

Analyse Chromosomique sur Puce à ADN (ACPA) :

GUIDE DES BONNES PRATIQUES pour l'activité postnatale

*Version 1.0 Novembre 2010
corrigée Version 2.0 juin 2015
corrigée Version 2.1 avril 2016
Version 3.0 janvier 2018
Version 3.1 décembre 2018*

Version rédigée par le groupe ACPA et le groupe qualité du réseau Achropuce

Date de rédaction : 12 décembre 2018	Date de révision : N/A	Version 3.1
Rédigée par : Patrick Callier, Martine Doco Jean Michel Dupont, Delphine Fauvert, Boris Keren, Audrey Labalme, Emilie Landais, Geneviève Lefort, Olivier Pichon, Sylvia Redon, Damien Sanlaville, Caroline Scluth-Bolard Caroline Thambo, Magali Tournaire,	Relecture Nicolas <u>Chatron</u> Charles Coutton Cédric Lecaignek Nathalie Lemeur Jonathan Levy Anne Claude Tabet Approuvé par : Martine Doco Jean Michel Dupont, Chantal Missirian Valérie Malan Damien Sanlaville,	

Table des matières

GUIDE DES BONNES PRATIQUES pour l'activité postnatale	0
INTRODUCTION	2
Définition	2
1. DOCUMENTATION	3
2. LOIS ET DECRETS DE REFERENCE	5
2.1. Textes "généraux"	5
2.2. Agréments et autorisations	5
2.2.1 Cytogénétique constitutionnelle	5
2.2.2 Génétique moléculaire	6
2.3. Dispositif sur les « caractéristiques génétiques » de la personne	6
3. HABILITATION DES BIOLOGISTES	6
4. ECHANTILLONS BIOLOGIQUES pour l'ACPA	7
4.1 Pré-requis	7
4.2 Indication	7
4.3 Identification des prélèvements	7

4.4 Type de prélèvements	8
4.3. Transport	8
4.4. Réception des prélèvements.....	8
5. REALISATION DE L'EXAMEN de l'ACPA	9
Pré-analytique	9
Analytique	9
Post-analytique.....	9
5.1. L'ACPA	9
5.1.1. Spécifications tissulaires.....	9
5.1.2. Extraction de l'ADN	10
5.1.3. Choix de l'ADN de référence (puces SNP non concernées).....	10
5.1.4. Choix du modèle expérimental (puces SNP non concernées).....	11
5.1.5. Etapes techniques proprement dites (puces SNP non concernées)	11
5.1.6. Analyse des données	12
5.2. Validations.....	15
5.2.1. Conditions d'application.....	15
5.2.2. Types de Puces	16
5.2.3. Validation technique des Puces à ADN	16
5.2.4. Validation bio-informatique	16
5.3. Documentation (Dossiers).....	16
5.3.1 Images ou tableaux représentatifs des résultats obtenus	16
5.3.2 Contenu du dossier patient.....	16
5.3.3. Contenu du Compte rendu ou feuille de résultats.....	17
6. CONFIRMATION DES ANOMALIES	18
6.1 Techniques de confirmation.....	19
6.1.1 Confirmation d'un résultat anormal.....	19
6.1.2 Confirmation par FISH	19
6.1.3 Confirmation pour les Oligonucleotide array.....	19
6.1.4 Confirmation par ACPA.....	20
7. DELAI DE REPONSE ET ECHECS	20
8 STOCKAGE ET ARCHIVAGE	20
8.1 Lames.....	20
8.2 Documents	20
8.3 Fichiers informatiques.....	20
8.4 Ré-analyse	21
8.5 Transfert/Export.....	21
9 CONTROLE QUALITE INTERNE et EVALUATION EXTERNE de la QUALITE.....	21
9.1 Qualité intra laboratoire.....	21

9.2 EEQ	21
•Contrôle prospectif sur échantillons d'ADN.....	21
•Contrôle rétrospectif	22
ANNEXE 1.....	23
Exemple de compte rendu de Caryotype moléculaire ou ACPA	23
Résultat du caryotype Moléculaire	23

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 des 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, il englobe les techniques de CGH array et SNP array.

Il s'inscrit dans le cadre de la réglementation en vigueur

- 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).
- 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),
- Lois no 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique (NOR : ETSX1117652L) ;
- Loi 2013-442 du 30 Mai 2013 portant réforme de la Biologie Médicale (NOR : AFSX1242935L) ;
- 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 (NOR : AFSP1313547A) ;
- Décret 2015-1152 du 16 Septembre 2015 relatif aux conditions et modalités d'exercice des biologistes médicaux et portant création de la Commission nationale de biologie médicale (NOR : AFSH1510973D).

Il s'inscrit dans la démarche d'accréditation (Iso 15189) maintenant obligatoire pour la biologie médicale (« Loi sur la Biologie Médicale »).

Ce guide des bonnes pratiques en 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 évaluations externes de la qualité et les contrôles internes 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 homologies de séquences ADN, permettant l'identification d'un déséquilibre en perte ou gain de tout ou partie d'une ou plusieurs régions génomiques.

Ces techniques sont basées soit sur le principe de l'Hybridation Genomique Comparative 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 variant nucléotidiques (modification d'une ou plusieurs paires de base). 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 (isodisomie). 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 utilisée en première intention ou en complément des techniques de caryotype ou de FISH ciblée. Différents types de puces peuvent être utilisés, pan-génomiques, avec différents niveaux de résolution, ou ciblés sur une région génomique, etc.

La sensibilité du caryotype moléculaire dépend en partie du nombre, de la distribution, de la taille des clones/sondes ou oligonucléotides imprimés et des critères biostatistiques utilisés pour l'analyse des données.

