

ACCLF



11ème Bulletin de l'Association des Cytogénéticiens de Langue Française

Bonne Année

1998

Présidente :
Catherine Turleau
Vice-présidents :
Anne-Marie Capodano
Jean-Louis Taillemite
Jacqueline van den Akker
Sylvain Briault
Secrétaire général:
François Picard
Trésorier :
François Thépot

Sommaire

- Editorial
- Retour sur le Xème colloque
- A propos de la microdissection
- L'Internet et le cytogénéticien
- La FISH en hématologie
- Nouvelles diverses

Éditorial

L'ACLF a 10 ans ! Elle a réussi au cours de ces dix années à rassembler la majorité des cytogénétiens français et à constituer une famille qui, chaque année, a plaisir à se retrouver à l'occasion de son colloque. Ces réunions annuelles nous permettent de nous enrichir de nos expériences, d'exposer nos problèmes, de confronter nos points de vue, mais aussi de profiter d'un climat qui, d'année en année, se fait de plus en plus convivial.

Notre association a réussi à réunir des individus ayant des origines variées : pédiatrie, histologie, hématologie, anatomie pathologique, etc... Il lui faut maintenant maintenir une cohésion entre les cytogénétiens exerçant dans des domaines différents : constitutionnel prénatal, constitutionnel postnatal, hématologie, tumeurs solides. Il lui faut aussi continuer à rassembler les cytogénétiens du secteur public et du secteur privé car une analyse objective démontre qu'ils sont plus complémentaires que concurrentiels.

L'ACLF est maintenant reconnue par les pouvoirs publics puisqu'elle est réglementairement représentée à la Commission Nationale de Médecine et Biologie de la Reproduction et du Diagnostic Prénatal. Elle est consultée par la Commission de la Nomenclature des Actes de Biologie Médicale pour la cotation des actes de cytogénétique.

L'ACLF a réussi à faire prendre en charge le remboursement du caryotype foetal et a contribué à faire reconnaître les signes d'appel biologiques comme indication du même caryotype foetal.

Nous devons continuer à agir pour faire revaloriser le caryotype constitutionnel postnatal et faire adopter une cotation particulière pour les actes de cytogénétique oncohématologique. Face à ces problèmes qui restent à résoudre nous devons rester très vigilants et nous méfier des prises de position extrêmes qui ne peuvent que nous nuire. Dans la conjoncture actuelle, la seule manière d'aboutir est de démontrer notre sérieux, d'être crédibles tout en sachant être réalistes. L'avenir de la cytogénétique en dépend.

L'ACLF est la seule structure qui représente l'unité de la cytogénétique. Puisse-t-elle, dans la décennie qui commence, continuer efficacement l'oeuvre qu'elle a entreprise.

François PICARD

Retour sur le Xème colloque

De l'avis unanime, le Xème colloque, qui coïncidait avec les dix ans de l'ACLF, fut un grand succès. Sur le plan scientifique, le choix des thèmes et la qualité des exposés permirent aux nombreux participants d'y trouver leur pâture intellectuelle en confortant leur connaissances et en élargissant leurs centres d'intérêt. Les quelques résumés adjoints à ce bulletin apportent d'ailleurs une trace de certains moments forts de ce Xème colloque.

Comme on pouvait s'y attendre, l'organisation, qui reposait essentiellement sur les épaules de notre ancien président François Picard et de son équipe, fut sans faille.

Mais surtout, il y régna une ambiance chaleureuse et détendue qui tient sans doute à cette cohésion, désormais acquise, de l'ensemble des cytogénéticiens, tous réunis dans l'Association, et aux espoirs nombreux qui les portent.

L'activité des laboratoires privés, dont les structures, organisées à l'échelon national, garantissent aux femmes enceintes un diagnostic prénatal de qualité, va encore croître du fait de l'utilisation des marqueurs sériques par les femmes de tous âges. Dans le domaine de la recherche, la Cytogénétique est devenue moléculaire, à l'affût de nouveaux procédés innovants. Dès à présent, la mise à profit de techniques telles que microdissection, étirement de l'ADN et caryotype spectral, favorise de nombreuses collaborations et commence à porter ses fruits.

Encore un grand merci, donc, à François Picard et à toute son équipe.

Le prochain colloque aura lieu à **Tours, du 21 au 23 Septembre 1998**. Le programme scientifique, actuellement en préparation, vous sera adressé ultérieurement, mais la date peut être réservée dès maintenant.

