ADN témoin doivent être comprises afin d'interpréter correctement les résultats.

Les ADNs de référence sont le plus souvent normaux mais ils peuvent être anormaux dans certaines circonstances.

Le résultat de chaque nouvel ADN contrôle doit être comparé aux résultats obtenus avec le précédent (au minimum sur 1 analyse). Les CNVs de l'ADN de référence utilisé doivent être référencés dans le laboratoire. Ces données peuvent servir de témoin interne à l'expérience

Le laboratoire peut choisir de ne pas utiliser un ADN de référence par exemple en utilisant une approche en trio ou quatuor entre patients. Le plan de l'expérience devra veiller à coupler des patients avec des phénotypes différents.

5.1.1. 4 Le Cot-DNA

Le Cot-DNA (si celui-ci n'est pas inclus dans le kit du fournisseur) sera choisi en fonction du protocole expérimental. Il doit être référencé dans le protocole (dosage, référence, n° de lot).

5.1.1. 5 Les échantillons douteux

Si l'échantillon ne répond pas aux critères de qualité il est recommandé de demander un nouveau prélèvement. Si cela n'est pas possible, il faut trouver la meilleure solution afin de donner la meilleure réponse à la question clinique posée et de préserver l'échantillon en cas de décès du patient.

Si l'échantillon est en quantité insuffisante, dans certaines situations une amplification globale du génome peut être indiquée. Cette technique pourra être réalisée si le laboratoire en a l'habitude et en précisant les biais d'analyse inhérents à cette technique, dans le rapport, de façon à ce que le clinicien et le patient soient informés. Le mode opératoire de l'amplification globale sera incorporé dans le manuel technique.

5.1.2. Marquage et purification

Le laboratoire doit être capable de marquer et de purifier l'ADN suivant les recommandations du fournisseur du Kit requis. Le marquage est réalisé avec des fluorochromes compatibles avec le lecteur des lames utilisé. Un contrôle du marquage est réalisé selon un protocole établi au sein du laboratoire.

L'ozone peut altérer les fluorochromes notamment le Cy5, il est préférable de vérifier la quantité d'ozone (cartes météo ou capteurs) avant de techniquer les lames si ce phénomène d'altération a été observé dans le laboratoire. Dans le cas d'un taux d'ozone élevé, on peut utiliser des cassettes de protection pour la puce ou sinon techniquer dans une salle équipée d'un extracteur d'ozone...

5.1.3. Hybridation et choix du modèle expérimental

Le type de puce est choisi en fonction de l'indication. Cela peut être une puce pan-génomique ou ciblée.

Les lames ou supports sont choisis en fonction du type d'examen réalisé au laboratoire. La date de péremption doit être respectée, les lames sont conservées à l'abri de l'humidité et de la lumière et à température ambiante (cf recommandations du fournisseur).

Le protocole d'hybridation est défini à la suite de la mise au point de la technique dans le laboratoire et suivant les recommandations du fournisseur de la puce en trio, duo ou simple hybridation contre de l'ADN témoin, en sexe opposé ou non, en inversion de fluorescence (dye swap) ou non. Le choix du modèle expérimental doit être documenté.

L'ADN témoin choisi (ADN de référence ou pool d'ADN) doit rester le même pour une série de lame.

Les contrôles en sexe-opposé (sex mismatch) donnent une anomalie construite qui est intéressante pour établir la qualité de la technique de microarray à travers l'établissement de différence de dosage entre le chromosome X et le Y. Cependant

pour les anomalies des gonosomes, ou de la ploïdie il est préférable de réaliser des analyses en sexe identique et opposé ou de confirmer par FISH ou caryotype.

5.1.4. Lavage et séchage

La procédure de lavage et de séchage est rédigée suivant les recommandations du fournisseur. La procédure en cas de bruit de fond ou de tache doit être rédigée (les lames sont relavées ou non utilisées).

5.1.5. Lecture, saisie des données et analyse

Le scanner doit être régulièrement contrôlé selon les recommandations du fournisseur. Pour certaines lames il est nécessaire de scanner la lame vierge avant hybridation. La lecture est réalisée sur un lecteur compatible avec le type de puce utilisé. Elle est réalisée aussi rapidement que possible sur ce lecteur après l'hybridation et les lavages. Les images sont stockées sur un ordinateur dédié dont la capacité de stockage est compatible avec cette technique. Elles sont analysées par un logiciel dédié qui permet d'extraire des ratios de fluorescence en chaque point et région prédéfinie de la lame hybridée. Ce logiciel génère des fichiers qui seront analysés afin de définir si le ratio obtenu est significativement augmenté ou diminué par rapport à l'ensemble des points de la lame et en fonction de la qualité globale de l'hybridation.

