29.11.12
B. Quilichini

Ronéo : Alizée

TECHNIQUES DE CYTOGÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE

PRINCIPE
APPLICATIONS CLINIQUES
en pathologie acquise

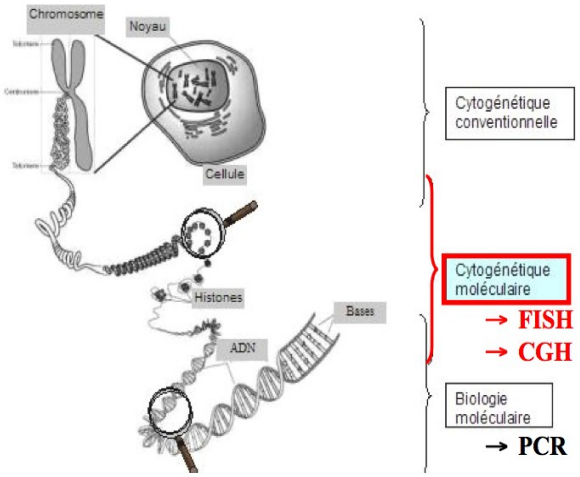
I. HISTORIQUE :

PLAN :
HISTORIQUE
INTRODUCTION
TECHNIQUE FISH INTER INTERPHASIQUE ET MÉTAPHASIQUE
NF ISO 15189- Guide de bonnes pratiques en cytogénétique.
APPLICATIONS CLINIQUES EN PATHOLOGIE ACQUISE
TECHNIQUE CGH conventionnelle et array
CONCLUSION

Rappel : FISH= Fluorescent in situ Hybridization

Années 70	Années 80/90
Utilisé seulement en recherche (1969-GALL et Pardue) : → sonde d'ADN marquée par un radio-isotope : • analyse longue • précaution d'utilisation Technique pas facile.	Domaine de la Routine Hospitalière ET de la Recherche : → Sonde d'ADN marquée par modification chimique/physique : (fluorescence) • rapide : 48H • efficace → « Nouvelles techniques » de cytogénétique moléculaire: Multiplex FISH interphasique concerne le noyau et métaphasique c'est les préparation chromosomique, mBand FISH, CGH conventionnelle , CGH array.

II. INTRODUCTION



La cytogénétique c'est l'étude du chromosome.

- **ADN** est déliée on regarde a la loupe des séquences énormes (entre 100 et 400 kb) = **TECHNIQUE DE FISH= cytogénétique moléculaire :**
  - on utilise une sonde et on répond a une question « est ce que ce locus est présent ou pas ? »
  - je prend la sonde et je regarde si ça s'hybride ou pas.
- **Le chromosome** : on le met en culture = **technique de caryotype = cytogénétique conventionnelle.**

- **La biologie moléculaire :** on fait une extraction de l'ADN, on l'amplifie dans les machines de **PCR**.

Caryotype =examen de 1ere intention

→ limites de la cytogénétique conventionnelle :

- **la résolution** : 1 bande = 1500kb donc si on a une délétion on ne verra rien.
- **l'obtention de métaphases :**
  - caryotype → mitose → bloque en métaphase
  - mais certaine fois on n'arrive pas a obtenir de métaphase et on n'a que des noyaux (ADN en pelote de laine) donc échec du caryotype.

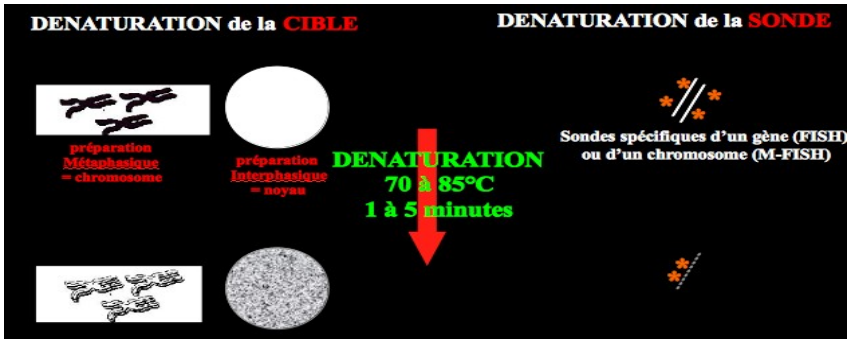
→ D'où l'intérêt de la cytogénétique moléculaire..

III. PRINCIPE

→ Le principe de la technique FISH avec des sondes froides est basé sur le fait que l'ADN est une molécule double hélice formée de deux brins complémentaires.

