



Université de REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Ecole doctorale Sciences, Technologies, Santé

UFR Médecine STS
EA 3801

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne

Discipline MEDECINE STS

Caroline FRANCOIS-FIQUET

Présentée et soutenue publiquement le
24 Mai 2013

FENTES LABIO-PALATINES :
Approche étiologique génétique. Place des gènes de l'angiogenèse.
Développement d'un modèle d'étude *in vivo* chez l'enfant.

Directeur de thèse
Professeur Martine DOCO-FENZY

JURY

Président	Professeur Philippe N'Guyen
Directeur	Professeur Martine Doco Fenzy
Rapporteur	Professeur Laurence Olivier-Faivre
Rapporteur	Professeur Philippe Pellerin
Membre du jury	Professeur Bruno Bachy
Membre du jury	Professeur Marie-Laurence Poli-Merol

REMERCIEMENTS

I wish to thank the **American Memorial Hospital Foundation Inc.** (Boston USA) for their help in the field of research on facial clefts.

Merci à Monsieur H.Krug pour son assistance, sa gentillesse et sa disponibilité.

Aux Membres du jury

Au Professeur Martine Doco-Fenzy, Service de génétique, CHU Reims

Un chirurgien qui fait de la génétique... Qui l'aurait cru... Merci d'avoir accepté ce challenge et cette aventure. Merci de votre enseignement, de votre disponibilité et de votre patience. J'ai appris beaucoup et ma pratique quotidienne en a été grandement enrichie. Merci pour ce beau bagage et cette curiosité que ce travail m'a permis d'acquérir.

Au Professeur Philippe Nguyen, Chef de Service d'Hématologie, Directeur de l'EA 3801, CHU Reims

Merci de m'avoir accueilli dans votre équipe. J'ai grandement apprécié votre dynamisme, votre curiosité scientifique et votre encadrement. Je vous remercie de la confiance que vous m'avez accordée.

Au Professeur Philippe Pellerin, Service de Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique, Centre de référence Maladies Rares «Centre de référence des Malformations Cranio Maxillo Faciales Rares», CHU Lille

Merci d'avoir partagé avec moi votre passion pour la chirurgie des fentes labio-palatines. J'ai appris beaucoup de vous et vos enseignements ont été précieux.

Au Professeur Laurence Olivier-Faivre, Centre de Génétique, Centre de référence Maladies Rares « Anomalies du développement et Syndromes Malformatifs », CHU Dijon

Merci d'avoir accepté l'expertise de ce travail. J'espère qu'il vous donnera satisfaction.

Au Professeur Bruno Bachy, Chef de service de chirurgie infantile, CHU Rouen

J'ai toujours apprécié votre passion pour notre discipline, votre franc-parler et votre approche directe. Je suis certaine que mon jury s'enrichira de votre présence. Merci d'avoir accepté d'y participer.

Au Professeur Marie-Laurence Poli-Merol, Chef de service de chirurgie infantile, CHU Reims

Un jour vous m'avez dit en lisant les remerciements d'un de nos internes que « les remerciements sont le reflet de la personne qui les écrit ».

J'espère que vous verrez dans ces quelques lignes la gratitude et l'admiration que je vous porte.

A ma famille,

À ma Juliette qui pour l'instant veut être docteur pour pouvoir travailler avec sa maman... J'espère que ton métier, quel qu'il soit, pourra t'apporter autant de passion et d'épanouissement personnel que la chirurgie m'apporte. Ton amour, ton rire et ta présence sont pour moi une source incommensurable d'énergie et de bonne humeur.

A Manu qui je crois a dépassé les limites de la compréhension lors de la relecture de cette deuxième thèse... Merci pour ton aide, ta patience, et ton soutien au cours de ces 4 dernières années riches en travail, mobilité à l'étranger, déménagement et changement de carrière en tout genre...

A ma Mère qui a toujours été là tout au long de ce périple même si celui-ci n'est pas toujours très clair pour ceux qui n'en font pas partie. Tu ne m'as jamais jugée et tu m'as toujours laissée, depuis mon plus jeune âge, libre de mes choix. C'est grâce à cette autonomie que je suis capable aujourd'hui de m'adapter à toute situation. Merci pour l'éducation et les belles valeurs que tu m'as données.

A ma sœur Fany, Fred et mes nièces Zoé et Nina qui ont toujours été un soutien dans les moments d'incertitude, de découragement et de fatigue. Merci de m'avoir donné mes deux merveilleuses nièces qui sont comme Juliette mes rayons de soleil.

A mes grands parents qui ont toujours cru en moi et m'ont donné des valeurs, de l'assurance, une âme d'esthète et le goût de la curiosité.

A ma cousine Bénédicte qui est un peu pour moi comme une grande sœur. Merci pour ta belle âme, ton grand cœur et ton soutien. Merci de valoriser mon travail avec tes belles tournures. Tu fais partie intégrante de ma réussite.

A ma tante Martine qui m'a toujours comprise, soutenue et encouragée dans ce cursus.

Aux autres membres de ma famille : Brigitte, Guy, Claire, Véro, Benoît, Olivier, Marie-Sophie, Yrieix, Gigi, Tonton Jean, Jean, Nicole, Agnès, Ginette, Jean-Luc, Isabelle, Philippe, Pascal, Cécile, Jérémy, que j'embrasse tendrement.

A mon Père qui m'a inculqué l'excellence et la rigueur dont j'ai besoin pour tirer le meilleur de moi-même en tant que chirurgien. J'espère que tu aurais été fier de moi...

Aux personnes qui ont participé à ce travail

A mon service

A **Nadia** qui a traversé pour moi 1000 fois le CHU dans tous les sens pour amener toujours au bon endroit tous ces prélèvements. Merci de ta bonne humeur, de ta gentillesse et de ton efficacité.

Merci à tous ceux qui ont participé aux prélèvements

Aux IADEs, aux anesthésistes (Catherine, Hugues, Phiphi, Sylvie, et Tata Lili), aux IBODEs et infirmières du bloc, à toute l'équipe de l'hospitalisation, et à Chantal.

Une dédicace particulière pour Annette, Christine B, Guiguite qui ont partagé avec moi plus que ce travail. Merci pour votre soutien même à l'autre bout de la planète.

Aux équipes de recherche qui m'ont accueillie

Au service de génétique

Au Pr D. Gaillard : Merci de m'avoir accueillie dans votre service. J'admire votre incroyable culture « phénotypique ».

A Pauline et Christelle qui m'ont appris le métier à la paillasse. Quelle patience...

A Laurence, Nathalie et Daniel pour leurs bons soins envers mes fibroblastes.

A Emile Landais qui m'a apporté assistance technique.

A Audrey Lannoy pour sa bonne humeur, son sourire et son aide.

A Camille Leroy pour son aide dans les moments d'urgence.

A Emilie Raimond avec qui j'ai partagé des objectifs communs de recherche.

Au service d'anatomopathologie

Au Professeur P. Birembaut, au Dr S. Bellefqih, au Dr A. Durlach, Dr M. Dauphin, au Dr K. Joseph, au Dr D. Zachar, au Dr T. Galissier, au Dr V. Leroux-Kozal qui ont analysé les prélèvements et à leurs secrétaires qui ont tapé tous ces comptes rendus.

Merci pour la qualité de votre travail et votre aide.

A l'EA 3801 et au service d'Hématologie

A **Gaël et Annie** pour leur patience avec mes ARN, et surtout pour leur gentillesse et leur disponibilité tout au long de cette thèse.

A **Claire et Pascale** qui m'ont guidée dans ce travail et qui ont toujours été d'une grande aide.

Et tous les membres de l'EA avec qui je n'ai pas eu l'occasion de travailler directement sur ce projet mais qui ont toujours été ouverts aux discussions et qui les ont enrichies de leurs idées.

Aux membres de la tumorothèque et à la **Plateforme PRBI** de Reims pour leur aide logistique.

Aux membres du CPDPN de Reims,

A Elisabeth, Jean-Paul et Martine, pour leur expertise sur les diagnostics anténataux, et pour ces dernières années passées ensemble.

A Madame Coralie Barbe du DRCI pour son aide dans la rédaction des protocoles AOL et PHRC.

A Madame Alenka Alaimo de la bibliothèque universitaire de la faculté de médecine de Reims qui a vérifié ma bibliographie.

Mais aussi

A mes camarades de galère inscrits eux aussi en thèse de « science »

Thomas Guillard, Eric Nectoux, et Aurélien Binet. Je n'ai qu'une phrase à vous dire : Il faut l'avoir vécu pour savoir ce que ça représente...

Aux Médecins/Chirurgiens Montpelliérains qui ont fait de moi ce que je suis

Monsieur le Professeur Saint-Aubert, et Monsieur le professeur Averous

Mais aussi au Docteur William Jacot et au Docteur David Kéré

Aux chirurgiens pédiatres qui m'ont formée

Les docteurs Mohamed Belouadah, Marie-Agnès Bouché-Pillon, Salim Daoud, Francis Lefebvre, Gérard Lefort, Marie-Laurence Poli-Merol, ainsi que Sophie Bourelle, et Charles Senah.

Aux chirurgiens avec qui je travaille actuellement,

Au Professeur Marie-Paule Vazquez et au Professeur Arnaud Picard qui m'ont donné l'opportunité de compléter ma formation cette année au sein de leur service. Merci pour votre aide, votre implication, et votre soutien dans mes projets de carrière.

À mes copains d'internat

Xavier et Alex, Jean-Yves, Fabinouz et Fadi, Daniel, Rach et Virginie, Lolo et Sophie, Édouard et Steph, Julien et sa petite Caro, Mathieu et Prisca, et notre Thibault.

Aux internes que j'ai eu la chance d'avoir comme élève

Mag, Reda, Antoine, Aurélien, Aurélie, Elodie, Esther, Jean-Yves, Joëlle, les Guillaume, les Mathieu, Laurent, Ben, Bertrand, Alex, Charles, Yohann, Stéphanie, Les Sébastien, Lyse, Cécile, Romain, Tristan, Yassin, Kessara, Cecilia...

A mon co-chef Julien Davrou

J'ai toujours été triste de ne pas avoir eu de co-chef pendant mon clinicat de chirurgie pédiatrique. J'ai beaucoup de chance de partager cette expérience « parisienne » avec toi. Merci de ton aide, tes conseils et de ta compréhension pendant la rédaction de cette thèse.

Aux ORL à qui je suis très attachée

A Edouard Chauvet, « Merol », Philippe Clair, Marc Labrousse, et « Pascalou ».

Au Professeur Chays qui partage avec moi l'amour des livres anciens.

Aux chirurgiens qui m'ont marquée et mes Maîtres étrangers

Au Professeur Véronique Martinot qui pour moi est un modèle.

Au Docteur Romuald Werner qui m'a appris plus qu'il ne le croit.

Au Professeur Emile Dehoux qui reste pour moi un de mes maîtres.

Au Professeur Louise Caouette-Laberge qui m'a reçu à bras ouvert à Montréal.

Au Professeur Zhang Zhi-Yong et son équipe qui ont été pour moi une deuxième famille pendant mon séjour en Chine.

A mes amis plasticiens et « assimilés »

A Alexis, Clothilde, Ronan, Omar, David, Louise, et Olivier.

A la promo rémoise de P2 2010 dont je suis la marraine

Merci de cet honneur Rabelaisien et Faluchard !

Je vous souhaite à tous de réussir brillamment vos études et votre vie.

Au chef Dominique, Murielle et toute l'équipe de l'internat

Merci d'avoir pris soin de nous toutes ces années. Votre bonne humeur et votre gentillesse m'ont toujours fait du bien !

A mes amis de toujours

Mag, Fred, Maryline, Greg, Poison, et D'ion.

« Ce que j'ai écrit ici, je ne l'aurais certainement pas écrit il y a dix ans, et je ne l'écrirais peut-être plus dans quelques années. Mais les faits restent fixés par l'image, ils serviront à ceux qui feront de nouveaux progrès dans la connaissance de la malformation »

Victor Veau, 1938



RESUME

Les fentes labio-palatines (FLP) sont la malformation cranio-faciale congénitale la plus fréquente. D'origine multifactorielle, elles sont la conséquence d'un défaut de fusion des bourgeons faciaux.

Objectif et Méthodologie

L'objectif de ce travail a été d'étudier la place des gènes de l'angiogenèse dans le cadre de la piste étiologique des FL/P. La méthodologie de ce travail comportait 3 étapes :

- Une analyse systématique et exhaustive des gènes impliqués dans les FL/P comprenant les gènes identifiés mais aussi les gènes potentiellement impliqués.
- Une analyse rétrospective des explorations génétiques des FL/P opérées au CHU de Reims entre 2003 et 2009.
- La mise en place d'une analyse prospective (2009-2012, AOL) :
 - Génomique constitutionnelle par CGH Array
 - *In situ* au niveau des berges des fentes issues de déchets opératoires des chirurgies primaires des FL/P comprenant :

Le développement d'un protocole de culture cellulaire de fibroblastes

Une analyse anatomopathologique

Et surtout le développement d'un modèle d'étude *in vivo* chez l'enfant d'analyse d'expression des gènes de l'angiogenèse.

Résultats

L'analyse systématique des gènes impliqués dans les FL/P a mis en évidence 95 gènes dont plus d'une dizaine sont connus comme liés aux mécanismes d'angiogenèse (facteurs de croissance et protéases). Ces derniers sont en interaction entre eux mais aussi avec 18 autres gènes impliqués eux aussi dans les FL/P. Ainsi au total 1/3 des gènes d'intérêt sont soit des gènes de l'angiogenèse soit en lien avec eux.

L'étude rétrospective nous a permis de mettre en exergue certaines formes cliniques originales qui ont été étudiées et publiées sous un angle « étiologique ».

L'étude prospective nous a permis, après obtention des consentements, d'inclure 72 patients (30 FLP, 24FL, 18FP) opérés au CHU de Reims entre 2009 et 2012 d'une chirurgie primaire.

Nous présentons :

- nos résultats anatomopathologiques, et génétiques (CGH Array)
- notre protocole de culture cellulaire

- nos réflexions, notre cheminement aboutissant à la création du modèle d'étude d'analyse d'expression des gènes de l'angiogenèse

Discussion

La littérature a bien mis en avant une implication des phénomènes angiogéniques dans la constitution des FL/P par le biais des facteurs de croissance (*TGF β* , *PDGF C et Ra*, *FGF*, *TGFA*, *FGFR1*, *FGFR2* ; *VEGF*) et des protéases (*MMP/TIMP2*). L'ensemble de nos manipulations *in situ* nous permet aujourd'hui de disposer du matériel nécessaire pour l'étude de l'expression des facteurs impliqués dans l'angiogenèse sur les berges des fentes.

Parallèlement, l'étude génomique constitutionnelle en CGH Array a permis de retrouver des variations non-connues comme polymorphiques chez 62% de nos patients. Des études familiales vont compléter notre travail. Elles permettront de savoir si ces CNV sont héritées ou *De Novo* et ainsi de préciser leur caractère bénin ou pathologique. L'identification chez un de nos patients d'une amplification, même de petite taille, du gène *SKI* (gène lié à la voie des *TGF β*) nous encourage dans la poursuite de nos recherches d'anomalies constitutionnelles des gènes de l'angiogenèse dans les FL/P

La CGH array est une technique qui nous a paru particulièrement utile et fiable en terme de « scanning » et de dépistage.

En conclusion, en pratique clinique, la découverte des anomalies préalablement certainement sous estimées par les cliniciens doit nous mener à une nouvelle réflexion sur le conseil génétique et sur l'utilité dans l'avenir d'un dépistage plus systématique.

Mots clef :

Fente labiale, fente palatine.

Etiologie, génétique, angiogenèse, CGH Array,

Chirurgie plastique, chirurgie cranio-faciale, Chirurgie pédiatrique, Procédure de chirurgie maxillo-faciale et buccodentaire.

Intitulé et adresse de l'unité de recherche :

EA 3801 dirigé par Monsieur le Professeur Philippe Nguyen

Laboratoire d'hématologie

Hopital Robert Debré

Avenue du Général Koenig

51100 REIMS

France

ABSTRACT

Cleft lip-palate : Genetic-etiologic approach and role of gene expression in angiogenesis. Development of an vivo study model in children.

Cleft lip and palate (CLP) are the most common congenital craniofacial malformation. They have a multifactorial etiology and are the consequence of incomplete fusion of the facial buds.

Objective and Methodology

The objective of this work was to study the role of the genes of angiogenesis in the framework of studying the etiology of CL/P. Our methodological approach included 3 steps:

- Systematic and thorough analysis of the genes involved in CL/P including identified genes but also genes that could be potentially involved.
- A retrospective analysis of the operated clefts at the University Hospital of Reims between 2003 and 2009.
- Implementation of a prospective analysis (2009-2012, AOL):
 - Constitutional genomic study by CGH Array
 - In situ with tissue specimens extracted from surgically excised cleft edges including:
 - The development of a protocol for fibroblast cell cultures
 - Histopathological analysis
 - And above all the development of an in vivo study model in children for analyzing the expression of genes of angiogenesis.

Results

The systemic analysis of genes involved in cleft lip palate unveiled 95 genes including about ten that are known to be related to angiogenesis mechanisms (growth factor and proteases). These genes interact between themselves but also with 18 other genes also involved in CL/P. In all, 1/3 of relevant genes are either angiogenesis-related genes or in direct relation with them.

The retrospective study permitted to underline the some original clinical forms that were studied and published under an « etiologic » angle.

The prospective study included 72 patients (30 CLP, 24CL, 18CP), for whom we obtained informed signed consents, operated at the University Hospital of Reims between 2009 and 2012 for primary cleft surgery.

We present:

- Our histopathological and genetic results (CGH Array)
- Our cell culture protocol (submitted for publication)
- Our approaches and thought process behind the design of a study model for analyzing expression profiling of angiogenic genes

Discussion

The literature has highlighted the role of angiogenesis in the formation of cleft lip/palate via growth factors (*TGF β* , *PDGF C and Ra*, *FGF*, *TGFA*, *FGFR1*, *FGFR2*, *VEGF*) and proteases (*MMP/TIMP2*). All our manipulations *in situ* have yielded the necessary material, i.e. edges of resected clefts, to study the expression of factors involved in cleft angiogenesis.

In parallel, the constitutional genomic study in CGH Array enabled to uncover abnormalities in 62% of our patients. Family studies will complete our work. They will help to refine if these CNV are inherited or de novo and thus indicate their benign or pathological nature. In one of our patients, the identification of the *SKI* gene (related to the *TGF β* pathway) encourages us to continue our research of genetic abnormalities of angiogenic genes involved in cleft lip/palate. CGH array appeared to be a very useful and reliable method in terms of scanning and screening.

In conclusion, in clinical practice, the discovery of abnormalities which were probably underestimated by clinicians before, leads us to rethink the issue of genetic counseling and the relevance of a more systematic screening for these abnormalities in the future.

Keywords :

Cleft lip, cleft palate,

Etiological, genetics, angiogenesis, CGH Array,

Plastic surgery, Cranio-facial Surgery, Pediatric surgery, maxillo-facial and oral surgical procedure.

TABLES DES MATIERES

REMERCIEMENTS	3
RESUME	15
ABSTRACT	17
TABLES DES MATIERES	19
TABLE DES MATIERES DES FIGURES	23
TABLE DES MATIERES DES TABLEAUX	27
TABLE DES ABREVIATIONS	29
INTRODUCTION	31
I. EMBRYOLOGIE	33
A. Embryologie générale	33
B. Embryologie du pôle céphalique	39
1. Embryologie de la lèvre (4 ^{ème} sem- 7 ^{ème} sem)	39
2. Embryologie du palais (6 ^{ème} sem- 11 ^{ème} sem)	41
a) Embryologie du palais primaire (6 ^{ème} sem-7 ^{ème} sem)	41
b) Embryologie du palais secondaire (7 ^{ème} sem-11 ^{ème} sem)	42
3. Embryologie de la bouche embryonnaire	45
C. Embryologie pathologique	45
II. RAPPELS ANATOMO-CLINIQUES	46
A. Anatomie descriptive normale	46
1. La lèvre supérieure	46
a) Plan superficiel	47
b) Plan musculaire	47
c) Face muqueuse	49
d) La vascularisation	49
2. Squelette osseux	50
3. Le nez	50
4. Ensemble bouche/nez	53
5. Le palais	53
B. L'anatomie pathologique	55
C. Formes cliniques	58
III. EPIDEMIOLOGIE	59
A. Prévalence	59
B. Récurrence	61
C. Facteurs de risques	62
1. Facteurs environnementaux	62
a) Tabac	63
b) Alcool	63
c) Acide foliques et vitamines	63
d) Stéroïdes	64

e) Anticonvulsivants	64
2. Les facteurs génétiques	65
a) Anomalies chromosomiques	66
b) Génomique et fentes labiales et/ou palatines: les gènes identifiés	66
c) Expressivité variable selon la localisation anatomique	66
3. Interaction génétique et environnement	67
IV. ANGIOGENESE	69
A. Définition	69
B. Implication dans l'embryologie	70
C. Facteurs activateurs et inhibiteurs de l'angiogenèse	73
D. Angiogenèse et malformations congénitales cranio-faciales	75
1. Vaisseaux et morphogénèse faciale	75
2. Facteurs de croissance et fentes	76
3. Traitement anti-angiogénique et fentes	78
<u>HYPOTHESES, PROBLEMATIQUES ET PLAN D'ETUDE</u>	79
I. HYPOTHESES DE TRAVAIL	79
II. PROBLEMATIQUES	80
A. Génétique et fente labio-palatine	80
B. Modèle	80
C. Place de l'angiogenèse dans la genèse des fentes faciales	80
D. Taille des échantillons	81
1. Culture cellulaire de fibroblaste	81
2. Extraction d'ARN	81
III. PLAN D'ETUDE	82
<u>1ERE PARTIE : ANALYSE DES GENES IDENTIFIES OU POTENTIELLEMENT IMPLIQUES DANS LES FENTES LABIO-PALATINES</u>	83
I. FENTES LABIALES ET/OU PALATINES : GENES IDENTIFIES ET VOIES DE SIGNALISATION	87
A. Gènes identifiés	87
1. <i>TBX1</i>	88
2. <i>IRF6</i>	89
3. <i>TP63</i>	90
4. <i>PVRL1</i>	90
5. <i>TBX22</i>	91
6. <i>FGFR2</i>	92
7. <i>MSX1</i>	92
8. <i>SUMO1</i>	93
9. <i>FOXE1</i>	93
10. <i>SATB2</i>	94
11. <i>CRIPSPLD2</i>	94
12. <i>TBX10</i>	95
13. <i>SPRY2</i>	95
14. <i>RYK</i>	95
B. Les voies de signalisation	96
1. TGF	96
2. BMP	96
3. WNT	97
4. FGF	98
5. SHH	98

II. FENTES LABIALES ET/OU PALATINES SYNDROMIQUES ET NON SYNDROMIQUES: SYNTHÈSE DES GENES IDENTIFIÉS ET DES GENES POTENTIELS	99
A. Localisation des gènes potentiels et identifiés dans les FL/P	101
B. Synthèse des données générales sur les gènes potentiels et impliqués dans les FL/P	104
C. Analyse de l'implication des gènes potentiels et d'intérêt des FL/P	110
III. FENTES LABIALES ET/OU PALATINES SYNDROMIQUES ET NON SYNDROMIQUES : GENES POTENTIELS OU IDENTIFIÉS AYANT UNE IMPLICATION DANS LES PROCESSUS D'ANGIOGENÈSE	115
A. Facteurs de croissance	115
1. Voie des TGF	115
a) <i>TGFA</i>	115
b) <i>TGFβ</i>	116
2. PDGFC et PDGFRa	121
3. FGF et FGFR	122
B. Enzymes protéolytiques : MMP et TIMP2	123
2EME PARTIE : ETUDE RETROSPECTIVE	125
<hr/>	
I. POPULATION D'ETUDE	127
A. Fente labio-palatine et génétique anténatale	127
B. Fente labio-palatine et conseil génétique	127
II. RESULTATS	128
A. Fente labio-palatine et génétique anténatale	128
B. Fente labio-palatine et conseil génétique	131
1. Place du conseil génétique : étude rétrospective	131
2. Formes cliniques d'intérêts	133
a) Forme familiale de fente palatine et cataracte	133
b) Etude des cas d'association fente palatine et tératomes cervicaux faciaux	139
3EME PARTIE : ETUDE PROSPECTIVE	143
<hr/>	
I. MATERIEL ET METHODE	145
A. Population concernée par l'AOL	145
B. Prélèvements et matériel d'étude	146
1. Analyse constitutionnelle : prélèvement de sang circulant	146
2. Analyse <i>in situ</i> : prélèvement de berge de FL	146
3. Analyse <i>in situ</i> : prélèvement de berge de FP	147
4. Prélèvements témoins	148
C. Exploitation des prélèvements	149
1. Etude constitutionnelle de l'ADN de sang circulant en CGH Array	149
a) Extraction d'ADN sur sang circulant	149
b) Purification de l'ADN génomique par Traitement à la RNase	149
c) Contrôle qualité : Migration sur gel d'Agarose 1%	149
d) CGH Array	149
2. Exploitations des prélèvements des berges des FLP	152
a) Développement d'un protocole de culture cellulaire de fibroblaste	152
b) L'analyse anatomopathologique des berges de FL/P.	152
c) Le développement d'un modèle d'étude <i>in vivo</i> d'analyse d'expression des gènes de l'angiogenèse chez l'enfant porteur de FL/P.	153
II. RESULTATS	157
A. Etude de cohorte des patients Rémois	157
B. CGH Array sur sang circulant	163
1. Analyse descriptive globale	163
2. CNV bénins ou CNV pathogéniques ?	166
C. Analyse ciblée au niveau des berges	174

3. Anatomopathologie	174
a) Berge de FL	174
b) Berge de FP	180
4. Culture cellulaire sur prélèvements de berges de fentes faciales	186
5. Développement d'un modèle d'étude <i>in vivo</i> chez l'enfant d'analyse d'expression des gènes de l'angiogenèse dans les FL	195
a) Développement d'une technique d'extraction d'ARN sur prélèvements de berges de FL/P chez l'enfant	195
- Optimisation de l'extraction d'ARN sur petit échantillon (ganglion et prépuce)	196
- Extraction d'ARN sur une première série de berges de FL	197
- Extraction d'ARN sur les prélèvements témoins	200
b) Choix bibliographique des gènes d'intérêt et perspectives	202
c) Développement du protocole technique	203
DISCUSSION	205
CONCLUSION	221
ANNEXES	223
I. PROTOCOLES DE LABORATOIRE	225
A. Extraction d'ADN selon le protocole Qiagen	225
B. Purification de l'ADN génomique par Traitement à la RNase	227
C. Contrôle qualité de l'ADN par Migration sur gel d'Agarose 1%	228
D. Protocole d'analyse du sang circulant par CGH ARRAY	230
E. Analyses anatomopathologiques des berges de FLP	240
F. Protocoles d'extraction ARN	243
G. Quantification et qualification de l'ARN	245
II. PROTOCOLES DE RECHERCHE	249
A. AOL 2010	249
B. Projet PHRC Jeune chercheur 2013	253
C. Projet séquençage haut débit 2012	259
III. ARTICLE COMPLEMENTAIRE	269
IV. PRESENTATIONS EN CONGRES	281
BIBLIOGRAPHIE	283

TABLE DES MATIERES DES FIGURES

Figure 1: Coupes sagittales d'un embryon humain à 16 jours, 18 jours, 22 jours et à la fin du premier mois. (Carlson BM, 2009)	33
Figure 2: Coupes sagittales de l'extrémité craniale entre le 18 ^{ème} et le 22 ^{ème} jour.	33
Figure 3: Place des gènes majeurs impliqués dans le développement embryonnaire	34
Figure 4: Embryon humain de 30 jours vue au microscope électronique. (Jirasek JE, 1983)	35
Figure 5 : Embryon humain vue de face durant la 4 ^{ème} semaine montrant la rupture de la membrane oropharyngé (Carlson BM, 2009)	35
Figure 6: Aspect de l'organisation de la région de la membrane pharyngée de l'embron humain de profil à la fin du 1er mois	35
Figure 7: Vue latérale d'un embryon humain. Organisation de la tête et du pharynx au 30 ^{ème} jour (Carlson BM, 2009)	36
Figure 8: Aspect d'un embryon humain vue de profil durant la 4 ^{ème} semaine embryonnaire (Carlson BM, 2009)	36
Figure 9: Formation de la face. Vue de face de l'extrémité céphalique d'un embryon humain entre la 4 ^{ème} sem et la 8 ^{ème} sem embryonnaire. (Carlson BM, 2009)	37
Figure 10: Distribution des crêtes neurales chez l'homme au niveau de la face et du cou	38
Figure 11: Schéma de la neurulation (Gammill LS, 2003)	38
Figure 12: Migration des cellules de la crête neurale issues du mésencéphale et des rhombomères (Carlson BM, 2009)	38
Figure 13: Synthèse des périodes de sensibilité tératogénique des différents organes au cours de l'embryogenèse et de la fœtogénèse (Carlson BM, 2009)	39
Figure 14: Face d'un embryon humain au microscope électronique à balayage au 42 ^{ème} jour (Couly G, 2012)	40
Figure 15 : Schéma de la migration des cellules de la crête neurale, répartition des différents bourgeons (Couly G, 2012)	40
Figure 16: Vue inférieure du palais chez un enfant à terme. Délimitation des palais primaire (vert) et secondaire (violet)	41
Figure 17 : Palais secondaire lors de la 7 ^{ème} semaine : fusion des procès palatins (Couly G, 2012)	42
Figure 18: Schéma en plan coronal du processus de fusion palato-nasal (Carlson BM, 2009)	43
Figure 19: Vue inférieure de la voute palatine lors de sa formation. A partir de la 6 ^{ème} semaine et jusqu'à la fin de son développement. (Carlson BM, 2009)	43
Figure 20: Formation du palais sur coupes sagittales	43
Figure 21: Fermeture du palais secondaire (palais mou) Palais en vue inférieure	44
Figure 22: Coupe frontale du pole céphalique d'un embryon humain montrant la fusion des lames palatines (A, B,) (Carlson BM, 2009)	44
Figure 23: Schéma de l'ensemble lèvre-nez-palais en vue inférieure représentant les différentes formes de FL/P	45
Figure 24: Lèvre normale chez l'enfant	46
Figure 25 : Anatomie musculaire de la région péribuccale et du nez vue de face (Sobotta J, 1994)	48
Figure 26 : Anatomie musculaire de la région péribuccale et du nez vue de profil (Sobotta J, 1994)	49
Figure 27: Schéma la vascularisation des lèvres sur une vue de face chez l'homme (Millard RJ, 1977)	50
Figure 28: Répartition anatomique de l'arcade vasculaire artérielle au niveau du philtrum	50
Figure 29 : Anatomie du squelette et du cartilage du nez vue de 3/4 (Pavy B, 1998)	51
Figure 30 : Anatomie des cartilages alaires et du muscle nasal au niveau du seuil narinaire (Pavy B, 1998)	52

Figure 31 : Anatomie du nez : squelette, muscles et cartilages. Vue de face (Pavy B, 1998)	52
Figure 32: Schémas de l'ensemble lèvres/nez de face. (Pellerin P)	53
Figure 33: Planche anatomique du palais osseux en vue inférieure (Millard RJ, 1977)	54
Figure 34 : Anatomie musculaire, nerveuse et vasculaire du palais normal chez l'adulte en vue inférieure bouche ouverte avec dissection de la fibromuqueuse du côté gauche jusqu'au plan vasculaire (Netter FH, 2011)	55
Figure 35: Anomalies anatomiques constatées en cas de FLP totale gauche	55
Figure 36: Schéma de face de la vascularisation des lèvres et du nez chez un enfant porteur d'une FLP Gauche (Millard R, 1977)	56
Figure 37 : Description de l'anatomie pathologique en cas de division vélo-palatine (Bentz ML, 2008)	57
Figure 38: FL isolée fruste droite	58
Figure 39 : Schéma d'une fente vélo-palatine vue de dessous	58
Figure 40: Photographie d'une fente vélo-palatine vue de dessous bouche ouverte	58
Figure 41 : Fente vélaire	58
Figure 42 : FLP totale unilatérale droite	59
Figure 43 : FLP totale bilatérale	59
Figure 44: Prévalence des FL/P par zone géographique (pour 10 000 naissances) (IPDTC, 2011)	61
Figure 45 : Proportion de formes isolées de FL/P selon l'origine géographique (IPDTC, 2011)	61
Figure 46: Localisation topographique et chronologique de l'expression des gènes pendant la palatogenèse (Stanier P, 2004)	67
Figure 47: Rôle chronologique des principaux gènes pendant la palatogenèse (Kouskoura T, 2011)	67
Figure 48: Schéma de la maturation d'un vaisseau (Hanahan)	70
Figure 49 : Schéma explicatif des différentes étapes de l'angiogénèse.	70
Figure 50: Schéma illustrant la formation du système vasculaire durant l'embryogenèse.	71
Figure 51: Stade 8 et 9 de Carnegie chez un embryon humain.	71
Figure 52 Développement vasculaire embryonnaire (Coultas L, 2005)	72
Figure 53: Etapes de la vasculogénèse (Darland DC, 1999-2001)	73
Figure 54 : Schéma d'embryon au 29 ^{ème} jour et à la 8 ^{ème} sem du système vasculaire, dont l'artère stapédienne (Larsen WJ, 1996)	76
Figure 55: Anomalie de développement du palais chez la souris (Kouskoura T, 2011)	77
Figure 56 Diagnostic de micro-délétion 22q11 par FISH sonde BCs ou PACs	88
Figure 57 : Fistules de lèvres inférieures rentrant dans le cadre de syndrome de Van Der Woude	89
Figure 58 Expression de mRNA <i>PVRL1</i> au niveau du palais durant l'embryogénèse chez la souris par hybridation <i>in situ</i> (Suzuki K, 2000)	91
Figure 59: Interactions entre les voies de signalisation Wnt et BMP	97
Figure 60: Cartographie des gènes impliqués dans la littérature dans les FLP S et NS chez l'homme	101
Figure 61: Synthèse de fonction des gènes TGFbeta, et PDGFc (entre autres) lors de de l'embryogénèse (Zhu X, 2012)	117
Figure 62: Voie de signalisation TGF Beta et BMP	118
Figure 63: Voie TGFβ simplifiée spécifiant l'articulation entre les différentes isoformes (Iwata J, 2011)	119
Figure 64: Schéma de synthèse répertoriant le moment du conseil génétique et le type d'analyse et de résultats obtenus	131
Figure 65: Schéma de synthèse d'objectif d'utilisation des différents prélèvements réalisés au cours de la chirurgie primaire	146

Figure 66 : Schéma opératoire de la chéiloplastie primaire selon la technique de Tennison modifié Malek. Les déchets opératoires issus de la plastie sont en couleur.	147
Figure 67 : Schéma opératoire d'une FLP. Les déchets opératoires issus de l'avivement de la lchette sont en couleur.	147
Figure 68: Schéma descriptif de la zone de prélèvement des échantillons témoins lors de la chirurgie primaire de lèvre (chéiloplastie)	149
Figure 69 : Schéma descriptif de la technique de CGH-Array	151
Figure 70: Exemple de résultats de CGH Array. Présence d'une délétion sur le chromosome 17 p12 correspondant à une délétion de 1342pb du gène <i>PMP22</i>	151
Figure 71: Répartition des formes cliniques de fentes (FL, FP, FLP) inclus dans l'AOL	157
Figure 72: Fréquence et type des antécédents familiaux de FL/P	158
Figure 73: Taux de diagnostic anténatal de FL/P en fonction de la forme clinique	158
Figure 74: Répartition des formes syndromiques (S) et non syndromiques (NS) dans la population de patients inclus dans l'AOL	160
Figure 75: Répartition des anomalies associées en cas de forme syndromique.	162
Figure 76: Répartition du type d'anomalies retrouvées en CGH Array d'après le logiciel d'analyse chez 46 FL/P (puces 180k)	163
Figure 77: Délétion en 17p12 de 1342pb gène <i>PMP22</i> (CGH Array Pucés 180k)	167
Figure 78: Délétion Xp22.33/Yp11.32 de 315kb gène <i>SHOX</i> (CGH Array Pucés 180k)	169
Figure 79: Amplification en 1p36.33 de 35 pb gène <i>SKI</i> (CGH Array Pucés 180k)	171
Figure 80: Amplification en 5q32.2 de 42 pb gène <i>MSX2</i> (CGH Array Pucés 180k)	172
Figure 81: Délétion de 31kb en 22q12.3 gène <i>LARGE</i> (CGH Array Pucés 180k)	172
Figure 82: Amplification interstitielle en Xq13.3 gène <i>KIAA2022</i> (CGH Array Pucés 180k)	174
Figure 83: Aspect berge externe de fente labiale unilatérale (HES x 63) : versant muqueux / surface / muqueuse (épithélium) malpighienne hyperplasique et chorion fibreux	176
Figure 84: Aspect berge externe fente labiale (HES x 100) : hyperplasie de l'épithélium malpighien muqueux, chorion fibreux, et en profondeur muscle strié en coupe longitudinale.	176
Figure 85: Hyperplasie sébacée (HES x 63) sur prélèvement de berge externe de fente labiale (NB : présence d'un peu d'épiderme tout en haut à gauche)	177
Figure 86: Hyperplasie sébacée au fort grossissement (HES x 250) sur prélèvement de berge externe de FL (NB : une petite tige pileuse en haut à droite).	177
Figure 87: Plan musculaire strié bien constitué avec présence en profondeur d'un nerf hypertrophique (HES x 250) (FL berge externe)	178
Figure 88: Aspect du muscle strié (striations croisées) sur berge de FL. (coupes longitudinales HES X400)	178
Figure 89: Berge interne de fente labiale (HES x 100) : versant cutané / surface / épiderme, annexe pileuse bien orientée, hyperplasie sébacée, 2 gros vaisseaux en profondeur.	179
Figure 90: Immunomarquage anti-CD31 x 63 (sur l'automate Ventana Benchmark XT) confirmant la présence d'une malformation capillaire selon la classification ISSVA (aspect histologique de microangiome capillaire) au niveau d'un prélèvement de fente labiale gauche berge externe.	180
Figure 91 : Schéma opératoire d'une FLP. Les déchets opératoires issus de l'avivement de la lchette sont en couleur.	181
Figure 92: Hyperplasie de l'épithélium malpighien muqueux, 2 lobules salivaires accessoires en profondeur dans le chorion fibreux dans le cadre de prélèvement de berge de fente vélaire HES x 25	182
Figure 93: Œdème du chorion sur berges de fentes vélo-palatines (Veau type I) (HES x 250)	183
Figure 94: Hyperpigmentation muqueuse associant des mélanocytes dendritiques intra-épithéliaux et des mélanophages dans le chorion. (Fontana X 250) chez une patiente à peau noire porteuse d'une fente vélaire	183