LA MICRODISSECTION CHROMOSOMIQUE : APPLICATIONS ET PERSPECTIVES

Philippe JONVEAUX*

L'établissement du caryotype fournit une "image" globale du génome cellulaire. Toutefois les conditions techniques inhérentes à la réalisation du caryotype font que cette image peut être entachée d'un certain degré d'imprécision, et dans certaines situations, les techniques conventionnelles d'exploration chromosomique ne permettent pas toujours d'appréhender la constitution chromosomique de certaines anomalies complexes. Les progrès réalisés dans le domaine de l'hybridation *in situ* en fluorescence autorisent, depuis quelques années, l'utilisation de sondes moléculaires spécifiques de tout ou partie de chromosome. Pour autant, une telle approche nécessite au préalable de faire un choix dans la batterie de sondes mise à disposition pour espérer décrypter au mieux l'anomalie chromosomique. Ce choix est basé sur des données cliniques, des données

cytogénétiques. N'est-il pas "édifiant" -si l'on tient compte du rendement technique et des conséquences sur le conseil génétique - de caractériser, en une ou deux hybridations, une anomalie chromosomique complexe ? Ce n'est cependant pas toujours la règle et *in fine* le choix dépend souvent des possibilités financières du laboratoire de génétique.

Depuis peu, une nouvelle technique de cytogénétique moléculaire est venue enrichir l'arsenal du cytogénéticien : la microdissection chromosomique. Cette approche s'est révélée très performante dans l'analyse des aberrations chromosomiques complexes associées aux malformations congénitales, aux affections accompagnées d'un retard mental ou observées au cours des cancers. Elle occupe, en outre, une place à part entière dans le domaine de la recherche en génétique chromosomique et tout particulièrement dans la cartographie physique du génome et l'isolement de nouveaux gènes. La microdissection a pour objectif d'isoler toute partie de chromosome, normale ou anormale, et d'obtenir une banque d'ADN spécifique des fragments disséqués.

Au plan technique, la microdissection est réalisée à l'aide d'un microscope inversé, d'un micromanipulateur et de fines aiguilles siliconées. L'extrémité de l'aiguille est amenée perpendiculairement à l'axe du chromosome et la dissection est obtenue en poussant délicatement l'aiguille au travers de la bande ou du chromosome cible. L'ADN chromosomique adhère à l'extrémité de l'aiguille, puis est déposé dans une solution de collection. Cette opération est répétée précisément sur 4 à 5 chromosomes cibles. Le tampon de collection contient des amorces oligonucléotidiques dont la séquence est partiellement dégénérée. L'ADN chromosomique est d'emblée amplifié selon la technique maintenant bien connue de DOP-PCR (*Degenerated Oligonucleotide Primed-PCR*). En outre, la présence de sites de restriction dans l'amorce permet la construction de microbanque d'ADN chromosomique. Il est nécessaire de vérifier que le matériel amplifié est bien d'origine humaine et qu'il provient bien de la région microdisséquée. Pour cela, une partie du produit PCR est soumise à une deuxième amplification de 15 cycles en présence de dUTP biotinylé assurant un marquage de la sonde de microdissection. La sonde est ensuite hybridée sur des chromosomes métaphasiques normaux. Le signal d'hybridation est amplifié et révélé selon la technique classique d'hybridation *in situ* en fluorescence.

APPLICATIONS ET PERSPECTIVES

La microdissection et le diagnostic chromosomique

La microdissection chromosomique est applicable à tous les domaines de la cytogénétique constitutionnelle (prénatale et postnatale) et oncologique. Tout particulièrement, elle apporte au cytogénéticien une meilleure définition de certaines anomalies chromosomiques. L'origine des marqueurs chromosomiques surnuméraires et de certains chromosomes impliqués dans des remaniements complexes (non identifiables à l'aide des techniques de marquage en bande) peut être largement facilitée par cet abord. Ainsi, la microdissection de ces marqueurs suivie de l'amplification PCR du matériel chromosomique et de l'hybridation *in situ* de ce produit sur des métaphases normales ont permis de dévoiler leur constitution chromosomique et de mieux comprendre les

mécanismes à l'origine de leur formation. Une telle information a un impact considérable dans la prise en charge du diagnostic prénatal chromosomique. En outre, l'identification précise du matériel chromosomique participera de ce fait à une meilleure définition chromosomique de certains tableaux cliniques enrichissant la compréhension de la pathologie malformative et du retard mental. Dans la même optique, la microdissection peut produire à volonté tous types de sondes spécifiques d'un chromosome entier, d'un bras, voire d'une bande donnée. Ces sondes peuvent être utilisées pour colorier tout ou partie de chromosome, aidant là encore à la caractérisation d'anomalies chromosomiques.