- **ETAPE DE DÉNATURATION** = Ces deux brins peuvent être séparés par la chaleur et/ou par traitement acide ou alcalin (on pète les liaisons hydrogènes)
- **ETAPE D'HYBRIDATION** = une sonde d'acide nucléique contenant une séquence complémentaire au simple brin d'ADN, peut alors former un hybride spécifique avec l'ADN simple brin
- **ETAPES DE REVELATION** = Cette sonde est marquée directement ou indirectement avec un ou plusieurs fluorochromes, l'hybridation des séquences nucléiques complémentaires peut être visualisée en fluorescence après contre coloration du support (chromosomes ou noyaux)

A) ETAPE DE DÉNATURATION : 1 à 5 min



- La sonde est double brin on doit la séparer pour quelle puisse s'hybrider sur l'ADN du patient = on dénature.
- Sur une lame de verre où il y a nos préparation interphasique et métaphasique on dénature rapidement (sinon abime le matériel) a une T°C entre 70 à 85°C associé au formamide.
  - Formamide = baisse le seuil de T°C de dénaturation des molécules d'ADN.

B) ETAPE D'HYBRIDATION : qq heures à 3j



- Il y a recherche de complémentarité de bases

- La sonde se fixe sur les 2 séquences spécifiques du génome mais EGALEMENT sur des séquences qui possèdent la complémentarité pour 6 bases.
- Hybridation overnight = toute la nuit.

C) LAVAGE ET REVELATION :



- on lave pour enlever toutes ces hybridations non spécifiques
- on contrecolore avec le DAPI (bleu fluo) permet de révéler les spots = signaux fluorescents

D) LECTURE AU MICROSCOPE A FLUORESCENCE.

APPROCHE CIBLÉE

- **Cible : Chromosomes ou Nx interphasiques**
- Sonde(s) d'acide nucléique complémentaire(s) d'une séquence donnée

Fish interphasique : noyaux interphasiques.

- **Principe :** j'utilise une sonde je la lance sur les noyaux et je vais compter 100, 200 noyaux
- **interet :**
  - analyse d'un grand nombre de cellules en évitant l'étape de culture donc **gain de temps.**
    - **ex en prénatal dépistage de trisomie 21**
    - aneuploidies = anomalie de nb chromosome en + ou en -
  - spé oncologie et hématologie :
    - on recherche des remaniements génétiques acquis
    - On recherche un clone acquis minoritaire anormal
    - **par ex dans les leucémies**

→ **résultat rendu en %**

Fish métaphasique : métaphases 1 ou 2 chromosomes

- **intérêt :** dépend de la **taille de l'anomalie** certain se voit sur le caryotype et d'autre non, dans ce cas on fait un fish métaphasique.
  - Recherche de délétion, d'anomalies de structure
  - Identification de marqueurs

→ **résultat rendu en chromosomes**

Multiplex-FISH et SKY : métaphases panchromosomique

- **Analyse d'un caryotype complexe**

→ **résultat rendu sur chromosome**

mBand FISH : étude du banding d'un chromosome

- recherche d'anomalie de structure d'1 chromosome

→ **résultat rendu sur chromosome.**

APPROCHE GLOBALE

- **Cible : Chromosomes de référence (CGH conventionnelle) ou BACS / Oligont (CGH array)**
- 2 Sondes : ADN génomique total de référence et ADN génomique total à tester marqués différemment.
- Utilisé en onco pas en hématologie.

CGH : hybridation génomique comparative

CGH CONVENTIONNEL : métaphases pangénomiques

- Analyse d'un caryotype complexe ou non (anomalies non détectables par technique de cytogénétique classique)
  → Recherche des déséquilibres Génomiques: GAIN OU PERTE

CGH ARRAY : BAC/oligo pangénomique

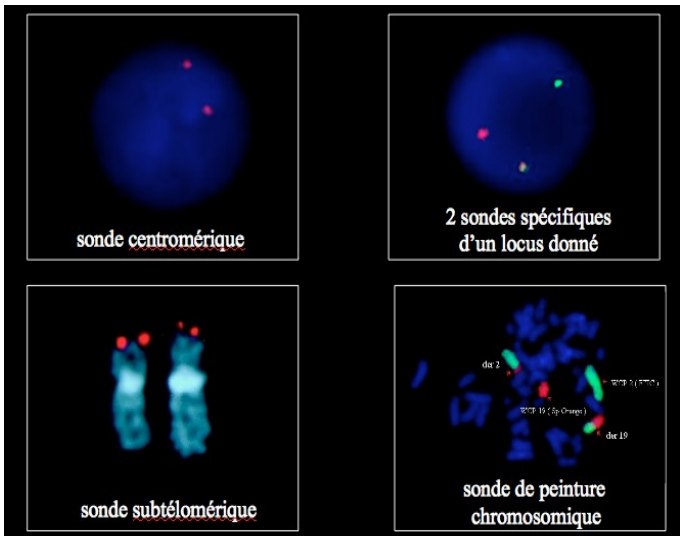
- PUCES ADN BACs/PACs et PUCES ADN OLIGONT : permet en une seule fois de voir si il y a des choses amplifiés ou en moins
- Analyse d'un caryotype complexe ou non (anomalies non détectables par technique de cytogénétique classique)
  → Recherche des déséquilibres Génomiques : GAIN OU PERTE