Figure 95: Aspect d'hypoplasie musculaire sur prélèvement de FVP. Quelques myocytes striés en coupe transversale dans du chorion fibreux, sans plan musculaire constitué. Capillaires superficiels sous l'épithélium, en profondeur vaisseaux de moyen calibre (artérioles et veinules). HES x 100	184
Figure 96: Aspects des myocytes striés en coupe transversale dans du chorion fibreux (HES x 250)	184
Figure 97 et Figure 98: Aspect des capillaires superficiels, sanguins congestifs et lymphatiques dilatés dans un chorion fibro-œdémateux dans le cadre de prélèvements de berge de fente vélo-palatine (Veau Type I) HES x 100	184
Figure 99: Aspect des glandes salivaires séromuqueuses dans le cadre de prélèvement de berge de fente vélaire HES x 250. Acini séreux rouges, acini muqueux bleuâtres, acini mixtes.	185
Figure 100: Pistolet de pulvérisation utilisé pour le temps de lyse cellulaire (première phase de l'extraction d'ARN)	197
Figure 101: Schéma de synthèse de l'articulation entre les différents gènes de l'angiogenèse impliqués dans la genèse des FL/P	212
Figure 102: Aspect histologique de malformation capillaire chez l'enfant dans le cadre des angio-kératomes	214
Figure 103: Aspect histologique berge palatine (HES) (Enjolras O, 2007)	214
Figure 104: Bain Marie 70°C	225
Figure 105: Colonne Qiagen extraction ADN	226
Figure 106: Centrifugeuse Jouan GR 4 22	226
Figure 107: Aspect de la colone d'extraction du protocole Quiagen	226
Figure 108: Nanodrope sepctophotomètre 1000TM	227
Figure 109: Aspect de courbe typique d'ADN pur après extraction (analyse au Nanodrope)	227
Figure 110: Migration sur gel d'Agarose 1% dans le cadre du control qualité après extraction d'ADN	229
Figure 111 : Positionnement de la lame dans les cassettes	237
Figure 112 : Mise en place des cassettes dans le scanner pour analyse CGH Array	237

TABLE DES MATIERES DES TABLEAUX

Tableau 1: Registre international classé par ordre géographique, des années d'inclusion dans l'étude, du nombre total de naissance, du nombre total de cas de FL/P, ainsi que du calcul de la prévalence pour 10 000 naissances avec un intervalle de confiance de 95% (IPDTC, 2011)	60
Tableau 2 : Facteur de risques environnementaux des FL/P NS (Stuppia L, 2011)	63
Tableau 3 Possible interactions gène-environnement impliquées dans la palatogenèse des FL/P (Stuppia L, 2011)	68
Tableau 4 : Principaux médiateurs de l'angiogenèse	74
Tableau 5 : Principaux inhibiteurs de l'angiogenèse	74
Tableau 6: Résultats de l'étude sur les effets tératogènes du SUTENT® chez le lapin	78
Tableau 7: Synthèse des gènes identifiés dans les FL/P NS	87
Tableau 8: Classification des gènes candidats des FL/P NS selon leur famille et fonction (Kohli SS, 2012)	87
Tableau 9: Gènes référencés dans la littérature en rapport avec les FLP, classées par localisation chromosomique	101
Tableau 10: Nom, localisation, No OMIM, taille, fonction, et bibliographie en rapport avec les gènes référencés dans la littérature comme associés aux FL/P (gènes classées par ordre alphabétique)	104
Tableau 11 Synthèse des Phénotypes, types d'anomalies génétiques identifiées, liens avec d'autres gènes ou voies de signalisation, existence d'interactions environnementales, d'études familiales ou maternelles, de modèles animaux ou fœtaux liés aux gènes référencés dans la littérature comme associés aux FLP (gènes classées par ordre alphabétique)	110
Tableau 12: Fentes labio-palatines et conseil génétique anténatal au sein du CHU de Reims 2009-2012	129
Tableau 13: Synthèse des examens fœto-pathologiques des FL/P réalisés au CHU de REIMS entre 2009 et 2012	130
Tableau 14: Résultats des CGH Array réalisées dans le cadre de l'étude rétrospective (2003-2008) des FL/P NS	132
Tableau 15: Contexte environnemental prénatal des patients porteurs de FL/P inclus dans l'étude	157
Tableau 16: Synthèse des différentes formes cliniques de FL/P incluses dans l'étude	159
Tableau 17: Description clinique des FLP incluses dans l'étude	159
Tableau 18: Description clinique des FL I incluses dans l'étude	159
Tableau 19: Description clinique des FP I (FV et FVP) incluses dans l'étude	159
Tableau 20: Description des anomalies cliniques rencontrées dans les formes syndromiques selon leur origine.	162
Tableau 21: Age moyen, minimum et maximum de la chéiloplastie et de la staphylorrhaphie	162
Tableau 22: Description des formes cliniques des patients porteurs de FL/P ayant bénéficiés d'une analyse par CGH Array	163
Tableau 23: Description du type et de la fréquence des anomalies (délétions et amplifications) retrouvées en CGH Array chez 46 cas de FL/P	164
Tableau 24: Synthèse des 40 variations non connues comme polymorphiques CGH Array sur sang circulant de 30 cas de FL/P S et NS	164
Tableau 25: Synthèse des anomalies de plus de 150 Kb en cas de délétion et de 200Kb en cas d'amplification	166
Tableau 26: Résultats des analyses histologiques des berges de FL	174
Tableau 27: Synthèse des résultats anatomopathologiques des 24 cas de berges de FP analysées.	181

Tableau 28: Synthèse des techniques, protocoles, résultats et modifications apportées dans le cadre des premières extractions d'ARN sur ganglions visant à optimiser la technique d'extraction _____	196
Tableau 29: Synthèse des techniques, protocoles, résultats et modifications apportées dans le cadre de la deuxième phase d'extraction d'ARN réalisé sur prépuce (après la première phase d'optimisation sur des prélèvements ganglionnaires) visant à optimiser la technique d'extraction _____	197
Tableau 30: Synthèse des résultats d'extraction d'ARN sur berges de fentes labiales chez 10 patients _____	198
Tableau 31: Synthèse de la 1 ^{ère} série de résultats d'extraction d'ARN sur prélèvements témoins patients _____	200
Tableau 32: Synthèse de la 2 ^{ème} série de résultats d'extraction d'ARN sur pool de prélèvements témoins _____	201
Tableau 33: Gènes d'angiogenèse d'intérêt sélectionnés pour analyse d'expression au niveau des berges de fentes labio-palatines _____	202
Tableau 34: Tableaux de recueil de données pour 8 patients _____	231
Tableau 35: Quantité de réactifs nécessaire pour la préparation du mix utilisé pour la digestion enzymatique _____	232
Tableau 36: Synthèse des différentes étapes température, temps selon le type de lames utilisées ____	232
Tableau 37: Récapitulatifs des réactifs utilisés pour la CGH Array _____	233
Tableau 38: Quantité des réactifs utilisés pour l'hybridation génomique comparative sur lame selon le type de lame utilisée _____	234
Tableau 39: Composition des bains utilisés pour le lavage post-hybridation _____	235

TABLE DES ABREVIATIONS

CCB Cataracte Congénitale Bilatérale

CNV Variations du Nombre de Copies

CPDPN Centre Pluri Disciplinaire de Diagnostic Prénatal

DAN Diagnostic Anté-Natal

FE Facteurs Environnementaux

FIV Fécondation *In Vitro*

FL Fente Labiale

FL I Fente Labiale Isolée

FLA Fente Labio-Alvéolaire

FLN Fente Labio-Narinaire

FLP Fente Labio-Palatine

FLP I Fente Labio-Palatine Isolée

FL/P Fente Labiale et/ou Palatine

FLMP Fente Labio-Maxillo-Palatine

FP Fente Palatine

FP I Fente Palatine Isolée

FSM Fente Sous Muqueuse

FV Fente Vélaire

FVP Fente Vélo-Palatine

MEC Matrice Extra-Cellulaire

NS Non Syndromique

S Syndromique

INTRODUCTION

Les fentes labio-palatines (FL/P) sont des pathologies ancestrales, et multi-ethniques. Elles sont la conséquence d'un défaut de fusion des bourgeons faciaux en début de grossesse.

Malgré leur fréquence (prévalence : 9,92/ 10 000) et leur « ancienneté », l'étiologie de cette pathologie est encore incomplètement expliquée. La piste multifactorielle est toutefois reconnue de tous. Des facteurs génétiques et environnementaux ainsi que des interactions entre ces deux derniers facteurs ont été mis en cause.

L'objectif principal de notre travail a été de nous intéresser à l'étiologie des FL/P. Parmi les pistes étiologiques, nous avons souhaité travailler sur la piste génétique, et plus exactement sur la place que pourraient occuper les gènes de l'angiogenèse dans la genèse de cette pathologie.

Après une introduction sur les FL/P, la génétique et l'angiogenèse, nous aborderons la présentation des hypothèses de travail et de nos problématiques. La thèse sera ensuite présentée en 3 parties correspondant aux 3 étapes de notre méthodologie :

- Première partie : Analyse systématique et exhaustive des gènes impliqués dans les FL/P comprenant les gènes identifiés mais aussi les gènes potentiellement impliqués.
- Deuxième partie : Analyse rétrospective des explorations génétiques des FL/P opérées au CHU de Reims entre 2003 et 2009.
- Troisième partie : Analyse prospective (2009-2012, AOL):

- Génomique constitutionnelle par CGH Array

- *In situ* au niveau des berges des fentes issues de déchets opératoires des chirurgies primaires des FL/P comprenant :

- Le développement d'un protocole de culture cellulaire de fibroblastes

- Une analyse anatomopathologique

- Et surtout le développement d'un modèle d'étude *in vivo* chez l'enfant d'analyse d'expression des gènes de l'angiogenèse (extraction d'ARN, choix de gènes d'intérêt).

Nous concluons ce travail par une discussion et la présentation des perspectives.

I. EMBRYOLOGIE

Pour bien comprendre les mécanismes impliqués dans la genèse des FL/P il est important de connaître l'embryologie de l'extrémité céphalique dont la face et le palais font partie. Avant de débiter cette description spécifique nous ferons un petit rappel d'embryologie générale pour situer de manière chronologique la formation du système vasculaire et de l'extrémité céphalique.

A. Embryologie générale

Le système vasculaire (dont le cœur) fait partie des systèmes le plus précocement formés durant la vie embryonnaire. Dès le 19^{ème} jour des ébauches vasculaires (tube endocardique) se mettent en place dans l'aire précardiaque, située en avant et latéralement par rapport à la plaque neurale et à la membrane pharyngée. (Fig 1)

La membrane oropharyngée accompagne la rotation du tube cardiaque primitif. (Fig 2)

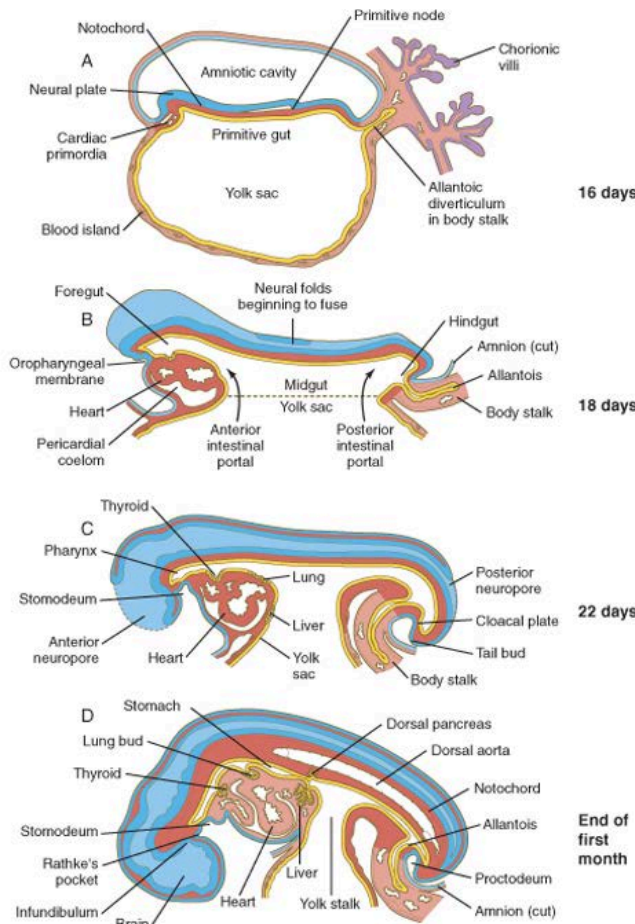
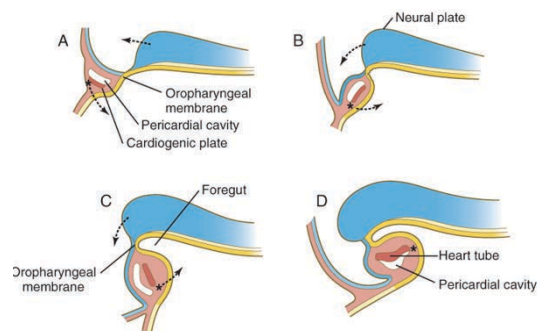


Figure 1: Coupes sagittales d'un embryon humain à 16 jours, 18 jours, 22 jours et à la fin du premier mois. (Carlson BM, 2009)

Figure 2: Coupes sagittales de l'extrémité craniale entre le 18^{ème} et le 22^{ème} jour.

Ces schémas montrent la rotation à 180° du tube primitif cardiaque lors de la croissance de l'extrémité cranial.

(Carlson BM, 2009)



Le développement embryonnaire est un mécanisme complexe qui est régi par un ensemble de gènes régulateurs, comprenant des signaux moléculaires, des facteurs de transcription et des gènes effecteurs. Le schéma ci-dessous souligne la chronologie et la localisation de des gènes principaux. (Fig. 3)

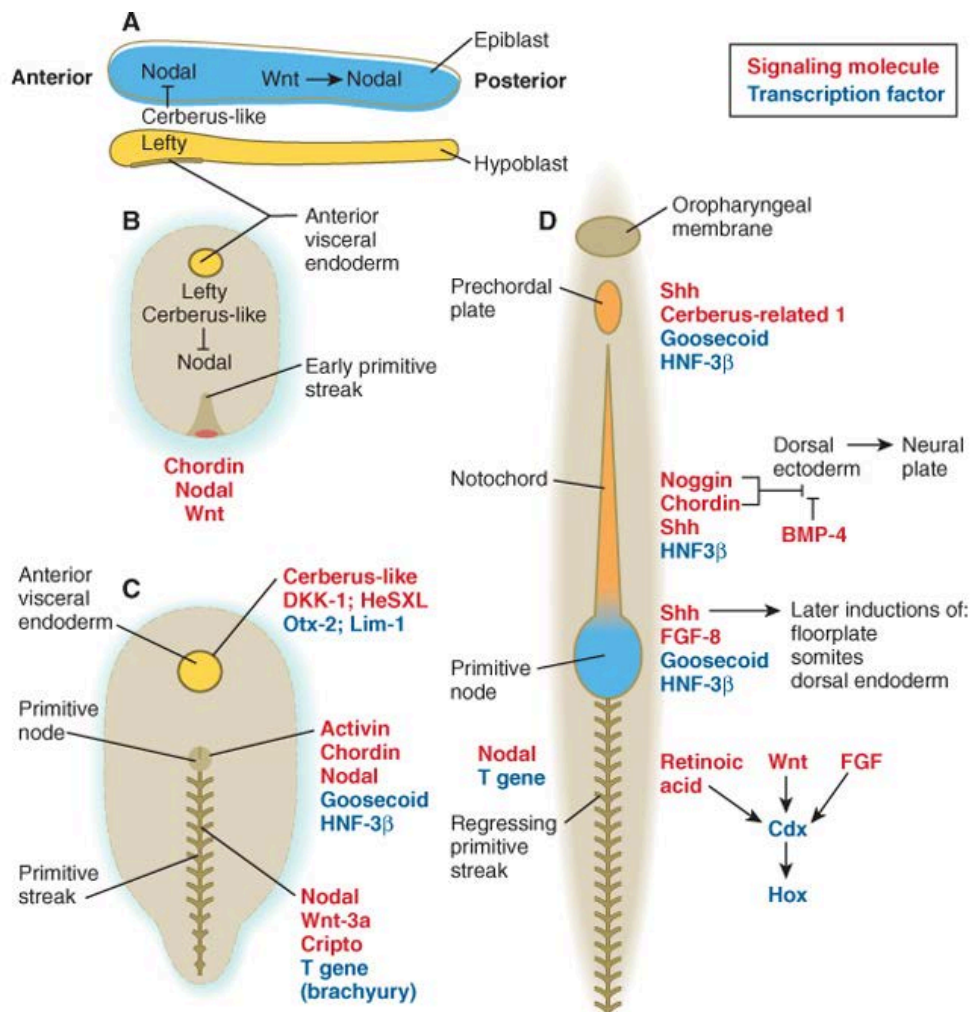


Figure 3: Place des gènes majeurs impliqués dans le développement embryonnaire
A Coupe sagittale du disque embryonnaire, début de formation de la ligne primitive
B Disque embryonnaire vue de dessus, début de formation de la ligne primitive (15^{ème} jour)
C Gastrulation (17^{ème} jour)
D Fin de la gastrulation et induction neurale

Le développement du système vasculaire débute pendant la 3^{ème} semaine de gestation (18^{ème} jour). A la 4^{ème} semaine le cœur commence à battre.

Durant cette 4^{ème} semaine on assiste à la séparation progressive des tissus embryonnaires et extra-embryonnaires. Cette phase complexe appelée délimitation fait intervenir des mouvements dans les 3 directions de l'espace et dans le temps. Ainsi la délimitation céphalique et caudale se fait par l'intermédiaire des mouvements de rotation des membranes pharyngée et cloacales.

Au niveau du pôle céphalique (crâne, face et cou) les voies aériennes et digestives sont étroitement liées au système nerveux et aux organes des sens. La mise en place d'un tel système interdépendant débute dès la 4^{ème} semaine, mais la face n'acquiert ses caractéristiques humaines que vers la 10^{ème} semaine. (Fig 4-5-6-7-8-9) Nous reviendrons plus en détails sur les mécanismes la formation faciale dans le chapitre suivant.



Figure 4: Embryon humain de 30 jours vue au microscope électronique. (Jirasek JE, 1983)
H : cœur, 1-2-3 : Arcs branchiaux

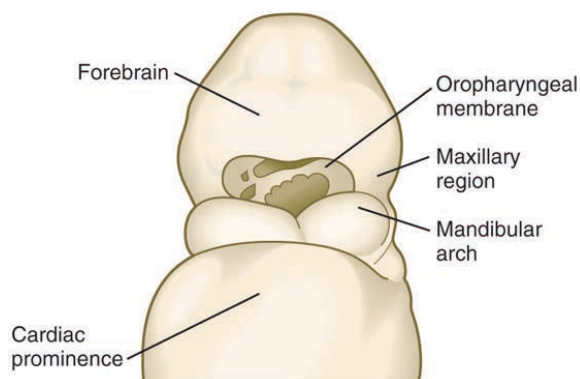


Figure 5 : Embryon humain vue de face durant la 4ème semaine montrant la rupture de la membrane oropharyngé (Carlson BM, 2009)

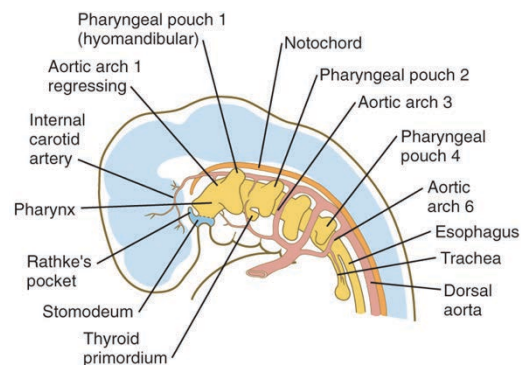


Figure 6: Aspect de l'organisation de la région de la membrane pharyngée de l'embron humain de profil à la fin du 1er mois

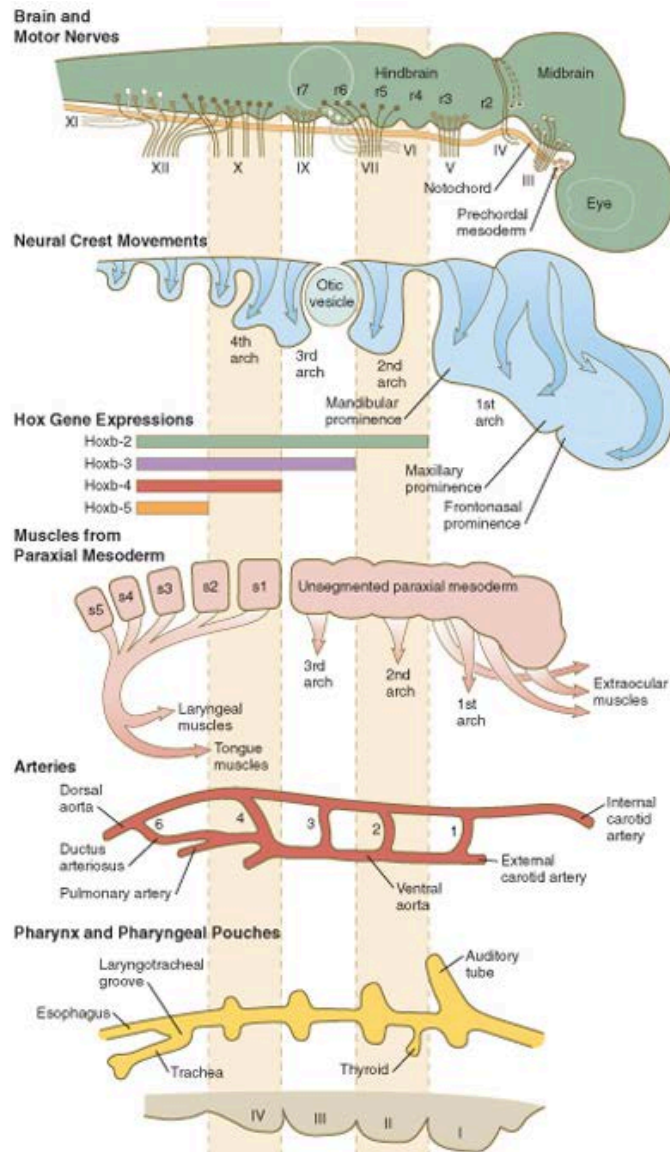


Figure 7: Vue latérale d'un embryon humain. Organisation de la tête et du pharynx au 30^{ème} jour (Carlson BM, 2009)

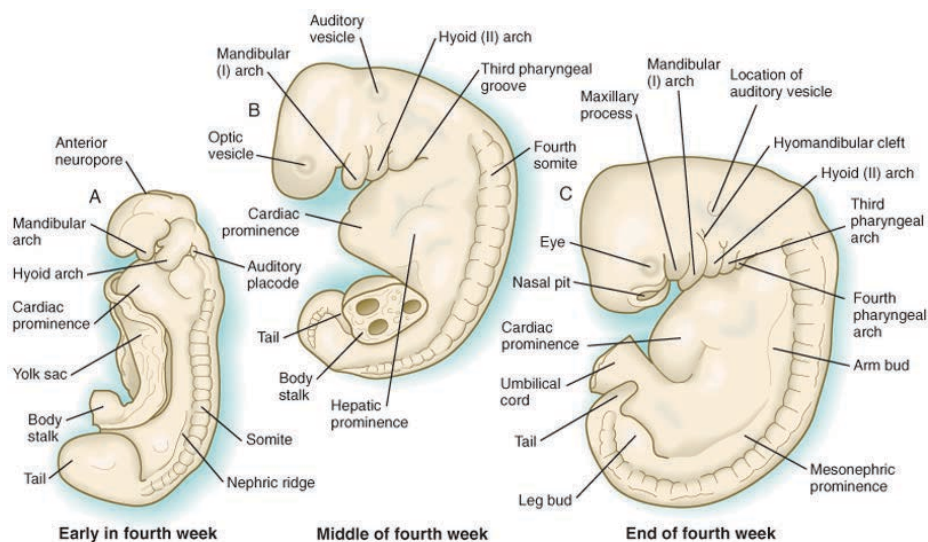


Figure 8: Aspect d'un embryon humain vue de profil durant la 4^{ème} semaine embryonnaire (Carlson BM, 2009)

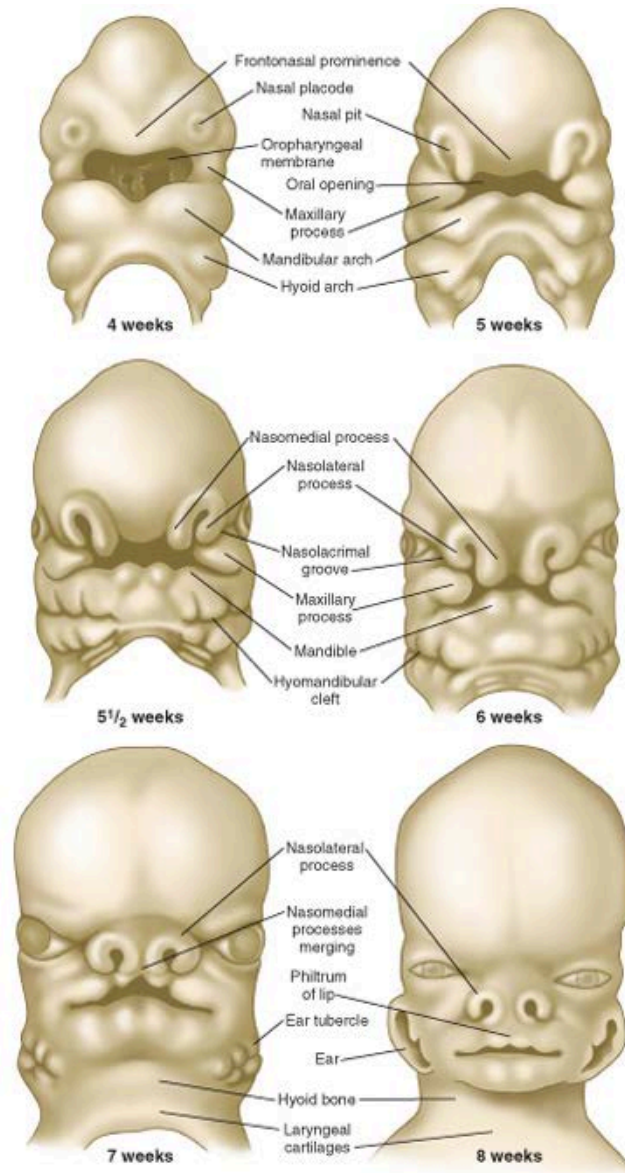


Figure 9: Formation de la face. Vue de face de l'extrémité céphalique d'un embryon humain entre la 4^{ème} sem et la 8^{ème} sem embryonnaire. (Carlson BM, 2009)

Avant de finir ces rappels sur l'embryologie il est important d'introduire la notion de crête neurale. Cette dernière désigne une population de cellules transitoires et multipotentes générées à partir de la région la plus dorsale du tube neural. Ces cellules migrent dans l'ensemble de l'embryon au cours du développement et donnent naissance à une grande diversité de types cellulaires chez le nouveau né. La crête neurale est à l'origine des mélanocytes (à l'exception des cellules pigmentaires de l'œil), d'une grande partie des os et des cartilages du squelette facial et du cou, de quelques cellules endocrines et donne naissance à toutes les cellules gliales et à la majeure partie des neurones du système nerveux périphérique. (Fig 10)

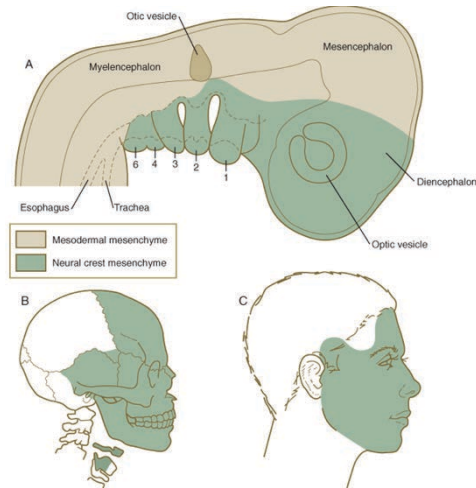


Figure 10: Distribution des crêtes neurales chez l'homme au niveau de la face et du cou

A : Chez l'embryon

B : Chez l'adulte au niveau du squelette

C : Chez l'adulte au niveau de la peau

(Carlson BM, 2009)

La crête neurale commence à se former après la gastrulation, à la jonction entre la plaque neurale et l'ectoderme adjacent. Durant la neurulation, les bords de la plaque, ou bourrelets neuraux, convergent au milieu de la ligne dorsale pour refermer le tube neural. (Fig 11) Les cellules de la crête neurale, alors situées dans le toit du tube, subissent une transition d'état, passant de cellules épithéliales à mésenchymateuses et délaminent du neuroépithélium. La délamination est un processus qui consiste à la spécialisation, au détachement et à la migration d'une population de cellules présente au sein d'un épithélium auparavant homogène. Ces cellules migrent alors vers la périphérie et se différencient en divers types cellulaires en fonction de leur localisation dans l'embryon et des signaux qu'elles reçoivent. (Fig 12)

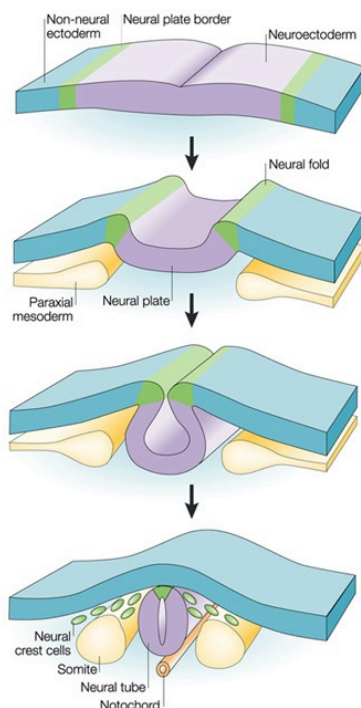


Figure 11: Schéma de la neurulation (Gammill LS, 2003)

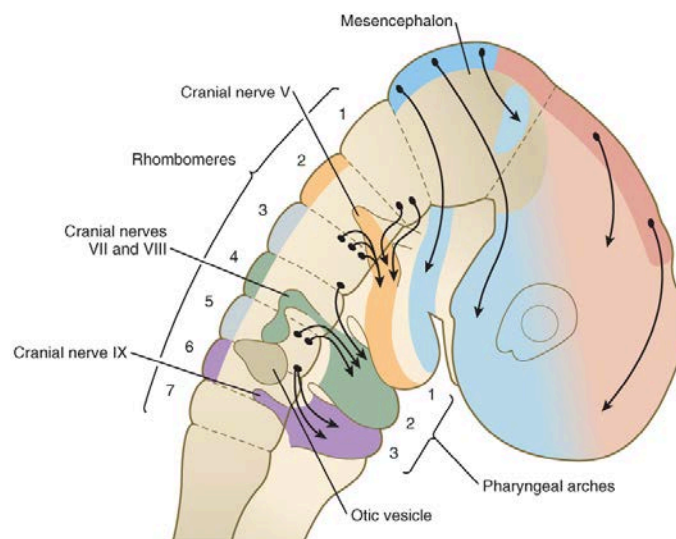


Figure 12: Migration des cellules de la crête neurale issues du mésencéphale et des rhombomères (Carlson BM, 2009)

B. Embryologie du pôle céphalique

Le développement de cette région nécessite une synergie temporo-spatiale rigoureuse entre les phénomènes cellulaires de migration, fusion, polarisation et apoptose, concernant des tissus d'origine endodermique, mésodermique, ectodermique, avec une forte participation des crêtes neurales. Cette interdépendance explique la vulnérabilité de cette région devant des dysfonctionnements innés et/ou acquis, et la fréquence des malformations craniofaciales, estimée à 1/3 des malformations congénitales à la naissance (Encha Razavi F, 2004). (Fig 13)

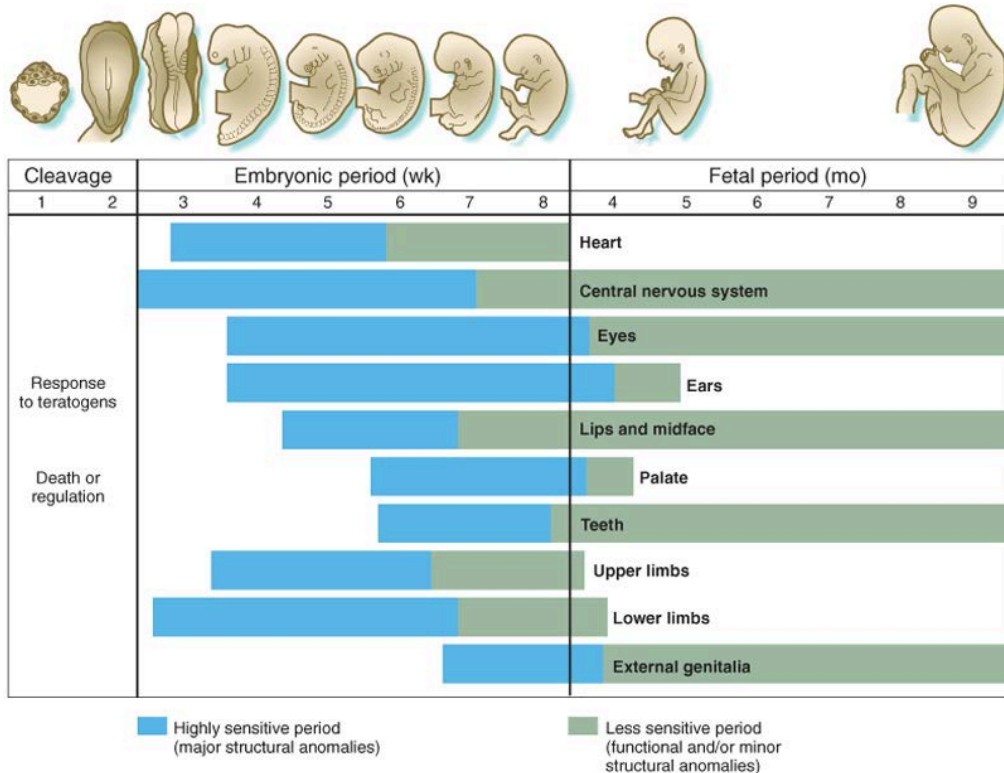


Figure 13: Synthèse des périodes de sensibilité tératogénique des différents organes au cours de l'embryogenèse et de la fœtogenèse (Carlson BM, 2009)

1. Embryologie de la lèvre (4^{ème} sem- 7^{ème} sem)

La formation de la face est la conséquence du développement et de la fusion de bourgeons faciaux : bourgeon naso-frontal, bourgeons maxillaires, bourgeons mandibulaires (Fig 14-15). Le développement de ces derniers se réalise au cours des 5^{ème} et 6^{ème} semaines embryonnaires. Les cellules de la crête neurale en mitose et en migration à la face inférieure du cerveau primitif vont être responsables du développement des bourgeons faciaux et des arcs branchiaux qui finissent par entrer en contact, puis par fusionner. En l'absence de migration des cellules des crêtes neurales il n'y a pas de fusion des bourgeons.

Le bourgeon frontal initialement déterminé par l'éminence du prosencéphale est le siège sur sa face inférieure et ventrale du développement des bourgeons nasaux internes et externes. Ce sont des massifs cellulaires entourant les deux placodes olfactives (futur nerf olfactif), positionnés par celles-ci et se développant grâce aux mitoses des cellules des crêtes neurales céphaliques antérieures.

Le premier arc branchial va donner un bourgeon mandibulaire et un bourgeon maxillaire.

Latéralement, les bourgeons maxillaires ont plutôt l'apparence de digitation et se développent sous les ébauches optiques.

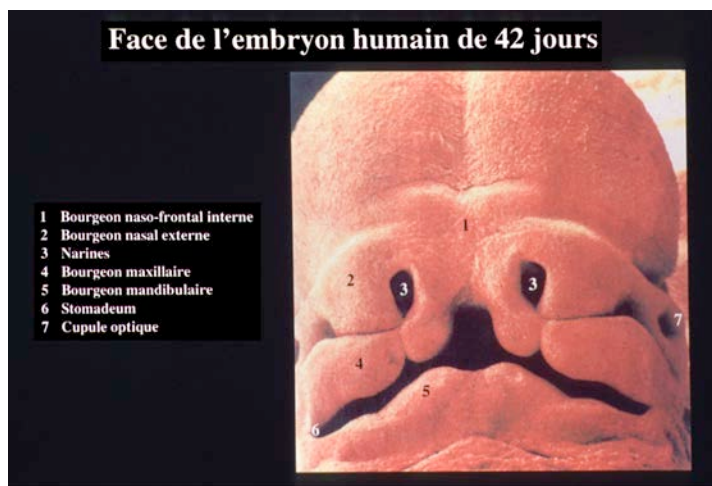


Figure 14: Face d'un embryon humain au microscope électronique à balayage au 42^{ème} jour (Couly G, 2012)

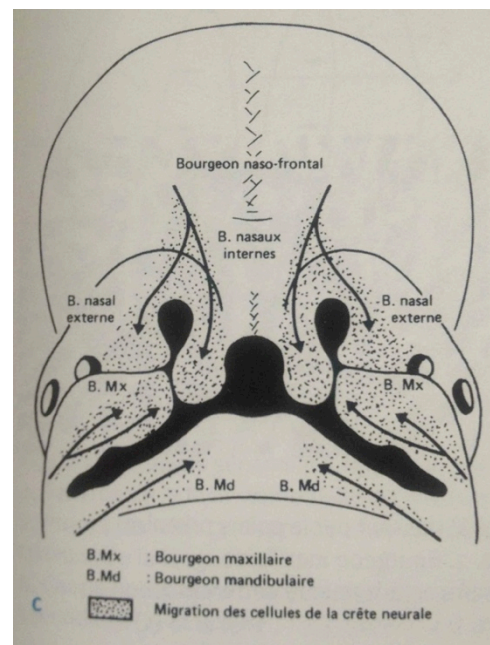


Figure 15 : Schéma de la migration des cellules de la crête neurale, répartition des différents bourgeons (Couly G, 2012)

Chaque bourgeon maxillaire (droit et gauche) va se développer puis rentrer en contact avec le bourgeon nasal externe homolatéral et fusionner. (Fig 14-15) Le bourgeon maxillaire va ensuite rentrer en contact et fusionner avec le bourgeon nasal interne pour former la lèvre et le seuil narinaire.

Pour que la fusion des bourgeons faciaux se déroule correctement, il faut :

- Des bourgeons de volume suffisant pour se rencontrer
- La compétence de l'ectoderme pour le recouvrement des bourgeons pour la mort cellulaire
- Les propriétés physico-chimiques du liquide amniotique aptes à assurer le contact ectodermique.

Ce sont ces défauts de fusion des bourgeons faciaux qui sont responsables de la persistance d'une fente labiale.

2. Embryologie du palais (6^{ème} sem- 11^{ème} sem)

Le palais se subdivise en 2 parties : le palais primaire et le palais secondaire. (Fig 16)

Cette distinction issue des observations embryologiques est importante car elle a une implication dans l'analyse clinique des FL/P.