La microdissection, outil de recherche en génétique chromosomique

A côté de l'abord diagnostique, la microdissection a déjà fait ses preuves dans le domaine de la cartographie physique du génome et dans l'isolement et la caractérisation de nouveaux gènes impliqués dans les maladies génétiques constitutionnelles et les cancers.

Certaines régions chromosomiques ont bénéficié d'une microdissection aboutissant à la construction de microbanques d'ADN spécifiques d'une bande chromosomique ciblée en fonction de certaines affections génétiques (2p23, 2q35, 3p14, 6q21, 10q11, 11q23, 15q11-12, 21q...). Chaque clone reconnaissant une séquence unique et spécifique dans le génome est utilisé comme marqueur dans l'étude de certaines maladies (marqueurs polymorphes utiles dans les études de liaison génétique ou dans la définition de certaines pertes d'hétérozygotie). Secondairement, ces clones peuvent servir à cribler d'autres banques d'ADN génomique : l'isolement de cosmides, de YACs contribuent à la construction de cartes physiques des régions microdisséquées. La mise en évidence d'un transcrit sur Northern blot autorise le criblage d'une banque d'ADNc spécifique d'un tissu à l'aide une telle microsonde.

Toujours plus loin dans la recherche en génétique chromosomique, la microdissection a été couplée à la technique de sélection d'ADNc. En effet, il est possible d'hybrider une banque d'ADNc (banque obtenue après ligation d'un duplex d'oligonucléotides sur des molécules ADNc issue d'ARNm d'une lignée dans laquelle une HSR a été mise en évidence) sur les propres chromosomes métaphasiques de lignée. Puis l'HSR au niveau de laquelle sont venus s'hybrider spécifiquement les ADNc, est microdisséquée. Ce n'est plus l'ADN matrice qui sera la cible de la PCR, mais cette fois les molécules d'ADNc, donc des gènes potentiellement inclus dans les amplicons, qui seront secondairement clonées. Cette approche a conduit à la découverte de plusieurs ADNc spécifiques des régions 12q13-21, fréquemment amplifiées dans les sarcomes et les tumeurs cérébrales. Depuis peu, il est possible d'isoler par cette technique des ADNc à partir de régions chromosomiques représentées en simple copie.

Sans aucun doute, les performances et les nouvelles applications de la FISH ont fait entrer les cytogénéticiens dans leur "siècle des lumières".

*** Laboratoire de Génétique Médicale, CHU Nancy**

E-mail : p.jonveaux@chu-nancy.fr

INTERNET DANS LA PRATIQUE QUOTIDIENNE DU CYTOGENETICIEN :

de la consultation de données à la transmission
d'images à distance

par Philippe LOCHU*

Le diagnostic chromosomique étant un travail d'observation, le doute conduit parfois à solliciter l'avis d'un deuxième œil. Les laboratoires disposant d'au moins deux cytogénéticiens ne sont à priori pas confrontés aux problèmes d'interprétation.

En revanche, la pratique de la cytogénétique en solo conduit, en cas de nécessité d'un deuxième avis, à s'adresser à un collègue, voire à un référent, parfois distant de plusieurs kilomètres.

Cette demande d'avis peut bien évidemment se faire par envoi postal de lames, de dossiers iconographiques, de disquettes ou disques optiques pour les laboratoires informatisés. Mais ces envois, outre le temps passé, font courir le risque de perte ou de détérioration des documents originaux.

C'est pourquoi, dès la création de notre laboratoire fin 1996, nous avons réfléchi au développement d'une ouverture sur l'extérieur par télétransmission.

Ce concept n'est évidemment pas nouveau, il est mis en pratique depuis plusieurs années par les anatomocytopathologistes et les hématologistes qui utilisent le réseau Numéris avec des systèmes type Transpath® (Leica) qui ont fait toutes leurs preuves. La ligne Numéris a l'inconvénient d'être coûteuse. Mais ces systèmes ont l'avantage d'être très rapides et complètement inter-communicants.

