



LABOSUD
OC BIOLOGIE

Etude interne

Date :entre le 22/02/2018 et le 17/07/2018.

Intitulé de l'étude : Etude de la qualité du banding chromosomique (dans le cadre du caryotypes sanguin) en fonction du délai pré-analytique .

Responsable(s) de l'étude : Haïssam RAHIL, Sonia MALLET, Bastien PASQUIER et Claudio ILARDO

∞ ∞ ∞ ∞ ∞

1-Introduction :

La cytogénétique est un domaine de la génétique qui étudie des chromosomes, y compris des changements numériques et leur relation aux déséquilibres structuraux. C'est après 1969, que la cytogénétique entre dans la période du banding chromosomique. Parmi les tests de cytogénétique classiques, le caryotype de répartition en classes de niveaux GTG (Bandes G, Trypsine, Giemsa) est le plus largement utilisé. Les techniques de banding usuels RHG ou GTG permettent de définir 300 à 550 bandes par génome haploïde avec une résolution d'environ 7 à 10x10⁶ pb par bande. Ce nombre de bandes par génome haploïde neutre (23 chromosomes X) va définir la sensibilité du caryotype. Dans cette étude, on utilise le marquage de l'euchromatine en bandes G (Giemsa) pour évaluer l'impact du délai pré-analytique sur la résolution du banding chromosomique.

La période de mise en culture des lymphocytes est une étape importante, qui peut être affectée par la phase pré analytique du test (1). Notre objectif est d'évaluer l'impact du délai pré-analytique, lorsqu'il dépasse 72h mais qu'il reste inférieur à 96h, sur la qualité de la résolution du banding (≥ 400 bps).

2-Échantillons et recueil :

La mise en culture des lymphocytes est réalisée à partir de prélèvement sang total recueilli stérilement sur héparine. Les échantillons sont transportés à température ambiante (entre 15°C et 25 °C).

3-Enregistrement et identification :

Chaque échantillon est identifié à l'arrivée au laboratoire

4-Protocole :

Etude des bandes G : elles sont obtenues par dénaturation enzymatique, avec la trypsine. Cette dernière digère les protéines et permet l'apparition après coloration au Giemsa d'une succession de bandes permettant de classer et d'analyser les chromosomes. Les bandes G correspondent aux bandes R négatives. Les bandes G marquent des régions d'ADN riches en liaison A-T et représentent des centres de condensation précoces pauvres en gènes actifs et en séquences Alu (2). Les lames ont été étudiées à l'aide d'un chercheur de métaphases LEICA © modèle GSL-120. Ce lecteur recherche systématiquement 40 métaphases. Conformément aux critères définis par « A.C.L.F » (3), l'étude du caryotype porte au minimum sur 15 métaphases et au moins 3 caryotypes doivent être établis. L'analyse

de la qualité des mitoses est réalisée sur le Cytovision © qui permet de quantifier le nombre de bandes par métaphase.

5-Matériel :

Voir RII-MOP.168

6-Analyse statistique :

Dans cette étude rétrospective réalisée entre le 22/02/2018 et le 17/07/2018, la qualité de la résolution du banding a été étudiée sur 857 caryotypes sanguins en tenant compte du délai pré-analytique.

Nous avons classé la qualité de la résolution du banding en 3 groupes : 300 bps, 400 bps et 550 bps. Les résultats sont exprimés en pourcentage de dossiers étudiés.

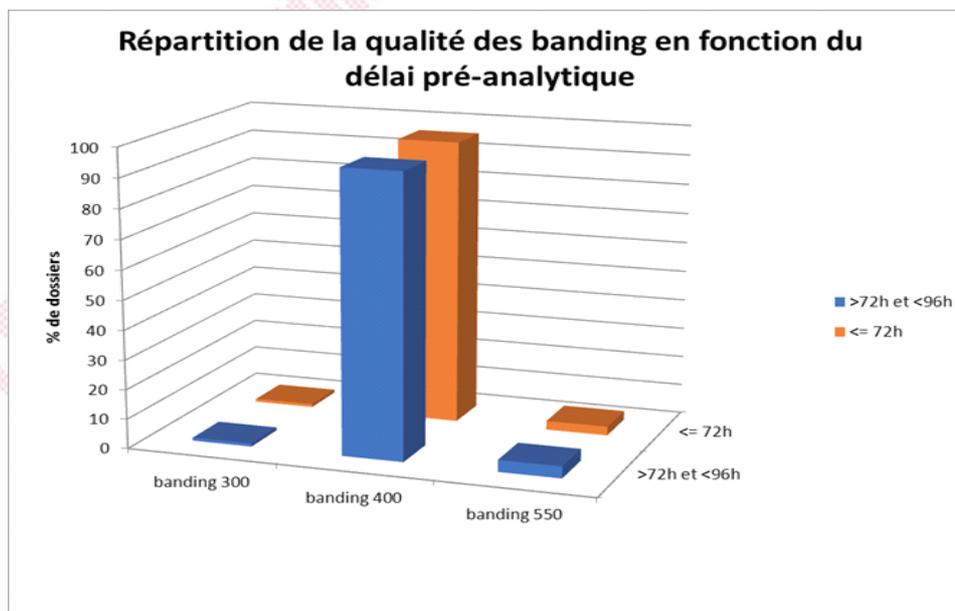
Un test de Wilcoxon est réalisé pour étudier statistiquement l'appariement des deux populations étudiées ($T \leq 72h$ versus $72h < T < 96h$)