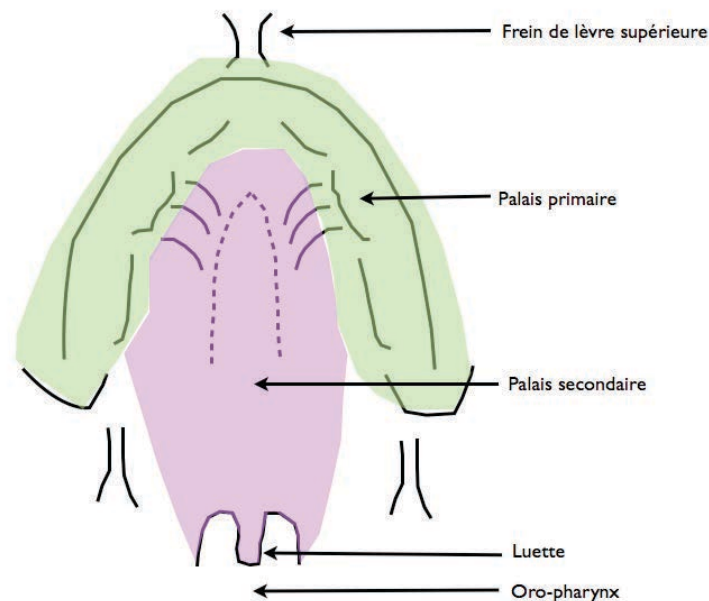


Figure 16: Vue inférieure du palais chez un enfant à terme. Délimitation des palais primaire (vert) et secondaire (violet)

a) Embryologie du palais primaire (6^{ème} sem-7^{ème} sem)

Le palais primaire se forme en même temps que la lèvre. Il correspond à la gencive, à la partie périphérique du palais celle qui est en avant de la papille incisive (Fig 16).

Comme nous l'avons vu précédemment au cours de la 6^{ème} semaine, les bourgeons maxillaires viennent au contact des bourgeons nasaux internes et externes. Ces contacts fusionnels ectodermiques constituent le mur épithélial de HOSCHSTETTER (1891). Sa disparition en quelques jours, vers la fin de la 6^{ème} semaine par mort cellulaire, permet la constitution d'un massif cellulaire mésenchymateux continu entre les bourgeons maxillaires droit et gauche et les bourgeons nasaux internes et externes : c'est le palais primaire.

Le mésenchyme de la crête neurale jouerait un rôle déclenchant de la mort cellulaire. L'absence d'apoptose à ce niveau peut donc être un mécanisme expliquant la présence d'une fente par persistance de l'ectoderme sur ces bourgeons.

A ce stade, de manière physiologique, il existe une communication normale entre les cavités nasales et buccales qui ne sont pas encore cloisonnées.

b) Embryologie du palais secondaire (7^{ème} sem-11^{ème} sem)

Le palais secondaire se développe après que les bourgeons constitutifs de la lèvre et du palais primaire n'aient fusionné. Au cours de la 7^{ème} semaine, les bourgeons maxillaires continuent leur développement volumétrique en arrière du palais primaire. Une cloison sagittale médiane (l'éperon descendant du septum primaire du bourgeon naso-frontal) va descendre du plafond des fosses nasales séparant le nez droit du nez gauche pendant que 2 cloisons horizontales (les lames palatines) se développent à partir des régions latérales du palais primaire. (Fig 17)

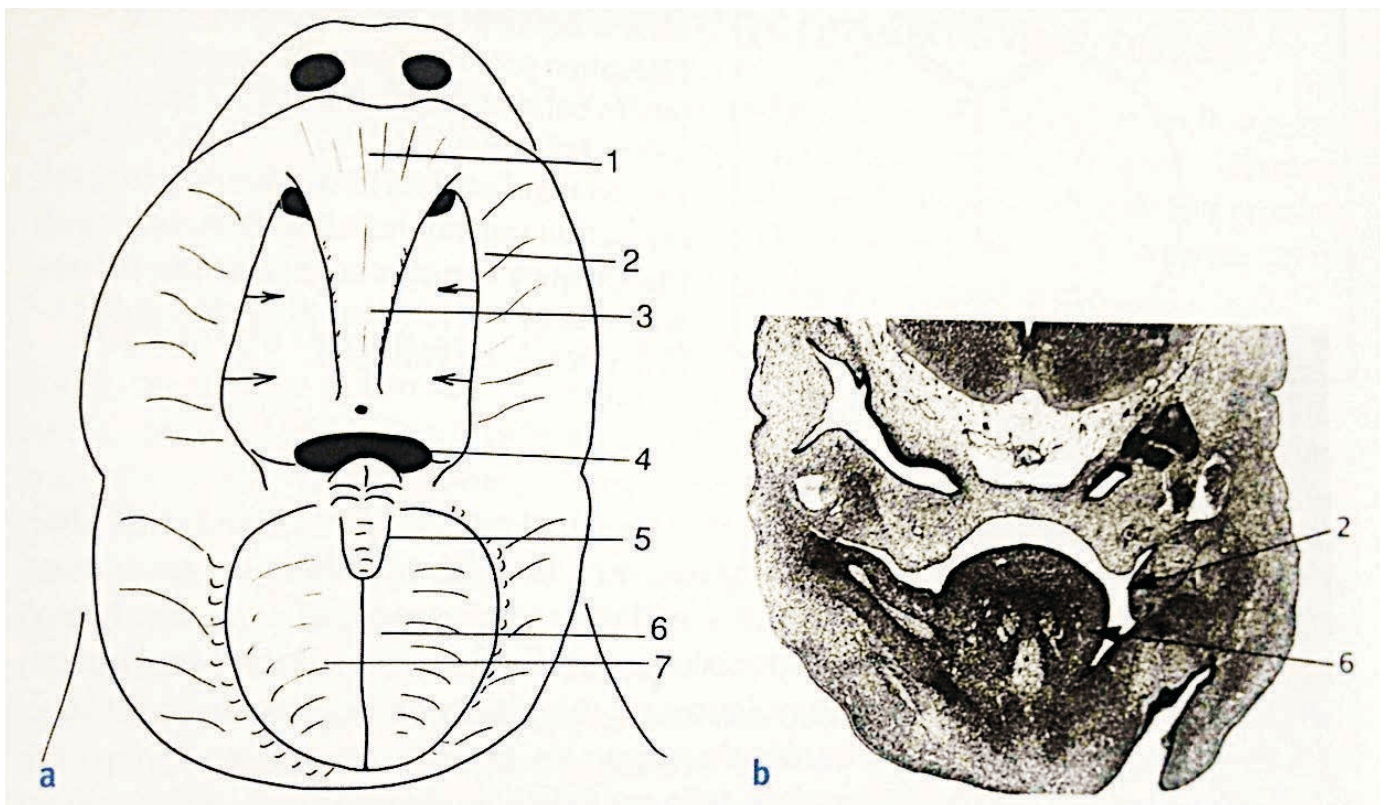


Figure 17 : Palais secondaire lors de la 7^{ème} semaine : fusion des procès palatins (Couly G, 2012)

a) Schéma de la face stomodéale du palais secondaire en formation :

- 1 Palais primaire,
- 2 Lames latérales (aussi appelées procès palatins),
- 3 Septum nasal,
- 4 Pharynx,
- 5, 6, 7 Tuberculum impar et tubercules latéraux de la langue

b) Coupe horizontale de l'embryon passant par les procès palatins du palais secondaire (2) et la langue (6).

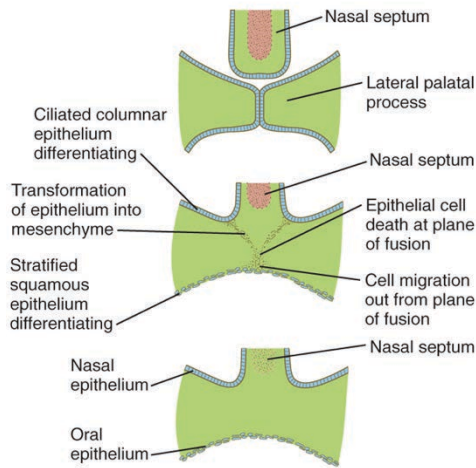


Figure 18: Schéma en plan coronal du processus de fusion palato-nasal (Carlson BM, 2009)

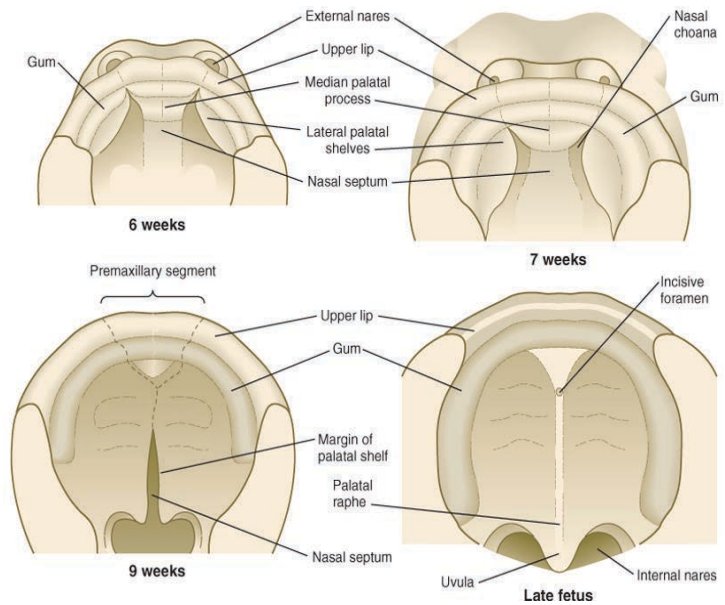


Figure 19: Vue inférieure de la voûte palatine lors de sa formation. A partir de la 6^{ème} semaine et jusqu'à la fin de son développement. (Carlson BM, 2009)

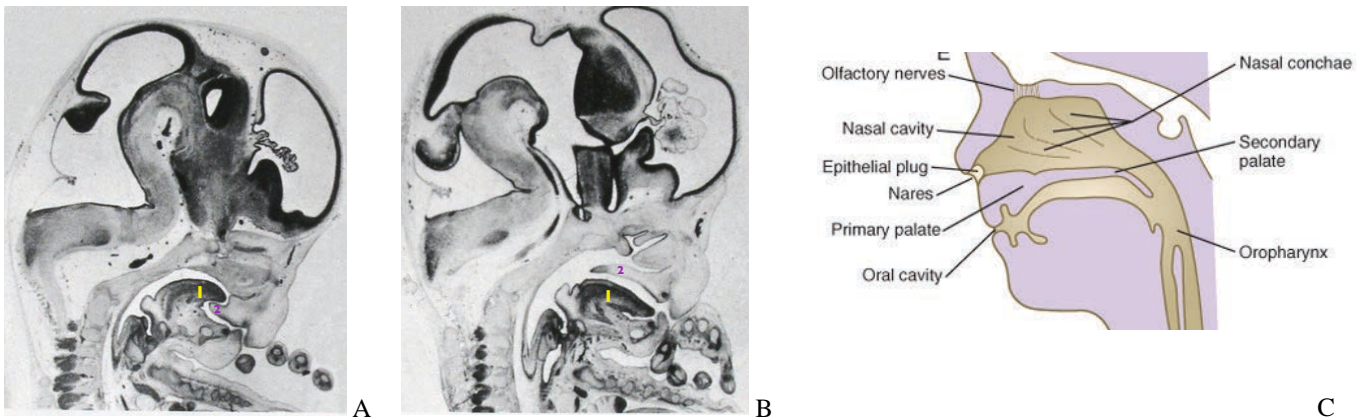


Figure 20: Formation du palais sur coupes sagittales

A et B : Embryon de fœtus humain à la 8^{ème} et 11^{ème} sem (Pr Couly G)

1 : Langue en position haute (A) puis s'abaissant (B)

2 : Palais en formation entre la 8^{ème} et 11^{ème}

C : Schéma d'une coupe sagittale d'embryon humain à 12^{ème} sem (Carlson BM, 2009)

Les 3 cloisons (1 sagittale médiane et les 2 cloisons latérales) se réunissent sur la ligne médiane d'abord en avant sur la papille rétro-incisive. (Fig 18-19-20) Puis elles se soudent d'avant en arrière jusqu'à la lèvre. (Fig 19-21) Le développement du palais se passe en plusieurs étapes séquentielles que sont la croissance, l'élévation puis la fusion. (Fig 22)

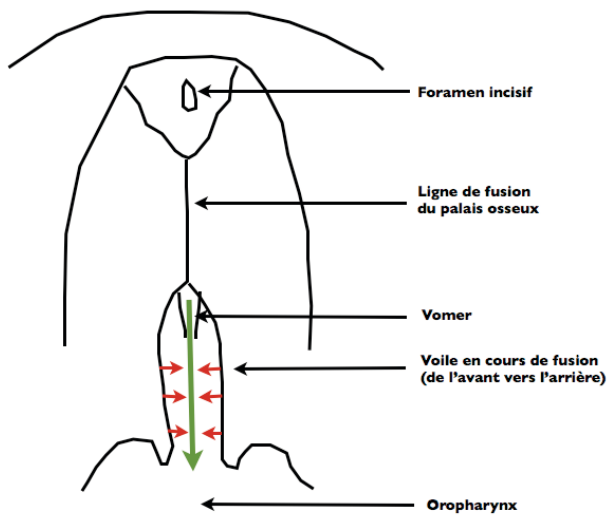


Figure 21: Fermeture du palais secondaire (palais mou) Palais en vue inférieure

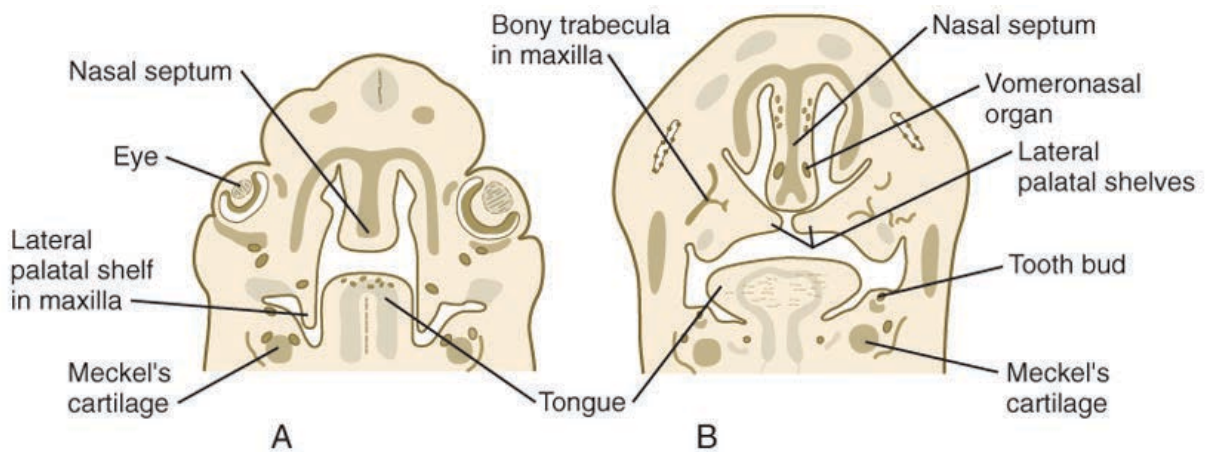


Figure 22: Coupe frontale du pôle céphalique d'un embryon humain montrant la fusion des lames palatines (A, B.) (Carlson BM, 2009)

Le massif lingual joue un rôle important dans la fermeture du palais secondaire. La descente de la langue dans la cavité buccale par le biais de la synchronisation neuro-musculaire des premières séquences orales gnoso-praxiques, conjointement à l'élévation puis au contact ectodermiques des procès palatins et du septum de la cloison nasale sont des éléments indispensables à la formation du palais secondaire. (Fig 20-22)

La composante mésenchymateuse du palais joue un rôle primordial dans les premières phases de la palatogenèse (croissance et élévation). En cas d'anomalie une FP peut persister. La palatogenèse nécessitent une orchestration minutieuse, chronologique de différents processus physiologiques, tels que la croissance, la prolifération, la différenciation, la migration et l'apoptose. Les gènes cellulaires de différenciation sont exprimés en réponse aux stimulations moléculaires de la matrice extra-cellulaire. Il est ainsi permis, pour certains défauts palatins, d'incriminer la défaillance de phénomènes moléculaires.

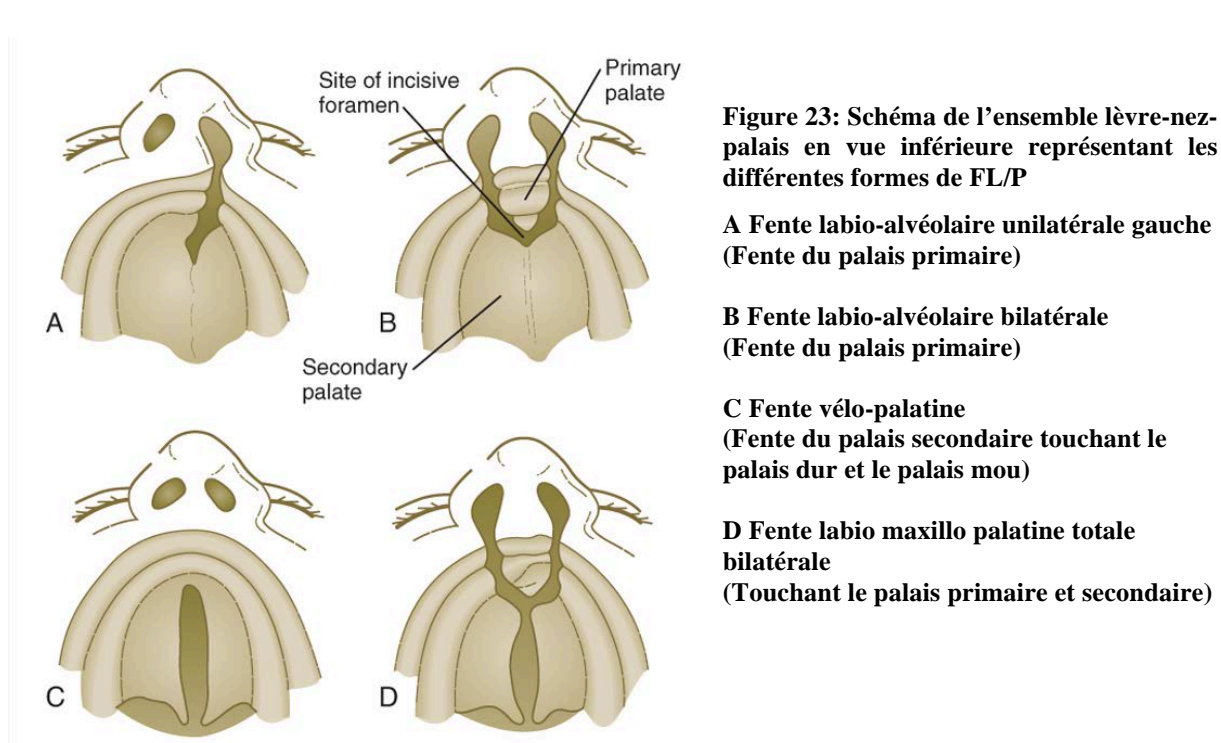
3. Embryologie de la bouche embryonnaire

C'est l'ensemble des bourgeons faciaux, en convergeant et fusionnant, qui vont délimiter en totalité la cavité stomodéale tapissée exclusivement d'ectoderme. Le stomodéum est en communication avec l'ébauche du pharynx en arrière à la suite de la résorption de la membrane pharyngienne (accolement de l'ectoderme et de l'endoderme céphalique) vers le 21^{ème} jour.

C. Embryologie pathologique

Les FL/P sont la conséquence d'un défaut de fusion des bourgeons faciaux. Les formes cliniques sont directement liées à l'embryologie.

La fente du palais primaire embryologique intéresse la zone labiale et maxillaire en avant du foramen incisif. (Fig 23 A et B) Elle est constituée entre la 4^{ème} et la 7^{ème} semaine de la vie intra-utérine. Le défaut de fusion du bourgeon maxillaire et du bourgeon nasal interne est responsable de la FL et de la fente alvéolaire (palais primaire).



La fente du palais secondaire embryologique intéresse la zone vélo-palatine en arrière du foramen incisif. (Fig 23 C) Elle est constituée entre la 7^{ème} et la 12^{ème} semaine de vie intra-utérine. Le défaut d'accolement relève de deux étiologies :

- dans la grande majorité des cas c'est un défaut d'accolement des bourgeons par absence d'apoptose des berges, les bourgeons étant par ailleurs normaux.

- Dans d'autres cas, l'hypoplasie d'un bourgeon peut être plus ou moins marquée. Il s'agit là, le plus souvent, du bourgeon nasal interne ; et le pronostic sur la croissance maxillo-faciale, et parfois sur le développement psychomoteur, est alors moins bon. Les bourgeons primaires et secondaires faciaux dérivent en effet du prosencéphale (Larsen WJ, 1996 ; Couly G, 1991).

II. RAPPELS ANATOMO-CLINIQUES

A. Anatomie descriptive normale

Il y a plusieurs entités anatomiques que nous allons aborder : la lèvre supérieure, le nez, et le palais.

1. La lèvre supérieure

La lèvre est définie par sa fonction (parole, mimiques, alimentation,...), sa morphologie et sa mobilité. Dans ce chapitre, nous travaillerons principalement sur ces deux derniers points.

La lèvre peut être décrite selon trois plans : un plan superficiel de recouvrement, un plan musculaire profond, et un plan interne muqueux le tout reposant sur un squelette osseux.

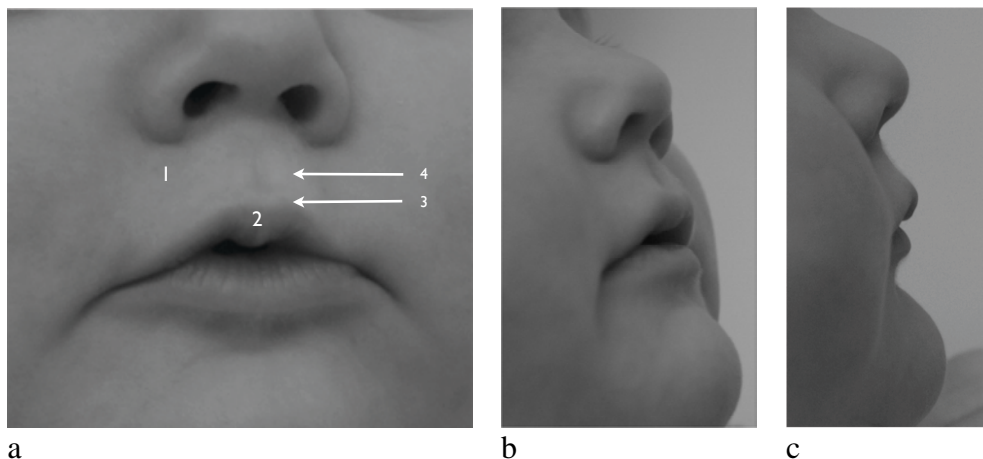


Figure 24: Lèvre normale chez l'enfant

A : Face B : $\frac{3}{4}$ C : Profil

1 : Lèvre supérieure blanche

2 : Lèvre rouge

3 : Ligne cutanéomuqueuse

4 : Crête philtrale gauche (philtrum)

a) Plan superficiel

Il se compose de :

- La lèvre rouge ou vermillon (Fig 24 A(2)), sa longueur d'une commissure à l'autre est égale à celle de la lèvre inférieure, sa largeur est variable selon les individus.
- La lèvre blanche (Fig 24 A(1)) qui est symétrique par rapport à un axe tendu de la base de la cloison nasale ou columelle au sommet de l'arc de Cupidon. Elle présente une dépression centrale, le philtrum qui est limité latéralement par les deux crêtes philtrales légèrement obliques en bas et en dehors et dont le relief s'amenuise de la base de la columelle aux extrémités latérales de l'arc de Cupidon.
- La ligne cutané-muqueuse (Fig 24 A(3)) correspondant à la jonction entre la lèvre blanche et le vermillon. Cette ligne est surmontée d'une crête cutanée : le limbe cutané qui correspond au lieu de projection antérieur maximal de la lèvre supérieure. Cette crête, dans l'ensemble concave vers le bas, présente dans sa partie moyenne un arc médian à concavité supérieure limitée latéralement par les crêtes philtrales : l'arc de Cupidon.

b) Plan musculaire

Les muscles ont un rôle majeur dans la souplesse et la mobilité de la lèvre, ce qui est important pour la mimique mais aussi pour la parole (énoncé des phonèmes labiaux).

Il se compose principalement du muscle orbiculaire de la bouche (orbicularis oris) qui se compose lui-même de 3 faisceaux (Fig 25) :

- Le faisceau incisif supérieur ou nasolabial tendu des commissures à la base de la columelle.
- Le faisceau incisif moyen, situé au-dessus du faisceau principal, dont les fibres les plus superficielles se terminent sur les crêtes philtrales.
- Le faisceau principal correspondant au demi-orbiculaire supérieur. Il est tendu d'une commissure à l'autre. Il est constitué de fibres musculaires parallèles réalisant le bord libre de la lèvre. Il constitue toute l'épaisseur de la lèvre rouge. Son bord supérieur déborde légèrement au-dessus du limbus. Il est surmonté de l'artère coronaire.

Le muscle orbiculaire intrinsèque reçoit les terminaisons des muscles dits extrinsèques, correspondant de dehors en dedans au muscle grand zygomatique, petit zygomatique, releveur de la lèvre supérieure et de l'aile du nez et au muscle nasal en dedans. Ces muscles se terminent sur l'orbiculaire et la peau de la lèvre supérieure pour les plus externes. (Fig 25-26)

Le muscle nasal dans son faisceau inférieur (partie alaire) s'enroule en dedans pour rejoindre le faisceau supérieur de l'orbiculaire afin de former le seuil narinaire. (Fig 30-31)

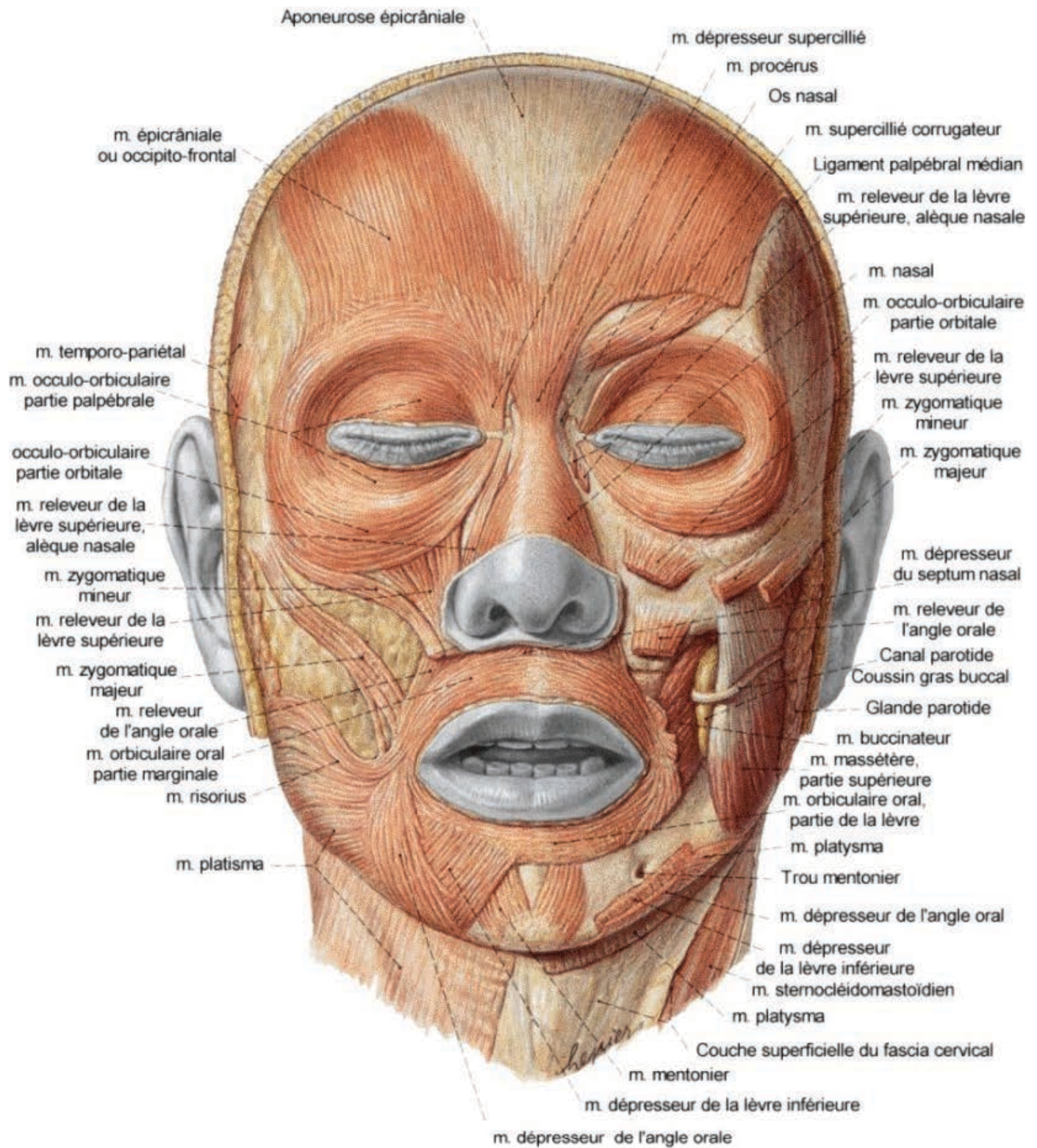


Figure 25 : Anatomie musculaire de la région péri-buccale et du nez vue de face (Sobotta J, 1994)

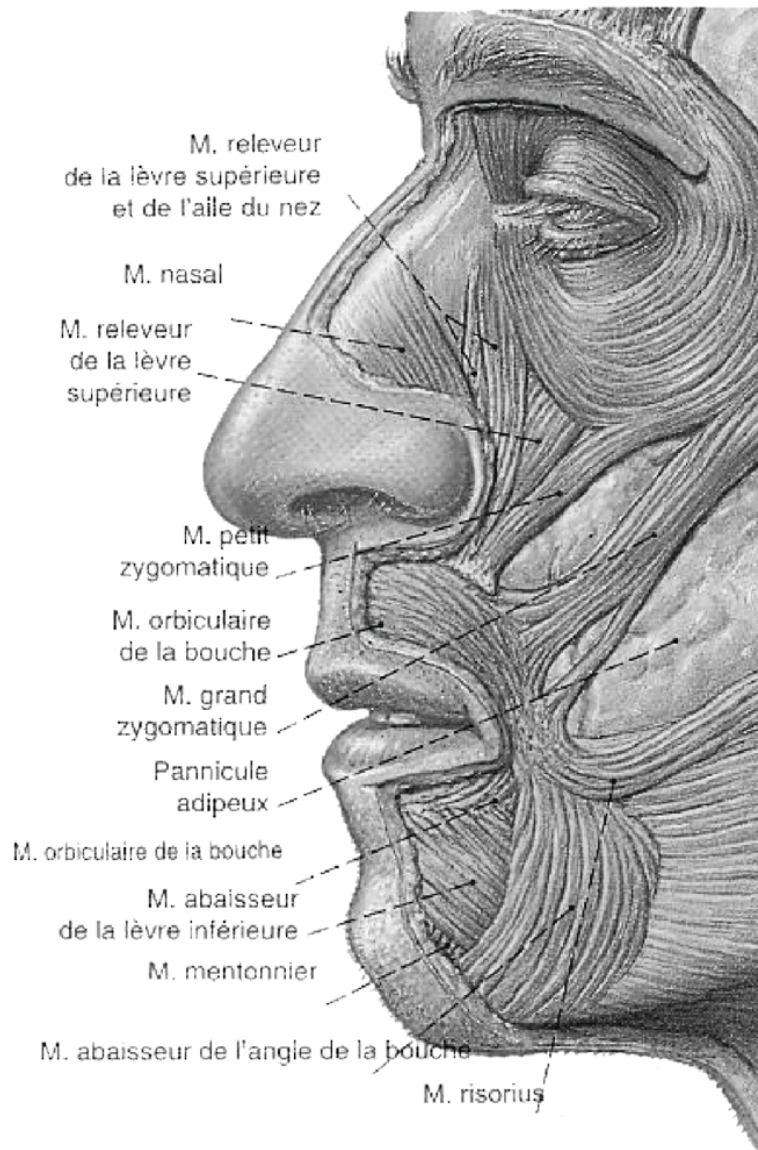


Figure 26 : Anatomie musculaire de la région péri buccale et du nez vue de profil (Sobotta J, 1994)

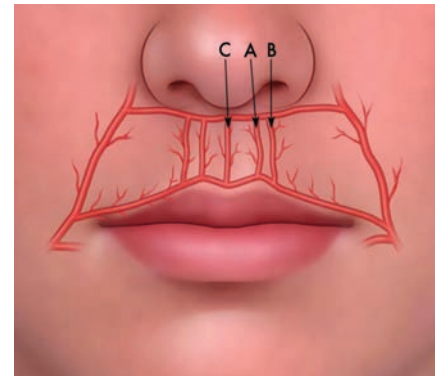
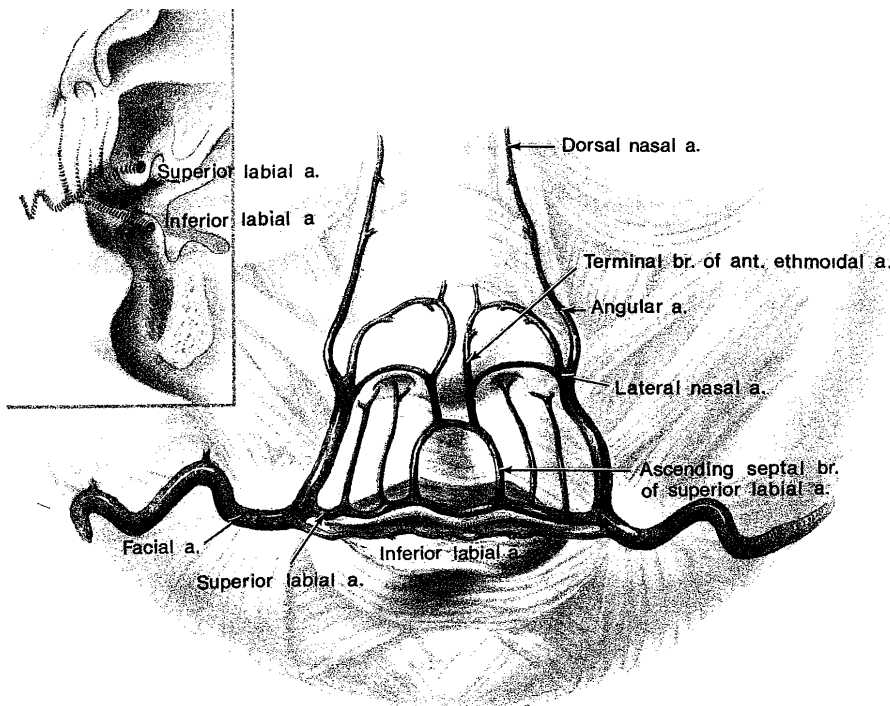
c) Face muqueuse

Elle est aussi appelée face postérieure. Elle forme avec la fibromuqueuse gingivale, le profond sillon gingivolabial (le vestibule de la lèvre) qui est marqué sur la ligne médiane par un repli muqueux : le frein.

d) La vascularisation

La vascularisation artérielle est sous la dépendance du système carotidien externe par l'intermédiaire des artères faciales (situées sous le plan des muscles peauciers) d'où naissent les artères coronaires labiales à proximité de la commissure (1 à 2 cm) (Fig 27-28). Chaque coronaire a un trajet flexueux horizontal. L'anatomie de l'arcade philtrale a été décrite à

plusieurs reprises chez l'homme avec plusieurs variantes selon les auteurs (Millard RJ 1977, Garcia de Mitchell CA, 2008). (Fig 27-28)



.4. Philtral vascular arcade. A, ascending philtral artery; B, lateral philtral artery; C, central philtral artery.

Figure 28: Répartition anatomique de l'arcade vasculaire artérielle au niveau du philtrum

(Garcia de Mitchell CA, 2008)

A Artère ascendante du philtrum

B Artère ascendante latérale externe

C Artère centrale du philtrum

Figure 27: Schéma la vascularisation des lèvres sur une vue de face chez l'homme (Millard RJ, 1977)

2. Squelette osseux

L'arc maxillaire est formé dans sa partie médiane par la réunion des deux os maxillaire. Cet arc joue un rôle clef dans la plastique de la face mais aussi dans la mastication ainsi que la statique de la lèvre.

3. Le nez

Le squelette de l'étage moyen de la face, dans sa partie antérieure, est constitué des deux os maxillaires droit et gauche. Ils se rejoignent à la partie médiane dans leur portion inférieure, pour former la crête nasale (épine nasale antérieure), sur laquelle va venir s'insérer la cloison cartilagineuse des fosses nasales. Le processus frontal de l'os maxillaire forme avec l'os nasal, la partie latérale et haute de l'ouverture piriforme.

Le squelette nasal se compose d'un squelette osseux et cartilagineux. (Fig 29)

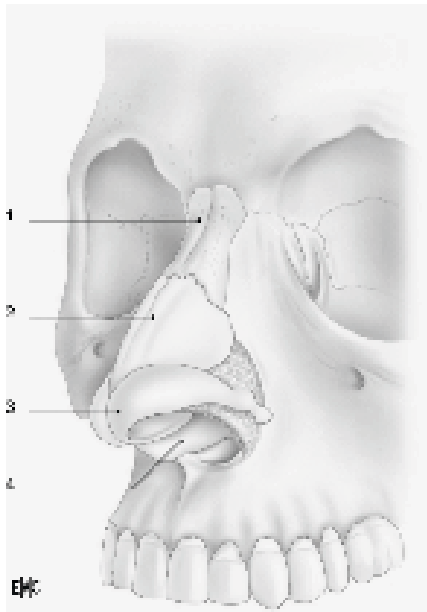


Figure 29 : Anatomie du squelette et du cartilage du nez vue de 3/4 (Pavy B, 1998)

- 1. Os nasal**
- 2. Cartilage latéral du nez**
- 3. Grand cartilage alaire**
- 4. Cartilage du septum nasal**

Le squelette osseux se compose :

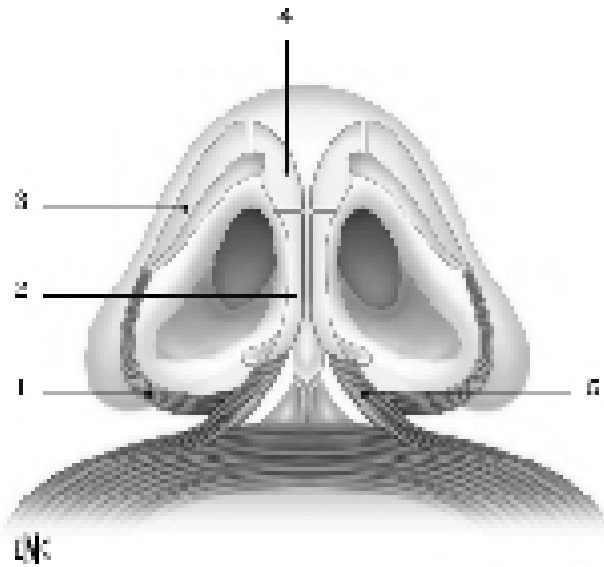
- du processus frontal de l'os maxillaire, de l'os nasal et de l'épine nasale du frontal pour la portion latérale de la pyramide.
- de la lame verticale du vomer qui constitue la partie postérieure de la cloison sagittale des fosses nasales. Elle se situe en arrière de la pyramide nasale.
- de la lame perpendiculaire de l'ethmoïde mince, lame osseuse sagittale, qui participe à la constitution des fosses nasales. Par son bord antérieur, elle s'unit en haut à l'épine nasale du frontal, en bas par son bord antéro-inférieur au cartilage de la cloison. Par son bord postérieur, elle s'unit à la lame verticale du vomer.