L'explosion d'Internet, son faible coût, sa facilité d'emploi nous ont conduits à demander aux fournisseurs d'analyseurs d'images dédiés à la cytogénétique de nous proposer une connexion inter-laboratoires via Internet. Notre choix s'est porté sur le logiciel Cytonet® (Applied Imaging) qui a été testé et mis en service aux USA. Ce logiciel est agréé par la FDA pour sa sécurité (les fichiers transmis sont cryptés).

A partir d'une ligne téléphonique (réseau commuté RTC) et à l'aide d'un modem, nous pouvons envoyer des dossiers iconographiques complets avec des données au format texte dans une boîte aux lettres (BAL) située sur le serveur d'Applied Imaging aux USA. Cet envoi se fait bien sûr via notre serveur local Internet (Net Auvergne Transwold) auquel nous sommes abonnés (30 F/mois). Le coût d'un envoi est donc celui d'un appel téléphonique local.

Les droits d'entrée des BAL sont définis et sont accessibles avec des mots de passe. Chaque utilisateur a une BAL personnelle.

Pour échanger des dossiers avec un autre laboratoire, pour un deuxième avis ou pour constituer une banque d'images etc..., il suffit de les faire parvenir dans la BAL du laboratoire choisi, qui pourra les consulter à partir de n'importe quel poste Internet après récupération.

Mieux encore, le laboratoire destinataire peut transférer les dossiers sur son propre analyseur d'images. Ils pourront être retraités (modification de classement du caryotype, montages de composition, ajout de commentaires ...) et être imprimés. Le dossier pourra ensuite être renvoyé dans la BAL de l'expéditeur avec les commentaires, le tout en quelques minutes. L'expéditeur n'aura plus qu'à récupérer les corrections ou commentaires sur sa BAL.

Il est également possible de consulter ses propres dossiers de n'importe où dans le monde en quelques minutes. Il suffit pour cela de se connecter, à partir de n'importe quel poste Internet, à sa propre BAL dans laquelle les techniciens auront préalablement envoyé les dossiers concernés. Les images sont alors consultables sans possibilité de correction, mais un commentaire écrit peut être ajouté et le dossier réexpédié. On peut aussi utiliser le courrier électronique pour envoyer des commentaires aux techniciens du laboratoire. La BAL n'est pas limitée en place, on peut y mettre autant de dossiers ou d'images que l'on veut.

Que les images soient restituées sur un poste Internet classique ou sur un analyseur d'images, elles ont une excellente définition (aussi bien en cytogénétique morphologique qu'en FISH).

Les laboratoires non équipés du logiciel Cytonet® peuvent, à partir de n'importe quel micro-ordinateur connecté au Web et équipé de Powerpoint® (Microsoft®), envoyer leurs images à un autre cytogénéticien internaute. Il suffit de copier les fichiers de l'analyseur d'images sur une disquette, de les intégrer dans une diapositive sur Powerpoint® puis de les expédier en document joint par courrier électronique. Votre interlocuteur devra être équipé de la même version de Powerpoint® ou d'un logiciel compatible pour les visualiser.

Les laboratoires n'effectuant pas d'analyse informatisée du caryotype peuvent numériser à l'aide d'un scanner des photographies classiques puis les envoyer par courrier électronique. Nous avons aussi testé cette procédure, qui restitue également une très bonne qualité d'image.

Le réseau Internet est un outil formidable qui deviendra à moyen terme indispensable dans la pratique quotidienne de la cytogénétique. S'il se crée un grand réseau entre laboratoires de cytogénétique, on peut imaginer qu'il devienne un outil du contrôle de qualité, ou de l'enseignement post-universitaire, et qu'il rendra la pratique de notre discipline plus interactive.

Outre la communication inter-laboratoires, ce réseau permet d'accéder à bon nombre de serveurs qui représentent une source inépuisable d'informations pour les médecins et scientifiques : consultation de bases de données, revues bibliographiques, aide au conseil génétique, inscriptions aux congrès, consultation de serveurs de fournisseurs de réactifs...

Alors, si vous n'êtes pas encore abonnés au Net, dépêchez-vous. Futurs internautes, à vos écrans et bienvenue au club des " cyber-généticiens "

* **Laboratoire de Cytogénétique**
62, rue Bonnabaud BP 312
63009 Clermont-Ferrand Cedex
E-mail : phlochu@nat.fr

LA FISH

SES INDICATIONS, LES LIMITES DES SEUILS DE DETECTION ET LES PERSPECTIVES D'AMELIORATION POUR LE DIAGNOSTIC ET LE SUIVI DE LA MALADIE RESIDUELLE DES HEMOPATHIES

Docteur Nicole DASTUGUE*

(Seules les techniques utilisables en routine et quelques exemples de pathologie sont abordés).