7-Résultats:

Tableau I : Répartition (en %) de la qualité de résolution des banding en fonction du délai pré-analytique.

Délai pré-ana	Nbre dossiers étudiés	banding 300	banding 400	banding 550
$\leq 72h$	699	1%	96%	3%
$>72h$ et $<96h$	158	1%	95%	4%

Figure 1 : Répartition (en %) de la qualité de résolution des banding en fonction du délai pré-analytique.



8-Discussion :

En cytogénétique de routine, une technique présentant un banding ≥ 400 bps h représente un gage de sensibilité analytique (4). Cette qualité de résolution est fondamentale pour garantir une bonne identification des altérations chromosomiques. Avec une résolution chromosomique d'environ 7 à 10×10^6 pb par bande, de nombreuses délétions, duplications et translocations peuvent être détectées. Selon les recommandations de l'A.C.L.F (3) pour la cytogénétique constitutionnelle postnatale, un minimum de 400 bandes est requis, si non un deuxième prélèvement est recommandé (sauf en cas d'anomalie de nombre concordante avec la clinique (ex : trisomie 21) ou une ACPA réalisée par ailleurs).

En 2014, l'étude publiée par Bulla (1) a montré une augmentation de la mortalité cellulaire des lymphocytes 24h après le recueil, mais sans diminuer la résolution des bandes GTG qui se maintenait autour de 400 bps h. Assurant ainsi une bonne sensibilité analytique de l'examen.

En 2016, T. Chandan et al. (5), ont montré que l'index mitotique (IM) était stable entre T0h (IM = 0,62) et T7 jours après le prélèvement (IM = 0,53) pour un transport à température ambiante (22-28°C). Pour cette étude, la comparaison des aspects morphologiques des chromosomes en métaphase (T0h versus T7jours) était bonne.

Dans notre étude, la répartition du nombre de dossiers présentant un banding à 300, 400 et 550 est identique entre les deux populations étudiées ($T \leq 72$ h versus $72 < T < 96$ h). Le test de Wilcoxon montre un parfait appariement ($p = 1,000$, $\alpha = 0,05$). Le pourcentage de dossiers présentant un nombre de bandes GTG à 400 reste stable (96% versus 95%). Ces résultats démontrent qu'aucune altération de la résolution n'est impactée par l'allongement du délai pré-analytique.

9-Conclusion :

Le territoire médical pour l'activité de cytogénétique est en constante élargissement. Ce phénomène a pour effet d'augmenter les délais pré-analytiques dans le cadre des caryotypes sanguins. Même s'il est préférable de privilégier un délai pré-analytique court (< 24 h), les résultats de cette étude montrent un maintien de la résolution analytique (400 bps h) pour des délais pré-analytiques plus longs (T72h à T96h). Assurant ainsi une bonne qualité et une bonne fiabilité de l'examen.

10-Références bibliographiques :

- [1] L. Crubelati Bulla, E.Papa Ambrosio, A.B. Tozzo Martins,V.A. DellaRosa. Viability of lymphocyte culture, at different times after blood collection, for karyotype analysis. *J Bras Patol Med Lab*, v. 50, n. 2, p. 124-130, abril 2014.
- [2] M. Seabright. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*, v. 298, n. 7731, p. 971-2, 1971.
- [3] A.C.L.F : Guide de bonne pratiques en cytogéné, version 3, 2014.
- [4] ISCN (2016): *An international system for human cytogenetic nomenclature (2016) Vol. 149, N°1-2.* (eds) S Kager, Basel, 2016.
- [5] T. Chauhan, J. Suthar, R.K. Patel² , M Patel. Impact of Time and Temperature during Transportation of Blood Samples on Lymphocyte Culture and Chromosomal Preparation. *J. Chem. Bio. Phy. Sci. Sec. B*; February 2016 – April 2016, Vol. 6, No.2; 549-553.