Le squelette cartilagineux est formé par le septum cartilagineux (au centre), les cartilages triangulaires (ou latéraux supérieurs) et les cartilages alaires (ou latéraux inférieurs).

Le septum cartilagineux forme la partie moyenne de l'arête nasale. Il est de forme quadrangulaire. Il participe au soutien de la pointe nasale par son extrémité caudale. Alors que son bord antéro-supérieur (céphalique) continue la lame perpendiculaire de l'ethmoïde.

Le cartilage latéral supérieur correspond à la partie moyenne du squelette latéral de la pyramide nasale. Son bord antérieur s'unit au cartilage de la cloison et à celui du côté opposé. Son bord supérieur s'unit au bord inférieur de l'os nasal et du processus frontal du maxillaire. Le bord inférieur, quant à lui, est libre, mais il s'unit à la partie latérale du cartilage alaire par une membrane fibreuse.

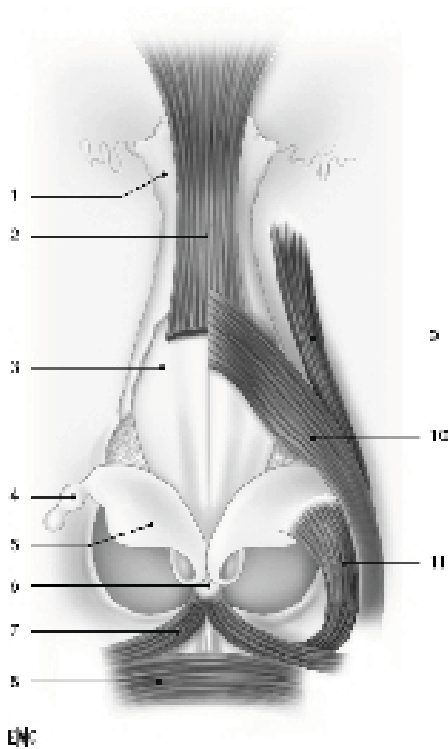
Les cartilages alaires constituent le squelette et la sous-cloison de la pointe du nez et latéralement des ailes du nez. Il est formé de la crus mésiale et de la crus latérale. (Fig 30)



Le muscle nasal et le faisceau supérieur de l'orbiculaire se rejoignent pour constituer la « corde » qui tend l'arc formé par le cartilage latéral inférieur.

- 1 Muscle nasal
- 2 Branche médiale du grand cartilage alaire ou crus mésiale
- 3 Branche latérale du grand cartilage alaire ou crus latérale
- 4 Partie intermédiaire du grand cartilage alaire ou crus intermédiaire
- 5 Muscle orbiculaire de la bouche (faisceau abaisseur du septum nasal)

Figure 30 : Anatomie des cartilages alaires et du muscle nasal au niveau du seuil narinaire (Pavy B, 1998)



- 1 Os nasal
- 2 Muscle procerus
- 3 Cartilage latéral du nez
- 4 Cartilage nasal accessoire
- 5 Grand cartilage alaire
- 6 Cartilage du septum nasal
- 7 Muscle orbiculaire de la bouche (faisceau abaisseur du septum nasal)
- 8 Muscle orbiculaire de la bouche (partie marginale)
- 9 Muscle releveur de la lèvre supérieure et de l'aile du nez
- 10 Muscle nasal (partie transverse)
- 11 Muscle nasal (partie alaire)

Figure 31 : Anatomie du nez : squelette, muscles et cartilages. Vue de face (Pavy B, 1998)

Le plan musculaire recouvre la pyramide ostéocartilagineuse. Ce plan correspond au muscle nasal qui est rattaché en haut et au milieu au muscle proserus. En bas, il adhère à la cloison nasale et se continue avec son homologue du côté opposé. Son bord postéro supérieur s'articule avec le muscle releveur de l'aile du nez et de la lèvre supérieure. Sa partie inférieure forme la partie alaire du muscle nasal.

4. Ensemble bouche/nez

Au décours de la description anatomique du nez et de la bouche il est important de souligner l'ensemble qu'il réalise. Effectivement le nez n'est pas posé sur la lèvre mais des liens étroits les unissent. Les fibres de l'orbiculaire externe s'attachent aux cartilages alaires de la pointe du nez (Fig 32).

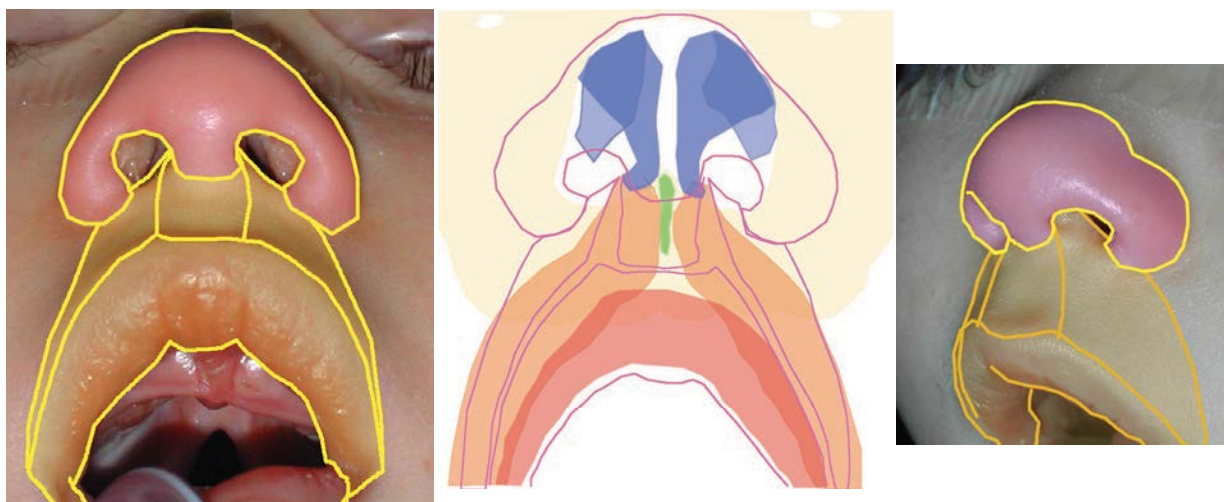


Figure 32: Schémas de l'ensemble lèvre/nez de face. (Pellerin P)

<http://www.fente-labio-palatine.fr/anatomie/anatomie-musculaire-levre>

5. Le palais

Le palais se compose d'une portion osseuse antérieure (palais dur) ; et d'une portion musculo-membraneuse postérieure (palais mou) appelée voile du palais.

En avant, le palais dur correspond au maxillaire. (Fig 33) La muqueuse qui le recouvre au niveau buccale est une fibro-muqueuse (tissu inextensible très adhérent au maxillaire). Sa couche profonde correspond au périoste du maxillaire.

En arrière, le voile du palais (Fig 33) sert de cloison mobile et contractile, en continuité avec le palais dur, entre la cavité buccale et le cavum. Il a une forme de quadrilatère. Il est formé d'une lame fibreuse, de muscles, et d'une muqueuse.

La face antéro-inférieure du palais est concave et lisse. Elle présente une saillie médiane antéro-postérieure qui se prolonge sur le voile et qui correspond au repli de la voûte palatine.

La face postéro-supérieure, quant à elle, est convexe et se trouve en continuité avec la muqueuse nasale. Le bord postérieur, dans sa partie médiane, présente un prolongement cylindro-conique appendu à la face inférieure, ce qui correspond à la luvette. De part et d'autre de celle-ci, on retrouve deux replis curvilignes, l'un antérieur, l'autre postérieur : les piliers du voile du palais.

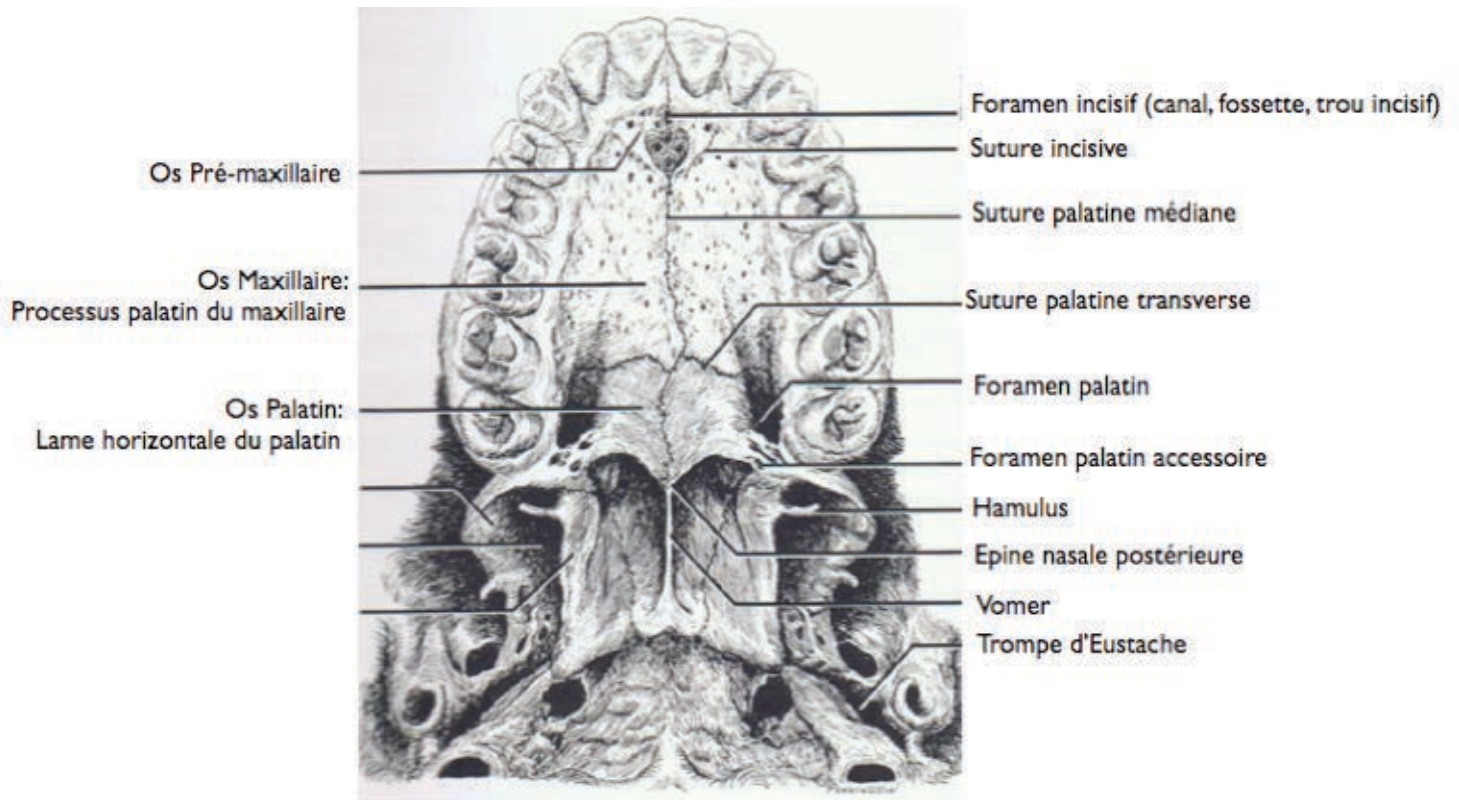


Figure 33: Planche anatomique du palais osseux en vue inférieure (Millard RJ, 1977)

L'aponévrose palatine est constituée principalement par les fibres tendineuses du muscle péri staphylin externe, et occupe la moitié antérieure du voile du palais, dont elle constitue la charpente. (Fig 34)

La musculature du voile est composée (de chaque côté) de 5 muscles (Fig 34):

- Le péristaphylin externe, qui se réfléchit au niveau du crochet de l'aile interne de la ptérygoïde pour former l'aponévrose palatine;
- Le péristaphylin interne ou élévateur du voile;
- Le pharyngostaphylin formé de trois faisceaux attire le voile en arrière et rétrécit l'isthme pharyngonasal. Il contribue à former le relief du pilier postérieur du voile;
- Le palatostaphylin ou azygos de la luette;
- Le glossostaphylin ou palatoglosse.

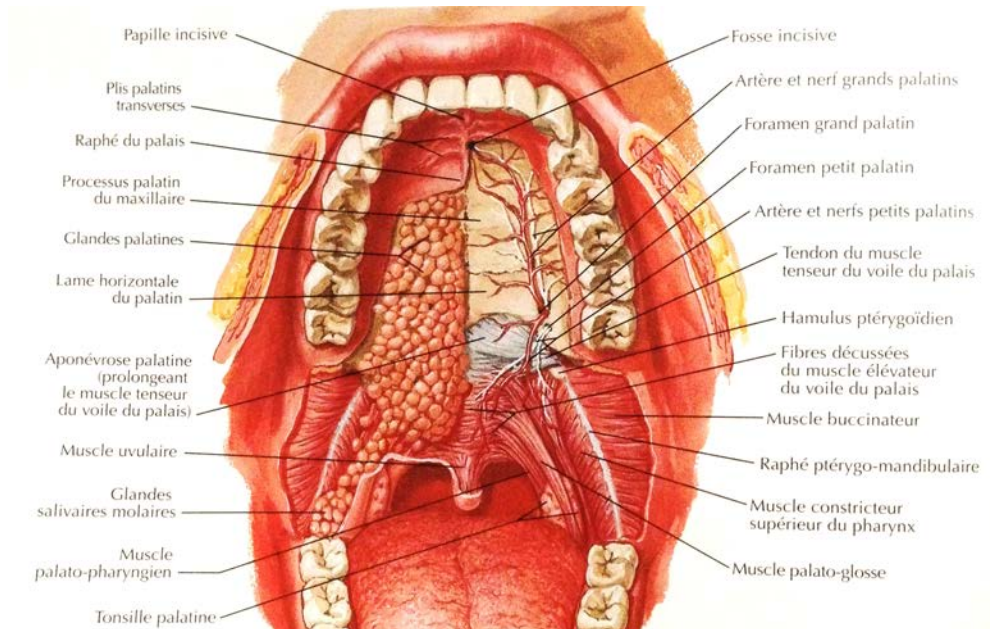


Figure 34 : Anatomie musculaire, nerveuse et vasculaire du palais normal chez l'adulte en vue inférieure bouche ouverte avec dissection de la fibromuqueuse du côté gauche jusqu'au plan vasculaire (Netter FH, 2011)

B. L'anatomie pathologique

Dans l'ouvrage *Bec de lièvre : formes cliniques-Chirurgie* de 1938, Victor Veau soulignait à juste titre que toutes les structures étaient présentes mais déformées. La présence d'une FL empêche les muscles externes d'atteindre la berge interne. Ceci ayant pour conséquence de déstabiliser l'anatomie du nez (déformation des cartilages alaires, de la cloison nasale et des cartilages triangulaires). (Fig 35)

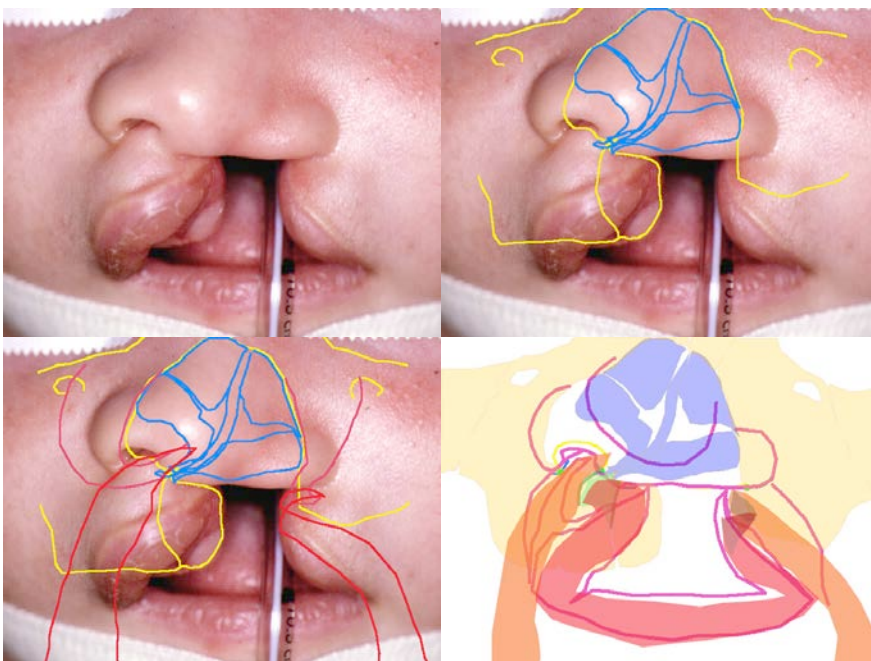


Figure 35: Anomalies anatomiques constatées en cas de FLP totale gauche

<http://www.fente-labio-palatine.fr/anatomie/anatomie-musculaire-levre>

La vascularisation de la lèvre en cas de fente labiale a été décrite par RJ Millard en 1977. (Fig 36) Les vaisseaux sont décrits anatomiquement à la même place que sur une lèvre normale c'est à dire qu'ils longent la jonction lèvre blanche/lèvre rouge puis sont ascendants et parallèle au philtrum. Toutefois la fente modifiant l'orientation du philtrum elle modifie « l'axe » général des vaisseaux. (Fig 36)

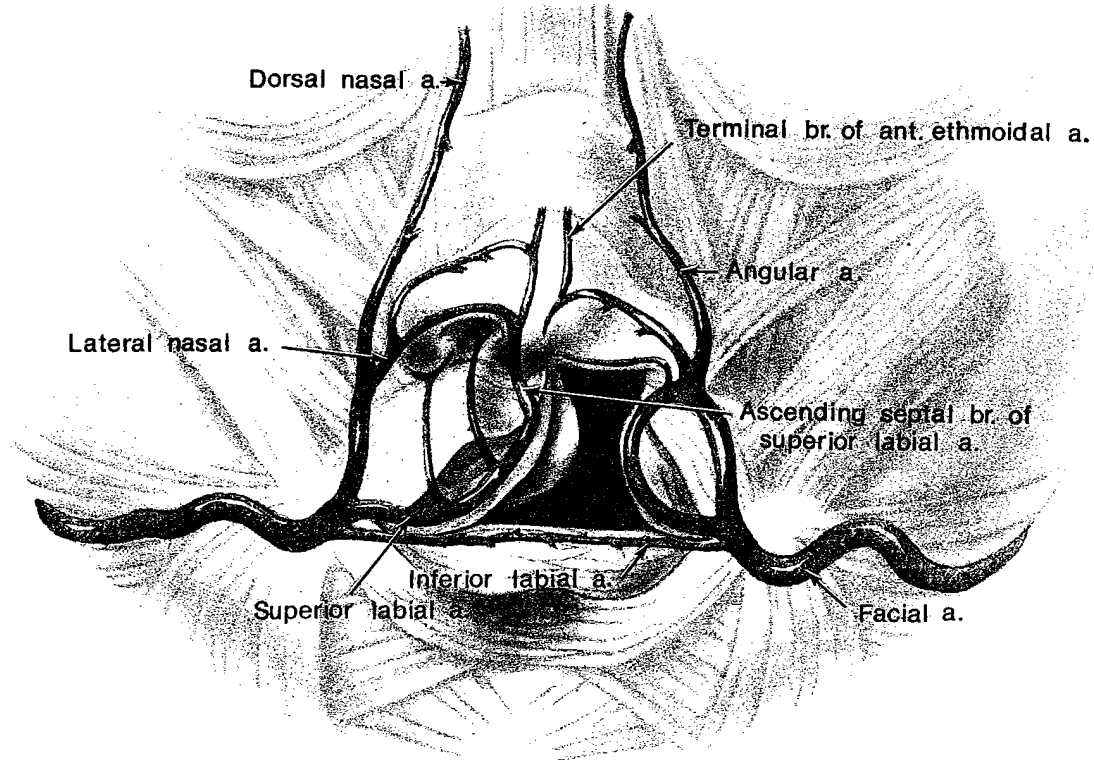


Figure 36: Schéma de face de la vascularisation des lèvres et du nez chez un enfant porteur d'une FLP Gauche (Millard R, 1977)

Zhang KQ et al ont réalisé des dissections et des artériographies chez 50 témoins (sans fentes) et chez 10 FLP. Ils ont mis en évidence que dans les FL unilatérales complètes, l'artère labiale supérieure s'étendait le long de la berge de la fente, se terminant au niveau de la base de l'aile du nez en latéral. En médiale, artère labiale se terminait dans la base de la columelle. Dans les FL bilatérales complètes, la distribution de la vascularisation était similaire à celle rencontrée au niveau de la berge externe d'une FL unilatérale complète. L'artère qui vascularisait le philtrum et le prémaxillaire provenait de l'artère septale postérieure, artère ethmoïde antérieure, et de l'artère « nasale alaire » et/ou artère nasale latérale (Zhang KQ, 1994).

En cas de FP, 3 éléments essentiels de l'anatomie des muscles du voile diffèrent de la normale (Fig 37):

- D'une part, l'orientation des muscles du voile est différente, postéro-antérieure, presque sagittale, ne réalisant pas le sphincter musculaire que montre le voile normal;
- D'autre part, l'aponévrose palatine n'est pas retrouvée;
- Enfin, il existe des insertions musculaires clairement individualisables des muscles du voile, directement sur le bord postérieur des lames palatines (bord postérieur de l'os palatin) (Fig 37). En fait, les muscles se dirigeant dans un sens postéro-antérieur, soit se prolongent au bord de la fente, soit se terminent directement au bord postérieur des lames.

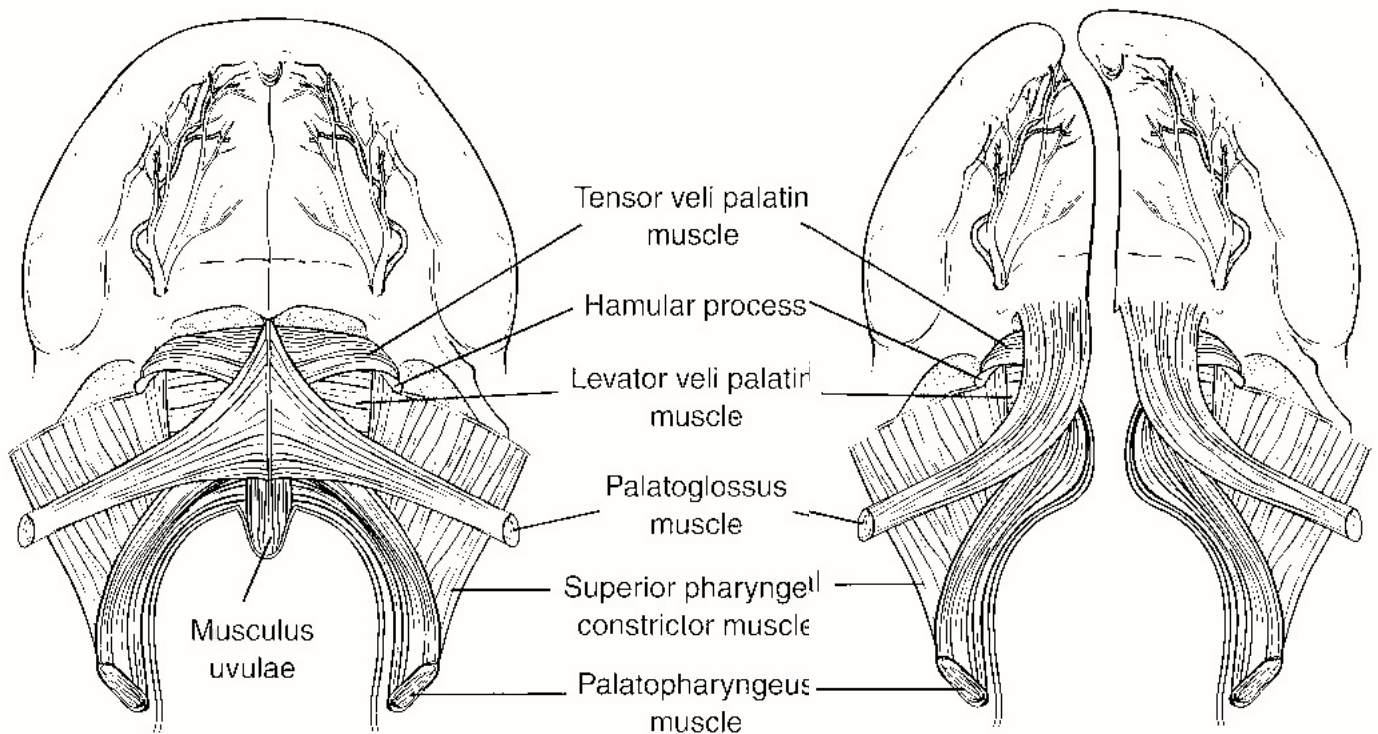


Figure 37 : Description de l'anatomie pathologique en cas de division vélo-palatine (Bentz ML, 2008)

En cas de FP postérieure, et même en cas de division sous muqueuse, on constate aussi l'orientation sagittale des fibres musculaires et l'insertion directe au bord postérieur des lames horizontales du palatin (Pavy B, 1998).

Zhang KQ et al ont décrit que le palais normal était vascularisé par 6 paires d'artères. En cas de FP, la branche antérieure de l'artère palatine ascendante devenait plus petite. La branche postérieure s'était déplacée vers l'avant et se dirigeait le long des berges de la fente. La branche palatine de la pharyngienne ascendante n'était pas retrouvée le long du muscle palato-pharyngé, mais descendait à partir de la base du crâne le long du muscle releveur du voile du palais (Zhang KQ. 1994).

C. Formes cliniques

Les FL/P regroupent bon nombre de formes cliniques différentes. Les phénomènes embryonnaires de formation de la lèvre et du palais étant consécutifs il est possible d'avoir une fente labiale sans fente palatine ainsi qu'une fente palatine sans fente labiale.

Lorsqu'on parle de FL/P il faut tout d'abord séparer les formes syndromiques (S) des formes non syndromiques (NS) qui n'ont pas la même fréquence et pas forcément la même étiologie. Ensuite pour classer les différentes FL/P il faut étudier la topographie de la fente. Celle-ci peut concerner:

- La lèvre de manière isolée, il s'agit alors d'une fente labiale (FL). La sévérité peut être plus ou moins importante allant de la forme fruste ou cicatricielle (Fig 38) ou la forme complète labio-narinaire.



Figure 38: FL isolée fruste droite
Aussi appelée fente cicatricielle,
ou microforme

- Le palais de manière isolée, il s'agit alors d'une fente palatine. De même la fente peut concerner tout le palais et on parle alors de fente vélo-palatine (FVP) (Fig 39-40) ou bien se limiter à l'atteinte du voile et on parle alors de fente vélaire (FV). (Fig 41)

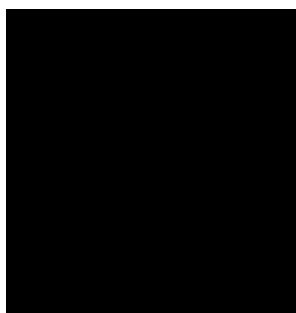


Figure 39 : Schéma d'une fente vélo-palatine vue de dessous



Figure 40: Photographie d'une fente vélo-palatine vue de dessous bouche ouverte

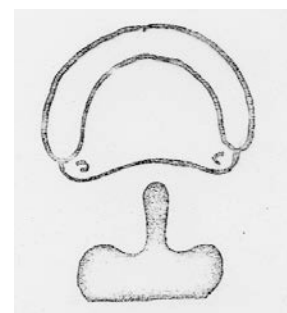


Figure 41 : Fente vélaire

- La lèvre et le palais, il s'agit alors de fentes labio-palatines (FLP).

On parle de fente totale lorsque le patient présente cliniquement une fente de la lèvre, du palais touchant aussi bien le voile que le palais osseux, mais aussi une fente alvéolaire (maxillaire) c'est à dire une fente touchant le palais primaire (Fig 42).



Figure 42 : FLP totale unilatérale droite

A Schéma de la lèvre et du nez vue de face, B Photo de la lèvre et du nez vue de face, C Schéma lèvre, nez, palais vue de dessous

La fente peut aussi être unilatérale (Fig 42) ou bilatérale (Fig 43).

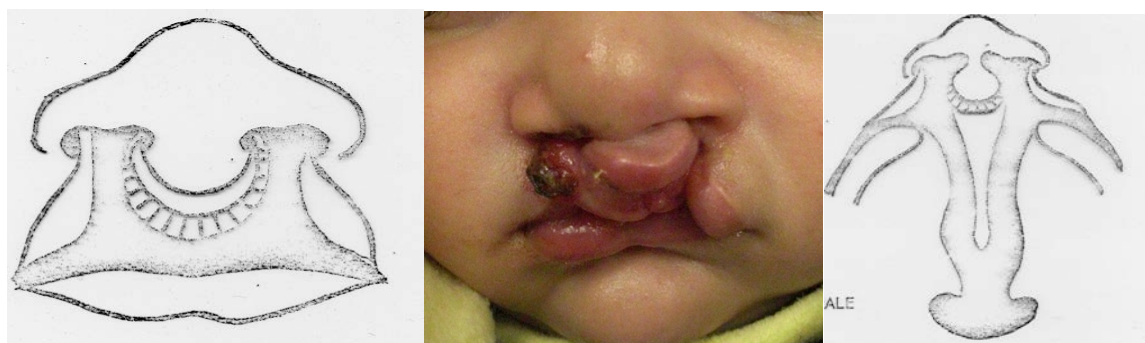


Figure 43 : FLP totale bilatérale

III. EPIDEMIOLOGIE

A. Prévalence

Plus de 1650 références [consultées le 11/03/2013] sont consultables sur Pubmed sur les items « Prevalence Cleft lip Cleft palate ». Les chiffres diffèrent beaucoup d'une publication à l'autre et sont surtout souvent approximatifs. De plus, les FLP ayant des présentations cliniques très hétérogènes les données sont parfois imprécises. D'après le travail de l'IPDTC Working group, sur 7,5 millions de naissances (54 registres dans 30 pays sur une

année), la prévalence des FL/P (toutes formes cliniques confondues (FL, FLP, FP)) était estimée à 9,92/10 000, avec une prévalence de 3,28/10 000 pour les FL, et de 6,64/10 000 pour les FLP (IPDTC, 2011). (Tableau 1)

La majorité des cas étaient des formes isolées, alors que dans 16% des cas ils étaient poly-malformatifs et 7% dans des syndromes connus.

Tableau 1: Registre international classé par ordre géographique, des années d'inclusion dans l'étude, du nombre total de naissance, du nombre total de cas de FL/P, ainsi que du calcul de la prévalence pour 10 000 naissances avec un intervalle de confiance de 95% (IPDTC, 2011)

Registry	Period Sent	Total Births	CL±P	CL±P per 10,000	95% CI	
Alberta	2002–2004	118,952	145	12.19	10.29	14.34
British Columbia*	2000–2002	121,619	131	10.77	9.01	12.78
Total Canada		240,571	276	11.47	10.16	12.91
Alabama	2000–2004	83,779	90	10.74	8.64	13.20
Arkansas	2001–2002	74,423	85	11.42	9.12	14.12
Atlanta	2001–2004	205,882	190	9.23	7.96	10.64
Colorado*	2000–2001	132,434	145	10.95	9.24	12.88
Hawaii	2000–2005	106,637	87	8.16	6.54	10.06
Illinois*	2000–2001	369,025	231	6.26	5.48	7.12
Michigan*	2001–2003	393,615	440	11.18	10.16	12.27
Oklahoma	2000–2004	252,380	339	13.43	10.04	14.94
Rhode Island*	2000–2003	49,451	40	8.09	5.78	11.02
Tennessee*	2000–2002	237,287	256	10.79	9.51	12.19
Utah	2000–2004	245,138	343	13.99	12.55	15.55
West Virginia	2000–2004	101,654	51	5.02	3.74	6.60
Total United States		2,251,705	2297	10.20	9.79	10.63
Mexico	2002–2004	79,537	119	14.96	1.39	17.90
South America	2001–2003	645,297	833	12.91	12.05	13.85
Total Mexico and South America		724,834	952	13.13	12.31	14.00
Austria-Styria	2001	10,050	11	10.95	5.46	19.58
Belgium-Antwerp	2001–2003	52,868	62	11.73	8.99	15.03
Belgium-Hainaut	2001–2003	36,461	29	7.95	5.33	11.42
Denmark-Odense	2001–2003	15,768	26	16.49	10.77	24.16
Finland	2004	57,945	54	9.32	7.00	12.16
France-Paris	2002–2003	77,000	83	10.78	8.59	13.36
France-Strasbourg	2001	13,860	14	10.10	5.52	16.95
Germany-Mainz	2001–2002	6290	15	23.85	13.35	39.33
Germany-Saxony Anhalt	2001–2005	87,458	127	14.52	12.11	17.28
Northern Netherlands	2001–2003	60,924	89	14.61	11.73	17.98
Switzerland-Vaud	2001–2003	20,942	22	10.51	6.58	15.91
Total Western Europe		439,566	532	12.10	11.10	13.18
Czech Republic*	2003–2004	191,349	141	7.37	6.20	8.69
Hungary	2001–2004	385,714	307	7.96	7.10	8.90
Poland*	2001–2003	724,742	641	8.84	8.17	9.56
Russia-Moscow Region	2002–2004	161,595	116	7.18	5.93	8.61
Slovak Republic	2001–2005	258,112	261	10.11	8.92	11.42
Ukraine*	2001–2004	101,510	87	8.57	6.86	10.57
Total Eastern Europe		1,823,022	1553	8.52	8.10	8.95
Ireland-Dublin	2001–2003	68,469	56	8.18	6.18	10.62
UK-North West Thames	2001–2003	140,672	126	8.96	7.46	10.66
UK-Oxford	2001–2003	18,334	15	8.18	4.58	13.49
UK-Wales	2000–2005	189,161	178	9.41	8.10	10.90
UK-Wessex	2001–2002	51,476	58	11.27	8.56	14.57
Total British Isles		468,112	433	9.25	8.40	10.16
Croatia*	2001–2003	16,739	11	6.57	3.28	11.76
France-Central East	2001–2004	425,304	279	6.56	5.81	7.38
Israel	2002–2004	26,317	19	7.22	4.35	11.27
Italy-Campania	2001–2003	172,300	79	4.59	3.63	5.71
Italy-East Sicily*	2001–2002	33,022	25	7.57	4.90	11.18
Italy-Emilia Romagna	2001–2003	81,642	48	5.88	4.33	7.80
Italy-North-East	2002–2004	174,857	105	6.00	4.91	7.27
Italy-Tuscany	2001–2003	80,505	48	5.96	4.40	7.91
Malta	2001–2003	11,629	8	6.88	2.97	13.55
Portugal-South	2001–2002	37,163	24	6.46	4.14	9.61
Spain-Asturias	2001–2003	20,911	14	6.70	3.66	11.23
Spain-Basque Countries	2001–2003	55,188	29	5.25	3.52	7.55
Total South-Mediterranean Europe		1,135,577	689	6.07	5.62	6.54
Australia-Victoria	2001–2004	251,312	243	9.67	8.50	10.97
Japan*	2001–2004	347,889	697	20.04	18.58	21.58
South Africa*	2001–2003	69,321	20	2.89	1.76	4.46
United Arab Emirates	2002–2003	17,188	12	6.98	3.61	12.19
Total		7,769,097	7704	9.92	9.70	10.14

* Registries not reporting termination of pregnancies (ToPs) although permitted in their catchment area.

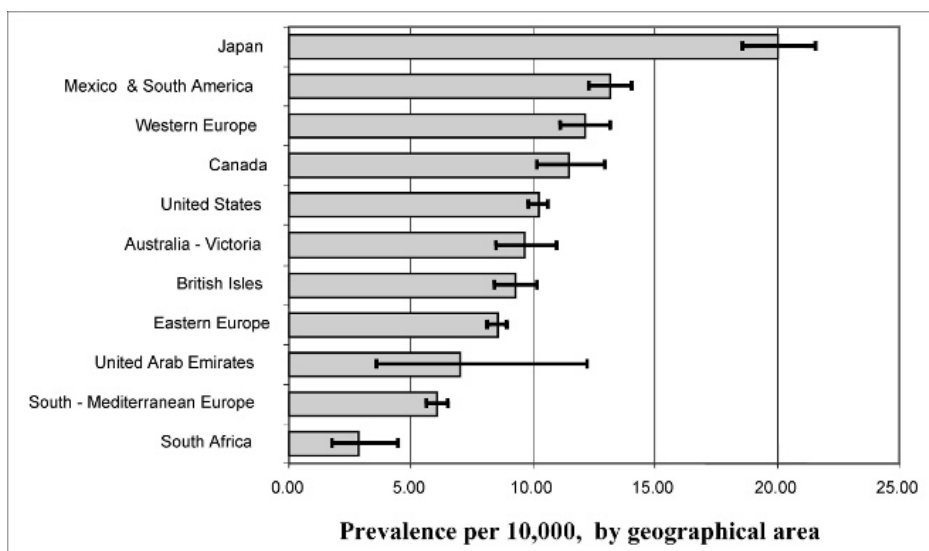


Figure 44: Prévalence des FL/P par zone géographique (pour 10 000 naissances) (IPDTC, 2011)

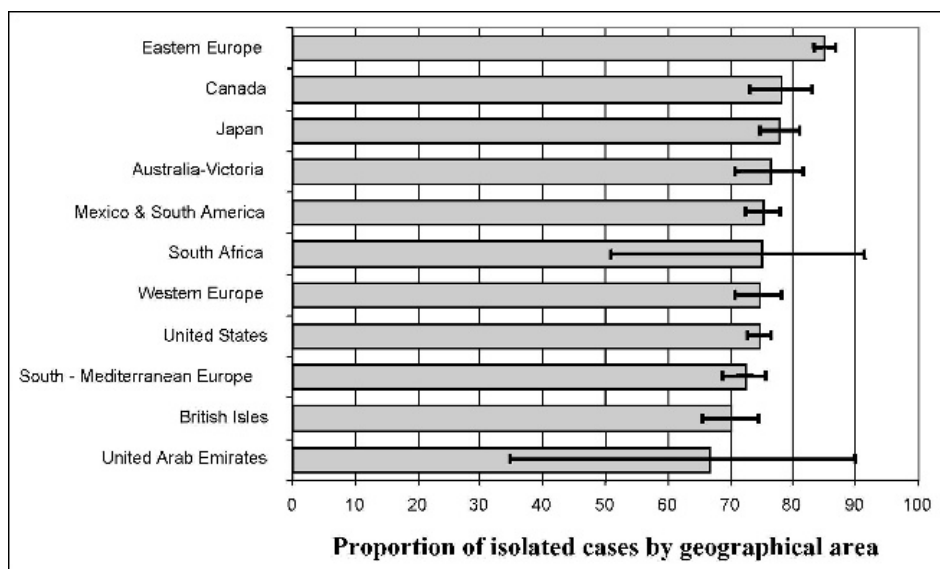


Figure 45 : Proportion de formes isolées de FL/P selon l'origine géographique (IPDTC, 2011)

Il est difficile de connaître précisément la prévalence en France des FL/P en l'absence de registre national. L'étude d'IPDTC a mis en évidence une prévalence en France égale à 10,78/10 000 naissances à Paris (étude sur 2 ans ayant retrouvée 83 FL/P sur 77 000 naissances) et 10,10/10 000 naissances à Strasbourg (étude sur 1an ayant retrouvée 14 FL/P sur 13 860 naissances).