SNP ARRAY : séquencage haut débit

IV. TECHNIQUE : FISH interphasique et métaphasique

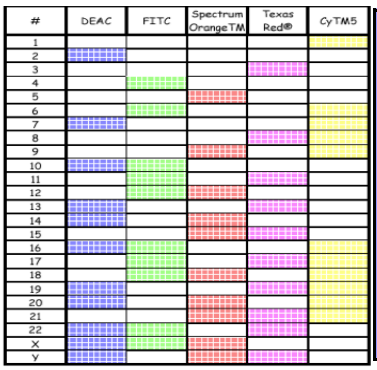
I. DIFFERENTS TYPES DE SONDES

A) SONDES COMMERCIALES directement liée a la structure du chromosome :



- **sondes centromériques** : séquences répétées
- **sondes de peinture chromosomique** : spécifique d'un chromosome entier ou d'un bras court ou d'un bras long
- **sondes subtélomériques :** extrémité des chromosomes
- **sondes spécifique d'un locus donné :** sonde LSI (ex on veut voir si on est délété du locus ATM on prend la sonde LSI-ATM).
- **sonde Multiplex FISH/SKY :** recherche
- **sonde m Band FISH :** recherche

En haut a G : noyaux contrecoloré au dapi on a utilisé une sonde du chromosome 8 : interprétation c'est normal.
En haut a D : sonde colorée avec 2 fluoroC différents
En bas a G : on est sur des chromosomes, reconnaît l'extrémité ici bras court ,en cytoG p (bras long q)
En bas a D : sonde de peinture en vert qui reconnaît le chromose 2 et en rouge reconnaît le chromosome 19 : un K2 normal, K19 et **translocation réciproque**

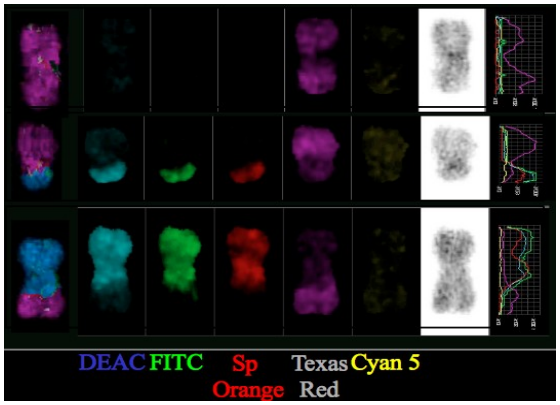


Sondes de peinture chromosomique → sonde MULTIPLEX-FISH : Combinaison unique de fluorochromes : spécifique d'une paire de K

- en une technique on colore tout les K
- On a 22 pairs de K (+ XX ouXY) et seulement 5 fluoroc donc on les combiné afin qu'ils soient spécifique pour chaque K.

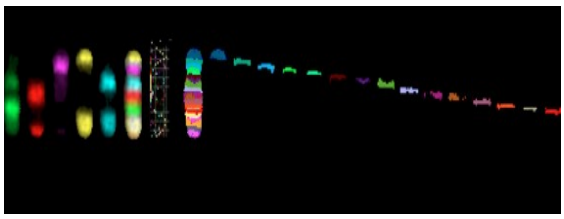
→ K1 = jaune
→ K2= cyan
→ K11= vert et magenta

- **intérêt : voir dans certaine patho qu'il y a toujours la meme anomalie → on trouve le gène responsable → diagnostique**



- 3 chromosomes :
  - en haut reconnu que par texas red = K3
  - au milieu : partie du haut : K3
  - en bas : partie du haut : X et en bas K3

→ translocation 3X



Sonde mBand FISH d'1 chromosome donné : combinaison unique de floroC : spécifique du banding d'1 K donné.

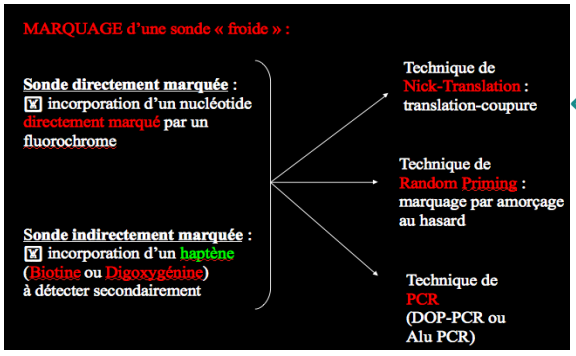
- Ici on a le K7 : il a été decoupé et chaque morceau et marqué par un fluoroC
- interet : délétion, inversion

B) SONDES FABRIQUÉES A PARTIR D'UN ADN RECOMBINANT D'INTERET

CHOIX du YAC (Yeast Artificial Chromosome),
BAC (Bacterial Artificial Chromosome) : bactérie dans laquelle on a inséré une séquence d'intérêt. **(ex escherichia coli)**
PAC (Phage Artificial Chromosome) ou
Cosmide

EXTRACTION et PURIFICATION : but : extraire la sq d'intérêt et fabriqué la sonde

1. On étale l' escherichia coli sur la gélose (dans chaque colonie il y a la sq d'interet donc on fait proliférer)
2. extraction dans la soude qui permet de reconnaître de façon spécifique la sq d'intérêt
3. Il faut maintenant l'intégrer au fluoroC : **MARQUAGE**



Nick translation : technique de référence « coupure-déplacement »

- on prend la molécule d' ADN on la coupe avec la Dnase et on integre une base, on choisi la couleur et une enzyme va fixer cette base dans la sq d'interet
- donc **Dnase I** pour couper et **ADN polymérase** pour reconstituer.