FISH : outil de diagnostic dans les leucémies à gène hybride

L'identification du gène hybride BCR-ABL permet le diagnostic de **leucémie myéloïde chronique** notamment dans les LMC Ph négatif et dans les cas dont les points de cassure des gènes BCR ou ABL sont inhabituels. De plus, la FISH permet la localisation du gène hybride. Compte tenu de l'importance pronostique du Ph dans les LAL, l'utilisation de la FISH pour faire le diagnostic de LAL Ph-positif est indispensable devant tout caryotype normal et tout échec des techniques cytogénétiques conventionnelles. L'interprétation des résultats doit être rigoureuse car elle détermine les choix thérapeutiques. La présence d'une seule métaphase avec gène hybride permet un diagnostic de certitude alors qu'un résultat basé sur la seule analyse de cellules interphasiques doit être donné en fonction d'une série témoin réalisée pour chaque couple de sonde BCR et ABL utilisé. Les séries témoins ont pour but de déterminer les seuils de positivité (donc les taux de faux-positifs : colocalisations dues au hasard donnant des images de fusion). Ces seuils sont établis en déterminant le nombre de faux-positifs sur plusieurs témoins normaux, sur 500 noyaux pour chaque témoin normal et en respectant des critères de lecture stricts (gène hybride si signaux superposés ou jointifs). Aucune règle n'est à ce jour standardisée mais il paraît raisonnable de localiser le seuil de positivité à la moyenne + 3 écart-types. Les résultats varient aussi en fonction de la taille des sondes (YAC ou cosmide). Une alternative intéressante pour abaisser les seuils de positivité et améliorer la sensibilité est l'utilisation simultanée d'un YAC couvrant un point de cassure et d'un cosmide télomérique au deuxième. Une cellule positive sera caractérisée par 5 signaux et une image de fusion de deux d'entre eux. Outre les faux-positifs, les facteurs influençant les taux de faux-négatifs doivent être connus : hybridation incomplète, état de la structure chromatinienne, superposition de chromosomes homologues, position du point de cassure ABL.

Leucémie aiguë promyélocytaire (LAM3) : comme dans les LMC, les t(15;17) variantes (simples, complexes ou cryptiques) représentent 5 à 10% des cas. La FISH a montré que le réarrangement PML-RARA peut être généré par insertion de RARA dans PML sur un chromosome 15 dans des LAM3 à caryotype normal.

Leucémie aiguë myélo-monocytaire (LAM4) variante éosinophile : le painting du bras court du chromosome 16 permet d'identifier l'inversion du chromosome 16. La FISH est utile surtout quand l'interprétation de la cytogénétique conventionnelle est difficile. Une perspective intéressante pourrait être l'utilisation simultanée d'un contig de cosmides dont les parties centromériques et télomériques au gène MYH11 sont marqués par des fluorochromes différents. L'image de fusion des fluorochromes

correspond dans ce cas aux chromosomes 16 normaux. Cette technique a en outre l'avantage d'identifier les délétions de la région centromérique à MYH11, associée à 20% des inv(16).

Leucémie aiguë lymphoblastique à t(12 ;21) : cette translocation indétectable en cytogénétique conventionnelle et qui représente un nouveau facteur de bon pronostic dans les LAL de l'enfant, doit être recherchée par FISH, ou par RT-PCR (réarrangement ETV6-AML1). Un painting du 21 associé à une sonde centromérique du 12 identifie la translocation. L'utilisation d'un YAC couvrant ETV6 donne trois signaux mais le plus souvent deux, car une microdélétion de allèle ETV6 non transloqué est rapportée dans 95% des cas.