B. Récurrence

Il existe de nombreuses familles avec plusieurs sujets atteints de FL/P. Effectivement cette observation clinique est connue depuis de nombreuses années et les FL/P font parties des

anomalies congénitales qui ont un risque de récurrence dans la descendance. Ce risque de récurrence a été étudié (Vikkula M, 2005).

- Lorsqu'un enfant de la famille est porteur d'une FL ou FLP, le risque de récurrence pour le second enfant a été estimé entre 3 et 7%. Si un parent est porteur d'une FL ou FLP, le risque de fente chez la descendance a été estimé entre 2 et 5%. Si un enfant et un parent sont porteurs de fente dans la famille, le risque de récurrence pour un deuxième enfant a été estimé à 15%.

- Lorsqu'un enfant de la famille est porteur d'une FP, le risque de récurrence pour le second enfant a été estimé entre 2 et 5%. Si un parent est porteur d'une FP, le risque de fente chez la descendance a été estimé entre 3 et 7% et si un parent et un enfant sont porteurs de FP, le risque de récurrence pour un deuxième enfant a été estimé à 17%. Les fente palatines isolées (FP I) sont génétiquement distinctes des FL avec ou sans FP.

C. Facteurs de risques

Les FL/P sont une anomalie congénitale courante d'étiologie complexe. Elles représentent un groupe hétérogène de malformations. Elles peuvent survenir isolément ou dans le cadre d'un large éventail de syndromes chromosomiques, mendéliennes, ou tératogènes. Beaucoup de progrès ont été faits dans l'identification des facteurs déclencheurs génétiques et environnementaux pour les formes syndromiques, mais concernant les formes non syndromiques qui sont les plus fréquentes l'étiologie est encore mal caractérisée. Récemment grâce à des travaux se basant sur des études épidémiologiques, cliniques (phénotype), d'association, et de l'analyse des modèles animaux, plusieurs facteurs de risque génétiques et environnementaux ont été identifiés et retenus dans les formes non-syndromiques. Ces résultats ont fait progresser la compréhension de la biologie du développement et créé de nouvelles opportunités pour la recherche clinique.

1. Facteurs environnementaux

L'implication de facteurs environnementaux dans les différentes formes de fentes est étudiée depuis plusieurs années. En règle générale l'identification de facteurs environnementaux est très importante car celle-ci offre la possibilité d'une prévention.

Actuellement, durant le premier trimestre de grossesse, le tabac, l'alcool et le déficit en acide folique apparaissent comme les facteurs de risques environnementaux les plus fréquemment

reconnus comme liés aux fentes oro-faciales. Toutefois d'autres facteurs ont aussi été évoqués (Rahimov F, 2012). (Tableau 2)

Tableau 2 : Facteur de risques environnementaux des FL/P NS (Stuppia L, 2011)

Exposition maternelle en début de grossesse
Tabac
Alcool
Alimentation
Infections virales
Drogue
Agents tératogène

a) Tabac

Même si la relation entre le tabagisme maternel et la présence d'une FL/P n'est pas une relation « forte » elle reste toutefois significative dans plusieurs études. Le risque relatif a été estimé à environ 1,3 à 1,5 fois (Wyszynski DF, 2002).

b) Alcool

La consommation abusive d'alcool chez la mère pendant la grossesse, en dehors du fait d'induire un syndrome d'alcoolisation fœtale, augmente également le risque de FLP. Munger et al. ont montré que la consommation maternelle multipliait le risque de FLP par 1,5 et jusqu'à 4,7 fois selon la quantité d'alcool ingéré de manière quotidienne (risque dose-dépendant) (Munger RG, 1996). Shaw et Lammer ont quant à eux souligné le fait que les mères qui avaient consommé plus de 5 verres par jour augmentaient le risque de fente chez leur bébé de 3,4 fois (Shaw GM, 1999).

Toutefois il a été aussi souligné que la consommation d'alcool à faible dose ne semblait pas augmenter le risque de fentes faciales (Natsume N, 2000).

c) Acide foliques et vitamines

Le premier lien établi entre métabolisme des folates et risque de fentes labio-maxillo-palatines (FLMP) dans la descendance d'un couple a été rapporté par Conway et Peer en 1958. Les travaux plus récents rapportent que l'absence de supplémentation en acide folique et de cobalamines en début de grossesse serait responsable d'un triplement du risque de FL/P (Shaw GM, 2002). En outre, un défaut du métabolisme de l'homocystéine maternelle est un facteur de risque de FL/P dans la descendance. Le rôle de la supplémentation en acide folique

dans la prévention de la FLP a été étudié dans plusieurs travaux. Il semblerait que la supplémentation à faible dose d'acide folique (concentration dans les produits céréaliers) ne soit pas un élément protecteur des FL/P (Ray JG, 2003). Seule une très forte supplémentation en acide folique (10 mg/jour) pourrait réduire le risque de FL/P de façon significative (réduction de 65%) (Tolarova M, 1995).

d) Stéroïdes

Le rôle des corticostéroïdes dans la genèse des fentes faciales est bien connu dans les modèles animaux (Baxter H, 1950). La prise de glucocorticoïdes par une souris gravide induit des FL/P dans la descendance. L'incidence de ces fentes varie toutefois en fonction du niveau de consanguinité, de la dose administrée et du stade gestationnel au moment de la prise.

Melnick et al. ont étudié les effets tératogènes sur la morphogénèse labiale liés à l'administration de la Triamcinolone/Hexacetonide au 8^{ème} jour de gestation (Melnick M, 1981). La fréquence des FL/P chez les petits des souris traitées a été jugée plus de 3 fois supérieure à la fréquence spontanée par rapport au groupe contrôle non-traité. De plus les embryons exposés au Triamcinolone/Hexacetonide présentaient une réduction sévère de la taille des bourgeons latéraux nasaux.

L'association entre la prise maternelle de corticoïdes durant la période péri-conceptionnelle (1 mois pré-conceptionnel - 3 mois post-conceptionnel) et le risque d'anomalies cranio-faciales chez les bébés a été étudiée. Les différents travaux (Carmichael SL, 1999-2007; Rodriguez-Pinilla E, 1998 ; Pradat P, Robert-Gnansia E, 2003) soulignent le lien entre prise régulière de corticoïdes et fente oro-faciale. Park-Wyllie et al. ont aussi démontré que bien que la Prednisone ne présentait pas de risque tératogène majeur chez l'homme en cas d'utilisation à doses thérapeutiques le risque de fente était multiplié par 3,4 fois (Park-Wyllie L, 2000). Ceci confirmant les données qui avaient été étudiées chez l'animal.

e) Anticonvulsivants

Les anti-convulsivants du type Phénytoïne/Hydantoïne, Oxazolidonones et l'Acide Valproïque ont démontré leur rôle dans l'augmentation des malformations congénitales.

Ces trois classes thérapeutiques peuvent conduire à la présence de FLP, même si souvent les tableaux poly-malformatifs peuvent être létaux.

Des études un peu anciennes se sont intéressées au rôle des benzodiazépines.

Saxen et al avaient remarqué une augmentation significative de la consommation de Benzodiazépines chez les mères de nourrissons atteints de FP isolée, et une augmentation non

significative chez les mères de nourrissons porteurs de FLP (Saxen I, 1975). Alors que Safra et Oakley rapportaient l'association fente et exposition au Diazépam pendant le 1^{er} trimestre de grossesse (Safra MJ, 1975).

Bien que le Diazépam à des doses élevées soit un tératogène faible chez les souris sensibles, son interférence avec le développement du visage du fœtus est probablement modeste, voire inexistant. Il est bien connu que les femmes atteintes d'épilepsie ont un risque accru d'avoir des enfants avec des fentes faciales. Ce risque a été principalement attribué aux effets tératogènes des antiépileptiques, mais d'autres facteurs de risque ont également été suggérés, comme l'épilepsie en soi ou certaines anomalies génétiques sous-jacentes associées à l'épilepsie (Durner M, 1992).

2. Les facteurs génétiques

Fogh-Andersen a été le premier, en 1942, à souligner un rôle génétique dans la genèse des fentes faciales (Fogh-Andersen P, 1942). Depuis, de nombreuses approches ont été utilisées pour préciser ce rôle : les modèles animaux, l'analyse des réarrangements chromosomiques (caryotype), linkage studies, les études clinico-génétiques, le séquençage de gènes candidats... Plusieurs articles de revue de la littérature récents ont fait un état des lieux des connaissances actuelles sur la cartographie des gènes des FL/P NS et la mise en exergue des gènes candidats (Rahimov F 2012, Stuppia L 2011, Mossey PA 2009). Ces découvertes ont été possibles grâce aux progrès et développement des techniques de génétiques (séquençage haut débit) et aux collaborations internationales.

Il faut toutefois bien différencier les formes syndromiques des formes non syndromiques.

La forme syndromique correspondant à la présence chez un patient porteur de fente d'une autre malformation ou anomalie spécifique. Dans ce cas, la plupart des anomalies sont d'origine monogénique ou chromosomique, même si dans certains cas l'origine peut être environnementale.

Les formes non syndromiques sont quant à elles plus fréquentes et représentent environ 70% des cas. La fente est alors isolée et l'origine est souvent multifactorielle avec une sensibilité génétique et l'influence de facteurs environnementaux (Mossey PA, 2009 ; Stuppia L, 2011 ; Mangold E, 2011 ; Rahimov F 2012, Dixon MJ, 2011 ; Kohli SS, 2012).

Le lien entre FL/P et génétique peut donc être plus ou moins bien identifié. Et en pratique il existe effectivement 2 cas de figure :

Dans le premier cas : Le lien a été établi formellement sur le plan génétique. Les anomalies peuvent être soit chromosomiques soit génomiques.

Dans le deuxième cas : le lien peut être clinique. Il peut s'agir dans ce cas de syndrome identifié de manière clinique avec des éléments qui font suspecter l'origine génétique (comme par exemple leur mode de transmission) mais dont l'anomalie génétique (mutation, ou variants) n'a pas encore été identifiée.

a) Anomalies chromosomiques

Certaines anomalies chromosomiques sont reconnues comme liés aux FLP comme par exemple :

- Les trisomie 13, 18, 21
- La délétion 22q11
- Les délétions 4pter, 5pter
- Et les délétions 4p36

b) Génomique et fentes labiales et/ou palatines: les gènes identifiés

L'anomalie génétique n'est pas toujours chromosomique mais peut être génique. La recherche dans ce domaine est en plein essor. L'analyse des gènes identifiés ainsi que l'analyse des gènes potentiellement liés aux FL/P fera l'objet de la première partie de la thèse. Nous ne détaillerons donc pas plus cette problématique dans ce chapitre.

c) Expressivité variable selon la localisation anatomique

Durant la formation de l'embryon il existe une variation temporo-topographique de l'expression génique. Ainsi certains gènes comme *BMP2*, *SHH*, *TGFβ3* ont été identifiés spécifiquement au niveau du bord des lames palatines durant les premières phases de la palatogenèse (Stanier P, 2004). (Fig 46) En dehors du facteur topographique, certains gènes se succèdent chronologiquement pour permettre la formation du palais (Kouskoura T, 2011). (Fig 46-47)

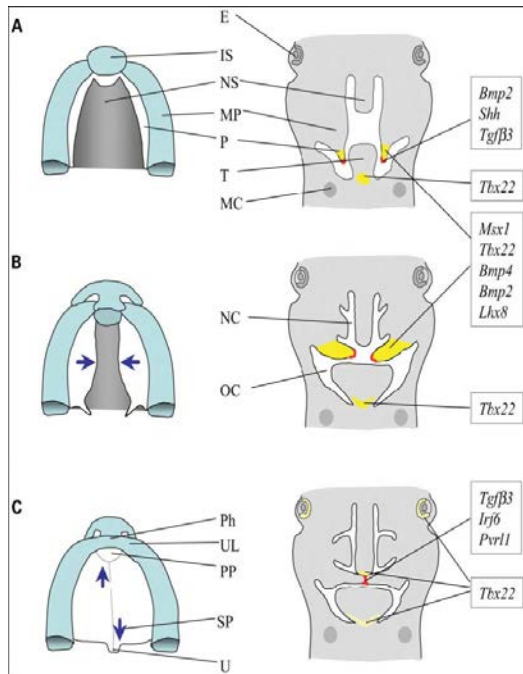


Figure 46: Localisation topographique et chronologique de l'expression des gènes pendant la palatogenèse (Stanier P, 2004)

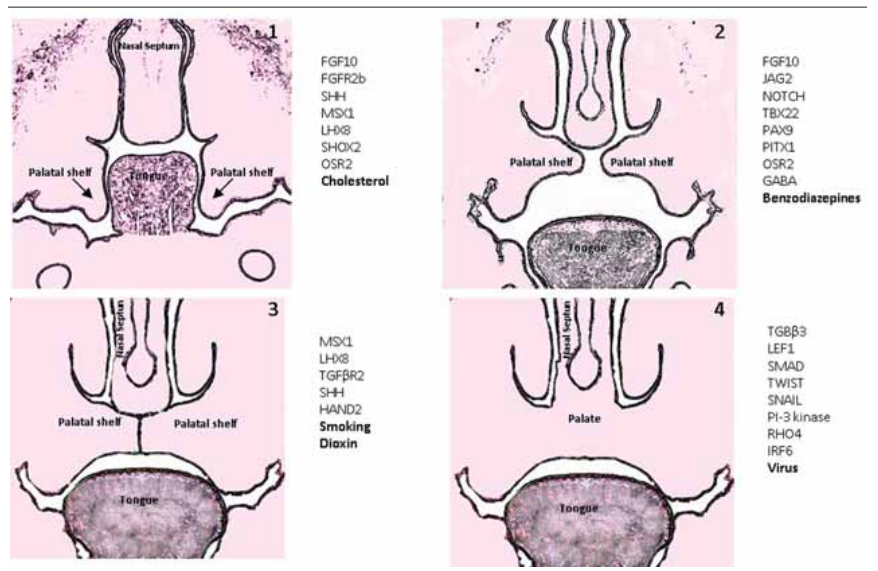


Figure 47: Rôle chronologique des principaux gènes pendant la palatogenèse (Kouskoura T, 2011)

1. Croissance des lames palatines issues des bourgeons maxillaires
2. Abaissement de la langue et élévation des lames palatines
3. Croissance et rapprochement des lames palatines
4. Fusion des lames palatines et du septum nasal

Deux éléments sont importants concernant la piste de l'étiologie génétique des FLP. Effectivement, dans le cadre de la recherche, il semble utile de réaliser des analyses localisées au niveau de la face, du palais et des berges des fentes. De plus, de par l'expression variable dans le temps de ces différents gènes durant la genèse faciale, il semble aussi judicieux d'effectuer des analyses à différents moments de la vie embryonnaire et en post-natal.

3. Interaction génétique et environnement

Les FL/P ont longtemps été soupçonnées comme pouvant être la conséquence d'une interaction complexe entre un ou plusieurs gènes et des facteurs environnementaux (Rahimov F, 2012). Ce n'est que récemment que la preuve a pu en être faite. (Engelman CD, 2009; Murcay CE, 2009; Gauderman WJ, 2010) Ainsi plusieurs facteurs environnementaux ont pu être identifiés comme interagissant avec certains gènes.

Tableau 3 Possible interactions gène-environnement impliquées dans la palatogenèse des FL/P (Stuppia L, 2011)

-
- *TGFA*
 - Smoke, vitamin deficiency
 - *TGFB3*
 - Smoke, alcohol
 - *MSX1*
 - Smoke, alcohol
 - *ADHIC*
 - Alcohol
 - *EPHX1, GSTM1, GSTT1, NAT1, NAT2, CYP1A1*
 - Smoke, drug abuse, occupational exposure
 - *RARA*
 - Vitamin A intake
 - *MTHFR, RFC1*
 - Folic acid intake
-

L'adjonction du tabagisme pendant la grossesse chez des femmes déjà porteuses d'anomalies génétiques augmente la prévalence des fentes faciales chez leurs enfants. De même le génotype maternel du glutathion-S-transférase (*GSTT1*) associé au tabagisme, augmente de manière significative le risque de FLP (odds ratio = 4,9) (VanRooij IA, 2001). L'association mère fumeuse et génotype *MSX1* chez les nourrissons multiplierait le risque de fente d'un facteur 7,16 (mécanisme probable de potentialisation) (Beaty TH, 2002).

L'impact de la consommation d'alcool sur certains génotypes en tant que facteur de risque de FLP doit encore être démontré même s'il semble être particulièrement en lien avec les gènes *ADHIC*, *MSX1*, et *TGFB3*.

Il a été souligné que l'association entre carence en acide folique et génotype pré-existant *TGFA* TaqI C2, augmentait le risque de FLP (Jugessur A, 2003a).

Cette piste étiologique environnementale et génétique est importante. Effectivement, s'il est encore difficile d'avoir une action préventive directe sur les gènes, il est envisageable d'agir sur les facteurs environnementaux (FE) et ainsi sur l'incidence de la pathologie.

Nous en avons maintenant fini avec l'introduction sur les FL/P (embryologie, anatomie, formes cliniques, et épidémiologie) et nous allons dans le chapitre suivant nous intéresser plus spécifiquement à l'angiogenèse.

IV. ANGIOGENESE

Avant de développer nos hypothèses de travail et nos objectifs, nous présenterons dans ce chapitre un rappel des définitions et des mécanismes de l'angiogenèse, puis une analyse des facteurs génétiques impliqués, et pour finir nous ferons l'état des lieux de l'implication de l'angiogenèse dans les malformations cranio-faciales.

A. Définition

La formation des vaisseaux peut être la conséquence de 2 types de phénomènes la vasculogenèse (formation de vaisseaux sanguins à partir de précurseurs hémangioblastes et angioblastes) et l'angiogenèse (formation de vaisseau à partir de vaisseaux pré-existants).

Le processus de la vasculogenèse est distinct de celui de l'angiogenèse. Le terme vasculogenèse est d'ailleurs strictement réservé à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins durant l'embryogenèse. Initialement, les cellules mésenchymateuses se différencient *in situ* en hémangioblastes précoces qui forment des agrégats cellulaires (îlots sanguins), dans lesquels la population cellulaire intérieure se différencie en précurseurs hématopoïétiques et la population cellulaire extérieure donne naissance aux cellules endothéliales primitives qui génèrent un réseau vasculaire fonctionnel. Ce plexus vasculaire primitif devient ultérieurement un réseau complexe de vaisseaux sanguins matures s'interconnectant. (Fig 50-52) La vasculogenèse se développe également à partir de cellules souches endothéliales issues de la moelle osseuse, mobilisées par différents facteurs de croissance.

Le terme d'angiogenèse quant à lui a été utilisé pour la première fois en 1935 par Hertig pour décrire la croissance des vaisseaux sanguins dans le placenta. Folkman l'a ensuite utilisé à son tour en 1972 pour décrire une néovascularisation associée à la croissance d'une tumeur solide (Kutryk MJB, 2001). Actuellement l'angiogenèse a été impliqué dans de nombreux mécanismes aussi bien durant l'embryogenèse qu'en post-natal.

Le programme de néoangiogenèse débute par une activation des cellules endothéliales par différents stimuli angiogéniques : la cellule endothéliale secrète des protéases qui dégradent la membrane basale et la matrice extra-cellulaire (MEC). (Fig 48) Les cellules endothéliales peuvent alors migrer de façon linéaire dans le conjonctif en formant des bourgeons puis des rameaux. Elles prolifèrent et synthétisent de nouvelles membranes basales en se groupant sous forme de tubes capillaires. (Fig 49) Plusieurs rameaux vont s'anastomoser et former des boucles capillaires. Les cellules de l'environnement et plus particulièrement les cellules issues

de cellules souches hématopoïétiques (neutrophiles, monocytes/macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes, plaquettes et mastocytes) contribuent au phénomène d'angiogenèse en produisant des médiateurs (facteurs de croissance, cytokines, chimiokines, enzymes, mais aussi macromolécules de la matrice extracellulaire).

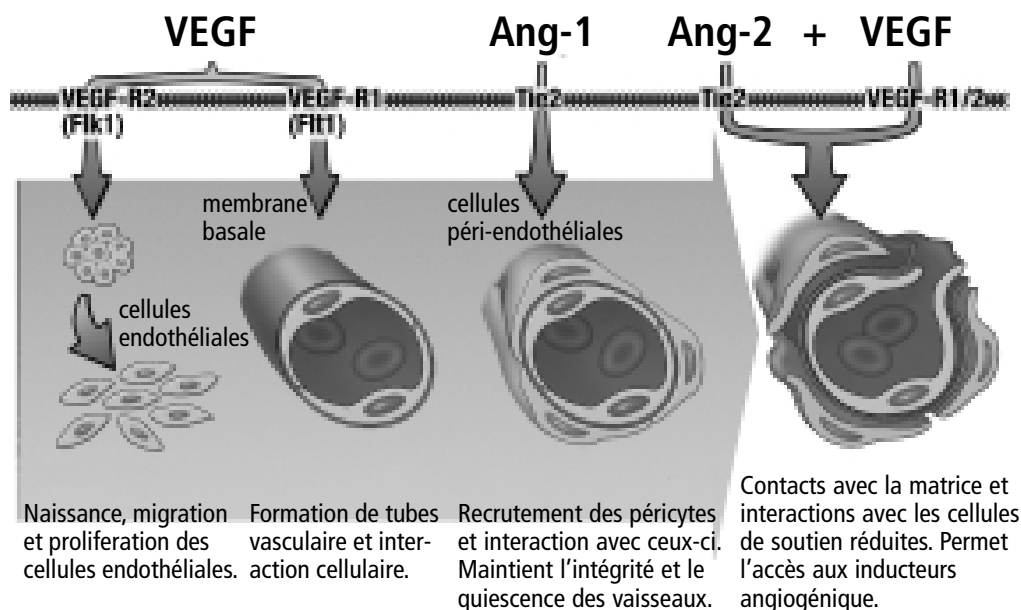


Figure 48: Schéma de la maturation d'un vaisseau (Hanahan)

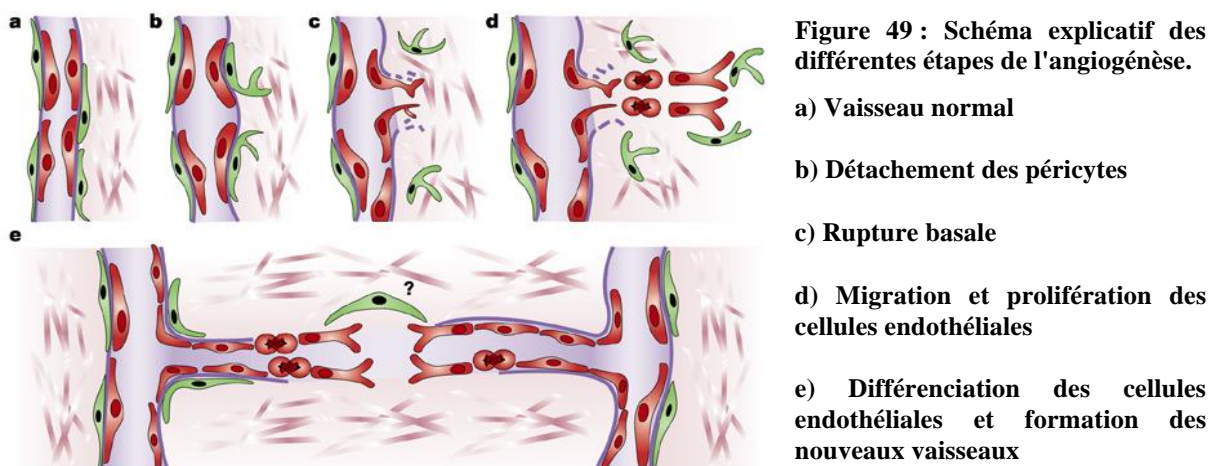


Figure 49 : Schéma explicatif des différentes étapes de l'angiogenèse.

B. Implication dans l'embryologie

Durant l'embryogenèse il existe à la fois des phénomènes de vasculogenèse mais aussi des phénomènes d'angiogenèse. (Fig 50) Ainsi plusieurs phases se succèdent. Tout d'abord il y a une phase de vasculogenèse qui permet la formation de vaisseaux. Puis à partir de ces vaisseaux issus de la vasculogenèse peut se mettre en place l'angiogenèse proprement dite qui va permettre la structuration du système vasculaire.

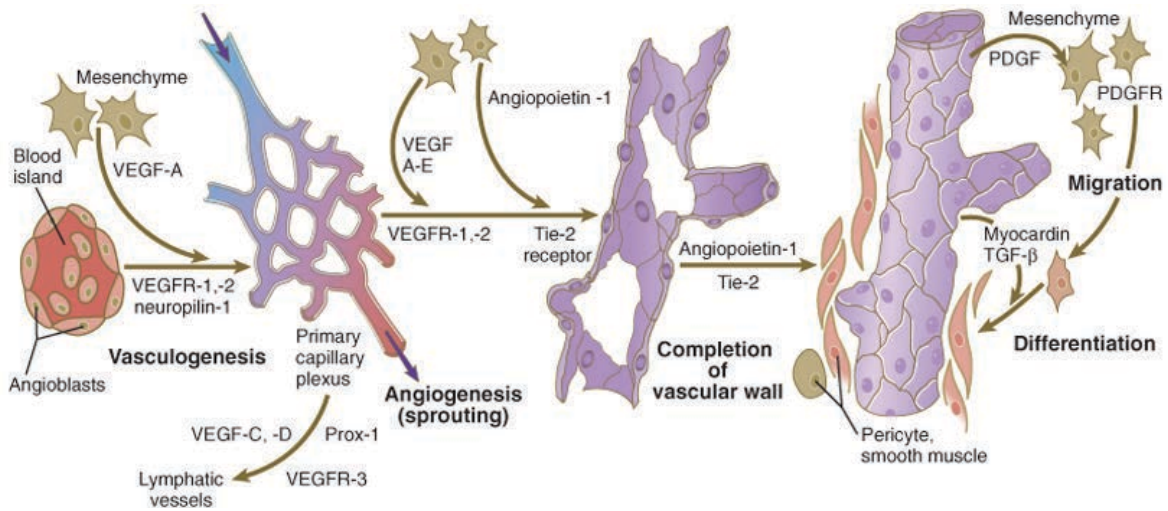


Figure 50: Schéma illustrant la formation du système vasculaire durant l'embryogenèse.

Globalement l'embryon peut être caractérisé selon trois critères : son âge, sa taille et ses caractéristiques morphologiques. C'est la corrélation de ces 3 critères qui va permettre d'identifier les stades embryonnaires ou stades de Carnegie. Le cœur et le système circulatoire dérivent du mésoderme. Les premiers signes de vasculogénèse apparaissent au stade 8 de Carnegie (21^{ème}-24^{ème} jour) dans la région de la vésicule ombilicale (extra-embryonnaire). (Fig 51)

Stade de Carnegie	8				9	
Nombre de jours	21	22	23	24	25	26
Grandeur en mm	1.0 – 1.5			1.5 – 2.5		
Description	Embryon piriforme Canal notochordal Canal neurentérique Ebauche de la gouttière neurale			Embryon somitique Membrane oropharyngée Coelome intraembryonnaire 1-3 somites		

Figure 51: Stade 8 et 9 de Carnegie chez un embryon humain.

<http://www.embryology.ch/francais/ipperiodembry/carnegie01.html>

On y trouve des agrégats cellulaires mésodermiques appelés hémangioblastes, ainsi nommés parce qu'ils donnent naissance aux hémocytoblastes ainsi qu'aux angioblastes. La formation des vaisseaux, tout comme celle du tube cardiaque, a donc un rapport étroit avec l'endoderme, qui semble jouer un rôle inducteur sur la formation de ces cellules. Au sein des ces agrégats

mésodermiques les cellules centrales s'arrondissent et se différencient en précurseurs des cellules sanguines (hémocytoblastes), alors que les cellules périphériques s'assemblent en cellules endothéliales (angioblastes) délimitant des vésicules. Avant le 24^{ème} jour les angioblastes donnent également naissance aux vaisseaux intra-embryonnaires à partir des angioblastes qui se sont différenciés dans la splanchnopleure. La colonisation, par les angioblastes, des organes en formation se fait par migration. Les organes produisent des facteurs angiogéniques, stimulant la formation des vaisseaux.

La vasculogénèse proprement dite, ou formation de vésicules *in situ*, se produit lorsque les angioblastes voisins se réunissent et délimitent ainsi la lumière d'un vaisseau. La formation de troncs vasculaires à partir d'un réseau de capillaires est également sous l'influence de facteurs hémodynamiques. En outre, des cellules locales se différencient en péricytes, en fibroblastes et en cellules musculaires lisses. Tous les vaisseaux ne sont toutefois pas issus d'un réseau de capillaires, les branches dorsales de l'aorte tout particulièrement, sont déterminées par la métamérie des somites.

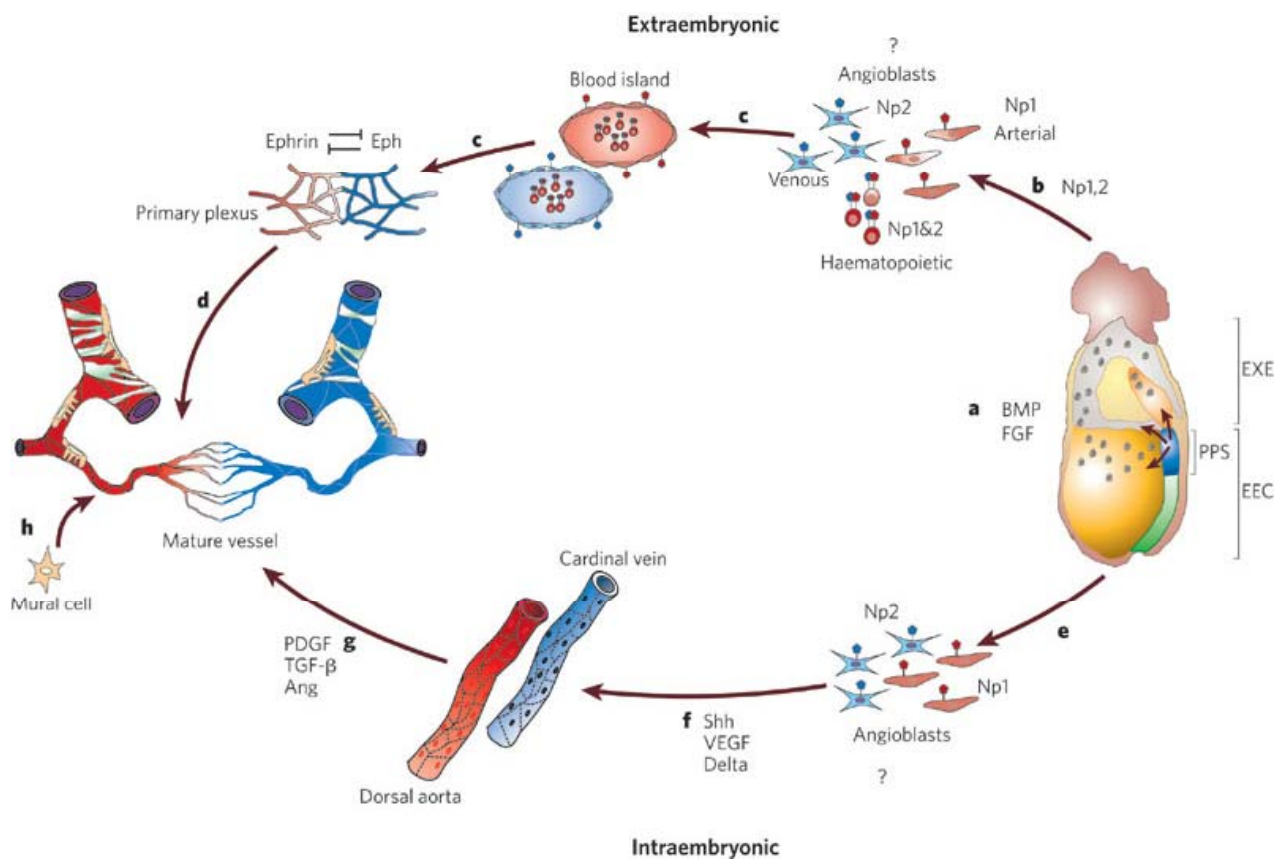


Figure 52 Développement vasculaire embryonnaire (Coultas L, 2005)

La formation du système vasculaire pendant l'embryogenèse est un système complexe passant par plusieurs étapes que sont la vasculogénèse avec la formation de vaisseaux d'abord

immatures puis matures suite au remodelage, puis l'angiogenèse qui permet le développement et l'arborisation du système. (Fig 50-52)

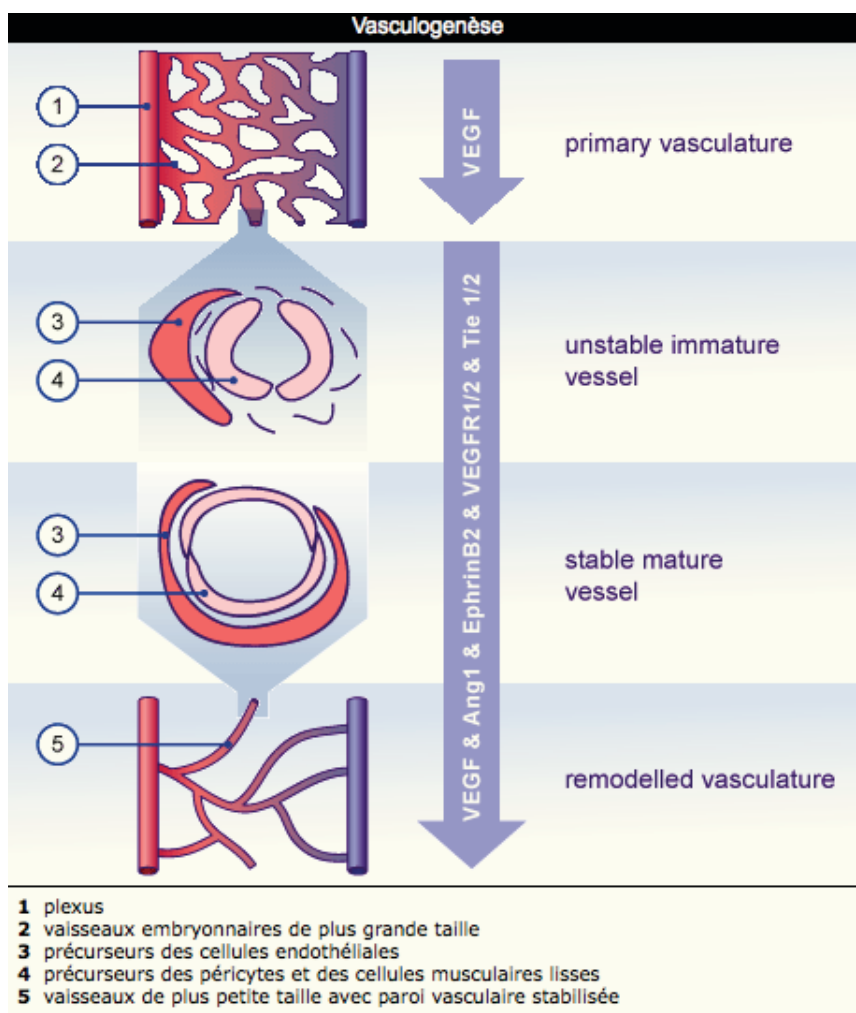


Figure 53: Etapes de la vasculogenèse (Darland DC, 1999-2001)

De nombreux gènes ont été identifiés à des étapes précises aussi bien dans la vasculogenèse que l'angiogenèse. (Fig 48-49)

C. Facteurs activateurs et inhibiteurs de l'angiogenèse

Comme nous venons de le voir de nombreux gènes ont été identifiés comme impliqués dans l'angiogenèse. Nous rapportons dans le tableau 4, les principaux médiateurs de l'angiogenèse.

Tableau 4 : Principaux médiateurs de l'angiogenèse

1. Facteurs de croissance	bFGF, aFGF, VEGF, ECGF, PD-ECGF, PDGF, HGF, IGF-1, TGF β , PlGF, angiopoïétine (Ang-1)
2. Cytokines	TNF α , IL1, IL6, IL8, IL15, G-CSF, GM-CSF, stromal-cell-derived factor 1
3. Chimiokines contenant un motif « ELR » ou sans motif « ELR »	IL8 (=CXCL8), ENA-78 (=CXCL5), Gro α (=CXCL1), Gro β (=CXCL2), CTAP-III (=CXCL7), SDF-1 (=CXCL12), Gro β (=CXCL2), MCP-1 (=CCL2), fractalkine (=CX3CL1)
4. Macromolécule de matrice extracellulaire	Collagène I, fibronectine, laminine, tenascine, héparine, héparane sulfate
5. Enzymes protéolytiques	MMP, activateurs du plasminogène
6. Molécules d'adhésion (CAM)	Intégrines β 1 et β 3, E-sélectine, VCAM-1, PECAM-1, CD34, sialyl Lewis ^x , endogline
7. Divers	Angiogénine, angiotropine, PAF, histamine, substance P, érythropoïétine, lipides (PG), adénosine, fibrinogène

ELR : motif glutamine-leucine-arginine

L'angiogenèse est très dépendante de ces médiateurs. En effet en l'absence de flux suffisant, ou en l'absence de concentrations suffisantes des facteurs angiogéniques (Tableau 4) et/ ou en présence d'inhibiteurs de l'angiogenèse (Tableau 5) on observe une régression des bourgeons vasculaires.

Tableau 5 : Principaux inhibiteurs de l'angiogenèse

1. Facteurs de croissance	TGF β (selon la dose)
2. Cytokines	IL7, IL4, IL6, IL12, IFN α , IFN γ , LIF
3. Chimiokines CXC (sans motif « ELR »)	IP10 (=CXCL10), PF-4 (=CXCL4), Mig (=CXCL9), I-TAC (=CXCL11)
4. Facteurs fixant l'héparine	Thrombospondine-1, PF-4, constatine, tumstatine
5. Inhibiteurs de protéases	TIMP-1, TIMP-2, PAI-1, PAI-2
6. Inhibiteurs tissulaires	Cartilage, cristallin, vitré
7. Divers	Angiostatine (fragment du fibrinogène), endostatine (fragment du collagène IV), SPARC (secreted protein acidic and rich cysteine), opioïdes, rétinoïdes

IP10 = interféron inducible protein-10

TIMP = tissue inhibitor of metalloproteases

L'équilibre entre les activateurs et inhibiteurs angiogéniques doit donc être strictement respecté pour aboutir à un système vasculaire compétent.