Il est nécessaire de vérifier que les critères qualité de l'image obtenue par le scanner sont compatibles avec une bonne interprétation des ratios de fluorescence (Par exemple : intensités globale, rapport signal/bruit,...)

Une dernière étape permettra la visualisation graphique sur un chromosome virtuel de l'ensemble de l'analyse.

Ces fichiers seront conservés comme toute information génétique

Les critères seront définis par chaque laboratoire en fonction de la plate forme utilisée, comme le niveau du bruit de fond ou le rapport signal sur bruit,...

En pratique, quelques critères seront à référencer dans le cadre du contrôle qualité interne (CQI) du laboratoire. Il s'agira de critères de suivi de la plateforme afin de repérer une éventuelle dérive et de s'assurer de la bonne qualité technique.

5.1.6. Interprétation, et Identification de la pathogénicité

L'interprétation des résultats c'est à dire des déviations du ratio de fluorescence comprend plusieurs étapes. Le laboratoire doit déterminer les seuils normaux et anormaux. Les valeurs de \log_2 ratio devront être définis pour retenir une perte, un gain, une amplification, mais également les valeurs normales.

Le rapport devrait comporter la description de ces seuils et les critères choisis pour différencier le normal de l'anormal.

Le laboratoire définira les critères qui lui permettent de retenir un CNV. Par exemple le nombre de sondes déviantes contiguës permettant de retenir une perte ou gain.

Il est nécessaire de dénombrer les variations de nombre de copies identifiées par le fournisseur de la puce comme des CNPs ou polymorphisme (si disponible)

Il faut ensuite dénombrer les CNPs déjà observés dans la population analysée (données du laboratoire, données de la littérature ou Internet : DGV, DECIPHER)

Les CNVs : variations de nombre de copie qui ne sont pas des CNPs peuvent alors être identifiés. Il faut apprécier si ces CNVs ont déjà été rapportés dans la littérature comme associés à un phénotype particulier. Les praticiens doivent avoir connaissance de l'existence de CNVs « bénins » ; décrit comme polymorphes ; et de CNVs de signification phénotypique inconnue. Ils pourront s'aider des données de la littérature et des bases de données existantes comme la « Database of Genomic Variants » pour leur analyse.

Certaines anomalies délétères peuvent survenir dans des régions connues comme variantes, ceci comprend des pertes ou gains englobant un CNV connu ou pouvant représenter une altération homozygote d'un CNV autrement bénin à l'état hétérozygote.

Pour ces CNVs un contrôle devra être réalisé en FISH ou en QPCR, ainsi qu'une analyse des parents avec cette même technique de contrôle.

Il est souhaitable d'évaluer la taille du remaniement, ses bornes et le nombre de gènes impliqués. La notion de gène est difficile à définir. Un travail d'interprétation est à réaliser en concertation avec le clinicien. Au minimum les gènes « OMIM » connus pour être impliqués en pathologie seront discutés avec le clinicien, voire mentionnés dans le compte rendu.

Si les parents ne sont pas disponibles, soit le CNV est associé à un syndrome récurrent (DECIPHER, gènes OMIM, Pubmed) et il pourra être conclu comme délétère, soit il ne l'est pas et le compte rendu ne pourra clairement conclure à une implication phénotypique de ce CNV. Néanmoins des informations complémentaires pourront émerger dans la littérature rapidement, il faut donc rester prudent.

La démarche utilisée pour statuer sur le caractère pathogène ou non d'un CNV doit être rédigée. Il est proposé de s'inspirer des critères majeurs de Lee et al, (Nature 2007) et/ou de Miller *et al*, (AJHG 2010).

5.2 Validations

5.2.1. Conditions d'application.

La technique d'ACPA pan-génomique est une technique complémentaire du caryotype, et doit être utilisée comme telle, sauf indications particulières. Elle pourra être utilisée en première intention devant certaines indications comme le retard mental associé ou non à un syndrome malformatif. Les résultats devront être contrôlés par une technique complémentaire de référence et dont le laboratoire a l'expérience.

5.2.2. Types de Puces

Les puces utilisées pour l'hybridation sont des puces de types BAC/PAC ou de type oligonucléotides. La résolution varie en fonction du type de puce et du fournisseur. Elle sera choisie en fonction de l'indication de l'examen.