→ la sonde est prête : double brin et marqué au fluoroC.

II. PREPARATION DU SUPPORT D'HYBRIDATION

- **differentes cibles :**
  - préparation métaphasique (chromosomes)
  - preparation interphasique (nx interphasique)
  - apposition ou coupe de tissus (tissus congelé -tissus en paraffine, ex tumeur)

- **prétraitement des lames**
  - vieillissement des lames

- action d'enzyme a activité lytique pour obtenir des lames bien propres (pepsine, Rnase)
- déshydratation dans des bains d'éthanol (70% - 90%-100%)

- **Pour les tissus en paraffine**: déparaffinage au xylène et prétraitement spécifique

III. DÉNATURATION et HYBRIDATION DE LA SONDE SUR SA CIBLE

- dénaturation THERMIQUE et/ou dénaturation CHIMIQUE (formamide) : 70 à 85° pendant 1 à 5min
- hybridation par complémentarité des bases nucléotidiques : 37° pendant qq heures à 3j.

IV. LAVAGE

- stringence de la solution de lavage
- température de lavage (73°) importante car si en dessous n'enlève pas les signaux aspécifiques et si au dessus : ca c'est redénaturé et la sonde c'est barrée.
  → **permet d'éliminer les sondes non spécifiquement fixées (« bruit de fond »)**
- Automatisation des étapes de prétraitement et de lavage

V. DÉTECTION DES SONDES (pas traité)

DETECTION DIRECTE	DETECTION INDIRECTE
Sondes directement marquées par un fluorochrome → Pas d'amplification du signal nécessaire **Avantages :** **RAPIDE** **SIMPLE** **Inconvenient :** Pas d'amplification possible si le signal est faible	Sondes marquées par des haptènes (biotine ou digoxigénine) révélés par immunoréaction grâce à des anticorps qui sont couplés à des fluorochromes (directement ou indirectement) **= AMPLIFICATION SIGNAL** **Avantage :** **Amplification du signal si le signal est faible** **Inconvénients :** - Plus long que la détection directe - Difficulté d'obtenir un rapport signal/bruit satisfaisant avec un minimum de bruit de fond

VI. CONTRE COLORATION AU DAPI/ANTIFADE

VII. ANALYSE AU MICROSCOPE A FLUORESCENCE :

Principe :

- Absorption d'énergie lumineuse par une molécule (fluorochrome)
- Passage à l'état de molécule excitée
- Relaxation partielle avec perte de chaleur par échange avec le milieu ambiant
- Retour à l'état fondamental par émission lumineuse (de plus grande longueur d'onde que l'onde de stimulation) = spectre de fluorescence

→ Les filtres utilisés : Dapi - FITC- Spectrum Orange - Texas Red - DEAC- Cyanine 5

V. APPLICATIONS CLINIQUES

(CYTOGÉNÉTIQUE CONSTITUTIONNELLE POSTNATALE)
(CYTOGÉNÉTIQUE CONSTITUTIONNELLE PRENATALE)
CYTOGÉNÉTIQUE ACQUISE HEMATOLOGIQUE (LEUCÉMIES)
CYTOGÉNÉTIQUE ACQUISE ONCOLOGIQUE (TUMEURS)

CYTOGENETIQUE HÉMATO-ONCOLOGIQUE :

→ **recherche d'anomalie acquise**

intérêt de la FISH/caryotype car :
→ **index mitotique des cellules anormales faible**
→ **qualité des métaphases médiocre**
→ **contamination des cellules tumorales par du tissus sain**
→ **recherche de translocations ou délétions cryptiques avec les sondes spécifiques.**

→ **interet diagnostique, pronostique et éventuellement du suivi de la maladie résiduelle**
→ **mise en évidence de gènes de fusion ou de réarangements génétiques à l'origine de la prolifération maligne ou de déséquilibres génétiques. (amplification ou délétion)**

Quelle sonde pour quelle pathologie ?

- Pour chaque pathologie en hématologie on a une translocation, délétion ou anomalie spécifique.
- Obligation de L'OMS

Sur quel support peut on réaliser la technique ?

- **1ère matrice :** préparation cellulaire issue des techniques de cytogénétiques conventionnelle étalée sur lame de verre.
- **2ème matrice :** coupe histologique d'une tumeur incluse en paraffine
- **3ème matrice :** frottis sanguin ou médullaire

Quelle sonde choisir ?