1.DOCUMENTATION http://www.eacrf.org/docs/GBPcyto2001/GBPC_ACLF.html - ancre342486

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 et 2013.
- 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, p654-662
- Lee, C., Iafrate, A.J. and Brothman, A.R.: Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis constitutional disorders. Nat Genet, 2007, 39, 548-54.
- Kearney HM, et al. Genetics in Medicine 13, 676–679; 2011. American College of Medical Genetics recommendations for the design and performance expectations for clinical genomic copy number microarrays intended for use in the postnatal setting for detection of constitutional abnormalities
- Kearney HM, et al. Genetics in Medicine 13, 680–685; 2011_2. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants
- Kearney HM, et al. Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. Genet Med. 2011 Jul;13(7):680-5.
- Hanemaaijer NM, et al. Practical guidelines for interpreting copy number gains detected by high-resolution array in routine diagnostics. Eur J Hum Genet. 2012 Feb;20(2):161-5.
- Miller DT, et al. Oligonucleotide microarrays for clinical diagnosis of copy number variation and zygosity status. Curr Protoc Hum Genet. 2012 Jul; Chapter 8: Unit8.12.
- Vermeesch JR, et al. Genome-wide arrays: quality criteria and platforms to be used in routine diagnostics. Hum Mutat. 2012 Jun;33(6):906-15.
- Srebniak MI, Diderich KE, Govaerts LC, Joosten M, Riedijk S, Galjaard RJ, Van Opstal D. Types of array findings detectable in cytogenetic diagnosis: a proposal for a generic classification. Eur J Hum Genet 2014 Jul; 22(7): 856–858.
- Rehder CW, et al. American College of Medical Genetics and Genomics: standards and guidelines for documenting suspected consanguinity as an incidental finding of genomic testing. Genet Med. 2013 Feb;15(2):150-2.
- Sarah T. South, et al. Genetics in Medicine 15, 901–909;2013. **ACMG** Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision 2013
- Turbitt E, et al. Preferences for results from genomic microarrays: comparing parents and health care providers. Clin Genet. 2015 Jan; 87(1):21-9.

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.
- Décret de juin 2000 abrogé et remplacé par le décret N°2008-321 du 4 avril 2008.
- 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°0167 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 (loi « Ballereau »)
- La loi n°2004-800 du 6 août 2004 relative à la bioéthique, modifiée par la loi du 7 juillet 2011 donne compétence à l'Agence de la biomédecine pour délivrer les agréments des praticiens pour les activités de génétique.
- **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**

2.2. Agréments et autorisations

2.2.1 Cytogénétique constitutionnelle

Les laboratoires de cytogénétique pratiquant les caryotypes constitutionnels (post natal) sont soumis à autorisation des ARS 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, modifiée par la loi du 7 juillet 2011 donne compétence à l'Agence de la biomédecine pour délivrer les agréments des praticiens pour les activités 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)

Pour Consulter les critères d'agrément des praticiens pour exercer une ou plusieurs activités de génétique (délibération du conseil d'orientation n°2013-CO-45 du 21/11/2013) : <http://www.agence-biomedecine.fr/agrement-praticiens-genetique>

Les textes 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 hématologie-oncologie le décret du 22/12/06 précise que le statut du praticien peut-être une personnalité scientifique devant rendre les résultats avec une double signature.

Autorisation des structures pratiquant la cytogénétique constitutionnelle

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

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

L'autorisation sera délivrée par le directeur général de l'ARS de votre région après avis de la commission spécialisée de la conférence régionale de la santé et de l'autonomie compétente pour le secteur sanitaire et de l'Agence de la biomédecine.

Le dossier type de demande d'autorisation est défini par l'arrêté du 13 février 2009

2.2.2 Génétique moléculaire

Pour les généticiens moléculaires, cf recommandations de l'ANPGM

Le praticien responsable doit avoir reçu l'agrément de l'Agence de la Biomédecine.

Pour Consulter les critères d'agrément des praticiens pour exercer une ou plusieurs activités de génétique (délibération du conseil d'orientation n°2013-CO-45 du 21/11/2013) : <http://www.agence-biomedecine.fr/agrement-praticiens-genetique>

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. Décret de juin 2000 abrogé et remplacé par le décret N°2008-321 du 4 avril 2008

[Loi de bioéthique de 2011](#)

Autres dispositions

- 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. HABILITATION DES BIOLOGISTES

Le biologiste devra être agréé pour les analyses de cytogénétique y compris les analyses de cytogénétique moléculaire ou analyses de génétique moléculaire

Pour Consulter les critères d'agrément des praticiens pour exercer une ou plusieurs activités de génétique (délibération du conseil d'orientation n°2013-CO-45 du 21/11/2013) : <http://www.agence-biomedecine.fr/agrement-praticiens-genetique>

Par ailleurs, 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 ou toute formation en cytogénétique ou en génétique moléculaire équivalente

4. ECHANTILLONS BIOLOGIQUES pour l'ACPA

4.1 Pré-requis

Pour toute étude constitutionnelle, le consentement signé et l'attestation de consultation du prescripteur signée sont obligatoires (arrêté du 27 mai 2013).

Il faut 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.

4.2 Indication

L'ACPA est une technique de première intention pour les indications suivantes :

- Troubles du neuro-développement (déficience intellectuelle, trouble du spectre de l'autisme...)
- Les syndromes malformatifs

L'ACPA peut également être réalisée pour :

- Les troubles de la reproduction
- Les anomalies de la croissance
- Malformation isolée
- Contrôle de CNV détectée par une autre technique
- Caractériser un remaniement chromosomique identifié par un caryotype

Le niveau de résolution minimum recommandé est de 200 kb (ou 400kb) pour les CNVs pathogènes.

4.3 Identification des prélèvements

L'étiquetage des tubes et flacons contenant les échantillons doit être effectué selon les recommandations validées par le laboratoire pour l'identité du patient

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

- Le type de tissu prélevé
- Les indications cliniques de la demande et si un diagnostic est suspecté
- L'identification du médecin prescripteur

•Des renseignements cliniques spécifiques susceptibles de déterminer le choix des techniques à mettre en œuvre et de permettre une interprétation optimale. Si ceux-ci ne peuvent pas être pas obtenus, le compte rendu du résultat devra le mentionner.

4.4 Type de prélèvements

La technique d'ACPA peut être réalisée après l'extraction de l'ADN de chacun des échantillons contenant de l'ADN : sang (périphérique, du cordon), les « suspensions cellulaires » (liquide amniotique, salive, culot cellulaire fixé...), tissus frais ou congelés (fibroblastes cutanés, biopsies anatomo-pathologiques ou du trophoblaste...) ou tissus inclus en paraffine (cf tableau 1).

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 (**proposition des quantités minimales requises dans le tableau ci-dessous**)

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 réalisation de l'examen demandé.