FISH : outil de diagnostic des anomalies de nombre

Trisomies : l'identification d'un clone trisomique doit tenir compte du seuil de positivité déterminé pour chaque sonde utilisée. Les faux-positifs, dus à des signaux dédoublés, peuvent être générés par des chromatines décompactées, certaines cellules en phase S et G2, la réplication d'un homologue avant l'autre, la superposition de deux signaux d'une cellule tétraploïde et les artefacts. Comme pour les gènes hybrides, il est recommandé d'établir le seuil de positivité de la technique sur une série témoin. Le seuil généralement admis est $> +3\%$. La sensibilité pourrait être améliorée en augmentant le nombre de cellules analysées, notamment en automatisant la lecture, et par l'hybridation simultanée de plusieurs sondes. Parmi les pathologies qui bénéficient de la FISH, citons la recherche de la trisomie 12 dans les LLC, difficile à mettre en évidence par cytogénétique conventionnelle et les hyperdiploïdies > 50 chromosomes dans les LAL de l'enfant. Pour ce dernier diagnostic, la FISH doit être envisagée en 3^e intention car l'index d'ADN déterminé par CMF est le critère utilisé (à défaut du caryotype) pour classer les patients dans les groupes à risque.

Monosomies : les seuils de positivité (moyenne + 3 écart-types) sont plus élevés que dans les trisomies : 7 à 10% de fausses monosomies. Ce taux est dans les hémopathies très dépendant de l'état de la structure chromatiniennne. Pour tout résultat difficile à interpréter car proche de 10%, il est prudent de tester la qualité de l'ADN cible avec une sonde d'un chromosome supposé non atteint.

Surveillance de greffe : le décompte des cellules XX et XY facilite grandement le suivi de la reconstitution hématologique.

FISH : outil de surveillance de la maladie résiduelle ?

Dans la LMC : Compte tenu de la sensibilité des techniques FISH (aux environ de 10-3) et de celle de la RT-PCR (10-4-10-6), ces deux techniques seront informatives à des périodes différentes de la maladie. Actuellement, les protocoles thérapeutiques s'appuient uniquement sur les résultats du caryotype et de la RT-PCR (qualitative et quantitative). Seuls des protocoles prospectifs étudiant les trois techniques (caryotype, FISH, RT-PCR) permettront d'évaluer l'utilité clinique des techniques FISH. Parmi celles-ci, la technique des " hypermétaphases ", qui permet d'analyser de 500 à 1000 métaphases par lame permet d'améliorer la sensibilité et les intervalles de confiance.

Dans les leucémies aiguës : Les techniques FISH sont informatives à deux périodes de l'évolution : à la fin du traitement d'induction car la FISH permet de contrôler la qualité de la rémission complète, et au delà de 3 mois, pour la recherche de cellules résiduelles. Les pathologies de bon pronostic doivent être explorées en priorité car il est important de tout mettre en œuvre pour

détecter les patients à risque de rechute anormalement élevée. Pour les LAM : inv(16), t(8 ;21) et t(15 ;17). Pour les LAL, t(12 ;21), hyper > 50. Les techniques à utiliser restent à définir. Les meilleures seront celles qui permettent la sensibilité la plus élevée et les taux de faux-positifs les plus faibles. La valeur prédictive sur le devenir de la leucémie paraît être différent selon la pathologie.

Conclusion : la FISH est un outil complémentaire du caryotype et des techniques de biologie moléculaire, qui est le plus souvent utilisée en deuxième intention. L'interprétation des résultats, notamment sur cellules interphasiques, doit être basée sur les résultats de séries témoins déterminés pour chaque sonde utilisée. Ces précautions d'utilisation de la FISH sont justifiées par l'importance croissante accordée par les cliniciens à la cytogénétique, y compris la cytogénétique moléculaire, pour prendre des décisions thérapeutiques.

*** Laboratoire d'hématologie, CHU, TOULOUSE**

NOUVELLES

Législation :

L'arrêté sur le consentement écrit pour la réalisation des marqueurs sériques est paru dans le JO du 30 Octobre.

De plus, un **consentement écrit** concernant toutes les analyses : cytogénétique, génétique moléculaire, biologie foetale, hématologie, maladies infectieuses, portant sur le foetus est désormais nécessaire. Un modèle est proposé auquel il est loisible d'ajouter éventuellement des éléments complémentaires (il n'est bien sûr pas possible d'en retrancher).

Les **centres pluridisciplinaires** (décret n° 97-578 du 28 Mai 97) doivent faire l'objet d'une demande dont le modèle vient d'être publié et peut être demandé dans les DASS et les CHU. Ces centres comportent nécessairement des praticiens responsables des analyses cytogénétiques, mais dont le lieu d'activité ne se situe pas obligatoirement dans les locaux du centre pluridisciplinaire.

Enseignement

Le C2 de Cytogénétique est reconduit.