D. Angiogenèse et malformations congénitales cranio-faciales

Il n'existe pas de lien clairement établi entre l'angiogenèse et la présence d'une FL/P toutefois plusieurs publications nous donne à penser qu'un tel lien existe.

1. Vaisseaux et morphogénèse faciale

Des travaux sur modèles animaux (agneau, rats..) ont démontré la place importante de la vascularisation dans la morphogénèse faciale.

- Koster D et al se sont intéressés aux conséquences de la ligature de la carotide commune droite chez le rat albinos âgé de 42 jours. Ce geste a été responsable de la dilatation des autres artères principales du cou ainsi qu'à l'apparition de nombreuses anastomoses collatérales (Köster D, 1986).

- Le même mécanisme a été étudié sur des modèles fœtaux. Ainsi Escobar LF et al ont réalisé chez l'agneau des obstructions carotidiennes entre 115-117 jours de gestation. (Pour un terme à 147 jours) Ils ont alors noté l'apparition d'anomalie cranio-faciale à type de séquence de Pierre Robin, syndrome de Goldenhar, mais aussi de microsomie hémifaciale. Ils en ont conclu que les anomalies vasculaires, chez l'agneau, même à un stade tardif, pouvaient être responsable d'anomalies cranio-faciales sévères (Escobar LF, 1998).

- Le syndrome de Goldenhar a été décrit pour la première fois en 1952. C'est un syndrome polymalformatif caractérisé par des microties, une hypoplasie mandibulaire, une microsomie hémifaciale, des anomalies de la cavité orale, oculaires, de l'appareil respiratoire, génito-urinaires, cardiaques, du système nerveux, et squelettiques vertébrales. Sa fréquence varie entre 1/3500 à 1/26000 naissance. Il intéresse plus souvent la partie droite de la face (3 /2) et le sexe masculin (M/F:3/2). Son étiologie est inconnue, mais des facteurs génétiques et environnementaux ont été suspectés. Bien que la plupart des cas soient sporadiques, des transmissions autosomiques récessives et dominantes ont aussi été décrites. Toutefois il a été évoqué que l'étiologie de ce syndrome pourrait être la conséquence d'une souffrance vasculaire du mésoderme céphalique par anomalie de l'artère stapédienne. (Fig 54) Ceci aurait pour conséquence une anomalie du développement des 1^{er} et 2^{ème} arcs branchiaux.

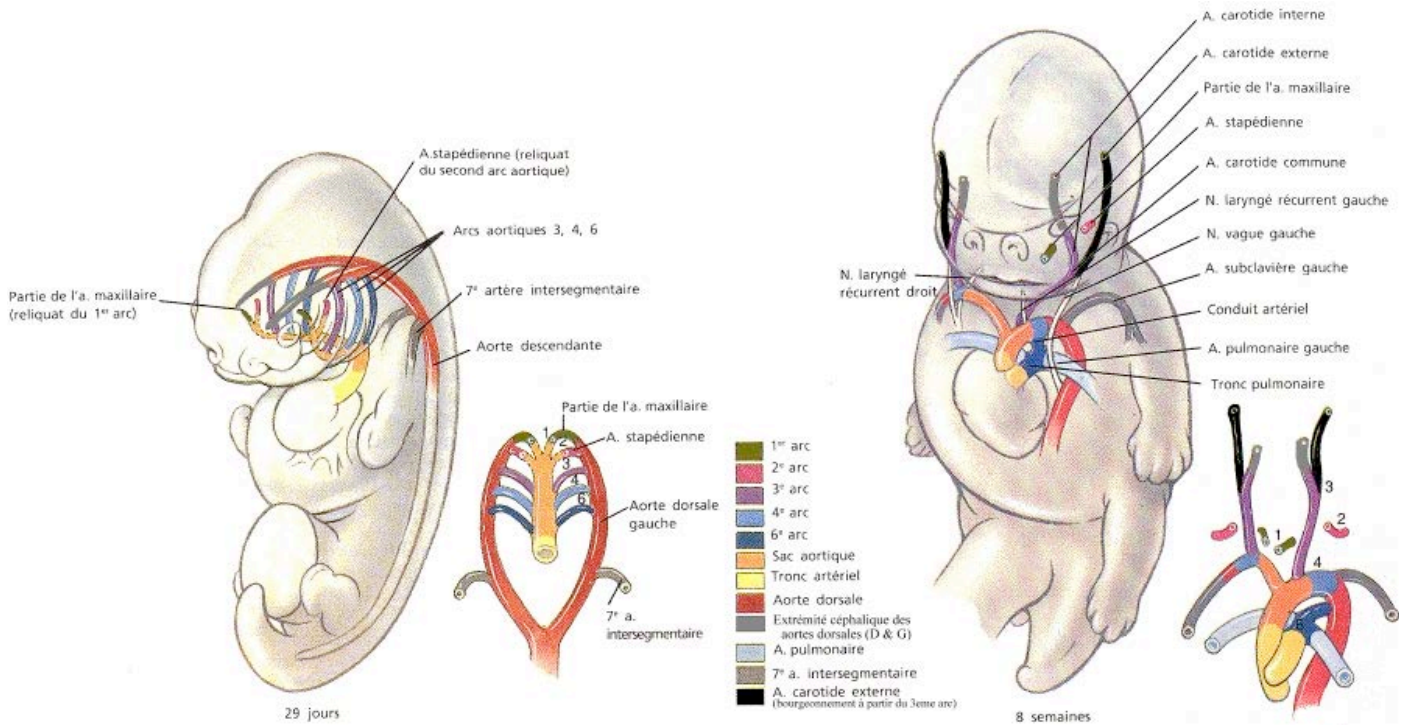


Figure 54 : Schéma d'embryon au 29^{ème} jour et à la 8^{ème} sem du système vasculaire, dont l'artère stapédienne (Larsen WJ, 1996)

Un élément qui renforce cette théorie est la présence de ce syndrome chez un seul des jumeaux monozygotes.

- L'analyse anatomopathologique des berges de FLP chez la souris a mis en évidence des anomalies d'aspect des vaisseaux, ces derniers étant sous-développés et immatures au niveau de la région palatine en cas de FLP (Amin N, 1994).

2. Facteurs de croissance et fentes

Des anomalies des facteurs de croissance ou de leurs récepteurs ont été retrouvées aussi bien dans des cas de FLP humaines syndromiques que non-syndromiques.

Ainsi des études familiales ont identifié les mutations de *FGF8* et *FGFR1* comme responsables de FLP NS (Riley M B, 2007 Mar 13;104(11):4512-7).

VEGF et *TBX1* ont un rôle par l'intermédiaire de la T-box 1 protéine qui est nécessaire au développement artériel du cœur, de la face, du cou, du thymus et de la thyroïde (Yagi H, 2003). Dans les travaux de Yagi la piste de la pathologie micro-vasculaire embryologique avait été évoquée. Il a constaté qu'en fonction des isoformes de *VEGF* l'expressivité du syndrome de Digeorge était différente (Stalmans I. 2003). Certaines observations soulignent le fait que les voies de signalisations du *VEGF* semblent avoir un rôle dans le développement

osseux par leur action activatrice du développement vasculaire durant la formation osseuse endochondrale. Mais les voies de signalisation du *VEGF* semblent aussi jouer un rôle dans le développement osseux par leur action régulatrice sur la survie et sur l'activité des cellules chondrogéniques et ostéogéniques. Le *VEGF* jouerait un rôle direct sur les chondrocytes pour les protéger de l'hypoxie. Il participe aussi au remodelage osseux post-fracturaire par activation de la croissance vasculaire mais aussi par activation des ostéoblastes et ostéoclastes.

Le rôle de *TGFβ* dans la genèse des fentes a été souligné à travers de nombreux travaux chez l'animal (Kouskoura T, 2011).

- Chez la souris l'inactivation du récepteur *TGFβ* (R2) dans les cellules de la crête neurale est responsable de FP (Wurdak et al. 2005).

- Les anomalies du récepteur *TGFβ* R2 chez les embryons mutés sont responsables d'asymétrie faciale, de micrognathie, de petite langue et d'anomalie de position des lames palatines.

Ces travaux suggèrent la place importante du *TGFβ* R2 dans le développement oro-facial.

- L'inactivation de *BMP7*, un autre membre de la famille des TGF, est lui aussi responsable d'anomalies du développement des dents et du palais (mou et dur) (Zouvelou V, 2009 15 ;31B(4) :361-74 ; Zouvelou V, 2009 ; 53(4) :597-603.) (Fig. 55)

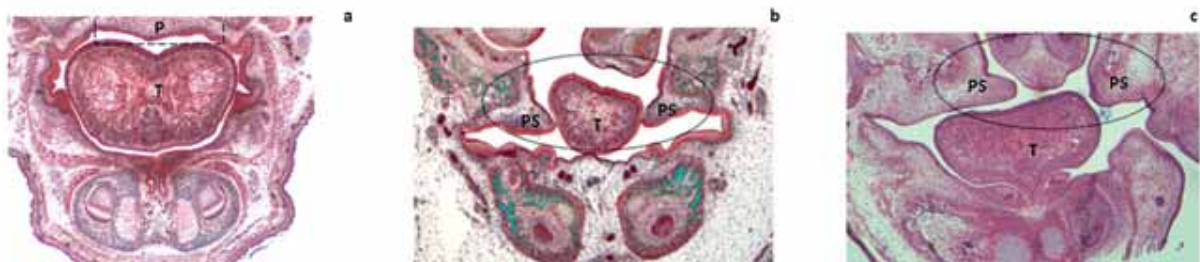


Figure 55: Anomalie de développement du palais chez la souris (Kouskoura T, 2011)

a) Analyse histologique d'embryon de souris avec palais normal en coupe coronale

b) Analyse histologique d'embryon de souris n'exprimant pas *TGFβ* R2 : existence d'un défaut de fusion avec la présence de la langue interposée entre les lames palatines

c) Analyse histologique d'embryon de souris n'exprimant pas *BMP7* : existence d'un défaut de fusion des lames palatines

T Tong : Langue, P Palate : Palais, PS Palate shelf : Lame palatine.

- Les travaux de Noriko ont mis en évidence que *TGFβ3* était un promoteur de la fusion labiale par prolifération des cellules mésengiales et angiogenèse (Muraoka N, 2005).

Chez l'homme l'implication de *TGFβ3* dans les fentes a aussi été soulignée (Lidral A C, 1998).

3. Traitement anti-angiogénique et fentes

D'autres travaux indirects soulignent la place de l'angiogenèse dans les malformations cranio-faciales et les fentes faciales, comme par exemple l'étude de l'effet tératogène du SUTENT® chez le lapin et le rat. Le SUTENT® (Pfizer Sunitinib malate (SU11248, SUTENT®, Pfizer) = un puissant inhibiteur de la voie du VEGF) est un inhibiteur des récepteurs des tyrosines kinases. Un des effets tératogènes constaté est la persistance d'une FLP chez le lapin. Il existe toutefois un effet dose. Les fentes ont été retrouvées pour des doses \geq à 1mg/kg/jour (Patyna S, 2009). (Tableau 6)

SUNITINIB AND NONCLINICAL EMBRYO-FETAL DEVELOPMENT

211

Table 2b
Incidence Summary of Specific Fetal Malformations in Rabbits

Parameter	Sunitinib dose (mg/kg/day)			
	0	0.5	1	5
Gross examination, n^a	49	45	39	7
Visceral examination, n^a	0	0	0	0
Skeletal examination, n^a	0	0	0	0
Litters examined, n	5	6	5	2
Gross malformations, n/n^b	0/0	0/0	1/1	2/1
Cleft lip	0/0	0/0	1/1	2/1
Cleft palate	0/0	0/0	0/0	1/1

^aNumber of fetuses examined.

^bNumber of fetuses/number of litters with malformations.

Tableau 6: Résultats de l'étude sur les effets tératogènes du SUTENT® chez le lapin

Toutes ces études soulignent la possibilité d'un rôle de l'angiogenèse dans les malformations cranio-faciales congénitales. C'est à partir de ces constatations que nous avons souhaité étudier le rôle des gènes de l'angiogenèse dans l'étiologie des FL/P.

HYPOTHESES, PROBLEMATIQUES ET PLAN

D'ETUDE

La recherche dans le domaine de l'étiologie des fentes faciales est un très vaste sujet. De nombreux angles d'approche peuvent être utilisés aussi bien sur le plan des hypothèses et de la philosophie générale des travaux que sur les techniques et les moyens de recherche mis en œuvre (modèles animaux, *in vivo*, *in vitro*, clinique, génétique...).

Comme nous l'avons déjà vu l'interaction de facteurs génétiques et environnementaux est l'hypothèse étiologique actuellement la plus consensuelle concernant les FL/P NS. Ces interactions et les facteurs mis en cause doivent pouvoir expliquer l'hypothèse mécanique d'un défaut de fusion des bourgeons faciaux :

- Soit par leur rôle dans le défaut d'accolement des bourgeons par défaut d'apoptose des berges.
- Soit par leur rôle dans le défaut de développement cellulaire (migration, différenciation,...) responsable d'une hypoplasie du bourgeon.

I. HYPOTHESES DE TRAVAIL

La première hypothèse de travail a été de retenir l'hypoplasie d'un bourgeon comme phénomène responsable, partiellement ou totalement, de la persistance de la fente.

La deuxième hypothèse de travail a été de supposer que cette hypoplasie puisse être la conséquence, partielle ou totale, d'une anomalie vasculaire consécutive à un trouble de l'angiogenèse.

La troisième hypothèse de travail a été de se dire que s'il existait des anomalies angiogéniques celles-ci pourraient être dues à des anomalies génétiques sur les gènes de l'angiogenèse.

La quatrième hypothèse de travail a été d'envisager qu'en cas d'anomalies génétiques de l'angiogenèse, ces dernières présenteraient probablement un tropisme topographique.

Effectivement, il semble plus probable qu'il s'agisse d'anomalies localisées de l'angiogenèse au niveau des bourgeons, car dans le cas contraire, une anomalie constitutionnelle généralisée de l'angiogenèse serait probablement létale. Il nous a donc semblé judicieux de travailler sur les berges des FL/P, au plus près de la zone où pourrait avoir eu lieu le dysfonctionnement.

II. PROBLEMATIQUES

A. Génétique et fente labio-palatine

La littérature récente a fait un état des lieux des connaissances actuelles sur la cartographie des gènes des FLP NS et a mis en exergue des gènes candidats « reconnus » (Rahimov F, 2012 ; Stuppia L, 2011 ; Mossey PA, 2009).

En prérequis à notre travail de recherche fondamentale il était indispensable de réaliser une analyse précise et exhaustive des gènes identifiés dans les FL/P S et NS et des gènes supposés impliqués.

B. Modèle

Concernant la problématique du modèle que nous souhaitons étudier. Nous avons le choix entre le modèle animal et le modèle humain. Nous avons décidé de travailler sur le modèle humain. L'accessibilité à ce type de prélèvements était pour nous facile et ce modèle nous a semblé être plus adapté à notre analyse.

C. Place de l'angiogenèse dans la genèse des fentes faciales

Afin de préciser la place de l'angiogenèse dans les défauts d'accolements des bourgeons faciaux nous avons choisi deux approches :

- La première approche était « indirecte ». Elle comportait deux volets :

Le premier correspondait à une recherche clinique rétrospective basée sur l'analyse de formes familiales, ou syndromiques non répertoriés dans la littérature et d'étiologie inconnue. Le but de ce travail était de rechercher chez ces patients identifiés des anomalies génétiques et parmi celles-ci l'existence ou non d'anomalies des gènes de l'angiogenèse.

Le deuxième consistait à rechercher des anomalies génomiques constitutionnelles de manière systématique et prospective chez tous les patients porteurs de FL/P S ou NS opérés pendant la période de l'étude. Là aussi une recherche des anomalies des gènes de l'angiogenèse était effectuée.

- La deuxième approche était directe c'est à dire *in situ*. Le but était d'étudier, à terme, de manière *in vivo* chez l'enfant, l'analyse d'expression des gènes de l'angiogenèse directement au niveau de la malformation (berges des FL/P). Il nous fallait donc développer dans un premier temps un modèle d'étude permettant, dans l'avenir, de disposer d'un moyen d'analyse fiable et reproductible.

Pour pouvoir mener à bien l'étude prospective il a été nécessaire de rédiger un protocole AOL (Appel d'offre local) nous assurant un apport financier mais surtout qui nous a permis de structurer notre étude. Les prélèvements devaient être réalisés en accord avec les règles éthiques après information éclairée des parents, et après obtention des consentements d'étude et de prélèvements en vue d'analyse génétique.

D. Taille des échantillons

Une des difficultés de ce travail était l'accès aux prélèvements. Effectivement les enfants étant opérés en période néonatal et les plasties chirurgicales étant les plus économes possibles les prélèvements étaient de petite taille et unique pour chaque enfant.

1. Culture cellulaire de fibroblaste

Afin de palier à ces petits volumes nous devions développer une technique visant à augmenter la quantité du matériel à notre disposition. Nous avons donc décidé de développer et protocoliser une technique de culture cellulaire de fibroblastes à partir des berges des FLP. Cette technique devait être simple, fiable et reproductible.

2. Extraction d'ARN

L'analyse d'expression ne se faisant que sur l'ARN, il était nécessaire d'extraire l'ARN des prélèvements. Pour rendre cette technique d'extraction d'ARN réalisable, les tissus prélevés devaient être fragmentés. De par leur nature histologique (peau, muscle et muqueuse), ces

échantillons allez être difficiles à fragmenter. De plus leur petite taille allait poser le problème de la quantité d'ARN obtenue après extraction. Pour toutes ces raisons il fallait prévoir un temps d'optimisation de cette technique extraction d'ARN sur berges de FL/P.

III. PLAN D'ETUDE

Afin de répondre à la question «Est-il pertinent de considérer que les FL/P sont en relation avec les gènes de l'angiogenèse ?» nous avons développé une méthodologie en 3 étapes :

- La première étape consistait à l'analyse systématique et « exhaustive » des gènes impliqués dans les FL/P comprenant les gènes identifiés mais aussi les gènes potentiellement impliqués. Le but de cette analyse était de faire un état des lieux sur les connaissances actuelles sur gènes et FL/P mais surtout d'identifier parmi ces gènes ceux qui avaient une implication dans les mécanismes d'angiogenèse.

- Une deuxième étape consistait à l'analyse rétrospective des explorations génétiques des FL/P opérées au CHU de Reims entre 2003 et 2009.

- Une troisième étape consistait à mettre en place une analyse (2009-2012, AOL) prospective:

- Génomique constitutionnelle par CGH Array

- *In situ*, au niveau des berges des fentes issues de déchets opératoires des chirurgies primaires des FL/P comprenant :

Le développement d'un protocole de culture cellulaire de fibroblastes

Une analyse anatomopathologique

Et surtout le développement d'un modèle d'étude *in vivo* pour l'analyse d'expression des gènes de l'angiogenèse (extraction d'ARN).

La suite de la thèse s'articulera selon ces 3 étapes.

1ERE PARTIE :

ANALYSE DES GENES IDENTIFIES OU

POTENTIELLEMENT IMPLIQUES DANS LES

FENTES LABIO-PALATINES

Les nouvelles technologies et les coopérations nationales et internationales permettent, tous les jours, des découvertes dans ce domaine. Il nous a semblé indispensable de débiter ce travail de thèse par une analyse « exhaustive » des gènes impliqués dans les FL/P. Certains articles récents de revue ont présenté des synthèses sur les gènes candidats dans les formes non syndromiques. (Rahimov F, 2012 ; Stuppia L, 2011 ; Mossey PA, 2009). Nous les analyserons ci-après. Toutefois de nombreux autres gènes sont impliqués dans les formes syndromiques, mais aussi de manière plus anecdotique ou plus indirecte dans les FL/P NS. Ce travail d'analyse et de synthèse « exhaustive » a été réalisé tout au long de la thèse entre 2009-2013; étant donné les avancées extrêmement rapides de la recherche dans ce domaine ses résultats restent une image au moment « t » de la rédaction.

Les recherches ont été effectuées à partir de plusieurs bases de recherches mais les deux sources principales ont été les suivantes :

- **OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man):** avec les mots clef suivants « Cleft, Cleft lip, Cleft palate, Cleft lip palate, lip, palate ». Nous avons mis en évidence 331 références Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) pour l'item « cleft lip, cleft palate ». Dont 314 correspondent réellement aux FL/P.

- **Pub med:** avec les mots clef suivants « Cleft, Cleft lip, Cleft palate, Cleft lip palate, gene, genetics, mutation ». Nous avons mis en évidence 1118 articles [17/03/2013].

Nous avons dans effectué un tri des publications en sélectionnant :

- Les gènes identifiés comme liés aux FL/P,
- Les gènes potentiellement impliqués dans les fentes.

Pour chaque sous groupe, et pour chaque gène:

Nous avons collecté des données générales

Référence OMIM

La localisation du gène

Sa taille

Son rôle, sa fonction (quand celle-ci était clairement identifiée)

Puis nous avons fait une analyse de l'implication de ces gènes dans les FL/P basée sur:

L'analyse du type de fente (FL, FP, FLP) corrélé à ce gène

L'analyse du type syndromique ou non syndromique

L'analyse du type d'anomalies génétiques mises en évidence (mutation, délétion, polymorphisme...) et/ou des techniques génétiques utilisées

La recherche d'éventuelles interactions avec d'autres gènes ou voies de signalisation

La recherche d'interaction avec l'environnement, ainsi que l'agent responsable (tabac, alcool, toxique, déficit vitaminique...)

La recherche d'études familiales ou d'études maternelles décrites

La recherche de modèles animaux décrits

L'analyse de l'implication de ce gène dans les FL/P en soulignant la possibilité que l'implication soit incertaine ou que le rôle soit indirect.

Et pour finir la réalisation d'un recueil de références bibliographiques sur le gène et les FL/P

Enfin grâce aux informations collectées sur la fonction des gènes nous avons extrait parmi l'intégralité des gènes (potentiels ou impliqués) ceux qui avaient une fonction dans les mécanismes d'angiogenèse.

Les résultats sont présentés en 3 parties :

- La première concerne les gènes et les voies de signalisation qui ont fait la preuve de leur implication. Ils seront présentés succinctement selon l'ordre suivant gènes des formes syndromiques, puis gènes des formes non syndromiques, et pour finir les voies de signalisation.

- La deuxième partie concerne la synthèse « exhaustive » c'est à dire des gènes impliqués mais aussi de tous les gènes potentiels (suspectés ou partiellement validés). Nous la présenterons en plusieurs étapes :

Localisation chromosomique des gènes

Celle ci se fera grâce à un premier tableau répertoriant tous les gènes classés par ordre de localisation chromosomique. Mais aussi par le biais d'une cartographie plaçant l'ensemble de ces gènes sur les chromosomes (réalisé « à la main » sans logiciel)

La synthèse des données générales des gènes.

Celle-ci sera présentée dans un tableau présentant les gènes par ordre alphabétique

L'analyse de l'implication de ces gènes dans les FL/P

Celle-ci sera aussi présentée sous forme de tableau avec classification alphabétique des gènes.

- La troisième partie correspond à l'identification gènes d'intérêt des FL/P connus pour être aussi impliqués dans l'angiogenèse.

I. FENTES LABIALES ET/OU PALATINES : GENES IDENTIFIES ET VOIES DE SIGNALISATION

A. Gènes identifiés

Plusieurs gènes ont identifiés dans le cadre des FL/P NS. (Tableau 7-8) Certains de ces gènes avaient d'ailleurs déjà été incriminés dans les formes de FL/P S.

Gène	Chromosome
<i>MTHFR</i>	1p36
<i>IRF6</i>	1q32
<i>TGFA</i>	2p13.3
<i>SATB2</i>	2q32
<i>SUMO1</i>	2q33.1
<i>RYK</i>	3q22.1
<i>TP63</i>	3q28
<i>MSX1</i>	4p26
<i>ACOD4</i>	4q21
<i>TFAP2A</i>	6p24.3
<i>FGFR1</i>	8p12
<i>FOXE1</i>	9q22.3
<i>TBX10</i>	11q13.2
<i>PVRL1</i>	11q23.3
<i>SPRY2</i>	13q31.1
<i>BMP4</i>	14q22.2
<i>TGFB3</i>	14q24.3
<i>GABRB3</i>	15q12
<i>CRISPLD2</i>	16q24.1
<i>CLPTM1</i>	19q13
<i>TBX22</i>	Xq21.1

Tableau 7: Synthèse des gènes identifiés dans les FL/P NS

TABLE 2. Genes Involved in Susceptibility to Nonsyndromic CL/P

- Growth factors
 - TGFA, TGFb3
- Transcription factors
 - MSX1, IRF6, TBX22
- Genes involved in the metabolism of xenobiotics
 - CYP1A1, GSTM1, NAT2
- Genes involved in the nutritional metabolism
 - MTHFR, RARA
- Genes involved in immune response
 - PVRL1, IRF6

Tableau 8: Classification des gènes candidats des FL/P NS selon leur famille et fonction (Kohli SS, 2012)

Ci-dessous sont détaillés les gènes et les voies de signalisations qui ont été reconnus par Rahimov et al comme impliqués dans les FL/P à l'issue d'une revue de la littérature concernant les cas *in vivo*, *in vitro* mais aussi les études sur modèles animaux (Rahimov F, 2012). Plusieurs gènes ont été reconnus comme responsables de FL/P S. Trois d'entre eux *TBX22*, *PVRL1*, et l'*IRF6* ont aussi été identifié comme gènes candidats des FL/P NS.

1. *TBX1*

TBX1 est un gène humain codant pour la protéine T-Box 1. La famille T-box joue un rôle dans la formation des tissus et organes durant l'embryologie. T-box 1 protein est nécessaire au développement artériel cardiaque, de la face, du cou, du thymus et de la thyroïde. Il est impliqué dans le syndrome de Digeorge. Ce syndrome correspond à une dysgénésie sur le plan embryonnaire des 3ème et 4ème arcs branchiaux. Il touche 1 nourrisson/4000 naissances. Sa présentation clinique a été décrite initialement en 1965 par Digeorge. Elle regroupe un ensemble de signes comme des anomalies cardiaques (Tétralogie de Fallot, CIV, anomalie de l'arc aortique...) des anomalies palatines (FP, luvette bifide, incompetence vélopharyngée sans fente), des dysmorphies des oreilles, un aspect des doigts longs et fins, ainsi qu'un retard mental plus ou moins sévère. Son diagnostic se fait en génétique par la recherche de la micro délétion 22q11 par technique de FISH par exemple. (Fig 56) La délétion 22q11 correspond à la perte d'un segment contenant l'information génétique d'environ 30 protéines.

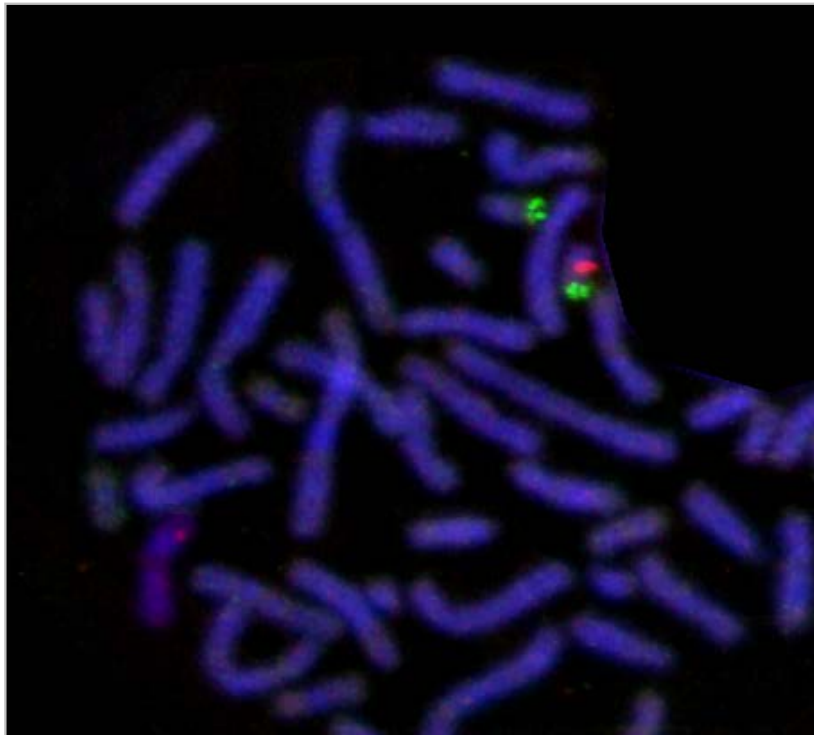


Figure 56 Diagnostic de micro-délétion 22q11 par FISH sonde BCs ou PACs

2. *IRF6*

IRF6 (Interferon regulatory factor-6) fait partie d'une famille de 9 facteurs de transcription. Il fonctionne comme un activateur transcriptionnel coopérant (Little HJ, 2009). *IRF6* est fortement exprimé dans l'ectoderme correspondant à la zone de développement de la face. Ainsi des souris déficientes pour les deux allèles d'*IRF6* présentent une peau très épaisse, des anomalies sévères des membres ainsi que des anomalies cranio-faciales dont des fentes du palais secondaire (Kondo S, 2002). L'absence d'un épiderme stratifié normal chez la souris *IRF6*⁻, en raison du défaut de prolifération et de différenciation des kératinocytes, confirme le rôle important d'*IRF6* dans le développement de l'épiderme (Ingraham CR, 2006 ; Richardson RJ, 2006).

La mutation d'*IRF6* cause deux syndromes par désordre allélique autosomique dominant :

- Le syndrome de Van Der Woude

C'est le syndrome le plus fréquent connu pour être pourvoyeur de FL/P S. Il représenterait à lui seul 2% des étiologies de tous les cas de FL/P (Burdick AB, 1986).

Ce syndrome est caractérisé par des fistules de la lèvre inférieure, et des hypodonties et une FL avec ou sans FP, ou une FPI. (Fig 57)

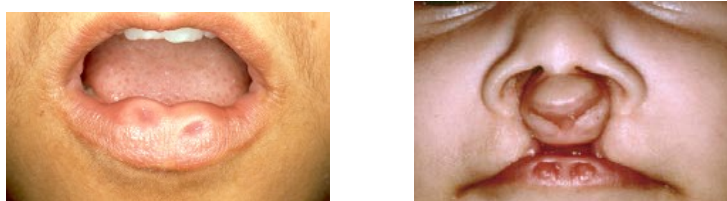


Figure 57 : Fistules de lèvre inférieures rentrant dans le cadre de syndrome de Van Der Woude

Parmi les nombreux gènes candidats contribuant aux FL/P, *IRF6* est le seul gène qui a montré un degré élevé de cohérence des résultats à travers les études. Et c'est en 1990, le locus génétique du syndrome de Van Der Woude a été localisé sur le chromosome 1 (Murray JC, 1990). La zone critique du syndrome de Van Der Woude a été progressivement réduite à 1q32-q41. Et c'est en 1999, que le syndrome de la bride poplitée a été relié à la même région (Lees MM, 1999). En 2002, Kondo et al. décrivent le cas de jumeaux monozygotes discordants pour le syndrome de Van Der Woude non hérité des parents. Le syndrome de Van Der Woude affectant un seul des deux jumeaux a été attribué à une mutation somatique (Kondo S, 2002).

Dans la plupart des cas de syndrome de Van Der Woude, les mutations d'*IRF6* sont responsables de la non fonctionnalité ou l'haplo insuffisance protéique. Mais dans d'autres cas, ces mutations étaient des faux-sens et affectées des domaines liant l'ADN aboutissant à des phénotypes sévères.

- Le syndrome de bride poplitée

Ce syndrome aussi appelé syndrome facio-génito-poplitée et Popliteal pterygium syndrome, a la même présentation clinique que le syndrome de Van der Woude mais présente de surcroît des brides poplitées souvent bilatérales, des anomalies des orteils et des ongles, des syndactylies, ankyloblépharon, et des malformations génito-urinaires (cryptorchidie et bifidité scrotale chez le garçon, hypoplasie des grandes lèvres chez la fille).

3. TP63

Ce gène a été découvert il y a un peu plus de 20 ans. C'est un membre de la famille des facteurs de transcription de p53. *TP63* a un rôle majeur dans la formation des membres. Il participe à la formation de la peau, des seins, du cœur et de la face. Il intervient dans les interactions mésenchyme/épithélium. Les mutations de *TP63* ont été incriminées dans plusieurs syndromes malformatifs comme :

Le syndrome EEC3 (Ectrodactyly, Ectodermal Dysplasia, and Cleft Lip/Palate Syndrome 3) dans lequel on rencontre des FL/P (Celli J, 1999)

Le syndrome Pieds mains fendues

Le syndrome AEC (Ankyloblépharon-Ectodermal Defects-Clefting) dans lequel il y a des FL/P

L'Adult syndrome (acro-dermato-ungual-lacrimal-tooth)

Le syndrome membre/sein auquel s'associe des FP

Le Rapp Hodgkin syndrome (dysplasie ectodermique anhidrotique et FL/P)

Syndrome orofacial cleft 8 connu pour la présence de FL/P

En dehors des formes syndromiques des mutations (faux sens) de novo perturbant le domaine fonctionnel de p63 ont été identifiées dans les FL/P NS (Leoyklang P, 2006).

4. PVRL1

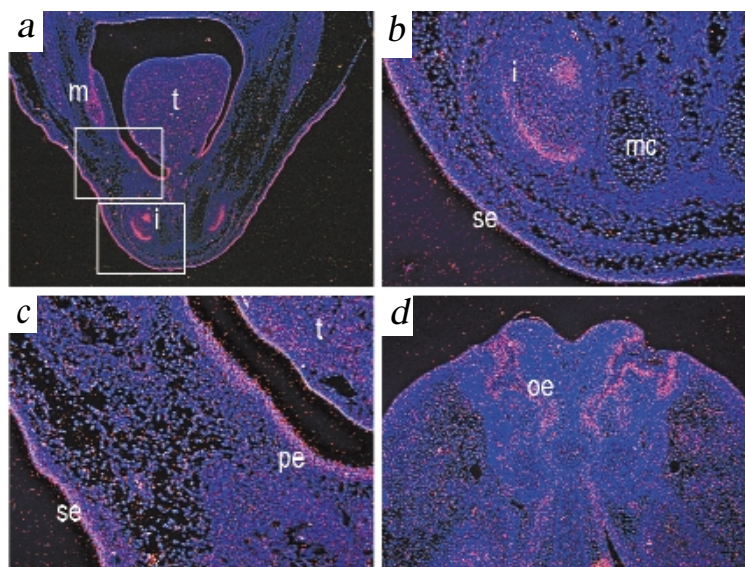
La protéine PVRL1 (Poliovirus Receptor-Related 1) a été initialement identifiée comme récepteur du poliovirus-related protein (PRR). Takahashi et al. ont confirmé la fonction de PRR comme molécule d'adhésion cellulaire, et l'ont rebaptisé nectine-1 (Takahashi K, 1999).

Ce gène est impliqué dans les dysplasies ectodermiques qui se caractérisent par un très grand nombre de maladies dans lesquelles au moins deux des quatre structures ectodermiques sont touchées (chevelure, dentition, ongles et glandes sudorales). Le syndrome de Zlotogora-Ogur correspond à l'association d'une FL/P (une FL avec ou sans FP), d'une dysplasie ectodermique

avec une atteinte des membres (syndactylies), et un retard mental. Ce syndrome est transmis de façon autosomique récessive.

Chez l'animal, *PVRL1* est exprimée au niveau de l'épithélium du bord médial des lames palatines et à la surface de la peau dans l'épithélium. Ces localisations correspondent aussi aux phénotypes des syndromes de dysplasie ectodermique et F/LP (Suzuki K, 2000).

Une certaine proportion des cas de FLP NS peut-être expliquée par les mutations en *PVRL1* (Sözen MA, 2001 ; Avila JR, 2006).



- a) Les transcrits de *Pvrl1* sont largement limités aux structures à E15
- b) ARNm PVRL1 est détecté dans le composant ectodermique de l'incisive (donnant naissance à l'émail)
- c) ARNm PVRL1 est détecté dans l'épithélium du bord médian des lames palatines et dans l'épithélium de surface cutanée
- d) A E15.5 ARNm PVRL1 est détecté dans l'épithélium olfactif

T: Langue, Mc: Cartilage de Meckel,
 Pe: épithélium du palais,
 Se: épithélium de surface de la peau,
 I : Bourgeon de l'incisive
 M : Bourgeon de molaire
 Oe: épithélium olfactif

Figure 58 Expression de mRNA *PVRL1* au niveau du palais durant l'embryogénèse chez la souris par hybridation *in situ* (Suzuki K, 2000)

5. *TBX22*

TBX22 (T-box transcription factor-22) code pour une protéine de 400 acides aminés. La région N-terminale contient un domaine de liaison à l'ADN la T-box. Cette dernière a la particularité d'avoir 20 acides aminés de moins que les autres T-box connues. Les transcrits de *TBX22* n'ont été trouvés que dans l'ADNc humain foetal. *TBX22* agit comme un répresseur transcriptionnel et il autorégule son expression. Il interagit avec *SUMO1*.

Les mutations de *TBX22* sont responsables du syndrome de FP lié à l'X (X-linked cleft palate). L'expression clinique de ce syndrome est très variable. Les signes cliniques peuvent être un palais ogival, une luvette bifide, une FP et/ou une ankyloglossie. Cette dernière n'est toutefois pas toujours présente mais retrouvée en moyenne chez 79% des malades hommes et 45% des malades femmes. Le syndrome a été trouvé dans un certain nombre de grandes

familles, et hérité selon un mode mendélien lié à l'X semi-dominant. En utilisant l'analyse de liaison génétique, Stanier et al. ont situé le locus du gène sur le chromosome Xq21 (Stanier P, 1993).

L'étude du gène *TBX22* chez 256 sujets présentant une FP a mis en évidence des mutations de *TBX22* (5 mutations codantes, et 4 mutations d'épissage) chez 4% des individus (Marçano AC, 2004).

Concernant l'embryologie *TBX22* a été impliqué dans la palatogenèse. Il a été localisé au niveau du palais en formation et de la base de la langue. (Fig 46)

6. *FGFR2*

Cf : 1^{ère} partie. III. A. 3

7. *MSX1*

Le gène *MSX1* (Muscle-Segment homeobox 1) est responsable de la synthèse d'une protéine qui régule l'activité d'autres gènes. Il fait partie de la grande famille des gènes Homeobox qui agissent pendant le développement précoce. Plus précisément, ce gène est essentiel pour le développement normal des dents et d'autres structures buccales, ainsi que le développement des ongles et des orteils.

La souris dépourvue du gène *MSX1* présente une fente du palais secondaire ainsi que d'autres anomalies cranio-faciales dont des agénésies dentaires (Satokata I, 1994).

Chez l'homme, l'association *MSX1* et FLP NS ou FP I a été retrouvée de manière significative dans différentes populations (Lidral AC, 1998; Suzuki Y, 2004 ; Tongkobpetch S, 2006). La mutation de *MSX1* a d'abord été identifiée comme responsable d'une forme autosomique dominante d'agénésie dentaire (Vastardis H, 1996;13:417–21.). Par la suite, Van den Boogaard et al. ont décrit une forme familiale d'association concomitante d'agénésie dentaire et de FL+/-P. Le séquençage direct de *MSX1* a révélé une mutation causale. (Van Den Boogaard MJ, 2000)

Récemment, une analyse de séquence à grande échelle de *MSX1* a été effectuée sur 917 patients avec FLP. 16 patients avec FL, FLP et FP I avaient une mutation. Pour les auteurs les mutations dans *MSX1* sont responsables d'environ 2% des FL/P NS (Jezewski P A, 2003). Il est intéressant de voir dans ce travail que l'implication *MSX1* est présente dans tous les types de fentes.