Type de prélèvement	Sang EDTA ou hépariné	Tissus frais ou congelé	Tissus inclus en paraffine	Cellules jugales ou urothéliales
Quantité minimale recommandée	2mL	500mg	-1g (tissus frais)	2 écouvillons pour les frottis jugaux conservés dans 1 mL de sérum physiologique Urines à définir

Tableau 1 : Nature des échantillons

NB : Pour les puces à oligonucléotides, il est recommandé d'utiliser un ADN de référence extrait dans les mêmes conditions (type de prélèvement, technique d'extraction...) que l'ADN du patient testé afin de limiter les artefacts techniques.

4.3. Transport

Le transport doit répondre aux règles de bonnes pratiques. Les échantillons doivent être acheminés au laboratoire à température ambiante (sang, liquide amniotique, le plus rapidement possible). En cas d'expédition, le mode d'acheminement choisi doit idéalement permettre une réception par le laboratoire dans les 48 heures. Si ce délai n'est pas possible la qualité de la technique sera évaluée avant de rendre le résultat. Cette remarque ne concerne pas les tissus fixés.

4.4. Réception des prélèvements

Le cytogénéticien ou biologiste moléculaire est responsable des échantillons biologiques acceptés dans son laboratoire. Il utilise la technique la plus appropriée. 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 non conformité 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.

5. REALISATION DE L'EXAMEN de l'ACPA

Comme toute les analyses en biologie, l'ACPA comporte 3 phases :

Pré-analytique

- Gestion du prélèvement
- Connaissance ~~des signes cliniques~~ ou du phénotype du patient afin de permettre une interprétation médicale des résultats.

Analytique

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

Post-analytique

- Connaissance des bases de données de référence des CNVs
- 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 mise à jour chaque année. Les anciennes versions des procédures seront gardées 5 ans.

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, Nanodrop), 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. 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, villosités choriales fraîches digérées, tissus inclus en paraffine). Néanmoins le rapport signal sur bruit peut être différent pour chacun des types tissulaires.

Il peut exister des discordances entre le tissu frais et la culture cellulaire qui seront révélées par l'ACPA notamment dans le cas des mosaïques.

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.

Le laboratoire devra déterminer pour chaque type tissulaire ou cellulaire, les critères d'évaluation de la qualité minimale de l'expérience pour le rendu de résultat.

5.1.2. Extraction de l'ADN

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.

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, villosités chorales 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 (1µl) (type nanodrop, bioanalyseur, fluoromètre...). La qualité de cet ADN sera contrôlée suivant un protocole établi, avant toute hybridation.

Si l'échantillon est en quantité très faible ou 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.

Si l'échantillon ne répond pas aux critères de qualité, il est recommandé de ne pas réaliser l'analyse ACPA et de demander un nouveau prélèvement.

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.

5.1.3. Choix de 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 d'utiliser un ADN de référence de même qualité, si possible provenant d'un même tissu et d'un même type d'extraction.

Il est recommandé que le laboratoire établisse des échantillons contrôles masculins et féminins, et les règles de bon usage pour les utiliser. Ils seront utilisés en opposition de sexe ou non. Il est toutefois préférable de faire des hybridations en sex match (individus de même sexe). Le laboratoire doit préciser s'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.

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'analyse.

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.

5.1.4. Choix du modèle expérimental (puces SNP non concernées)

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, quatuor, 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 sur le compte-rendu.

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

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.

5.1.5. Etapes techniques proprement dites (puces SNP non concernées)

5.1.5.1. Marquage

Le laboratoire doit être capable de marquer et de purifier l'ADN suivant les recommandations du fournisseur du kit de marquage.

Si nécessaire, cette étape peut être précédée d'une digestion enzymatique des échantillons afin de faciliter le marquage.

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 un caisson à ozone ou techniquer dans une salle équipée d'un extracteur d'ozone (pièce « ozone-free »). Les fluorochromes Cy5 les plus récents sont plus résistants à l'ozone.

NB : Il faut rester vigilant à propos des signaux faibles qui peuvent révéler des délétions homozygotes.

5.1.5.2. Hybridation sur lame

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 selon les recommandations du fournisseur.

Le protocole d'hybridation est défini à la suite de la mise au point de la technique dans le laboratoire et/ou suivant les recommandations du fournisseur.

Si un four à hybridation est utilisé, celui-ci devra être calibré et vérifié selon les instructions du fournisseur.

5.1.5.3. Lavages post-hybridation

La procédure de lavage et de séchage est rédigée suivant les recommandations du fournisseur.

Les procédures de lavages spécifiques (présence excessive d'ozone, nouveau lavage en cas de bruit de fond ou de tache) doivent être également rédigées.

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 ou enceinte équipée d'un extracteur d'ozone.

5.1.5.4. Lecture et stockage des images

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 les étapes de lavage. Si cela n'est pas possible, les lames devront être conservées à l'abri de la lumière et de l'ozone.

Scanner : La résolution du scanner doit être compatible avec le format de puce utilisé. Le scanner doit être régulièrement contrôlé selon les recommandations du fournisseur.

Pour certaines lames il est nécessaire de scanner la lame vierge avant hybridation.

Les images sont stockées sur un ordinateur dédié (ou lecteur réseau) dont la capacité de stockage est compatible avec cette technique.

5.1.6. Analyse des données

5.1.6.1. Analyse primaire des données

Les données sont analysées par un logiciel dédié qui permet d'extraire des intensités 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 des intensités de fluorescence normalisées entre le test et la référence 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 de l'analyse (Par exemple : intensité globale, rapport signal/bruit, déviation standard des log ratio...). Ces critères seront définis par chaque laboratoire en fonction de la plate-forme utilisée.

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.

Dans le cas des puces SNP, en plus des ratios, des données de génotype sont également extraits par le logiciel dédié.

5.1.6.2. Interprétation et identification de la pathogénicité

L'interprétation des résultats de l'ACPA comporte donc deux étapes, une étape d'identification des régions en nombre de copie différent de 2 (exception des chromosomes X et Y) puis une étape d'interprétation de la pathogénicité potentielle de ces régions.

- Identification des CNV

Le laboratoire doit déterminer les seuils normaux et anormaux de \log_2 ratio pour retenir une perte, un gain, une amplification, ainsi que le nombre de sondes déviantes contiguës permettant de retenir un CNV.