Un collège des Enseignants en Génétique est en voie de constitution. Il a pour but d'être en relation avec le Ministère de l'Education Nationale pour tous les enseignements concernant la Génétique.

Une Association des Internes en Génétique est constituée

Le guide des bonnes pratiques

Il est en cours d'élaboration, avec la participation de tous. Les responsables sont les suivants :

- M. Prieur pour la cytogénétique constitutionnelle,
- R. Saurat pour la cytogénétique prénatale
- N. Dastugue pour la cytogénétique hématologique.

N'hésitez pas à entrer en relation avec eux pour toutes les suggestions qui vous semblent importantes.

Hybridation in situ sur frottis jugal. (diagnostic d'anomalies du nombre des gonosomes)

Prélèvement

Les cellules sont prélevées par grattage de la face interne de la joue après rinçage de la bouche avec de l'eau ou du serum physiologique. Le prélèvement est alors étalé sur lame et séché rapidement. L'étalement doit être riche.

Fixation

Les cellules sont fixées pendant une heure dans un bain d'acétone glacial, conservé à -80°C, suivi d'un bain d'alcool absolu glacial. Les lames peuvent être conservées jusqu'à hybridation dans un bain d'alcool 70% .

Hybridation

L'hybridation est effectuée selon les techniques classiques :

- Séchage des lames à l'air,
- Dénaturation dans un bain de formamide 70%, 2 SSC (3 à 5 mn à 70°C),
- Passage dans trois bains d'alcool à 4°C (70%, 85% et 100% pendant 2 mn),
- Dénaturation des sondes (sondes alpha satellite du chromosome X et Y marquées par la biotine et par la digoxigénine) diluées dans le tampon d'hybridation (70°C, 3 mn),
- Hybridation entre lame et lamelle scellées au rubber cement (1 nuit à 37°C en chambre humide),
- Lavages posthybridation dans une solution de 0,4 SSC (72°C, 2 mn), puis 0,2 SSC, 0,05% Tween 20 (30 s, température ambiante),
- Rinçage des lames dans le PBS,
- Révélation de l'hybridation par incubation avec des anticorps anti-biotine FITC et anti-digoxigénine Rhodamine,
- Rinçage dans du PBS,
- Montage des lames en PPD pH11,
- Observation.

Solution d'hybridation :

Formamide : 50 ml
 20 SSC : 10 ml
 Denharts 100X : 1 ml
 NaH₂PO₄ 1M, Na₂HPO₄ 1M, pH 6,8 : 4 ml
 filtrer
 Dextran 50% : 20 ml
 H₂O : 14 ml

Ajuster à pH 7, conserver en aliquots à -20°C.

Solution de PPD (p-Phenylenediamine) :

PPD : 0,05 g
 PBS : 5 ml
 ajuster à pH 11
 Glycérol : 45 ml

Conserver dans l'obscurité à - 20°C

EUROPEAN CYTOGENETICISTS ASSOCIATION

**E.C.A.
APPLICATION FOR MEMBERSHIP**

NAME:		
ACADEMIC TITLE: (in abbreviation, eg, M.D., D.Sc., Ph.D., etc)		
MAIN WORK TOPIC(S): (i.e. Prenatal Cytogenetics, Cancer Cytogenetics)		
INSTITUTION:		
POSITION HELD:		
Street / PO Box:		
CITY:	ZIP CODE:	
COUNTRY:		
TELEPHONE:	FAX:	E-MAIL:
PERSONAL ADDRESS:		
TELEPHONE:	FAX:	E-MAIL:

MEMBERSHIP FEE: U\$ 90 for 3 years

(Reduced fee for students and members from Eastern countries U\$ 30 for 3 years)

REGULAR MEMBER ()

HONORARY MEMBER ()

Method of payment:

() Cheque enclosed

() Please charge to my credit card

() Master Card () Visa

Card N°:

Exp. date:

I herewith state that I support the scientific and clinical goals of the E.C.A.

Date:

Signature

Please Return This Application to **EUROPEAN CYTOGENETICISTS ASSOCIATION**,
Laboratoire d'Histologie-Embryologie-Cytogénétique, Faculté de Médecine, Place
Henri-Dunant, B.P. 38, 63001 CLERMONT-FERRAND CEDEX FRANCE

Fax: 33 4 73 26 91 82

E-MAIL: Paul.Malet@u-clermont1.fr