Tableau important +++

Les différents types de sonde du laboratoire

TYPE DE SONDE	RESULTATS	IDEOGRAMMES	NOYAUX INTERPHASIQUES	SONDES
SINGLE COLOR	**DELETION** Noyau normal: 2 signaux rouges + 2 signaux verts. Noyau anormal: 1 signal rouge, 2 signaux verts. **MONOSOMIE** Noyau anormal: 1 signal rouge, 1signal vert. **TRISOMIE** Noyau anormal: 3 signaux rouges,3 signaux verts	Ex: Délétion	Ex: Délétion — Contrôle	LSI ATM/P53 13q14/13q34/CEP12 LSI CEP7 /D7S486 (7q31) LSI EGR1/D5S23,D5S721 (5q31/5p15)
	AMPLIFICATION ratio= gène d'intérêt/ contrôle Rb 2,2			HER 2/neu (17q12)
DUAL COLOR DUAL FUSION	**TRANSLOCATION** Noyau normal: 2 signaux rouges + 2 signaux verts. Noyau anormal: 2 signaux jaunes (fusion d'un signal rouge et d'un signal vert) + 1 signal rouge + 1 signal vert			LSI ETO/AML1 t(8;21) (q22;q22) LSI IGH/BCL2 t(14;18) (q32;q21) LSI IGH/CCND1 t(11;14) (q13;q32) LSI PML/RARA t(15;17) (q22;q21)
DUAL COLOR EXTRA SIGNAL	**TRANSLOCATION** Noyau normal: 2 signaux rouges + 2 signaux verts. Noyau anormal: 1 signal jaune (fusion entrun signal rouge et un signal vert)+ deux signaux rouges (dont un extra signal)+ 1signal vert		Extra signal	LSI BCR/ABL t(9;22) (q34;11) LSI TEL/AML1 t(12;21) (p13;q22)
DUAL COLOR BREAK APART	**TRANSLOCATION** Noyau normal: 2 signaux jaunes (= fusion d'un signal rouge et d'un signal vert). Noyau anormal: 1 signal jaune + 1 signal rouge + 1 signal vert			LSI MLL (11q23) LSI IGH DC (14q32)
TRIAL COLOR REARRANGEMENT	**DELETION CRYPTIQUE OU TRANSLOCATION** Noyau normal: 2 signaux jaunes tri-color = fusion d' 1 signal rouge, d'1 signal vert et d'1 signal bleu. Noyau anormal: délétion cryptique= 1 signal jaune tri-color (= fusion d'1 signal rouge, d'1 signal vert et d'1 signal bleu + 1 signal jaune deux couleurs =fusion d'un signal vert et d'un signal bleu. Réarrangement= 1 signal jaune tri-color +1 signal jaune deux couleurs(fusion d'un signal vert et d'un signal rouge)+ 1 signal bleu isolé		Délétion cryptique ; Réarrangement	LSI FIP1L1/PDGFRA (4q12)

1. SINGLE COLOR Probe

→ **Sonde spécifique d'un locus donné, marqué avec 1 seul fluorochrome**

- Possibilité d'utiliser un cocktail de sondes

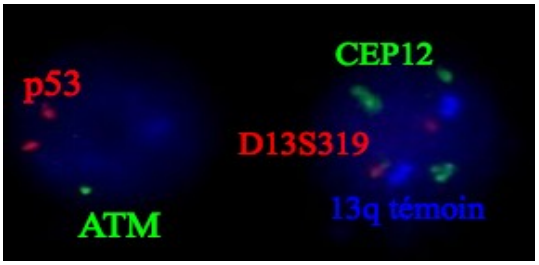
Intérêt :

DELETION ?

AMPLIFICATION ?

À coupler avec un locus témoin du chromosome impliqué +++

Pour les amplifications rendre un ratio locus recherché / sonde témoin +++ (ex: HER2 → ratio HER2/CEP17 → amplification si R >2,2)



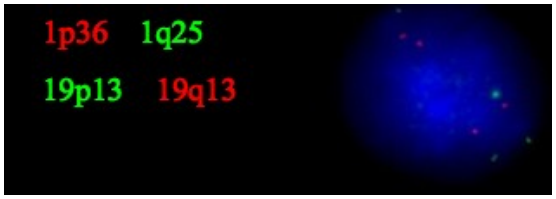
Cocktail LLC :

- une sonde ATM marquée en vert
- une sonde p53 marquée en rouge

interprétation du noyaux : délétion du locus ATM

- du centromère de 12 marqué en vert
- sonde du K13 marquée en rouge
- sonde reconnaît aussi K13 en bleu

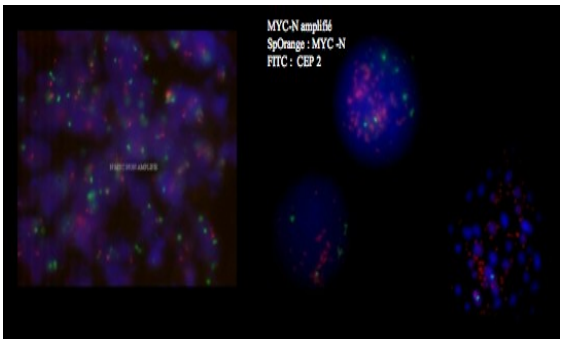
interprétation : il y a une trisomie



Cocktail Oligodendrogliome :

- locus situé sur le bras court du K1 en rouge
- locus situé sur le bras long du K1 en vert.