- Evaluation de la pathogénicité du/des CNV(s) identifié(s)

Le laboratoire doit définir les critères retenus pour évaluer la pathogénicité des CNV identifiés, par exemple la présence ou l'absence de gènes dans la région, les descriptions antérieures dans le laboratoire, les bases de données internationales (DGV, DECIPHER, ClinGen...) ou la littérature scientifique ou via des genomes browsers (UCSC, Ensembl...).

5.1.6.3. Identification des CNVs

Les données brutes issues du scanner sont analysées par un logiciel dédié qui permet de mettre en évidence les CNVs. Ces fichiers d'interprétation (fichiers txt par exemple) seront conservés comme toute information génétique.

Le laboratoire définira les critères de l'analyse pour la détection des CNVs aussi bien en perte qu'en gain : algorithme utilisé, nombre de sondes déviantes contiguës ou taille minimale des déséquilibres génomiques, seuil choisi de détection, p-value (SNP array),...

Il est recommandé de connaître les variations de nombre de copies identifiées par le fournisseur de la puce comme des CNVs bénins (polymorphisme introduit une notion de fréquence) (si disponible) et également les CNVs de l'ADN témoin (si utilisé).

5.1.6.4. Classification des CNVs

Les praticiens doivent avoir connaissance des classifications des CNVs de bénin à pathogène et devront classer les CNVs observés. Ils devront ensuite établir une interprétation globale pour le patient idéalement en concertation avec le clinicien qui l'a adressé.

Par souci d'homogénéisation avec la classification des variants ponctuels, les CNV seront classés :

5 : Pathogène

4 : Probablement pathogène

3 : VOUS / VSI

2 : Probablement bénin

1 : Bénin/polymorphique

Pour les CNVs de susceptibilité aux désordres neuropsychiatriques et de prédisposition cf fin du chapitre

Aide à la classification des CNVs :

Caractéristiques de la région	Exemples	Interprétation
Remaniement répertorié dans les bases de données de variations polymorphiques chez des sujets contrôles au moins 3 fois	Délétion des gènes de récepteurs défensine en 8p23.1	Bénin
Remaniement hétérozygote d'un gène de maladie autosomique récessive		Benin sauf si phénotype concordant avec la pathologie récessive Dans ce cas, classer VOUS et discuter avec le clinicien de l'opportunité de rechercher une altération du second allèle.
Remaniement considéré comme facteur de susceptibilité à effet faible	Délétion 15q11	A discuter au regard de la

	Région BP1-BP2	clinique et de la bibliographie
<p>Remaniement répertorié dans les bases de données de variants polymorphes moins de trois fois</p> <p>Remaniement touchant une région intergénique non impliquée dans la régulation de l'expression d'un gène</p> <p>Intron d'un gène non impliqué en pathologie humaine</p> <p>Remaniement touchant des gènes mal connus</p> <p>Remaniement concernant un ou plusieurs gènes pour lesquels il existe des arguments en faveur d'un rôle dans la pathologie (modèle animal, profil d'expression...) mais sans altération du(des) gène(s) rapporté(s) chez des patients dans la bibliographie</p>		VOUS
Intron ou région proche d'un gène impliqué dans la pathologie		VOUS ou pathogène si arguments suffisants (phénotype clinique très évocateur, possibilité d'essais fonctionnels par exemple)
Remaniement pour lequel il existe des arguments bibliographiques forts pour évoquer une pathogénicité (Très grande taille, gène de déficience intellectuelle, syndrome microdélétionnel ou microduplicationnel connu....)	Délétion 1p36 Délétion au locus PW/AS Délétion 9q34	Pathogène
Remaniement connu pour donner un syndrome à expressivité variable	Duplication 22q11.2 Délétion 1q21.1 Délétion 16p11.2	Pathogène si clinique compatible

Tableau 2 : Aide à la classification des CNVs.

Si un CNV est répertorié sur au moins 100 % de sa taille comme polymorphique, il peut être lui-même considéré comme bénin sauf si dans la région non chevauchante il existe un gène OMIM morbide en rapport avec le phénotype du patient. Il est important d'avoir à l'esprit que certaines anomalies pathogènes peuvent survenir dans des régions connues comme polymorphes, 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.

Si les parents ne sont pas disponibles, soit le CNV est associé à un syndrome récurrent (DECIPHER, OMIM, Pubmed) et il pourra être conclu comme pathogène, soit il ne l'est pas et le compte rendu ne pourra clairement conclure à la pathogénicité de ce CNV qui sera identifié comme variant de signification inconnue (=VOUS). Néanmoins des informations complémentaires pourront émerger dans la littérature ultérieurement, et le biologiste pourra être amené à réinterpréter ce variant à la demande du clinicien et de l'évolution clinique.

Certain CNVs peuvent s'exprimer sur un mode dominant, ils se caractérisent par une pénétrance ou une expressivité variable. Si le CNV est hérité, l'interprétation doit tenir compte du phénotype du parent transmetteur. Tout CNV hérité n'est pas bénin, il est parfois nécessaire de poursuivre l'enquête familiale pour identifier la ségrégation d'un CNV. Une délétion héritée d'un parent sain peut révéler une pathologie récessive.

De plus les pertes ou gains de ces CNVs peuvent se traduire par des pathologies en lien avec les TAD (topologically associated domains).

Pour que cette classification soit fonctionnelle et utilisable par tous et dans toutes les circonstances, il faut séparer la classification d'un CNV de l'interprétation médicale du rôle de ce CNV chez un patient donné. Ainsi un CNV classé en VOUS dans un contexte clinique donnée pourra être classé en pathogène dans un autre contexte clinique. Le critère majeur reste les éléments cliniques et la corrélation génotype /phénotype.

Cas particulier des régions d'homozygotie : dans le cas des puces SNP, des données de génotype sont également obtenues en plus données de CNV. Ces génotypes permettent de détecter des régions d'homozygotie (ROH pour region of homozygosity). Ces ROH peuvent orienter vers une isodisomie uniparentale (iUPD) lorsqu'elles ne sont retrouvées que sur un seul chromosome chez un patient. Les praticiens doivent interpréter ces suspicions d'iUPD en fonction du chromosome concerné, soumis ou non à l'empreinte parentale et de la pathologie du patient. Les ROH peuvent aussi être un marqueur de consanguinité, dans ce cas elles peuvent être retrouvées n'importe où sur le génome. L'interprétation de ces ROH doit s'effectuer dans le cadre d'une discussion clinico biologique pour orienter le conseil génétique vers une pathologie autosomique récessive ou pour aider à l'identification de gènes récessifs susceptibles d'être ensuite testés par des méthodes ciblées.