Une autre étude a montré que le contexte génétique combiné des variants rares de *TGFA* et

MSX1 pouvait augmenter le risque de FP jusqu'à 9,7 fois, ce qui démontrait l'importance de l'interaction gène-gène dans l'étiologie des FLP NS (Jugessur A, 2003b).

8. *SUMO1*

SUMO1 (SMT3 Suppressor of Mif Two 3 Homolog 1) est impliqué dans la modification post-traductionnelle de nombreuses protéines cellulaires. Il agit sur le transport nucléaire, la régulation transcriptionnelle, l'apoptose et la stabilisation des protéines (Su HL, 2002).

Une translocation réciproque équilibrée entraînant l'haplo-insuffisance de *SUMO1* a été identifiée chez un patient avec FLP I unilatérale (Alkuraya FS, 2006).

Des associations entre FLP NS et des variants de *SUMO1* ont été signalées dans deux populations ancestrales Chinoise (Song T, 2008) et Irlandaise (Carter TC, 2010).

Chez la souris E13.5, il a été retrouvé une forte expression de *SUMO 1* au niveau de la lèvre supérieure, du palais primaire, et du palais secondaire. Dans ce modèle un allèle hypomorphique de *SUMO1* était responsable d'une FP (Alkuraya et al., 2006).

Certains travaux, tout en soulignant la place de *SUMO1*, s'intéressent aussi aux gènes de proximité de *SUMO1* comme pouvant avoir un rôle dans la genèse des fentes (Shi M, 2008).

Ainsi *TBX22* est une cible pour *SUMO1*. Ce dernier agissant dans la répression des *TBX22* activés. Le processus de « sumoylation » est également soumise et profondément affectée par les stress environnementaux, tels que répertoriés par Andreou et al. (Andreou AM, 2007).

Ainsi, ces derniers ont suggéré que la modification de *SUMO1* pourrait représenter une voie commune qui régulerait le développement normal cranio-facial et qui serait impliquée dans la pathogenèse des formes à la fois mendélienne et idiopathique de fentes oro-faciales.

9. *FOXE1*

Ce gène a été initialement identifié chez la drosophile. C'est un facteur de transcription présent au début de la morphogenèse thyroïdienne. Il jouerait un rôle dans la migration de celle-ci mais aussi dans sa différenciation. Ce gène est exprimé au niveau de l'endoderme de l'intestin antérieur, mais aussi au niveau de l'ectoderme cranio-pharyngé impliqué dans la formation du palais et de la poche de Rathke. Son expression est transitoire entre le 8^{ème}, 8^{ème}_{1/2} et le 13^{ème}_{1/2} jours de vie embryonnaire. *FOXE1* est exprimé dans l'épithélium de la zone de fusion entre les bourgeons nasal, médial et maxillaire (Stanier P, 2004).

FOXE1 présenterait un lien avec la voie signalisation hedgehog. *FOXE1* est exprimé chez la souris au niveau des follicules pileux mais aussi chez la souris et chez l'homme au niveau des

cellules basales des carcinomes au même endroit et au même moment que l'activation de la voie de signalisation de hedgehog.

Dans le cadre des FL/P, *FOXE1* a été impliqué aussi bien dans les phénotypes de FL/P et FPI. L'analyse des mutations de *FOXE1* a mis en évidence 2 mutations faux sens familial spécifiques. Bien que normalement classées comme bénignes ces deux mutations ont été identifiées comme mutations délétères (Moreno LM, 2009).

10. SATB2

SATB2 (Special AT-Rich Sequence Binding Protein 2) appartient à une petite famille de protéines liant l'ADN qui se lient spécifiquement à une région de fixation de la matrice nucléaire (MAR) pour réguler la transcription du gène dans un tissu spécifique par le biais du remodelage de la chromatine (Britanova O, 2005). SATB2 contient deux sites de liaison avec SUMO. (Site d'épissage accepteur consensus) SUMO1 ou 3 diminue l'activation des gènes médiés par *SATB2*. La sumoylation altère les cibles des *SATB2* à la périphérie du noyau ce qui suggérerait que cette modification réversible peut moduler la localisation de l'ADN sub-nucléaire *SATB2*.

Chez la souris, *SATB2* est fortement exprimé dans le palais (FitzPatrick DR, 2003). Les études chez l'animal délété en *SATB2* ont rapportés de sévères malformations cranio-faciales (Britanova O, 2006; Dobrev G, 2006). La souris porteuse d'une seule copie fonctionnelle de *SATB2* présente différentes anomalies cranio-faciales (dont des FP) proche des phénotypes humains résultant de *SATB2* haplo-insuffisance. La perte du deuxième allèle majore la sévérité des phénotypes.

Chez l'homme, les études menées sur les FP I ont mis en évidence une zone d'intérêt en 2q32-q33. Un point de rupture a été retrouvé au niveau de l'exon 2 de *SATB2*, et un second au niveau de 130kb en 3' du signal de polyadénylation de *SATB2*, dans une zone conservée non codante de l'ADN (FitzPatrick DR, 2003). Des associations significatives ont été signalées dans plusieurs populations asiatiques entre variants génétiques de *SATB2* et FLP NS (Beaty TH, 2006).

11. CRISPLD2

Ce gène a été identifié par Chiquet BT et al. sur le chromosome 16. Il est associé aux FL/P NS (Shen X, 2011 ; Chiquet BT 2011). Chez l'embryon de souris, l'expression de *CRISPLD2* a été localisée au niveau de l'oro et naso-pharynx, de la mandibule, du nez, du palais et des germes dentaires à différentes étapes du développement (Chiquet BT, 2007).

12. *TBX10*

Les gènes T-Box codent pour des facteurs de transcription qui ont des domaines d'ADN très conservés : la T-Box. Ces gènes sont exprimés de manière variable durant l'embryogénèse et/ou dans des tissus spécifiques à l'âge adulte. *TBX10* code pour une protéine qui contient une séquence qui présente une grande similarité avec la T Box de *TBX1*. Ce qui a fait conclure à la possibilité que *TBX10* soit un membre de la sous-famille *TBX1*.

L'expression ectopique de *TBX10* chez la souris transgénique entraîne l'apparition de FLP (Bush JO, 2004).

Des mutations de *TBX10* ont été identifiées chez des patients porteurs de FL/P NS (Vieira AR, 2005).

13. *SPRY2*

Les protéines de la famille Sprouty sont des protéines très conservées de la voie inhibitrice des tyrosines kinases. En 2000, Lim et al ont mis en évidence que *SPRY2* est exprimé par COS-1 dans le cytoplasme et co-localisé avec les protéines des microtubules (Lim J, 2000). La stimulation par EGF entraîne la translocation de *SPRY2* vers la membrane.

Chez la souris, *FGF* et *PDGF* stimule l'expression de *SPRY2* et inhibe l'expression de *SPRY1* dans le fibroblaste (Gross I, 2001). *SPRY1* et *SPRY2* inhibent les mécanismes de transcriptions induits par la signalisation du facteur de croissance et d'induction de c-fos, un gène nécessaire à la synthèse de l'ADN et la division cellulaire.

Chez la souris transgénique la sur-expression du gène homologue pour *Spry2* provoque de manière « étape dépendante » des anomalies cranio-faciales (Goodnough LH, 2007). Chez l'homme, la mise en évidence de mutations en *SPRY2* a permis d'incriminer ce gène dans les FL/P NS (Vieira AR, 2005).

14. *RYK*

RYK a été isolé pour la première fois en 1992 par Hovens et al. en tant que nouveau membre de la famille des récepteurs aux facteurs de croissance des protéines tyrosine kinase (Hovens, CM, 1992). Toutefois *RYK* a des voies de signalisation qui divergent des autres récepteurs aux tyrosines kinases (Katso RM, 1999 ; Lu W, 2004). Il existe une grande analogie entre les séquences codantes de *RYK* chez l'homme et la souris ce qui suggère un rôle important et conservé de cette molécule. Stacker et al. ont rapporté que chez les mammifères *RYK* (contrairement à l'homologue chez la drosophile) fonctionne comme corécepteur avec

Frizzled pour des ligands Wnt (Stacker SA, 1993). Ils ont constaté que RYK se lie à Dishevelled, à travers lequel il active la voie canonique Wnt, établissant un lien entre Wnt et Dishevelled. RYK joue un rôle crucial dans la signalisation médiée par Wnt (Lu W, 2004).

Chez l'homme le gène *RYK* a été impliqué dans les FL/P NS (Watanabe A, 2006).

B. Les voies de signalisation

Plusieurs voies de signalisation ont été identifiées dans les FL/P. Certaines présentant entre elles des interactions.

1. TGF

Cf 1^{ère} partie. III. A. 1.

2. BMP

La voie des *BMP* est une voie de signalisation qui régule d'importants processus de développement, incluant des mécanismes tels que la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Les membres de cette famille sont exprimés au niveau des ébauches oro-faciales avec une répartition temporo-spatiale. La croissance et la structuration faciale est dépendante des concentration en BMP (Barlow AJ, 1997; Ashique AM 2002 Development, Ashique AM 2002 Int J Dev Biol). L'inactivation conditionnelle du gène du récepteur BMP de type 1 (*BMPR1A*) au niveau des ébauches oro-faciales provoque une FL/P bilatérale et une agénésie dentaire, tandis que, la délétion conditionnelle du ligand de BMP 4 dans les même tissus est responsable de FL I (Liu W, 2005.). Les FL/P issues de ces anomalies ont été attribuées à un excès d'apoptose dans les tissus ectodermiques et mésenchymateux du bourgeon nasal médian. Fait intéressant, la FL chez la souris mutante BMP 4 constatée en début de gestation a été réparée à un stade avancé de l'embryogenèse, peut-être en raison de la redondance entre les facteurs BMP. Cette propriété de cicatrisation de BMP 4 peut aussi avoir un parallèle chez l'homme. Il a été proposé que BMP 4 puisse être impliqué dans les formes légères de FL (forme frustre-cicatricielle) comme une forme de FL in utéro « guérie » (Marazita ML, 2007). En faveur de cette hypothèse les mutations identifiées de BMP4 chez deux individus

présentant pour le premier des défauts musculaires de l'orbiculaire oris et l'autre une microforme de FL (forme frustre-cicatricielle) (Suzuki S, 2009).

Jusqu'à présent, seules deux études d'association ont été publiés sur les variants génétiques dans BMP4 et le risque de FL/P NS. (Suazo J, 2010) (Lin JY, 2008)

BMP4 a un rôle charnière entre plusieurs gènes ainsi il active *MSX1*, inhibe *Barx1* et présente des interactions avec *Fgf8* et *Shh*.

3. WNT

La voie Wnt/ β -Catenine (Fig 59) intervient durant le développement des vertébrés et des invertébrés. Le ligand Wnt-est une glycoprotéine sécrétée qui se lie à des récepteurs Frizzled, ce qui déclenche une cascade entraînant le déplacement de la kinase GSK-3 β multifonctionnel de la APC/Axin/GSK-3 β -complex. Au cours du développement, la voie Wnt / β -caténine intègre les signaux de plusieurs autres voies, y compris celle de l'acide rétinolique, le FGF, TGF- β , et BMP dans différents types de cellules et de tissus.

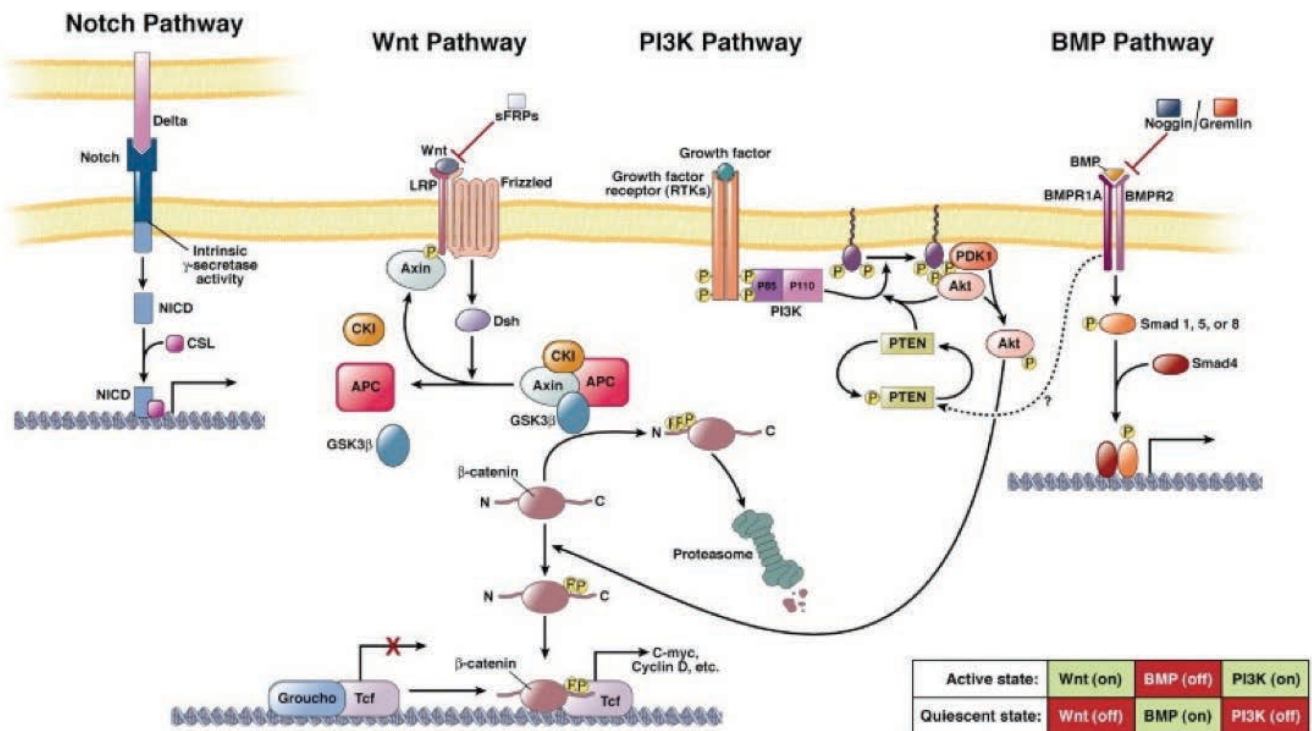


Figure 59: Interactions entre les voies de signalisation Wnt et BMP

<http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0016508508001856-gr2.jpg>

La voie de signalisation WNT a été impliquée de manière significative dans différentes

populations comme liée aux FL/P NS (Chiquet BT, 2008). Ce phénomène a été confirmé dans le modèle animal chez la souris (Juriloff DM, 2002-2006-2008).

4. FGF

Cf 1^{ère} partie. III. A. 3

5. SHH

La voie de signalisation SHH est impliquée dans divers aspects du développement embryonnaire et de la morphogénèse cranio-faciale, comme en témoigne un large spectre d'anomalies cranio-faciales causées par des perturbations dans cette voie.

Chez l'homme, les mutations dans *SHH* sont responsables d'un sous-ensemble de cas d'holoprosencéphalie (anomalies cérébrales et faciales) (Roessler E, 1996-2003).

Chez la souris, l'inactivation de *SHH* est responsable d'une forme létale. Les souris décèdent en prénatal à cause d'anomalies sévères de la ligne médiane (Chiang C, 1996).

La voie de signalisation de SHH se déclenche par la fixation de SHH au récepteur de surface cellulaire de Patched (PTC1). Ceci entraîne la désinhibition de la protéine transmembranaire Smoothed. Cette dernière actionne à son tour la famille des facteurs de transcription en doigt de zinc *GLI* qui régulent l'expression des gènes cibles en aval comme *FOXE1* (Brancaccio A, 2004; Eichberger T, 2004).

Un des gènes cibles en aval est le gène du récepteur Patched (*PTCH*) dont l'induction assure une autorégulation de la voie. Des mutations dans *PTCH1* sont associées au syndrome de Gorlin (naevomatose basocellulaire), qui comprend une FP dans 4% des cas. Un screening des mutations dans les séquences codantes de *PTCH* a été étudié dans 220 familles multiplex de FL/P NS et a révélé des mutations faux-sens dans la portion extracellulaire SHH, ce qui peut interférer avec son activité de liaison (Mansilla MA, 2006). Cependant, aucune mutation pathogène dans le SHH n'a encore été trouvée dans des fentes isolées (Orioli IM, 2002).

Une association significative a été trouvée entre polymorphisme mono-nucléotidique dans la région *GLI2* et FL/P NS dans diverses populations (Beaty TH, 2006).

En outre, il a été retrouvé chez des cas sporadiques de FL/P NS des mutations faux-sens qui perturbent les parties conservées de *GLI2* (Vieira AR, 2005).

II. FENTES LABIALES ET/OU PALATINES SYNDROMIQUES ET NON SYNDROMIQUES: SYNTHESE DES GENES IDENTIFIES ET DES GENES POTENTIELS

Nous vous rapportons notre synthèse sur les données générales de ces gènes (Référence OMIM, localisation et taille du gène, ainsi que son rôle, sa fonction quand celle-ci était clairement identifiée.)

La localisation chromosomique des gènes se fera grâce à un premier tableau répertoriant tous les gènes classés par ordre de localisation chromosomique. Mais aussi par cartographie.

La synthèse des données générales des gènes sera présentée dans un tableau classé par ordre alphabétique des gènes.

Puis nous vous rapporterons notre analyse de l'implication de ces gènes dans les FL/P basée sur l'analyse du type de fente (FL, FP, FLP, S, NS) concernée, du type d'anomalies génétiques mises en évidence (mutation, délétion, polymorphisme...), de l'existence d'interactions avec d'autres gènes ou voies de signalisation et avec l'environnement, d'études familiales ou d'études maternelles, et de modèles animaux.

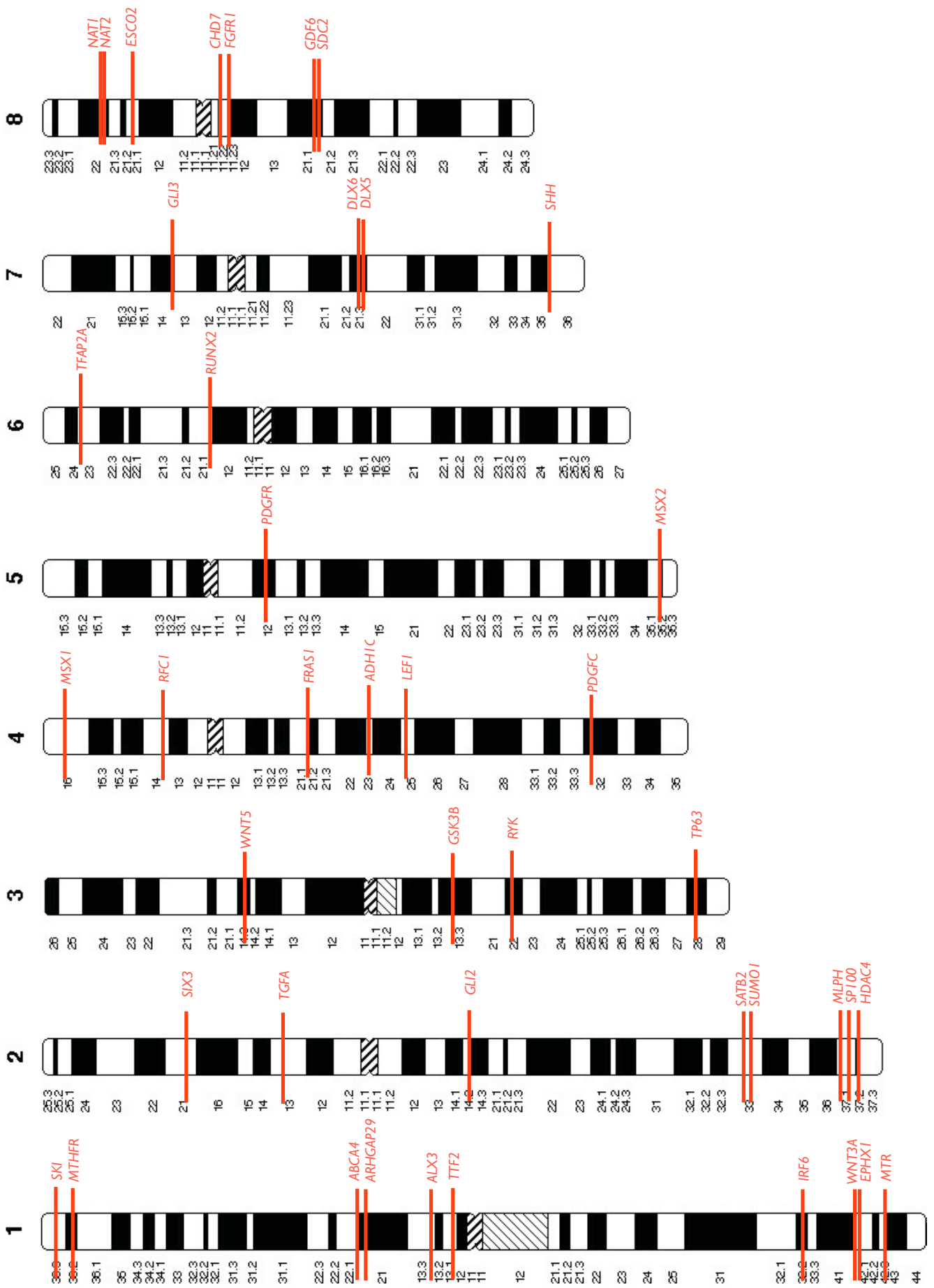
A. Localisation des gènes potentiels et identifiés dans les FL/P

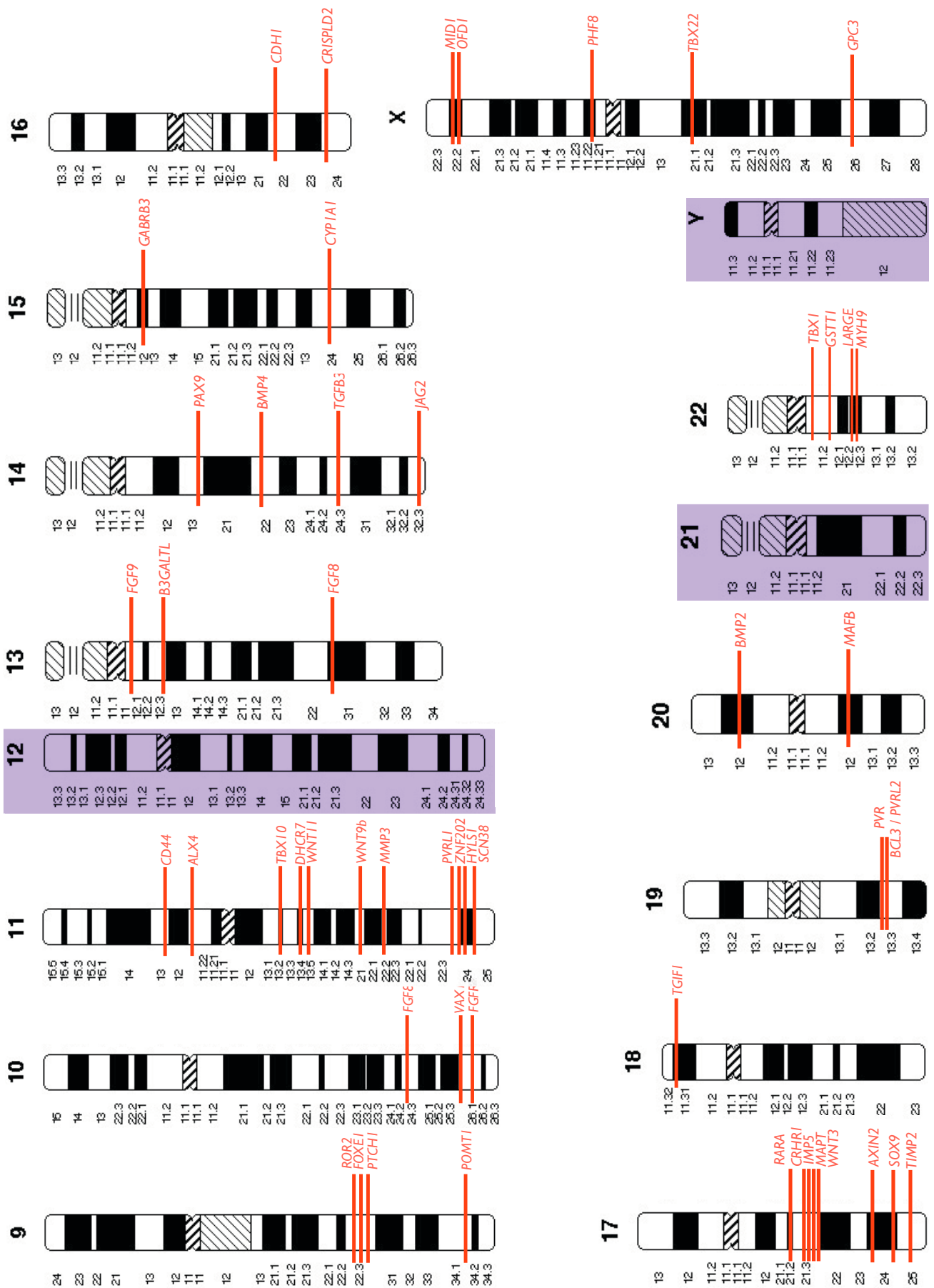
95 gènes ont été retenus comme potentiels ou impliqués dans les FL/P.

Tableau 9: Gènes référencés dans la littérature en rapport avec les FLP, classés par localisation chromosomique

Numéro Chromosome	Localisation	Gène	Numéro Chromosome	Localisation	Gène
1	1p22.1	ABCA4	10	10q24.32	FGF8
	1p13.1	TTF 2		10q26.1	VAX1
	1p21-p13	ALX3		10q26.13	FGFR2
	1p22.1-p21.3	ARHGAP29	11	11p11.2	ALX4
	1p36.22	MTHFR		11p13	CD44
	1p36.33	SKI		11q13.2	TBX10
	1q32.2	IRF6		11q13.4	DHCR7
	1q42	WNT3A		11q13.5	WNT11
	1q42.12	EPHX1		11q21.32	WNT9b
1q43	MTR	11q23		MMP3	
2	2p13.3	TGFA		11q23.3	PVRL1
	2p21	SIX3		11q23.3	ZNF202
	2q14.2	GLI2	11q24.1	SCN3B	
	2q33.1	SATB2	11q24.2	HYLS1	
	2q33.1	SUMO1	13	13q12.11	FGF 9
	2q37	MLPH		13q12.3	B3GALTL
	2q37.1	SP100		13q31.1	SPRY2
	2q37.2	HDAC4	14	14q13.3	PAX9
	3	3p21-p14		WNT5A	14q22.2
3q13.33		GSK 3 b		14q24.3	TGFB3
3q22.1		RYK		14q32	JAG2
3q28		TP63	15	15q12	GABRB3
4	4p14	RFC1		15q24.1	CYP1A1
	4p16.2	MSX1	16	16q22.1	CDH1
	4q21.21	FRAS1		16q24.1	CRISPLD2
	4q23	ADH1C	17	17q21	WNT3
	4q23-q25	LEF1		17q21.1	MAPT
	4q32.1	PDGF-C		17q21.2	RARA
5	5q32	PDGFRa		17q21.31	CRHR1
	5q35-q35	MSX2		17Q21.31	IMP5
6	6p21.1	RUNX2		17q24.1	AXIN2
	6p24.3	TFAP2A		17q24.3	SOX9
7	7p14.1	GLI3	17q25	TIMP2	
	7q21.3	DLX5	18	18p11.3	TGIF
	7q21.3	DLX6		19	19q13.31
	7q36	SHH	19q13.32		BCL3
8	8p21.1	ESCO2	19q13.32		PVRL2
	8p22	NAT1	20	20p12.3	BMP2
	8p22	NAT2		20q11.2-q13.1	MAFB
	8p11.23-p11.22	FGFR1	22	22q11.2	GSTT1
	8q12.1-q12.2	CHD7		22q11.2	TBX1
	8q22.1	GDF6		22q12.3	LARGE
8q22.1	SDC2	22q12.3		MYH9	
9	9q22	ROR 2	X	Xp11.22	PHF8
	9q22.3	FOXE1		Xp22	MID1
	9q22.32	PTCH1		Xp22.2	OFD1
	9q34.13	POMT1		Xq21.1	TBX22
				Xq26.2	GPC3

Figure 60: Cartographie des gènes impliqués dans la littérature dans les FLP S et NS chez l'homme





B. Synthèse des données générales sur les gènes potentiels et impliqués dans les FL/P

Tableau 10: Nom, localisation, No OMIM, taille, fonction, et bibliographie en rapport avec les gènes référencés dans la littérature comme associés aux FL/P (gènes classés par ordre alphabétique)

Gène	Noms	Localisation	OMIM	Taille (paires de base)	Rôle/fonction	Bibliographie
ABCA4	ATP-BINDING CASSETTE TRANSPORTER	1p22.1	601691	128 315	Produces an ATP-binding cassette (ABC) superfamily transmembrane protein expressed exclusively in retinal photoreceptors that is involved in clearance from photoreceptor cells of all-trans-retinal aldehyde (atRAL)	Yuan Q 2011; Beatty TH 2010
ADH1C	ALCOHOL DEHYDROGENASE 1C, GAMMA POLYPEPTIDE	4q23	103730	16 536	Encodes the gamma subunit of class I alcohol dehydrogenase (ADH) (EC 1.1.1.1), an enzyme that catalyzes the rate-limiting step for ethanol metabolism: the oxidation of alcohol to acetaldehyde.	Chevrier C 2005, Jugessur A 2009, Park JW 2006
ALX3	ARISTALESS-LIKE HOMEODOMAIN 3	1p21-p13	606014	10 707	Homeobox genes encode transcriptional regulators involved in cell-type differentiation and development	Park JW J Med Genet 2006
ALX4	ARISTALESS-LIKE 4, MOUSE, HOMOLOG OF	11p11.2	605420	49 723		Park JW J Med Genet 2006
ARHGAP29	RHO GTPase-ACTIVATING PROTEIN 29, PTP11-ASSOCIATED RHOGAP1; PARG1	1p22.1-p21.3	610496	126 081		leslie EJ 2012
AXIN2	AXIS INHIBITOR 2,	17q24.1	604025	33 085	Important role in the regulation of the stability of beta-catenin (116806) in the Wnt signaling pathway	Mostowska A 2012, Letra A 2012, Andrade Filho PA 2011, Menezes 2009
B3GALT1	UDP-GAL: BETA-GlcNAc BETA-1,3-GALACTOSYLTRANSFERASE-LIKE, BETA-3-GLYCOSYLTRANSFERASE-LIKE; B3GTL, BETA-1,3-GLUCOSYLTRANSFERASE; B3GLCT	13q12.3	610308	132 341	beta-1,3-glucosyltransferase involved in the synthesis of the unusual O-linked disaccharide glucosyl-beta-1,3-fucose-O- found on the thrombospondin (see THBS1; 188060) type-1 repeats (TSRs) of many biologically important proteins	Amano K 2012, Shimizu R 2010, Heinonen TY 2009, Hess D 2008
BCL3	B-CELL LEUKEMIA/LYMPHOMA 3	19q13.32	109560	12 340	Encodes an inhibitor (antagonist) for subunit 2 of nuclear factor kappa-B (NFKB2; 164012)	18 références sur pub med,
BMP2	BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 2, BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 2A; BMP2A	20p12.3	112261	12 600	Bone formation	Williams ES 2012, Sahoo T 2011
BMP4	BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 4, BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 2B; BMP2B, BMP2B1	14q22.2	112262	9 026	Vital regulatory molecule that functions throughout development in mesoderm induction, tooth development, limb formation, bone induction, and fracture repair	19 références sur pub med, Parada C 2012, Chen Q 2012, Suazo J 2011
CDH1	CADHERIN 1, E-CADHERIN; CDHE; ECAD, LIVER CELL ADHESION MOLECULE; LCAM	16q22.1	192090	98 318	Specific calcium ion-dependent cell adhesion molecule	Frebourg T 2006, Letra A 2009, Song Y 2011
CD44	CD44 ANTIGEN	11p13	107269	93 533	integral cell membrane glycoprotein with a postulated role in matrix adhesion lymphocyte activation and lymph node homing	Baroni T J Cell Physiol 2010, Park JW J Med Genet 2006
CHD7	CHROMODOMAIN HELICASE DNA-BINDING PROTEIN 7, KIAA1416	8q12.1-q12.2	608892	188 129	transcriptional regulator that binds to enhancer elements in the nucleoplasm. Also functions as a positive regulator of ribosomal RNA (rRNA) biogenesis in the nucleolus	Felix TM 2006, Pallais JC 2007, Vuorela P 2007, Delahaye A 2007, Jongmans MC 2006
CRHR1	CORTICOTROPIN-RELEASING HORMONE RECEPTOR 1, CORTICOTROPIN-RELEASING FACTOR RECEPTOR; CRFR1, CORTICOTROPIN-RELEASING HORMONE RECEPTOR; CRHR	17q21.31	122561	213 928	The corticotropin-releasing hormone receptor binds to corticotropin-releasing hormone, a potent mediator of endocrine, autonomic, behavioral, and immune responses to stress	Park JW 2006, Juriloff 2005, 2004, Mostowska A 2011
CRISPLD2	CYSTEINE-RICH SECRETORY PROTEIN, LCCL DOMAIN-CONTAINING, 2	16q24.1	612434	100 788		Carter TC 2010, Chiquet BT 2011, 2007, Girardi A 2011, Letra A 2011, Shen X 2011, Shi J 2010, Yuan Q 2012
CYP1A1	CYTOCHROME P450, SUBFAMILY 1, POLYPEPTIDE 1	15q24.1	108330	6 069	Cytochrome P1-450 is the form of P-450 most closely associated with polycyclic-hydrocarbon-induced aryl hydrocarbon hydrolase (AHH) activity	Chevrier C 2008, Kayano S 2004, Lie RT 2008, Shi M 2007

Gène	Noms	Localisation	OMIM	Taille (paires de base)	Rôle/fonction	Bibliographie
DHCR7	<i>STEROL DELTA-7-REDUCTASE</i>	11q13.4	602858	24 676	Encodes delta-7-sterol reductase, the penultimate enzyme of mammalian sterol biosynthesis that converts 7-dehydrocholesterol (7-DHC) to cholesterol.	Zechi Ceide RM 2009
DLX5	<i>DISTAL-LESS HOMEBOX 5</i>	7q21.3	600028	4 708		Jeong J Dev Dyn 2012, Vera Carbonell A 2012, Lo Iacono N 2008, Carstens MH 2002
DLX6	<i>DISTAL-LESS HOMEBOX 6</i>	7q21.3	600030	5 493	The human DLX5 and DLX6 genes are closely linked in a tail-to-tail configuration	Jeong J Dev Dyn 2012
EPHX1	<i>EPOXIDE HYDROLASE 1, MICROSOMAL; EPOXIDE HYDROLASE; EPHX; EPOXIDE HYDROLASE, MICROSOMAL XENOBIOTIC; EPOX</i>	1q42.12	132810	35 471	Important role in both the activation and detoxification of exogenous chemicals such as polycyclic aromatic hydrocarbons	Stuppia , Ramirez D 2007, Hartsfield JK 2001, Martz F 1977
ESCO2	<i>ESTABLISHMENT OF COHESION 1, S. CEREVISIAE, HOMOLOG OF, 2; ECO1, S. CEREVISIAE, HOMOLOG OF, 2; CTF7, S. CEREVISIAE, HOMOLOG OF, 2; ESO1, S. POMBE, HOMOLOG OF, 2; ESTABLISHMENT FACTOR ORTHOLOG 2; EFO2</i>	8p21.1	609353	40 692	Encodes a member of the family of acetyltransferases involved in the establishment of sister chromatid cohesion during S phase and postreplicative sister chromatid cohesion induced by double-strand breaks	Leem YE 2011, Vega H 2005
FGF8	<i>FIBROBLAST GROWTH FACTOR 8; FGF8 ANDROGEN-INDUCED GROWTH FACTOR; AIGF</i>	10q24.32	600483	5 941	Fibroblast growth factors are secreted proteins that interact with FGF tyrosine kinase receptors to mediate growth and development. The temporal and spatial patterns of FGF8 gene expression suggest that FGF8 is involved in gastrulation, regionalization of the brain, and organogenesis of the limb and face as an embryonic epithelial factor.	
FGF 9	<i>FIBROBLAST GROWTH FACTOR 9</i>	13q12.11	600921	33 426	Peptide regulatory factors that act through distinct tyrosine kinase receptors and are involved in various biologic processes during embryogenesis and adult life, including implantation, morphogenesis, angiogenesis, and possibly tumorigenesis	Iwata J J Bio Chem 2012, Nikopensius T 2010, Krejci P 2009
FGFR1	<i>FIBROBLAST GROWTH FACTOR RECEPTOR 1; FMS-LIKE TYROSINE KINASE 2; FLT2; FMS-LIKE GENE; FLG</i>	p11.23-p11.22	136350	57 697	Role in regulating cellular responses elicited by acidic FGF stimulation. Is essential for the normal formation of the organ of Corti	Stanier P 2012, Wang H 2011, Bailleul Forestier I 2010, Wan WD 2009, Riley BM 2007, Pitteloud N 2006, Kim HG 2005, Albuissou J 2005
FGFR2	<i>FGF RECEPTOR; PROTEIN TYROSINE KINASE, RECEPTOR-LIKE, 14; TK14</i>	10q26.13	176943	120 129	The fibroblast growth factor receptors comprise a family of related but individually distinct tyrosine kinase receptors.	Development of the lip and palate: FGF signalling Stanier P Front Oral Biol 2012
FOXE1	<i>FORKHEAD BOX E1; FORKHEAD, DROSOPHILA, HOMOLOG-LIKE 15; FKHL15 THYROID TRANSCRIPTION FACTOR 2; TTF2 TITF2</i>	9q22.3	602617	3 462	Transcription factors: present from the start of thyroid morphogenesis. Expressed in the lower undifferentiated compartment of hair follicles in mouse skin, at a time and site that parallel activation of the Shh	Nikopensius T Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 2011
FRAS1	<i>KIAA1500</i>	4q21.21	607830	486 700	encodes a putative extracellular matrix (ECM) protein and is mutated in Fraser syndrome	Clements SE 2012
GABRB3	<i>GAMMA-AMINO BUTYRIC ACID RECEPTOR, BETA-3</i>	15q12	137192	395 994	Family of proteins involved in the GABAergic neurotransmission of the mammalian central nervous system	Carter TC 2010, Marinucci L 2009, Vieira AR 2008, Inoue H 2008, Toso L 2007, Scapoli L 2002
GDF6	<i>GROWTH/DIFFERENTIATION FACTOR 6</i>	8q22.1	601147	18463	Required for normal formation of bones and joints in the limbs, skull, and axial skeleton (mouse)	Chiquet BT 2009
GLI2	<i>GLI-KRUPPEL FAMILY MEMBER 2</i>	2q14.2	165230	257 031	Encodes a vertebral transcription factor involved in SHH signal transduction	Vieira AR 2005, Kevelam SH 2011, Levi B 2011, Bertolacini CD 2012, França MM 2010, Carter TC 2012, Zechi Ceide RM 2009
GLI3	<i>GLI-KRUPPEL FAMILY MEMBER 3</i>	7p14.1	165240	276 923	Encodes a member of the zinc finger gene family related to Kruppel, a gene that is known to regulate development in Drosophila	Levi B 2011
GPC3	<i>GLYPICAN 3</i>	Xq26.2	300037	450 150	Are heparan sulfate proteoglycans that bind to the exocyttoplasmic surface of the plasma membrane through a covalent glycosylphosphatidylinositol (GPI) linkage. The main function of membrane-attached glypicans is to regulate the signaling of WNTs, Hedgehogs, fibroblast growth factors, and bone morphogenetic proteins	Golabi M 2006