Interprétation : noyau avec une trétasomie

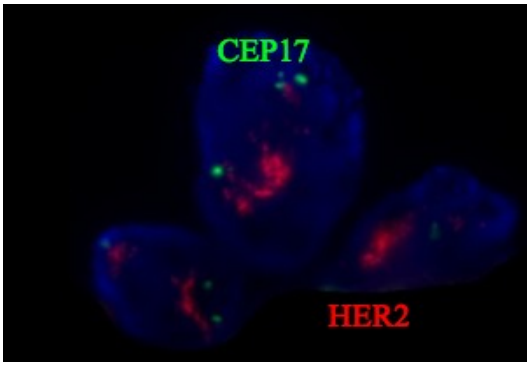


N-MYC couplée à une sonde centromérique chromosome 2 dans les neuroblastomes :

- en rouge : sonde qui reconnaît le gène N-MYC situé sur le bras court du K2
- en vert : sonde centromérique de K2

interprétation : 6 chromosomes 2 avec amplification de l'oncogène N-MYC en double minute.

→ **pronostic péjoratif**



HER2 couplée à une sonde centromérique du chromosome 17 dans les tumeurs du sein invasives :

- en vert : sonde centromérique K17
- en rouge : sonde qui reconnaît le locus HER2

Interprétation : amplifiation de HER2 en cluster : tout les locus s'agrègent.

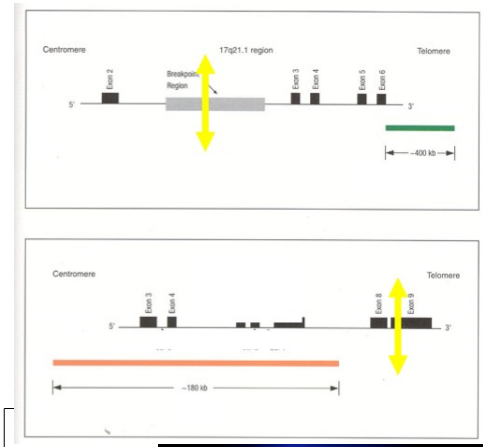
2. DUAL COLOR, SINGLE FUSION Probe :

Cocktail de 2 sondes

- une sonde spécifique d'un locus : FITC
- une sonde spécifique d'un autre locus : SO

Nx normal : 2xFITC – 2xSO
Translocation : 1xFITC – 1xSO – 1xfusion FITC-SO (jaune)

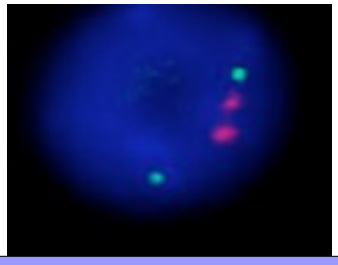
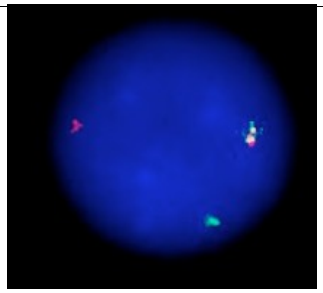
intérêt : Translocation
Inconvénient : superposition de 2 signaux fluo = faux positif (donc on utilise plus ces sondes).



Représente un chromosome

- en gris claire : le centromère et aux extrémités les télomères
- La barre en dessous représente la sonde qui reconnaît la partie au dessus et est de la couleur représentée. (rouge)
- la flèche jaune = endroit où ça coupe = break point

Ex : translocation réciproque entre K15 et K17

	
Noyaux normal : 2verts + 2 rouges	Noyaux transloqué : 1 rouge+ 1 vert + 1 jaune (accolement vert+ rouge)

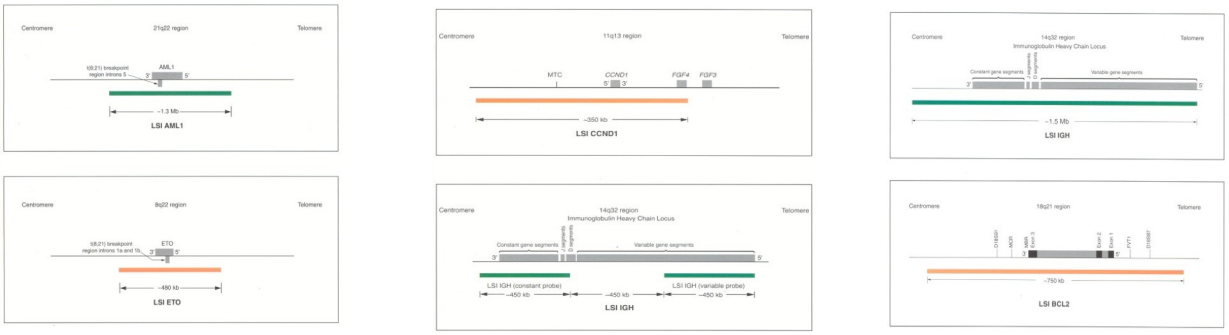
3. DUAL COLOR, DUAL FUSION Probe

Cocktail de 2 sondes

- une sonde spécifique d'un locus FITC
- une sonde spécifique d'un autre locus SO