Pour ce qui concerne les CNV de susceptibilité aux désordres neuropsychiatriques et de prédisposition, un groupe de travail spécifique mis en route en 2019 du sein de réseau AChroPuce . Les conclusions seront ajoutées au guide des bonnes pratiques.

5.2. Validations

5.2.1. Conditions d'application

cf indication (chapitre 4.2)

5.2.2. Types de Puces

Les puces utilisées sont en majorité des puces de type oligonucléotides (CGH-array ou SNP-array). La résolution ou l'enrichissement en sondes de certaines régions du génome 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 à ADN

La validation technique des puces pourra s'inspirer des recommandations du groupe de travail accréditation du réseau AChroPuce.

5.2.4. Validation bio-informatique

Le laboratoire doit maîtriser le logiciel d'analyse des données primaires et les logiciels d'aide à l'interprétation médicale des données.

En cas de mise à jour ou de changement du logiciel d'analyse, il est recommandé de ré-analyser 2 dossiers ACPA afin d'évaluer l'impact de ce changement sur le résultat.

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 suivant la durée définie par la législation en vigueur.

5.3.2 Contenu du dossier patient

Discrétion nécessaire par rapport au dossier patient partagé, seul le médecin prescripteur doit avoir accès au résultat interprété ou un médecin participant à la prise en charge du patient.

5.3.2.1. Données patient / puce

- Données administratives (Nom, Prénom, DDN)
 - Echantillon : date de prélèvement, date de réception, type échantillon, N°ADN, N° famille (option)
 - Type puce (puce BAC/PAC, puce oligonucléotidique pan génomique, puce oligonucléotidique ciblée, puce SNP...et fournisseur)
 - Prescription et nom du prescripteur, attestation de consentement
 - Consentement Oui/Non
 - Indication/clinique
- et tout document exigé par la norme iso 15-189

5.3.2.2. Données techniques

- Traçabilité des étapes techniques (feuille de travail, tableau ID ADN, critères de qualité et quantité (photographies des gels des ADN avant et après digestion enzymatique, et/ou dosage nanodrop +/- qubit ou autre bioanalyseur)

5.3.2.3. Résultats brut puce (scan lame)

Les résultats bruts sont conservés jusqu'au rendu complet du résultat.

5.3.2.4. Résultat patient : interprétation

- Type puce (puce BAC/PAC, puce oligonucléotidique pan génomique, puce oligonucléotidique ciblée, puce SNP...et fournisseur)
- 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 avec tous les CNV identifiés avec le niveau de résolution choisi).

5.3.3. Contenu du Compte rendu ou feuille de résultats

La feuille de résultat doit se conformer aux instructions de la norme iso 15-189, de l'Agence de la Biomédecine et répondre aux exigences des EEQ 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*. (Cf exemple en Annexe 1)

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'arrêté de 2013.

La feuille de résultat qui sera éditée doit préciser :

- L'Identification du patient (Nom, Prénom, date de naissance)
- L'Identification du médecin prescripteur
- Les Dates de Prélèvement, Date de réception, Date de rendu
- Le tissu examiné dont est issu l'ADN
- Type de plateforme utilisée. Type de lame utilisée (fournisseur, version)
- Le seuil de détection moyen estimé pour la lame
- Logiciel d'analyse utilisé
- L'ADN de référence (**optionnel**)
- Formule génomique selon les recommandations de l'ISCN en vigueur

En cas de CNV rapporté

- La version du génome utilisée
- La taille du déséquilibre
- Préciser si le CNV est
 - Un gain ou une perte
 - Hétérozygote ou homozygote
 - Homogène ou en mosaïque
 - Intercalaire ou terminal
- Le caractère *de novo* ou hérité si recherché
- 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**)

- Un commentaire explicite pour le prescripteur incluant la classification du CNV en fonction du phénotype du patient, des références bibliographiques et / ou à des bases de données publiques, le nom des gènes morbides pertinent vis-à-vis du patient ou de la prise en charge.
- Noter la nécessité d'un conseil génétique et de l'enquête familiale si non faite et une demande de vérification si non réalisée.
- La signature par un praticien agréé
- Les limites de l'examen. Par 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 remaniements équilibrés (translocations réciproques, translocation robertsoniennes, inversions et insertions équilibrées), des polyploidies, des mutations ponctuelles, ni des déséquilibres de régions non représentées sur la puce. Elle ne peut pas détecter des degrés très faibles de mosaïcisme (< 20 %) ».

Chaque laboratoire adaptera la phrase selon ses pratiques.

La formulation de la conclusion

- **Résultat normal** : donner la formule ISCN en vigueur et 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** : cf supra

Les commentaires sont adaptés aux CNV observés :

Il n'est pas recommandé de noter sur le compte rendu les **CNV polymorphiques/ bénins**.

Il est possible 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 et conclusions doivent être conservés au même titre que tous les examens de génétique suivant la réglementation en vigueur dans un dossier patient. Ils ne doivent être remis qu'au médecin prescripteur.

Il est possible de constituer, pour rassembler les résultats des parents, un dossier ou numéro de famille. Un résultat global (parents et enfant) doit être conservé.

Si l'échantillon ne permet pas d'obtenir une analyse de bonne qualité, il est nécessaire de le préciser voire redemander un prélèvement pour réaliser une nouvelle analyse.

Le résultat pourra être réinterprété plusieurs années après la date de rendu des résultats en fonction des connaissances acquises sur les CNVs. En particulier, le clinicien prescripteur peut être amené à demander une nouvelle interprétation de l'ACPA pour un patient donné, après discussion en staff clinico-biologique.

Le laboratoire doit définir sa politique pour la gestion des données secondaires.