5.2.3. Validation technique des Puces

Plusieurs types de puces peuvent être utilisés pour le diagnostic dans un laboratoire médical : des puces développées par le laboratoire, des puces d'origine académique, ou d'origine commerciale. La technique et le mode de validation doivent être documentés dans le laboratoire de même que les limites de l'analyse doivent être décrites dans le rapport.

Le praticien devra avoir une formation suffisante en ACPA. Par exemple en ayant participé à l'analyse, l'interprétation et le rendu de 50 ACPA ou être titulaire du DESC de cytogénétique.

Il faut suivre les étapes suivantes pour tout type d'ACPA avant de l'offrir au diagnostique : validation des nouvelles puces par des ADN avec anomalies chromosomiques connues, (un minimum de 2 anomalies sur des régions différentes) et d'un ADN témoin (vérifications de la présence des CNPs). Le laboratoire pourra également échanger 2 échantillons en aveugle normaux et anormaux avec un autre laboratoire de référence.

Une procédure de validation des lots de puces doit être écrite et tenue à disposition dans le laboratoire. Elle peut-être basée sur l'utilisation de témoins positifs tels que des anomalies déjà connues ou des polymorphismes d'un ADN témoin.

5.3. Documentation (Dossiers)

5.3.1 Images ou tableaux représentatifs des résultats obtenus

Des images ou tableaux représentatifs des résultats obtenus doivent être conservés

5.3.2 Contenu du dossier patient :

Discrétion nécessaire par rapport au dossier patient partagé.

5.3.2.1 Données patient / puce :

- Données administratives (Nom, Prénom, DN)
- Echantillon: date de prélèvement, date de réception, type échantillon, N°ADN, N°famille(option)
- Type puce (Bluegnome, Agilent, Affymétrie, etc...)
- Prescription et nom du prescripteur
- Consentement O/N, caryotype O/N
- Indication/clinique
- Nom des parents, indiquer si prélèvement disponible (optionnel)

5.3.2.2 Données techniques:

- Traçabilité des étapes techniques (feuille de travail, tableau ID ADN, critères de qualité (photo gel) quantité (nanodrop +/- qubit ou autre bioanalyseur), marquage)

5.3.2.3 Résultats brut puce (scan lame)

5.3.2.4 Résultat patient interprétation_

- ID patient, N° lame, type lame, type échantillon, anomalie (chr, del/dup, localisation cytogénétique, début/fin en position génomique (nt) et version de la carte du génome utilisée, syndrome associé, clone, AQ, validation FISH/QPCR),
- polymorphismes identifiés (tableau type Excel par exemple).

5.3.3 Contenu du Compte rendu ou feuille de résultats

La feuille de résultat doit se conformer aux instructions du GBEA, de l'Agence de la Biomédecine et répondre aux exigences des CQE et du décret [n° 2000-570 du 23 juin 2000](#) fixant les conditions de prescription et de réalisation des examens des caractéristiques génétiques d'une personne et de son identification par empreintes génétiques à des fins médicales et modifiant le code de la santé publique.

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

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

La description des seuils et des critères choisis pour différencier le normal de l'anormal est à mettre dans la feuille de paillasse et non le compte rendu. De même les items suivants sont à mentionner dans la mesure du possible sur la feuille de paillasse ou dans le dossier mais pas obligatoirement sur le compte rendu :

- L'identification et la nature de la puce, du fournisseur, N° de lot
- Algorithmes de normalisation et de segmentation utilisés, avec les paramètres si ceux-ci sont différents des paramètres par défaut.

Pour la définition de la taille du remaniement, penser à tenir compte de la densité du niveau de résolution de la puce utilisée.

La feuille de résultat doit préciser :

- L'identification du patient (N, Prénom, DN)
- L'identification du médecin prescripteur
- Les Dates de Prélèvement, Date de réception, Date de rendu
- Le tissu examiné
- Type de plateforme utilisée
- Le degré de résolution moyen estimé
- Logiciel d'analyse utilisé
- Le nombre total de sondes déviantes au niveau de l'anomalie (fonction du type de puce utilisées, plutôt pour les puces BACs/PACs) : optionnel
- Le type et le nombre de sondes ou loci sur la lame : optionnel
- La résolution attendue (moyenne: taille minimum et maximum)
- L'ADN de référence (optionnel)
- La Taille du déséquilibre (version genome browser)
- Les sondes non déviantes flanquantes (optionnel)
- Les sondes déviantes flanquantes (optionnel). Au minimum donner les positions génomiques
- La référence de la carte génomique utilisée au moment du rendu