Noyaux normal : 2xFITC – 2xSO
Translocation : 1xFITC – 1xSO – 2xfusion

intérêt : Translocation



→ 2 Sondes qui coupent a 2 niveaux différents (une orange et une verte), la sonde recouvre le point de cassure .



interprétation:

- 1 rouge + 1 vert
- 2 fusions

→ la probabilité pour qu'il est 2 superpositions dans le même noyaux est quasi nul c'est pour ça que ces sondes sont celles que l'ont utilise !

4. DUAL COLOR, ES PROBE (EXTRA SIGNAL)

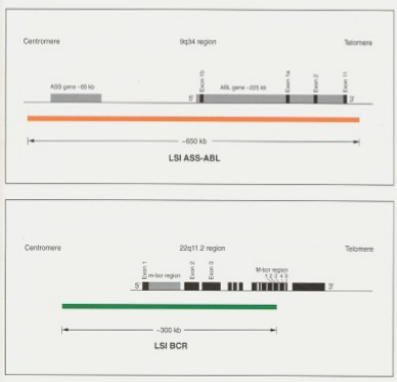
Cocktail de 2 sondes -

- une sonde spécifique d'un locus : FITC
- une sonde spécifique d'un autre locus : SO

Nx normal :2xFITC - 2xSO

Translocation : 1xFITC - 1xSO - 1xfusion FITC- SO (jaune) - 1 ES(ExtraSignal)

intérêt : translocation, sonde + spécifique, différencier différent point de cassure



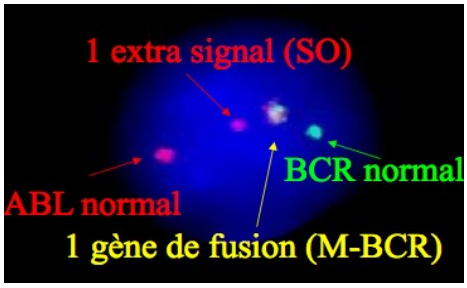
Il traite seulement l'exemple BCR

→ les points de cassures peuvent varier notamment pour la leucémie myéloïde chronique avec la translocation 9/22

→ le gène de fusion s'appelle BCR/ABS (Breakpoint Cluster Region et Mr Abelson)

→ en fonction du point de cassure on a M-BCR ou m-BCR et d'autre qui ont une valeur diagnostic et pronostic différente

→ sur le schéma de G : quand ca casse tout a G c'est m-BCR et tout a droite M-BCR

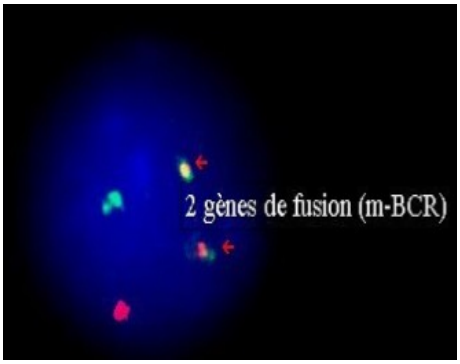


Ex : on casse en M-BCR

interprétation dans un noyaux transloqué :

- 1 rouge , 1 vert
- 1 jaune
- 1 rouge plus petit= Extra signal « le rien vient se coller »

ps : l'intensité de la fluorescence change en fonction de la taille de la sonde



Ex : on casse en m-BCR

interprétation :

- 1 vert
- 1 rouge
- 2 jaunes

DONC BIEN COMPRENDRE CA : il a insisté :
Pour la translocation M-BCR :

- on voit (sur le schéma d'avant des 2 sondes) qu'a droite de la région M-BCR c'est « blanc » la sonde ne recouvre pas la région donc si translocation la région « blanche » va aller avec la partie en haut rouge → **petit rouge = extra signal**
- les deux autres parties s'assemblent rouge et verte = 1 jaune
- **plus les normaux**

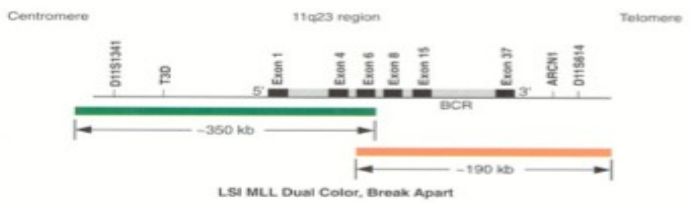
Pour la translocation m-BCR : ca coupe une région que la sonde recouvre donc on a 2 jaunes + **les normaux** : 1 vert et 1 rouge