6. CONFIRMATION DES ANOMALIES

6.1 Techniques de confirmation

6.1.1 Confirmation d'un résultat anormal

Pour le conseil génétique et un éventuel diagnostic prénatal, un CNV pathogène sera contrôlé, en FISH ou une autre technique (en fonction de la taille et des sondes disponibles), ainsi qu'une analyse des parents avec cette même technique de contrôle.

La technique de contrôle devrait se faire idéalement sur un tube différent que celui utilisé pour extraire l'ADN ayant permis de réaliser l'ACPA, ce qui est devrait être le cas pour le contrôle en FISH puisque le tube est sur héparine et non EDTA.

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. Les études familiales seront recommandées si le CNV est de classe 3,4 ou 5.

6.1.2 Confirmation par FISH

Si le CNV n'est vérifié qu'avec une sonde, il est recommandé de la choisir au milieu du CNV ou au sein d'un gène OMIM Morbide.

Eventuellement, l'utilisation de 2 sondes marquées avec des fluorochromes différents dans les duplications permet de donner l'orientation du segment remanié (en tandem ou en miroir).

Le clone doit être disponible dans un temps raisonnable (moins de 2 mois).

Pour le choix du clone, deux cas de figures :

- Sondes BAC/PAC commerciales déjà testées par la société donc déjà bien localisées dans la région
- Sondes BAC/PAC académiques (choisies à partir des bases de données comme Ensembl, UCSC...) à tester sur lames métaphasiques (il est possible d'utiliser les lames du patient) pour les valider comme les sondes commerciales. Il est possible de choisir une sonde déjà validée au laboratoire lors d'un diagnostic précédent.

En cas de perte (délétion), l'examen d'un minimum de 5 mitoses est souhaitable ; 10 à 15 pour les gains (duplications). Il faut également regarder au minimum 10 noyaux, en cas de délétion et 50 noyaux pour les duplications surtout de petites tailles. 50 si aucune mitose n'est analysable.

6.1.3 Confirmation pour les Oligonucleotide array

La technique de qPCR ou autre technique équivalente peut être utilisée pour confirmer la présence du remaniement.

En cas de duplication apparemment *de novo* (non héritée), il est nécessaire de réaliser une FISH afin d'écartier une insertion équilibrée chez l'un des parents, et pour différencier les duplications *in situ* des insertions/translocations/marqueurs. L'observation d'un seul signal sur chaque chromosome, est un argument très fort en faveur d'une duplication *in situ* et contre une insertion ou un marqueur. En effet, un à deux pour cent des duplications sont liées à la présence d'une insertion chez l'un des parents. Parfois le point d'insertion est lui-même à l'origine de la pathologie.

L'enfant peut être porteur d'une délétion apparemment *de novo* alors qu'un parent est porteur d'une insertion à l'état équilibré.

6.1.4 Confirmation par ACPA

La confirmation par ACPA peut se faire en cas de CNVs multiples. Elle peut concerner les apparentés. La confirmation par la puce se fait de fait dans les techniques en trio où dans les cas des puces SNP si les parents sont testés d'emblée mais une technique indépendante apporte plus de robustesse à la vérification et permet de disposer d'une sonde ciblée pour une étude familiale éventuelle (ou un diagnostic prénatal).

7. DELAI DE REPONSE ET ECHECS

Le délai de réponse et le pourcentage d'échecs (indicateurs qualité) doivent faire l'objet d'une procédure de contrôle de qualité interne.

Il est recommandé de rendre la majorité des dossiers en moins de 90 jours sans les vérifications.

8 STOCKAGE ET ARCHIVAGE

8.1 Lames

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 rend aléatoire la possibilité de relire efficacement ces lames, sauf si le laboratoire investit dans des chambres spéciales de conservation. Au-delà d'une année, les lames n'ont plus de signaux et peuvent donc être jetées. Il est nécessaire de conserver informatiquement l'image obtenue après le scan de la lame

8.2 Documents

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 **compte rendu** de l'ACPA signé doit être disponible et récupérable sous 10 jours dans le dossier du patient.

8.3 Fichiers informatiques

Le stockage des fichiers informatiques demande un volume d'environ **0,5 à 1 Go** par patient. Tous les fichiers générés par les différents logiciels d'interprétation doivent être conservés informatiquement tout comme les éventuelles prises d'écran représentatives de (des) (l')anomalie(s) détectée(s). En effet les versions logicielles changent et il n'est parfois plus possible de générer à nouveau les données obtenues à partir de l'image de départ. Il faut conserver au minimum le fichier brut (image brut du scanner) après extraction des données. L'archivage informatique doit suivre les recommandations concernant les données sensibles (sauvegarde en double, stockage dans des pièces différentes dont l'accès est contrôlé).

8.4 Ré-analyse

En cas de suivi d'un patient, si une nouvelle analyse des gènes inclus dans un CNV est demandée, il est conseillé de ressortir le compte rendu et de se servir des bornes maximales et minimales déjà identifiées (les convertir dans la bonne version du génome si nécessaire) et d'étudier l'apparition de nouveaux gènes ou de nouvelles données de la littérature. Un nouveau compte rendu accompagné d'un courrier devra alors être réalisé et transmis au prescripteur. Une trace de la nouvelle analyse devra être conservée dans le dossier patient.

Si une nouvelle analyse doit être faite dans le cadre de la mise à disposition d'un nouvel outil d'interprétation plus performant ou de l'amélioration des paramètres de détection des CNVs, il conviendra alors de repartir de l'image de la lame. Les nouvelles données générées devront être sauvegardées informatiquement et un nouveau compte rendu devra alors être émis et transmis au prescripteur avec un courrier expliquant les éventuels changements par rapport au premier compte rendu. Les données de la nouvelle analyse devront être stockées informatiquement et dans le dossier patient.

8.5 Transfert/Export

Si les données d'ACPA sont déportées et sauvegardées sur une base de données externe (exemple Cartagenia Bench) il conviendra de vérifier que les données sont bien anonymisées et que l'hébergeur est bien accrédité pour assurer une telle fonction de sauvegarde. Les données ne devront en aucun cas être utilisées à d'autres usages par quiconque. Le partage des données au niveau national ou international ne devra être effectué qu'après consentement du laboratoire effectuant l'analyse et de manière anonyme. Au terme du contrat entre l'hébergeur et le laboratoire les données devront pouvoir être intégralement restituées au laboratoire.