- La formule chromosomique (conventionnelle et/ou moléculaire) est donnée selon la nomenclature internationale en vigueur (ISCN) avec la position génomique des bornes du remaniement en clair. Le nom des clones, ou la liste partielle ou complète des gènes présents dans l'intervalle peut être renseigné,
 - formule :
 - arr CHR bandes (début pb->position fin pb)x..
 - *De novo* ou hérité si cherché
- et est accompagnée de son interprétation compréhensible pour les non-spécialistes.
- La méthode indépendante de contrôle, si réalisé dans le même temps, (nom, position et nombre des sondes utilisées), résultats exprimés clairement.
- La représentation graphique des régions remaniées (optionnel)
- La Signature par un praticien agréé

Le rapport doit donner les limites du test. Exemple : *« la puce a été conçue pour diagnostiquer des gains ou pertes de nombre de copies (déséquilibres chromosomiques). Elle peut détecter des aneuploidies, pertes, et gains des loci représentés sur la puce. Elle ne peut pas détecter des anomalies équilibrées (translocations réciproques, translocation robertsoniennes, inversions et insertions équilibrées), des mutations ponctuelles, ni des déséquilibres de régions non représentées sur la puce. Elle ne peut pas détecter des degrés très faible de mosaïcisme (< 20 %) ».*

Chaque laboratoire décidera de la formule à ajouter

La formulation de la conclusion

La conclusion décrira en clair la ou les anomalies significatives.

- **Résultat normal** : La formule *« Il n'a pas été décelé d'anomalie génomique déséquilibrée dans les conditions de l'examen »* est préférable au terme de *« examen normal »*.

- **Résultat anormal** : donner la formule ISCN en vigueur préciser les clones ou sondes impliqués, les résultats de la validation FISH/QPCR, ajouter le résultat des parents,

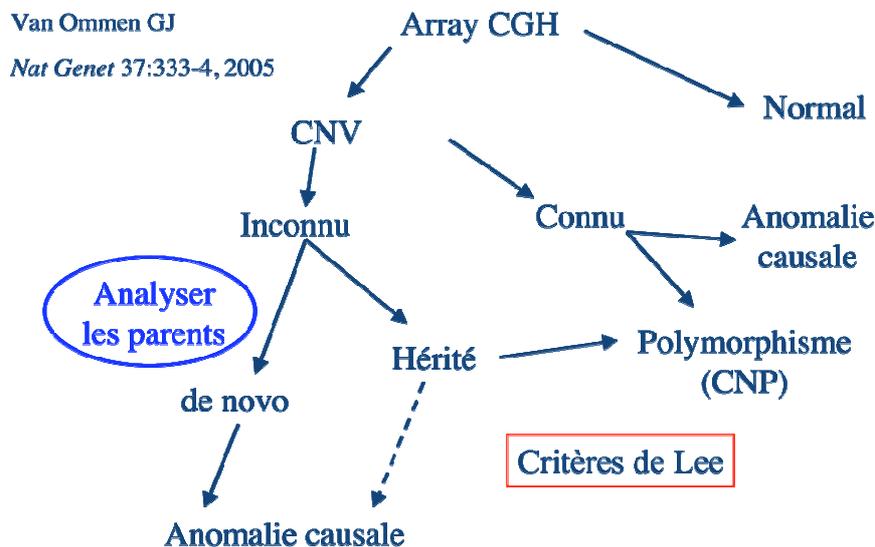
Les commentaires sont adaptés aux CNV observés, Il faut peut-être juste indiquer le nombre de CNV observés et préciser que des renseignements complémentaires sur ces CNV sont à disposition au laboratoire. Exemple de commentaire *"A noter la présence de plusieurs variations du nombre de copies (CNV) présentes chez des individus normaux, répertoriées dans la base de Toronto et considérées comme non délétères à ce jour. En fonction de l'évolution des connaissances, ces données pourraient être réinterprétées et nous serions alors amenés à vous recontacter afin de rechercher ces variations sur les ADNs parentaux pour préciser la corrélation génotype/phénotype."*

Il est recommandé d'associer un courrier d'accompagnement pour le clinicien qui expliquera l'analyse à prescrire pour les apparentés et proposera un conseil génétique. Les résultats doivent être conservés au même titre que tous les examens de génétique suivant la réglementation en vigueur. Ils ne doivent être remis qu'au médecin prescripteur.