5. DUAL COLOR, BREAK APART Probe

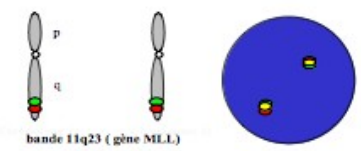
« pour cette sonde on oublie tout ce qu'on a appris avant »
1 seule sonde spécifique d'un locus mais marquée avec 2 fluorochromes
Nx normal : 2x fusions FITC-SO (jaune)
Réarrangement du gène : 1xFITC – 1xSO – 1xfusion FITC-SO (jaune)

intérêt : Réarrangement d'un gène
Avantages : très utile s'il existe plusieurs partenaires pour un même gène
-Pour MLL : > 50 partenaires différents
-Pour C-MYC : 3 partenaires différents
-Pour ALK : >5 partenaires différents
Inconvénients : ne permet pas déterminer le partenaire génique si pas de support métaphasique: intérêt du caryotype +++

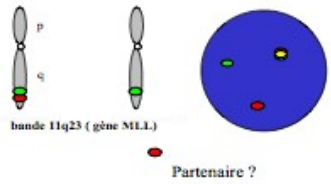
Pour une maladie donnée (leucémie aigue lymphoblastique) on peut avoir des translocations qui impliquent toujours un gène particulier= MLL qui se trouve sur le bras long du chromosome 11 .
→ La translocation a lieu avec ce gène et 60 autres gènes : le 11 peut se transloquer avec le 8, avec le 9 etc .. et a chaque fois ça donne un gène de fusion différent.
→ Mais MLL est toujours impliqué
→ Donc pour une hémopathie maligne on peut avoir 60 translocations différentes
(dsl cette partie n'est pas claire une certaine personne a eu une crise de toux .. je ne citerais personne).
→ MLL est un gène homéobox



→ il faudrait 60 sondes mais ils ont inventé cette sonde ! (dual color, break apart)
Principe : 1 sonde qui couvre toute les translocations, au niveau du gène MLL sur K11 : ils intègrent 2 sondes, une marquée en rouge et une marquée en vert (ca coupe toujours au meme endroit)



Noyaux normal :
2 jaunes



Noyaux transloqué :
1 vert
1 rouge
1 jaune correspondant au K11 normal
→ il y a séparation des signaux = « split du signal »

→ **attention on ne peut pas donner le partenaire de la translocation !**
→ **La seul façon est le caryotype.**

NOMENCLATURE :

La formule caryo : nb de k par cellule (46),chromosome sexuel (XX ouXY), anomalie (inversion/translocation..)

- **homme : 46,XY / femme : 46,XX / trisomie 21 d'un homme : 47,XY,+21**
- pour une translocation : 46,XX,t(1;18)( )
  → 1ere parenthèse = les k transloqués,
  → 2ème parenthèse= les points de cassures

On classe les chromosomes : en fonction de leur taille, ensuite index centromérique puis les bandes issus des techniques de dénaturation.

La formule FISH : dépend si on a travaillé sur noyaux ou sur métaphases

- sur noyaux on met le symbole « nucISH » et on ouvre une parenthèse avec tout ce qu'on voit
- sur métaphase : « ISH »

APPLICATIONS CLINIQUE :

- Quel examen cytogénétique prescrire à bon escient ?
  Clinicien ⇔Biologiste
- Place de la FISH / autres techniques (IHC, CISH, SISH, CGH…)
- Rapport coût/efficacité ?

→ FISH en pathologie constitutionnelle/acquise (JO 05/07): ⇒ B5OO/une sonde (135€)- 2 sondes au maximum remboursées si support métaphasique

- Domaine de la recherche clinique et du diagnostic en routine ?

NF ISO 15189 – accréditation COFRAC :

1- Qualification et Habilitation du personnel
→ **choix du biologiste**
2- Dossier de qualification de la méthode FISH
→ **indispensable dans la démarche d'accréditation**
3- Gestion de la documentation externe et interne pour la validation des sondes FISH
4- Contrôles métrologiques
5- CIQ et EEQ
→ **CIQ= contrôle interne de qualité (choix du biologiste)**
→ **EEQ= evaluation externe de qualité**

VI. GUIDE DE BONNES PRATIQUES EN CYTOGÉNÉTIQUE

QUELLES TECHNIQUES DISPONIBLES POUR L'ÉTUDE « CYTOGÉNÉTIQUE » DES PATHOLOGIES ACQUISES ?

1- le CARYOTYPE +++
2- la FISH +++
3- les TECHNIQUES INNOVANTES EN CYTOGENETIQUE MOLECULAIRE: CGH array
4- les techniques "frontières" en cytogénétique et en biologie moléculaire: SNP array, séquençage à haut débit ..