9 CONTROLE QUALITE INTERNE et EVALUATION EXTERNE de la QUALITE

9.1 Qualité intra laboratoire

cf document accréditation du réseau AChroPuce et gestion de la qualité dans le laboratoire

9.2 EEQ

Le laboratoire doit participer à un contrôle de qualité externe (ou évaluation externe de la qualité) ou contrôle inter laboratoire une fois par an.

Ce contrôle peut être prospectif ou rétrospectif.

•Contrôle prospectif sur échantillons d'ADN

Le choix de l'organisme de l'EEQ est libre, le laboratoire choisira le type de tissu ou le type d'EEQ en fonction de son application (exemple EEQ CEQAS, EMQN ou ACLF etc...).

Le laboratoire réalise alors les phases pré analytiques, analytique et post analytique.

Le résultat intègre l'information sur le Contrôle FISH (del), Q-PCR (dup ou petite del) ou MLPA si applicable et la recherche du caractère hérité ou *de novo*.

•Contrôle rétrospectif

Dossiers déjà rendus. Le laboratoire est expertisé sur un dossier déjà rendu par celui-ci.

ANNEXE 1.

Exemple de compte rendu de Caryotype moléculaire ou ACPA

Entête du laboratoire

Agréments du laboratoire et des praticiens

Date d'édition : Ville le 05/04/2016

Résultat du caryotype Moléculaire

Partie administrative :

N° du laboratoire

Nom de patient

Prénom du patient

Date de naissance

Date de réception de l'échantillon

Date de prélèvement

Type d'échantillon

Indication

Partie technique :

Plateforme utilisée

Type de puce utilisée

Plan de l'expérience

Paramètre qualité ? Ex : valeur du DLRS

Niveau de résolution théorique et rendue

Partie résultat

Formule ISCN et version du génome

Interprétation médicale

Commentaires éventuels

Signature

Pour l'interprétation

Pas d'anomalie :

« *Pas de déséquilibres chromosomiques pathogènes mis en évidence* »

Présence d'un déséquilibre génomique :

« *Présence d'un gain sur tel chromosome de x mégabase allant de la position génomique y à z comprenant w gènes* en précisant le nombre de copie identifié pour le déséquilibre et si une étude en FISH a été réalisée permettant de confirmer le gain et donner le mécanisme »-

« *Présence d'une perte sur tel chromosome de x mégabase allant de la position génomique y à z comprenant w gènes* en précisant le nombre de copie identifié pour le déséquilibre et si une étude en FISH a été réalisée permettant de confirmer le gain et donner le mécanisme ». Préciser délétion hétérozygote ou homozygote.

Donner le nom d'au moins un gène OMIM si pertinent.

Proposer une interprétation clinico-biologique : explique ou non le phénotype (ou partiellement).

Préciser la version du génome utilisée

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 d'interprétation du CNV à part

Préciser par quelle technique le CNV a été vérifié.

Préciser qu'il est recommandé d'étudier les parents

Préciser si possible la mécanique chromosomique

Faire référence au conseil génétique

Pour les commentaires éventuels

Exemple de commentaires possibles :

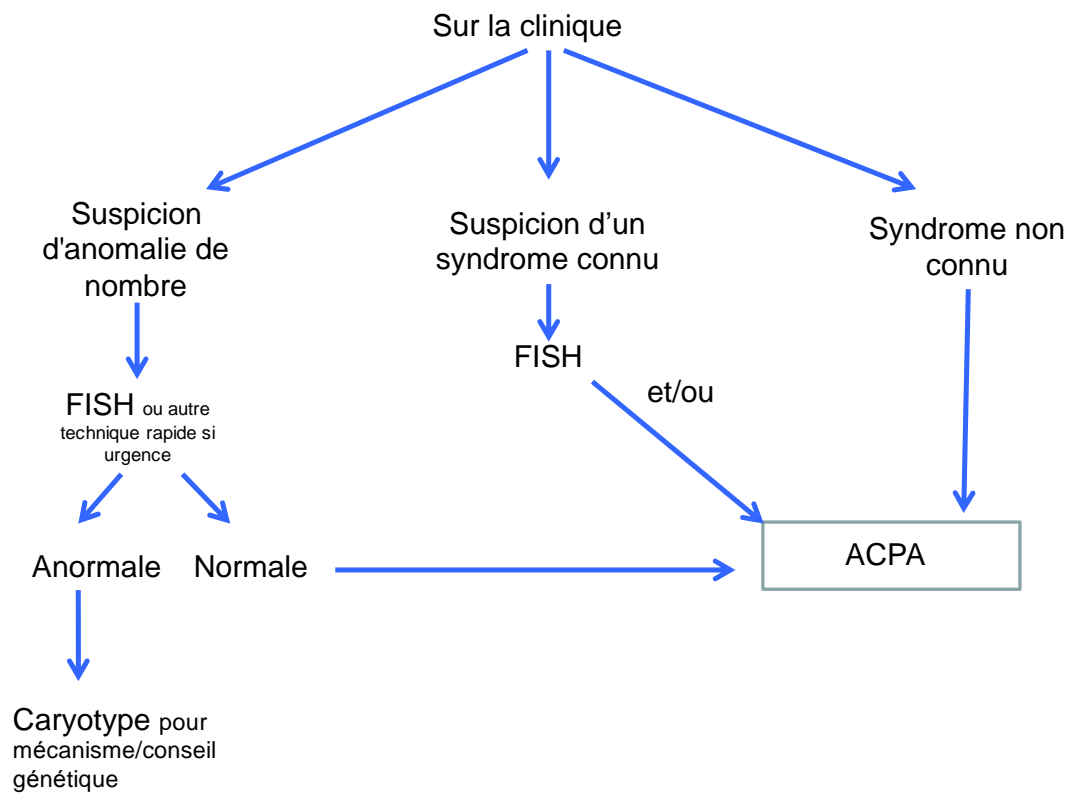
CNV bénins : A noter la présence de plusieurs variations du nombre de copies (CNV) présentes chez des individus normaux, répertoriées dans la base de Toronto et considérées comme non délétères à ce jour. En fonction de l'évolution des connaissances, ces données pourraient être réinterprétées et nous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

Limites de l'examen : 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 polyploïdies, des variations nucléotidiques ponctuelles, ni des déséquilibres de régions non représentées sur la puce. Elle ne peut pas détecter des degrés faibles de mosaïcisme.