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

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

Les examens et conclusion doivent être conservés dans un dossier patient. Un dossier famille doit être constitué pour rassembler les résultats des parents. Un résultat global (parents et enfant) doit être conservé.



Critères de Lee , 2007

6. CONFIRMATION DES ANOMALIES

6.1 Identité du Clone

Il s'agit de confirmer si chaque spot représente le bon clone. Il est impossible de valider chaque clone quand la puce est imprimée. La validation peut être obtenue si le laboratoire possède l'ADN des clones qui présente des variations de nombre de copies. Il faut connaître les discordances dans les résultats imputables à la mauvaise identification d'un clone sur la puce. Cette discordance peut-être mise en évidence par la FISH sur métaphase ou le spot apparaîtra sur le mauvais chromosome.

6.2 Identité de la sonde

Les sondes oligonucléotides sont synthétisées en utilisant des données du domaine public. Les loci utilisés doivent être documentés par le workshop Human Gene Mapping, GeneAtlas, The Genome Data Base, ou des publications dans la littérature à comité de lecture. Des milliers de sondes sont présentes sur les puces, il est impossible de valider chaque sonde quand la puce est imprimée. Le fournisseur doit avoir des protocoles robustes pour vérifier que la synthèse s'est déroulée normalement. Néanmoins il faut connaître les discordances imputables à une assignation anormale sur la carte physique du génome de la séquence de la sonde et donc de la puce. La stratégie d'analyse courante consiste à considérer plusieurs oligonucléotides pour la détermination des gains et pertes et minorera ce problème de mauvaise assignation.

Pour toute discordance la sonde doit être exclue de l'analyse.

6.3. Confirmation d'un résultat anormal

Le laboratoire doit établir un protocole qui permet de confirmer des résultats anormaux ou ambigus. Ceci inclus des analyses cytogénétiques classiques, en FISH, QPCR ou tout autre technique alternative.

Si le CNV n'est vérifié qu'avec une sonde ou un seul couple d'amorce, il est recommandé de les choisir au milieu du CNV

Dans l'idéal, il serait préférable de valider un CNV en utilisant des sondes ou des couples d'amorces localisées de part et d'autres des bornes du CNV.

Pour les vérifications en génétique moléculaire, si le CNV n'est pas retrouvé chez l'un des parents, un contrôle en FISH est très souhaitable afin de rechercher un remaniement chromosomique équilibré. 1 % des duplications sont liées à la présence d'une insertion chez l'un des parents.

6.3.1 Confirmation par FISH :

Le clone doit être disponible dans un temps raisonnable (moins de 2 mois). Quand une puce montre une anomalie qui n'est pas reproduite par la FISH, le protocole concernant les discordances (sensibilité parfois différente) doit être rédigé.

Les BACs ou clones utilisés doivent être validés comme les autres sondes. Cette validation peut être faite sur les lames du patient (métaphase et interphase).

Il est possible de choisir une sonde d'une région comprise dans le remaniement et déjà validée au laboratoire.

6.3.2 Confirmation pour les Oligonucleotide array

En cas d'anomalie les laboratoires de cytogénétique peuvent utiliser la FISH pour confirmation. Sinon il faut vérifier que les sondes seront disponibles dans un temps

raisonnable. Il faut écrire le protocole en cas de discordance avec la FISH (sensibilité parfois différente).

La technique de PCR quantitative et de MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) peut être utilisée pour confirmation après validation. Il faut écrire le protocole en cas de discordance. En cas de gain, une analyse par FISH est nécessaire malgré tout pour différencier les duplications in situ des insertions/translocations/marqueurs.

6.3.3 Etudes parentales

Il faut déterminer la meilleure technique de confirmation pour les autres membres de la famille.

Il est souhaitable de connaître le phénotype des patients et des membres de la famille pour interpréter les résultats.

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.

Une procédure doit être rédigée précisant les délais de rendu en fonction de l'indication (ex nouveau-né avec des malformations congénitales, enfant avec retard mental).

8 STOCKAGE ET ARCHIVAGE

Il est souhaitable que les lames examinées soient conservées jusqu'au rendu final de l'examen (contrôles parentaux compris). Néanmoins la dégradation des signaux de fluorescence ne permet pas cette exigence sauf si le laboratoire investit dans des chambres spéciales de conservation.

La durée de conservation des documents de cytogénétique conventionnelle ou moléculaire papiers (indications et résultats), documents scannés ou microfilmés, photographiques, électroniques ou informatiques devraient être d'au moins trente ans (décret 2000-570 du 23 juin 2000 et Article R1131-15 du Code de la Santé Publique).