Commentaires en fonction du type de puce utilisé (disomies par exemple, homozygotie)

Annexe 2 : arbre décisionnel

1) Suspicion clinique d'une anomalie déséquilibrée en période post natale

Suspicion d'anomalie déséquilibrée en post-natal

Annexe 3 : Curation des CNV récurrents

Version Hg19

Syndrome	Location	Size	Classe	Commentaire
1p36 microdeletion syndrome	1:10001-12840259	12.83Mb	5	
1q21.1 susceptibility locus for thrombocytopenia-Absent radius (TAR) syndrome	1:145386506-145748067	361.56kb	5	5
2q33.1 deletion syndrome	2:196925121-205206939	8.28Mb	5	
2q37 monosomy	2:239969863-240322643	352.78kb	5	
3q29 microduplication syndrome	3:195726835-197344663	1.62Mb	5	
3q29 microdeletion syndrome	3:195726835-197344663	1.62Mb	5	
Wolf-Hirschhorn syndrome	4:1569197-2110236	541.04kb	5	
Cri Chat syndrome (5p deletion)	5:10001-12533304	12.52Mb	5	
Sotos syndrome	5:175724636-177052116	1.33Mb	5	
Williams-Beuren syndrome (WBS)	7:72744455-74142672	1.40Mb	5	
7q11.23 duplication syndrome	7:72744455-74142672	1.40Mb	5	
Split hand/foot malformation (SHFM1)	7:96318078-96339203	21.13kb	5	
8p23.1 duplication syndrome	8:8100055-11764629	3.66Mb	5	
8p23.1 deletion syndrome	8:8100055-11764629	3.66Mb	5	
9q36 subtelomeric deletion syndrome	9:140513443-140730578	217.14kb	5	
WAGR (1p13 deletion) syndrome	11:31806339-32457087	650.75kb	5	
Potocki-Shaffer syndrome	11:43994800-46052450	2.06Mb	5	
Prader-Willi syndrome (Type 1)	15:22749354-28438266	5.69Mb	5	
Angelman syndrome (Type 1)	15:22749354-28438266	5.69Mb	5	
Prader-Willi syndrome (Type 2)	15:23619912-28438266	4.82Mb	5	
Angelman syndrome (Type 2)	15:23619912-28438266	4.82Mb	5	
15q24 recurrent microdeletion syndrome	15:74412643-75972911	1.56Mb	5	
15q26 overgrowth syndrome	15:99357970-102521392	3.16Mb	5	
ATR-16 syndrome	16:60001-834372	774.37kb	5	
Rubinstein-Taybi syndrome	16:3775055-3930121	155.07kb	5	
Miller-Dieker syndrome (MDS)	17:1-2588909	2.59Mb	5	
Charcot-Marie-Tooth syndrome type 1A (CMT1A)	17:14097915-15470903	1.37Mb	5	
Hereditary liability to pressure palsies (HNPP)	17:14097915-15470903	1.37Mb	5	
Smith-Magenis syndrome	17:16773072-20222149	3.45Mb	5	
Potocki-Lupski syndrome (17p11.2 duplication syndrome)	17:16773072-20222149	3.45Mb	5	
NF1-microdeletion syndrome	17:29107097-30263321	1.16Mb	5	
RCAD (renal cysts and diabetes)	17:34815072-36215917	1.40Mb	5	
17q21.31 recurrent microdeletion syndrome (Koolen-De Vries syndrome)	17:43705166-44294406	589.24kb	5	
Cat-Eye syndrome (Type 1)	22:1-16971860	16.97Mb	5	
22q11 deletion syndrome (Velocardiofacial/DiGeorge syndrome)	22:19009792-21452445	2.44Mb	5	
22q13 deletion syndrome (Phelan-Mcdermid syndrome)	22:51045516-51187844	142.33kb	5	
Leri-Weill dyschondroostosis (LWD) (SHOX deletion)	X:460558-753877	293.32kb	5	
Steroid sulphatase deficiency (STS)	X:6455812-8133195	1.68Mb	5	si garçon
Pelizaeus-Merzbacher disease	X:103031438-103047547	16.11kb	5	
Xq28 (MECP2) duplication	X:153287263-153363188	75.93kb	5	
Xq28 Microduplication	X:153624563-153881853	257.29kb	5	
AZFa	Y:14352761-15154862	802.10kb	5	
AZFb+AZFc	Y:19964826-27793830	7.83Mb	5	
AZFb	Y:20118045-26065197	5.95Mb	5	
AZFc	Y:24977425-28033929	3.06Mb	5	
Xp11.22-p11.23 Microduplication	X:48334549-52117661	3.78Mb	4	
2p21 Microdeletion syndrome	2:44410451-44589584	179.13kb	3	
1q21.1 recurrent microdeletion susceptibility locus for neurodevelopmental disorders	1:146533376-147883376	1.35Mb	0	facteur de susceptibilité
1q21.1 recurrent microduplication possible susceptibility locus for neurodevelopmental disorders	1:146533376-147883376	1.35Mb	0	facteur de susceptibilité
Familial adenomatous polyposis	5:112043201-112181936	138.74kb	0	Facteur de prédisposition
15q13.3 microdeletion syndrome	15:30910306-32445407	1.54Mb	0	facteur de susceptibilité
16p13.11 recurrent microduplication neurocognitive disorder susceptibility locus	16:14986684-16486684	1.50Mb	0	facteur de susceptibilité
16p13.11 recurrent microdeletion neurocognitive disorder susceptibility locus	16:14986684-16486684	1.50Mb	0	facteur de susceptibilité
16p11.2-p12.2 microduplication syndrome	16:21475060-29284077	7.81Mb	0	facteur de susceptibilité
16p11.2-p12.2 microdeletion syndrome	16:29606852-30199855	593.00kb	0	Facteur de prédisposition
Recurrent 6p12.1 microdeletion neurodevelopmental susceptibility locus	16:21946524-22467284	520.76kb	0	facteur de susceptibilité
16p11.2 microduplication syndrome	16:29606852-30199855	593.00kb	0	facteur de susceptibilité
22q11 duplication syndrome	22:19009792-21452445	2.44Mb	0	Facteur de prédisposition