Le stockage des fichiers informatiques demande un volume d'environ 0,5 à 1 Go par patient, il concerne les :

- Résultats (dont scan, fichiers Bluegnome (?), Agilent (?)), et conclusions: stockage dans dossier patient sur serveur ayant sauvegarde hebdo
- Référencement des données pour la traçabilité des résultats dans le dossier patient (sauvegarde hebdo)
- Stockage en double des données informatiques (serveur? Bandes magnétiques?)
- Stockage des résultats :
- les images brutes issues du scanner
- tous les fichiers générés par le logiciel d'analyse permettant une réanalyse des données

- les éventuels fichiers images représentatifs de(des) (l')anomalie(s) détectée(s)

L'archivage informatique doit suivre les recommandations concernant les données sensibles (sauvegarde en double, stockage dans des pièces différentes dont l'accès est contrôlé)

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

9 CONTROLE QUALITE INTERNE et EXTERNE

9.1 CQI

Chaque laboratoire devra référencer ses contrôles internes pour chaque point du protocole technique et du rendu de résultat

Technique :

Il est recommandé de faire une mise au point en sexe opposé pour vérifier si il y a une discrimination optimale par rapport à l'intensité des spots.

Il est recommandé de faire un contrôle d'un ADN témoin contre lui-même (self-self) afin de vérifier la normalité des log₂ ratios.

Le contrôle de la reproductibilité du mode opératoire se fera par

- Hybridation ADN self/ ADN self ?
- Hybridation du même patient plusieurs fois

La fréquence de ces contrôles sera à spécifier par le laboratoire.

Rendu de résultat

9.2 CQE

Le laboratoire doit participer a un contrôle de qualité externe ou contrôle inter laboratoire. Ce Contrôle peut être prospectif ou rétrospectif.

•Contrôle prospectif sur échantillons

- Choix adapté à la résolution de la puce utilisée par le laboratoire ?
- Contrôle FISH (del), Q-PCR (dup ou petite del) ou MLPA
- Nombre : 3 oligo Agilent, 1 BAC/PAC? (del, dup, mos, t)
- recherche du caractère hérité ou de novo
- Rendu du résultat
- Délai

•Contrôle rétrospectif

- Dossiers déjà rendus

Exemple de compte rendu de Caryotype moléculaire ou ACPA

En tête du laboratoire

Agréments du laboratoire et des praticiens

Lyon le 05/04/2010

Résultat du caryotype Moléculaire

Partie administrative :

N° du laboratoire

Nom de patient

Prénom du patient

Date de naissance

Date de réception de l'échantillon

Type d'échantillon

Indication

Partie technique

Plateforme utilisées

Type de puce utilisée

Plan de l'expérience

Paramètre qualité ? Ex : valeur du DLRS

Niveau de résolution

Partie résultat

Formule ISCN

Interprétation médicale

Commentaires éventuels

Signature

Pour l'interprétation

Pas d'anomalie :

Pas de déséquilibres chromosomiques pathogènes mis en évidence

Pour les anomalies

Présence d'un gain sur tel chromosome de x mégabase allant de la position génomique y à z comprenant w gènes.

Présence d'une perte sur tel chromosome de x mégabase allant de la position génomique y à z comprenant w gènes.

Préciser la version du génome utiliser

Si mosaïque, estimer le pourcentage en fonction des moyennes des valeurs des log2ratio

Donner des références bibliographiques si possible en faveur du caractère pathogène du déséquilibre. Possibilité de faire un courrier à part

Préciser par quelle technique le CNV a été vérifié.

Préciser qu'il est recommandé d'étudier les parents

Faire référence au conseil génétique

Pour les commentaires éventuels

Exemple de commentaire possible

A noter la présence de plusieurs variations du nombre de copies (CNV) présentes chez des individus normaux, répertoriées dans la base de Toronto et considérées comme non délétères à ce jour. En fonction de l'évolution des connaissances, ces données pourraient être réinterprétées et nous serions alors amenés à vous recontacter. Ces CNV sont disponibles sur demande

la puce utilisée a été conçue pour diagnostiquer des gains ou pertes de nombre de copies (déséquilibres chromosomiques de plus de x kb. Elle ne peut pas détecter des anomalies équilibrées (translocations réciproques, translocation robertsoniennes, inversions et insertions équilibrées), des mutations ponctuelles, ni des déséquilibres de régions non représentées sur la puce. Elle ne peut pas détecter des degrés très faible de mosaïcisme.