Gène	Noms	Localisation	OMIM	Taille (paires de base)	Rôle/fonction	Bibliographie
GSK 3 b	GLYCOGEN SYNTHASE KINASE 3-BETA	3q13.33	605004	273 095	Is a proline-directed serine-threonine kinase that was initially identified as a phosphorylating and inactivating glycogen synthase	Nelson ER 2011, Andrade Filho PA 2011
GSTT1	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE, THETA-1	22q11.2	600436	8 548	Catalyze the conjugation of glutathione to a wide range of potential toxins as the first step in detoxification	Chevrier C 2008, Lie RT 2008, Viera AR 2008, Shi M 2007, Hozyasz KK, Lammer EJ 2005
HDAC4	HISTONE DEACETYLASE 4	2q37.2	605314	353 485	HDAC4 possesses deacetylation activity against all 4 core histone	Park JW 2006
HYLS1	HYLS1 GENE	11q24.2	610693	17 035	Hyls1 interacted with Sas4 and was stably incorporated into centrioles as they formed via direct interaction with Sas4. Functional characterization of Hyls1 in <i>C. elegans</i> and <i>Xenopus</i> embryo ciliated epithelium revealed that Hyls1 was dispensable for centriole assembly and centrosome function, but that it was required for the formation of cilia.	Belengeanu V 2011
IMP5	INTRAMEMBRANE PROTEASE 5	17q21.31	608284	2 183		Park JW 2006
IRF6	INTERFERON REGULATORY FACTOR 6	1q32.2	607199	20 444	High levels of Irf6 mRNA along the medial edge of the fusing palate, tooth buds, hair follicles, genitalia, and skin	Brito LA 2012, Letra A 2012, Vieira AR 2012, Kohli SS 2012, Salahshourifar I 2012, Shi J 2011, Larrabee YC 2011, (117 références pub med...)
JAG2	JAGGED 2	14q32	602570	27 844	Jagged2 are subject to presenilin-dependent, intramembranous gamma-secretase processing, resulting in the production of soluble intracellular derivatives	Vieira AR 2005, Neiswanger 2006, Jagomagi T 2010, Scapoli L 2008
LARGE	KIAA0609	22q12.3	603590	756 839		Clement E, 2008
LEF1	LYMPHOID ENHANCER-BINDING FACTOR 1. TRANSCRIPTION FACTOR, T CELL-SPECIFIC, 1, ALPHA. TCF1-ALPHA	4q23-q25	153245	121412	Is a nuclear protein that is expressed in pre-B and T cells	Park JW 2006
MAFB	V-MAF MUSCULOAPONEUROTIC FIBROSARCOMA ONCOGENE FAMILY, PROTEIN B. KRML, MOUSE, HOMOLOG OF; KRML	20q11.2-q13.1	608968	3 393	Palatal development	Yuan Q 2011, Cheng H 2012, Lennon CJ 2012, Pan Y 2011, Beatty TH 2010
MAPT	MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN TAU. MTBT1	17q21.1	157140	133 953	The microtubule-associated proteins (MAPs) coassemble with tubulin into microtubules in vitro.	Park JW 2006, Juriloff DM 2004 et 2005
MID1	MIDLINE 1. MIDLINE 1 RING FINGER GENE. MIDIN. FINGER ON X AND Y, MOUSE, HOMOLOG OF; FXY	Xp22	300552	438 460	Plays a role in the ubiquitin-specific regulation of the microtubule-associated catalytic subunit of protein phosphatase 2Ac (PP2AC), and a MID1/alpha-4 (IGBP1) complex is the core of a microtubule-associated mRNP complex that links cytoskeleton-associated mRNA transport and translation control factors with members of the mTOR/PP2A signaling cascade	Hu CH 2012, Meroni G 2004, Scapoli L 2008, Hsieh EW 2008, Aranda Orgillès B 2008, So J 2008, Ferrentino R 2007, Mnayer L 2006 (15 références pub med)
MLPH	MELANOPHILIN	2q37	606526	69 891	Pigmentation	Park JW 2006
MMP3	MATRIX METALLOPROTEINASE 3	11q23	185250	8 007	Is a proteoglycanase closely related to collagenase with a wide range of substrate specificities. It is a secreted metalloprotease produced predominantly by connective tissue cells. Together with other metalloproteases, it can synergistically degrade the major components of the extracellular matrix. Stromelysin is capable of degrading proteoglycan, fibronectin, laminin, and type IV collagen, but not interstitial type I collagen.	Letra A 2012 et 2007, Bueno DF 2011

Gène	Noms	Localisation	OMIM	Taille (paires de base)	Rôle/fonction	Bibliographie
MSX1	MUSCLE SEGMENT HOMEODOMAIN, DROSOPHILA, HOMOLOG OF, 1; MSH, DROSOPHILA, HOMOLOG OF, 1; HOMEODOMAIN 7; HOX7	4p16.2	142983	4 272	Muscular differentiation	69 références pub Med, Liang J 2012 (forme familiale), Mostowska A 2010, Jagomagi T 2010, Singh VP 2012, Amato K 2012
MSX2	MUSCLE SEGMENT HOMEODOMAIN, DROSOPHILA, HOMOLOG OF, 2	5q35-q35	123101	6 609	Bone formation	vieira AR 2005, Kennedy AE 2012, Song L 2009, Suda N 2006, Ashique AM 2002, Johnston MC 1995
MTHFR	5,10-METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE	1p36.22	607093	21 198	Catalyzes the conversion of 5,10-methylenetetrahydrofolate to 5-methyltetrahydrofolate, a cosubstrate for homocysteine remethylation to methionine.	Luo YL 2012, 55 références
MTR	5-METHYLTETRAHYDROFOLATE-HOMOCYSTEINE S-METHYLTRANSFERASE	1q43	156570	108 701	The remethylation of homocysteine to form methionine is catalyzed by the cytoplasmic enzyme 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine S-methyltransferase, which is also called methionine synthase. This enzyme requires methylcobalamin (MeCbl), a derivative of cobalamin, or vitamin B12, for activity;	Chorna LB 2011, Blanton SH 2011, Bufalino A 2010, Brandalize AP 2007, Mostowska A 2006, Brouns R 2008, Martinelli M 2006
MYH9	MYOSIN, HEAVY CHAIN 9, NONMUSCLE	22q12.3	160775	106 741	Direct role in actin network disassembly in crawling cells	Jial ZL 2012, Birnbaum S 2009, Chiquet BT 2009, Martinelli M 2007
NAT1	N-ACETYLTRANSFERASE 1	8p22	108345	53 213	Isoniazid inactivation. Acetylator phenotype	Lie RT 2008, Lammer EJ 2004, Riley BM 2007, Erickson RP 2008, Grunert RR 2002
NAT2	N-ACETYLTRANSFERASE 2	8p22	612182	9 974	NAT1 and NAT2 gave rise to functional NAT proteins in transfected COS-1 cells. NAT2 had high N-acetyltransferase activity	Erickson RP 2010, Erickson RP 2008, Lie RT 2008, Lammer EJ 2004, Van Rooij IA 2002
OFD1	CHROMOSOME X OPEN READING FRAME 5; CXORF5	Xp22.2	300170	34 649		Doray B 2012, Jugessur A 2012, Toriello HV 2002, Romero M 2007, Mihci E 2007, Shotelersuk V 1999
PAX9	PAIRED BOX GENE 9	14q13.3	167416	22 148	Member of the paired box-containing gene family	Lee JK 2012, Kouskoura T 2011, Mostowska A 2010, Nakatomi M 2010, Sull JW 2009, Ichikawa E 2006, Vieira AR 2004, Hamachi T 2003, Slayton RL 2003, Vieira AR 2003, Schuffenhauer S 1999
PDGF-C	PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR C	4q32.1	608452	210 941	Major mitogens and stimulants of motility in mesenchymal cells, such as fibroblasts and smooth muscle cells, and also act on other cell types, including capillary endothelial cells and neurons	Wu D 2012, Jugessur A 2009, Choi SJ 2009
PDGFRA	PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR RECEPTOR, ALPHA.PDGFRA	5q32	173490	69 151	PDGFRA promoter linked to a luciferase reporter. PAX1 acts as a transcriptional activator of the PDGFRA gene in differentiated human embryonal carcinoma cells	Rattanasopha S 2012
PHF8	PHD FINGER PROTEIN 8	Xp11.22	300560	112 283	Recombinant PHF8 is an Fe(II) and 2-oxoglutarate-dependent N-epsilon-methyl lysine demethylase, which acts on histone substrates	Loenarz C 2010, Koivisto AM 2007, Abidi FE 2007, Laumonier F 2005
POMT1	PROTEIN O-MANNOSYLTRANSFERASE 1. ROTATED ABDOMEN, DROSOPHILA, HOMOLOG OF; RT	9q34.13	607423	20 905	Encodes protein O-mannosyltransferase, an enzyme that catalyzes O-mannosylation of proteins, an important protein modification in eukaryotes that is initiated by an evolutionarily conserved family of O-mannosyltransferases.	Vajsar J 2008, Tzschach A 2012
PTCH1	PATCHED, DROSOPHILA, HOMOLOG OF, 1	9q22.32	601309	74 078	Encodes a transmembrane protein that represses transcription in specific cells of genes encoding members of the TGF-beta and Wnt families of signaling proteins. Mouse: PTCH1 encodes the principle receptor for the Hedgehog signalling pathway	Carter TC 2010, Solomon BD 2000, Cobourne MT 2009, Lo Muzio L 2008, Cox TC 2004
PVR	POLIOVIRUS RECEPTOR. PVS. CD155. NECTIN-LIKE PROTEIN 5. NECL5	19q13.31	173850	22 332	Belongs to a large family of immunoglobulin (Ig)-like molecules called nectins and nectin-like proteins, which mediate cell-cell adhesion, cell migration, and cell polarization by homotypic contact or heterotypic interaction with other nectins.	Sozen MA 2009, Pezzetti F 2007, Warrington A 2006
PVRL1	POLIOVIRUS RECEPTOR-LIKE 1. HERPESVIRUS ENTRY MEDIATOR C; HVEC POLIOVIRUS RECEPTOR-RELATED 1; PVRR1. PVRR; PRR. NECTIN 1	11q23.3	600644	105 675	Belongs to the nectin subfamily of immunoglobulin-like adhesion molecules that participate in Ca(2+)-independent cell-cell adhesion. Nectins bind to the actin cytoskeleton through the adaptor protein afadin and are key components of adherens junctions	30 références Pubmed; Cheng HQ 2012

Gène	Noms	Localisation	OMIM	Taille (paires de base)	Rôle/fonction	Bibliographie
PVRL2	<i>POLIOVIRUS RECEPTOR-LIKE 2</i>	19q13.32	600798	43 093	Mouse: PVR and PVRL2 bound strongly with DNAM1	Nikopensius T 2011, 2010, Jagomagi T 2010, Sozen MA 2009, Pezzetti F 2007, Warrington A 2006
RARA	<i>RETINOIC ACID RECEPTOR, ALPHA</i>	17q21.2	180240	48 473		20 références pubmed, Carter TC 2010, Fan GZ 2007, Baroni T 2006, Suazo J 2005, Peanchitlerkajorn S 2003, Kanno K 2002, ...
RFC1	<i>REPLICATION FACTOR C, SUBUNIT 1. ACTIVATOR 1, 140-KD SUBUNIT. REPLICATION FACTOR C, 140-KD SUBUNIT; RFC140. RFC</i>	4p14	102579	78 920	Promoting cell survival after DNA damage	Vieira AR 2008, Wang Y 2009, Mostowska A 2006, Pei L 2006, 2004, Schultz RE 2004, Shaw GM 2003
ROR 2	<i>RECEPTOR TYROSINE KINASE-LIKE ORPHAN RECEPTOR 2. NEUROTROPHIC TYROSINE KINASE, RECEPTOR-RELATED 2</i>	9q22	602337	387 072	Using mouse proteins, Mikels and Nusse (2006) demonstrated that Ror2 is a receptor for Wnt5a and serves to inhibit canonical Wnt signaling	Wang H 2012, Mehawej V 2012, Brunetti Pierri N 2008
RUNX2	<i>RUNT-RELATED TRANSCRIPTION FACTOR 2. CORE-BINDING FACTOR, RUNT DOMAIN, ALPHA SUBUNIT 1; CBFA1 AML3 GENE; AML3 PEBP2-ALPHA-A OSF2</i>	6p21.1	600211	336 193	Encodes a Runt-related transcription factor, which is part of the RUNX gene family	Wu T 2012, Levi B 2011, Sull JW 2008
RYK	<i>RYK RECEPTOR-LIKE TYROSINE KINASE</i>	3q22.1	600524	175 667	Member of the family of growth factor receptor protein tyrosine kinases	Carter TC 2010, Watanabe A 2006
SATB2	<i>SPECIAL AT-RICH SEQUENCE-BINDING PROTEIN 2</i>	2q33.1	608148	201 767	Osteoblast differentiation	Chung J 2011, Mao XY 2010, Carter TC 2010, Beatty TH 2006, Vieira AR 2005
SDC2	<i>SYNDECAN 2SYND2 HEPARAN SULFATE PROTEOGLYCAN; HSPG HSPG1 FIBROGLYCAN</i>	8q22.1	142460	118 459		Chiquet BT 2009
SCN3B	<i>SODIUM CHANNEL, VOLTAGE-GATED, TYPE III, BETA SUBUNIT</i>	11q24.1	608214	26 058	Voltage-sensitive sodium channel beta subunits, such as SCN3B, are auxiliary components that regulate the ion-conducting alpha subunits.	Park JW 2006
SHH	<i>SONIC HEDGEHOG</i>	7q36	600725	12 288	Encodes sonic hedgehog, a secreted protein that is involved in establishing cell fates at several points during development. These genes are involved in the organization and morphology of the developing embryo, which is established through a series of inductive interactions	23 références pubmed, Stanier P 2012, Levi B 2011, Zechi-Ceide RM 2009, ...
SIX3	<i>SINE OCULIS HOMEBOX, DROSOPHILA, HOMOLOG OF, 3</i>	2p21	603714	4 315	Encodes a nuclear homeoprotein required for eye development	Solomon BD 2000, Richieri Costa A 2010 et 2006, Zechi Ceide RM 2009, Dubourg C 2007,
SKI	<i>V-SKI AVIAN SARCOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG</i>	1p36.33	164780	81 519	proto oncogene	Carmignac V 2012, Mangold E 2012, Mukhopadhyay P 2012, D'Mello J 2007, Vieira AR 2005, Lu W 2005
SP100	<i>NUCLEAR BODY PROTEIN SP100. SPECKLED, 100-KD</i>	2q37.1	604585	129 661		Park JW 2006
SPRY2	<i>SPROUTY, DROSOPHILA, HOMOLOG OF, 2</i>	13q31.1	602466	4 976	Sprouty family proteins are evolutionarily conserved inhibitors of tyrosine kinase signaling	Goodnough LH 2007, Vieira AR 2005
SOX9	<i>SRY-BOX 9</i>	17q24.3	608160	5 401	Essential gene for many developmental processes, such as chondrogenesis, migration and differentiation of neural crest cells and testis development	Benko S 2011, Alkuraya FS 2006, Jakobsen LP 2006
SUMO1	<i>SMALL UBIQUITIN-LIKE MODIFIER 1; UBIQUITIN-LIKE 1; UBL1 SMT3, YEAST, HOMOLOG 3; SMT3H3 SMT3C SENTRIN PIC1</i>	2q33.1		32 429	SUMO proteins, such as SUMO1, and ubiquitin posttranslationally modify numerous cellular proteins and affect their metabolism and function. However, unlike ubiquitination, which targets proteins for degradation, sumoylation participates in a number of cellular processes, such as nuclear transport, transcriptional regulation, apoptosis, and protein stability	Carta E 2012, Jia ZL 2011, De Assis NA 2010, Jia ZL 2010, Mostowska A 2010, Carter TC 2010, Shi M 2009, Song T 2008, Carinci F 2007, Alkuraya FS 2006

Gène	Noms	Localisation	OMIM	Taille (paires de base)	Rôle/fonction	Bibliographie
TBX1	<i>T-BOX 1</i>	22q11.2	602054	26 891	T-box genes are transcription factors involved in the regulation of developmental processes	Herman SB 2012, Simrick S 2012, Funato N 2012, Friedman MA 2011, Goudy S 2010, Choi M 2009, Shi M 2009, Zoupa M 2006, Arnold JS 2006
TBX22	<i>T-BOX 22</i>	Xq21.1	300307	17 014	TBX22 is expressed in the palatal shelves and is highest prior to elevation to a horizontal position above the tongue	22 références... Jiang RS 2012, Pauws E 2012, Kohli SS 2012, Davidson TB 2012, Kaewkhampa A 2012, Kantaputra PN 2011, Fuchs A 2010? Acevedo AC 2010...
TBX10	<i>T-BOX 10</i>	11q13.2	604648	8 258	TBX10 is a member of the TBX1 subfamily	Mostowska A 2012, Vieira AR 2005, Ichikawa E 2006, Bush JO 2004
TFAP2A	<i>TRANSCRIPTION FACTOR AP2-ALPHA; AP2 ACTIVATING ENHANCER-BINDING PROTEIN 2-ALPHA AP2 TRANSCRIPTION FACTOR; AP2TF TFAP2</i>	6p24.3	107580	26 474	AP2-alpha is a 52-kD retinoic acid-inducible and developmentally regulated activator of transcription that binds to a consensus DNA-binding sequence CCCCAGGC in the SV40 and metallothionein promoters	15 références... Aliferis K t 201, Shi J 2011, Lin AE 2011, Galliani E 2012...
TGFA	<i>TRANSFORMING GROWTH FACTOR</i>	2p13.3	190170	106 914	Transforming growth factors (TGFs) are biologically active polypeptides that reversibly confer the transformed phenotype on cultured cells. TGF-alpha shows about 40% sequence homology with epidermal growth factor (EGF) and competes with EGF for binding to the EGF receptor, stimulating its phosphorylation and producing a mitogenic response.	55 références... Letra A 2012, Zhu J 2010
TGFB3	<i>TRANSFORMING GROWTH FACTOR, BETA-3</i>	14q24.3	190230	24 893	Beta-type transforming growth factors are polypeptides that act hormonally to control the proliferation and differentiation of multiple cell types.	85 références... Zhu X 2012, Wu C 2012, Ulucan K 2012, Reiter R 2012, Doetschmann 2012, Saleem S 2012...
TGIF	<i>TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA-INDUCED FACTOR</i>	18p11.3	602630	48 371	TGIF belongs to a family of evolutionarily conserved, atypical homeodomain proteins that act as transcriptional repressors and corepressors in retinoid and transforming growth factor signaling pathways	Zechi Ceide RM 2009
TIMP2	<i>TISSUE INHIBITOR OF METALLOPROTEINASE 2</i>	17q25	188825	72 414	Selective affinities for members of the matrix metalloproteinase family.	Letra A 2012, Nikopensisus T 2011
TP63	<i>TUMOR PROTEIN p73-LIKE; TP73L p53-RELATED PROTEIN p63; p63 KET</i>	3q28	603273	265 864	p63 was detected in a variety of human and mouse tissues, including proliferating basal cells of epithelial layers in the epidermis, cervix, urothelium, and prostate. Unlike p53, the p63 gene encodes multiple isoforms with remarkably divergent abilities to transactivate p53 reporter genes and induce apoptosis.	68 références...
TTF 2	<i>TRANSCRIPTION TERMINATION FACTOR, RNA POLYMERASE II</i>	1p13.1	604718	42 568		Meng T 2012
VAX1	<i>VENTRAL ANTERIOR HOMEODOMAIN 1</i>	10q26.1	604294	9 781	Eye development	Slavotinek AM 2012, Nasser E 2012
WNT3	<i>WINGLESS-TYPE MMTV INTEGRATION SITE FAMILY, MEMBER 3. ONCOGENE INT4; INT4</i>	17q21	165330	70 649	The WNT gene family consists of structurally related genes encoding secreted signaling molecules that have been implicated in oncogenesis and in several developmental processes, including regulation of cell fate and patterning during embryogenesis.	Menezes R 2010
WNT3A	<i>WINGLESS-TYPE MMTV INTEGRATION SITE FAMILY, MEMBER 3A</i>	1q42	606359	54 210	The WNT gene family consists of structurally related genes encoding secreted signaling molecules that have been implicated in oncogenesis and in several developmental processes, including regulation of cell fate and patterning during embryogenesis.	Yao T 2011
WNT5A	<i>WINGLESS-TYPE MMTV INTEGRATION SITE FAMILY, MEMBER 5A</i>	3p21-p14	164975	24 231	The WNT gene family consists of structurally related genes encoding secreted signaling molecules that have been implicated in oncogenesis and in several developmental processes, including regulation of cell fate and patterning during embryogenesis.	He F 2008, Yu H 2012, Motostowska A 2012, Andrade Filho PA 2011
WNT9b	<i>WINGLESS-TYPE MMTV INTEGRATION SITE FAMILY, MEMBER 9B. WINGLESS-TYPE MMTV INTEGRATION SITE FAMILY, MEMBER 15; WNT15</i>	11q21.32	602864	53 530	Members of the WNT family, such as WNT9b, are structurally related genes that encode cysteine-rich secreted glycoproteins that act as extracellular signaling factors	Jin YR 2012, Jezewski PA 2008
WNT11	<i>WINGLESS-TYPE MMTV INTEGRATION SITE FAMILY, MEMBER 11</i>	11q13.5	603699	24 435		Yu H 2012, Mostowska A 2012, Andrade Filho PA 2011, Menezes R 2010, Chiquet BT 2008
ZNF202	<i>ZINC FINGER PROTEIN 202</i>	11q23.3	603430	17 499		Park JW 2006

C. Analyse de l'implication des gènes potentiels et d'intérêt des FL/P

Tableau 11 Synthèse des Phénotypes, types d'anomalies génétiques identifiées, liens avec d'autres gènes ou voies de signalisation, existence d'interactions environnementales, d'études familiales ou maternelles, de modèles animaux ou fœtaux liés aux gènes référencés dans la littérature comme associés aux FLP (gènes classés par ordre alphabétique)

Gène	Phénotype		Type d'anomalie génétique	Interaction avec d'autres gènes ou voie signalisation	Interaction avec l'environnement	Existence d'étude familiale ou maternelle	Existence de modèle animaux ou fœtaux	Lien indirect RÔLE incertain
	Type de fentes	Non syndromiques						
ABCA4	FL+/-P	x	Linkage, genome wild association, mutations	MAFB		x		
ADH1C			Linkage, genome wild association, mutations		alcohol	x		
ALX3	FP	x				X		
ALX4	FL+/-P	x	Linkage			X	x	x
ARHGAP29	FL+/-P	x	Genome wild association Mutations	Localisation proche ABCA4 IRF6?			souris	
AXIN2	FL/P	x	Linkage	WTN, CDH1, DVL2				
B3GALT1	FL/P		Mutations					
BCL3	FL+/-P	x	Linkage	TGFb-RARA		X		
BMP2	FP,FL/P	x	Linkage, délétions					
BMP4	FL+/-P	x	Variants, polymorphismes, mutations		X		souris	
CDH1	FL/P	x	Mutation				x	
CD44	FL/P		Linkage		tabac		x	x
CHD7	FLP	x	Mutation			X		
CRHR1	FL+/-P	x	Linkage variants polymorphisme			X	x	
CRISPLD2	FL+/-P	x	Variants polymorphisme Mutation	Gène de la chaîne des Folates	Folate		souris, zebrafish	Rôle protecteur de certains variants? Chevrier.C 2008
CYP11A1	FL, FLP, FP	x	Variants polymorphisme		tabac, drogue	X		
DHCR7	FP		SmithLemli Opitz syndrome					
DLX5	FL+/-P		EEC, Rapp-Hodgkin, SHFM	P63 chez l'homme SHH, MSX1, BMP chez la souris			souris	
DLX6	FL+/-P		Hodgkin, SHFM	P63			souris	?
EPHX1	FLP	X	Linkage variants polymorphisme		tabac drogue			

Gène	Phénotype		Type d'anomalie génétique	Interaction avec d'autres gènes ou voie de signalisation	Interaction avec l'environnement	Existence de familiale ou maternelle	Existence de modèle animaux ou foetaux	Lien indirect Rôle incertain
	Type de fentes	Non syndromiques						
		Syndromiques						
ESCO2	FL+/P		Roberts syndrome	Mutation				x?
FGF8	FL/P		Fente et hypogonadisme hypogonadotrophique	variants polymorphisme Mutation (de novo missense mutation)			souris	
FGF9	Palais (animal), FLP			Test Gène-gène interaction			x	X mais lien avec voie FGF
FGFR1		x	Kallmann	Mutation, Délétion			x	
FGFR2	FL/P		Apert, crouzon	Délétion			x	X mais lien avec voie FGF
FOXE1	FL+/P	x		Mutation, variants, linkage			x	
FRAS1	FL/P		AEC					X mais lien avec protéine p63
GABRB3	FP, FL/P	x			alcoolisme foetal chez la souris			
GDF6	FL/P	x		Linkage				x
GLI2	FL+/P	x	Holoprosencephalie	Linkage, mutation, délétion			x	
GLI3	FLP						souris (palais)	x
GPC3	FP		Simpson Golabi Behmel syndrome type 1	Mutation				
GSK 3 b	FL/P		OSCC (oral squamous cell carcinoma)	Variant, polymorphisme		Voie WNT	x	
GSTT1	FL+/P	x		Linkage	tabac, drogue			littérature contradictoire
HDAC4	FL+/P	x		Linkage			x	
HYLS1	FP, FL/P		Hydrolethalus syndrome	Mutation				x
IMP5	FL/P	x		Linkage				x
IRF6	FL+/P	x	Van Der Woude syndrome; Popliteal Pterygium syndrome	Linkage variants polymorphisme	x folate		x	
JAG2	FL/P	x		Linkage		TP63		
LARGE	FLP		Walker Warburg syndrome	Mutation, variants				
LEF1	FL+/P	x		Linkage			x	
MAFB	FL+/P	x		Genome wild association		ABCA4		
MAPT	FL+/P	x		Linkage		CLF1?	souris	
MID1	FL+/P	x	Optizg; BBB syndrome	Mutation				
MLPH	FL+/P	x		Linkage			x	

Gène	Phénotype		Type d'anomalie génétique	Interaction avec d'autres gènes ou voie de signalisation	Interaction avec l'environnement	Existence d'étude familiale ou maternelle	Existence de modèle animaux ou foetaux	Lien indirect Rôle incertain
	Type de fentes	Non syndromiques						
<i>MMP3</i>	FL+/-P	X	Variants polymorphisme, Test gène gène interaction	<i>TIMP2?</i>				
<i>MSX1</i>	CLP	X	Mutations	<i>PAX9</i>			x	
<i>MSX2</i>	FL+/-P	x		<i>Wnt beta caténine</i>			souris	x
<i>IMTHFR</i>	FLP	x	Linkage variants polymorphisme		acide folique	x		
<i>IMTR</i>	FL+/-P	x	Variants, polymorphisme		acide folique	x		
<i>MYH9</i>	FL+/-P	x	Linkage variants polymorphisme		X tabac			
<i>NAT1</i>	FL+/-P	x	Linkage		tabac, drogue, folates		souris	
<i>NAT2</i>	FL+/-P	x	Linkage		tabac, drogue		souris	
<i>OFD1</i>	FL/P		Mutation				souris	
<i>PAX9</i>	Palais, FL+/-P	x	Polymorphisme, mutation, délétion	<i>MSX1, TGFβ3</i>		x	souris	
<i>PDGF-C</i>	Palais, FL+/-P	x	Linkage,			X	souris	
<i>PDGFRa</i>	Palais	x	Mutation	<i>PAX1</i>	tabac probable	X	souris, zebrafish	
<i>PHF8</i>	FL+/-P		Mutation, délétion			X	souris	
<i>POMT1</i>	FL+/-P		Mutation, délétion					
<i>PTCH1</i>	FL+/-P	x	Walker Warburg syndrome				souris	
<i>PVR</i>	FL+/-P	x	Holoprosencéphalie, Gorlin	<i>SHH</i>			souris	
<i>PVRL1</i>	FL+/-P	x		<i>PVRL2</i>			x	
<i>PVRL2</i>	FLP	x	Linkage variants, Mutation	<i>PVR</i>				
<i>RARA</i>	FLP	x	Linkage variants	<i>TGF b</i>	vitamine A			bibliographie contradictoire
<i>RFC1</i>	FL+/-P	x	Polymorphisme		acide folique	x		
<i>ROR 2</i>	Palais, FL+/-P	x	Polymorphisme dans la forme non syndrome. Mutation dans la forme syndromique	<i>Wnt5a</i>			x	
<i>RUNX2</i>	Palais, FL+/-P		Polymorphisme	indian hedgehog signaling	Tabac	x	souris	
<i>RYK</i>	FLP	x	Mutation				x	
<i>SATB2</i>	FL+/-P	x	Mutation, polymorphisme	<i>SUMO, RUNX2</i>		x		
<i>SDC2</i>	FL+/-P	x	Linkage	<i>Myc</i>				x

Gène	Phénotype		Type d'anomalie génétique	Interaction avec d'autres gènes ou voie de signalisation	Interaction avec l'environnement	Existence d'étude familiale ou maternelle	Existence de modèle animaux ou foétaux	Lien indirect Rôle incertain
	Type de fentes	Non syndromiques						
SCN3B			Linkage					
SHH	FL+/- P		Mutation dans les formes syndromiques. Polymorphisme dans les formes non syndromiques				x	
SIX3	FL+/- P		Mutation				x	x
SKI	palais, FL+/-P		Variant, polymorphisme	<i>Shh, SMAD4</i>			x	
SPR100	FL+/- P		Linkage				x	
SPRY2	Palais, FL+/-P		Linkage, variant, mutation	<i>Voie des FGF</i>			souris	
SOX9	Pierre Robin Fente Palais	x Séquence Pierre Robin	Délétion séquence de Pierre Robin. Mutation en cas de forme syndromique				souris	
SUMO1	FL+/-P	X	Délétion, variant, linkage		tabac	x	souris	
TBX1	Palais, FL+/-P	X	Délétion, mutation, duplication				souris	
TBX22	FP	X	Mutation, variant			x	souris, zébrafish	
TBX10	FL+/- P	X	Variant				souris	Chez l'homme peu de chose surtout chez la souris
TFAP2A	FL+/- P	X	Polymorphisme, mutation, délétion				x	
TGFA	FL+/- P	X	Polymorphisme, linkage, mutation		Tabac: plusieurs études mais pas de rôle mis en évidence	x	souris	
TGFB3	palais	X	Polymorphisme		Tabac	x	chien, souris	
TGIF	FL+/- P						souris	x
TIMP2	FL+/-P	X	Polymorphisme	<i>MMP3</i>				
TP63	Palais, FL+/-P	X	Mutation				souris	
TTF2	Palais						souris	x, TTF2 correspond au nom utilisé pour 2 gènes différents TTF2 mais aussi FOXE1
VAX1	FL+/-P	X	Mutation	<i>shh chez la grenouille</i>			souris, zébrafish, grenouille	x
WNT3	FL+/- P	X	Mutation dans la forme syndromique, Variant, polymorphisme dans les formes non syndromiques				zebrafish, souris	
WNT3A	FL+/- P, FP	X	Variant, polymorphisme					
WNT5A	FL+/- P	X	Polymorphisme	<i>ROR2</i>				
WNT9b	FL+/- P			<i>FGF</i>			zebrafish, souris	
WNT11	FL+/- P, FP	X	Polymorphisme				zebrafish, souris	
ZNF202	FL+/- P	X	Linkage				x	

III. FENTES LABIALES ET/OU PALATINES SYNDROMIQUES ET NON SYNDROMIQUES : GENES POTENTIELS OU IDENTIFIES AYANT UNE IMPLICATION DANS LES PROCESSUS D'ANGIOGENESE

L'analyse de la littérature que nous avons menée sur « gènes et FL/P » a permis de retenir, au moment de la rédaction de la thèse et d'une manière générale, 95 gènes d'intérêt. Parmi ces gènes plusieurs étaient des gènes impliqués dans l'angiogenèse. Toutes les voies de l'angiogenèse ne sont pas concernées et les gènes impliqués sont principalement des facteurs de croissance ou des enzymes protéolytiques.

A. Facteurs de croissance

Les facteurs de croissance ayant un rôle dans l'angiogenèse et qui ont été reliés aux FL/P sont *TGF β* , *TGFA*, *PDGF c* et *PDGFR a* , *FGF* et *FGFR*. Nous ferons le point successivement sur leur rôle.

1. Voie des TGF

La superfamille des facteurs de croissance TGF et leurs récepteurs jouent un rôle important de liaison dans le développement cranio-facial. La plupart des connaissances sur le rôle de la voie de signalisation *TGF* dans le cadre des FL/P été découvert dans des modèles animaux et *in vivo*.

a) TGFA

Le *TGFA* a été un des premiers gènes rapportés comme associés aux fentes NS (Ardinger HH, 1989; Shiang R, 1993; Jugessur A, 2003b). Il est fortement exprimé lors de la fusion palatine et favorise la biosynthèse de la matrice extra-cellulaire. En outre, les allèles *TGFA* sont parmi les rares facteurs génétiques qui ont montré d'importantes interactions avec des facteurs environnementaux comme le tabagisme maternel et les facteurs nutritionnels vitaminiques (Shaw GW, 1996, 1998; Jugessur A, 2003a; Zeiger JS, 2005; Sull JW, 2009).

Le *TGFA* présente 40% d'homologie avec EGF (Epidermal Growth Factor) et rentre en compétition avec son récepteur l'EGFR. Ce dernier participe au développement cranio-facial et la formation du palais (Miettinen PJ, 1999). Il a d'ailleurs été spécifiquement étudié, sans

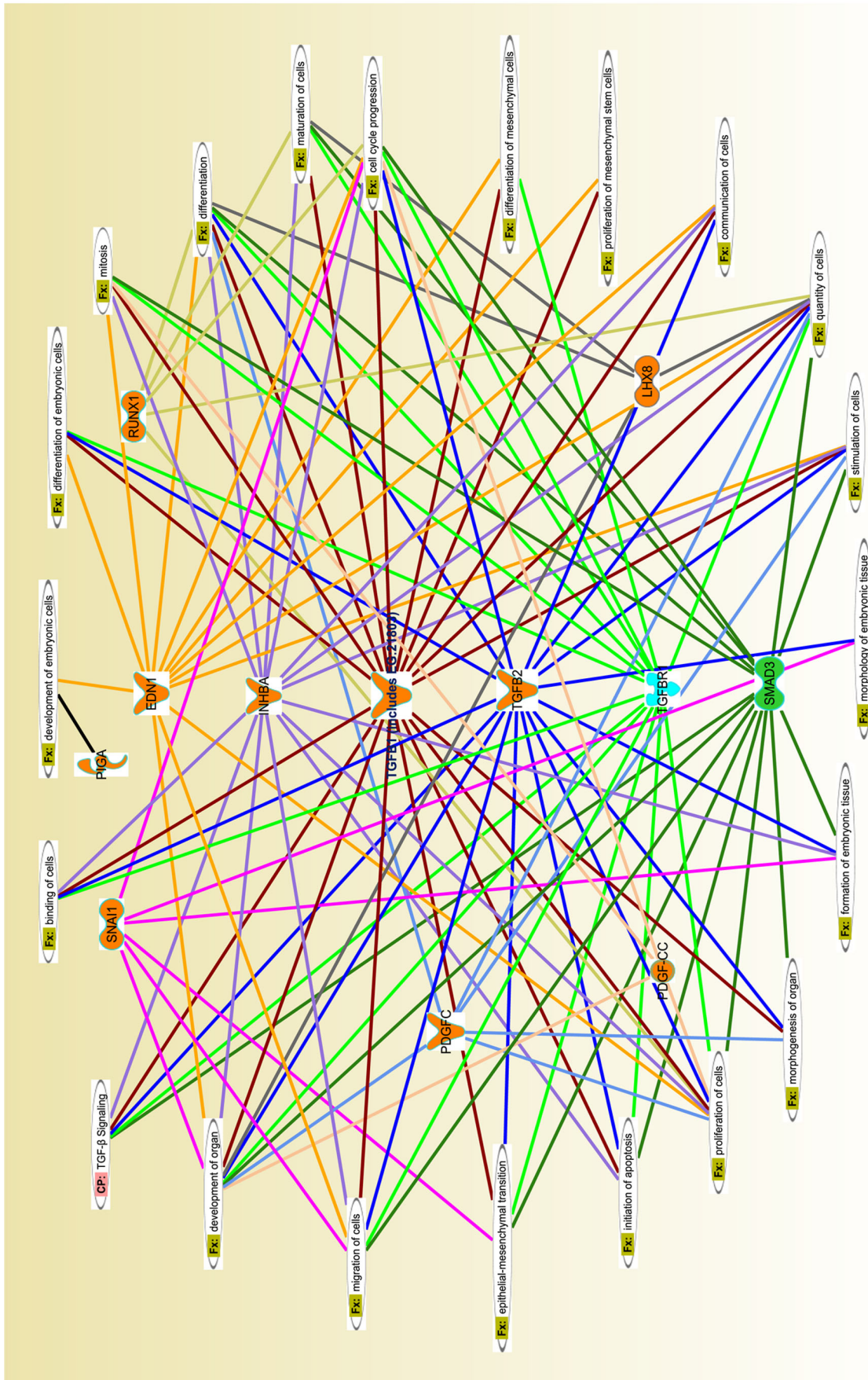
résultats, dans le cadre de son implication dans les FL/P NS (Martinelli M, 2009).

Une étude chez la souris semble souligner le rôle de TGFA comme stimulateur de MMP2 durant la phase embryonnaire. MMP2 est un activateur de la migration cellulaire et du remodelage tissulaire. Chez la souris homozygote Ph/Ph (délétion de la sous unité alpha du récepteur PDGF) il existe une anomalie du TGFA qui a été observée en même temps qu'une diminution de l'expression de MMP2 et de MT-MMP ayant pour conséquence des anomalies de développement cranio-faciaux et cardio-vasculaires (alors que l'adjonction *in vitro* de TGFA augmente l'expression de MMP2) (Robbins JR, 1999).

b) TGFβ

La voie de signalisation de TGFβ joue un rôle majeur dans la régulation de la croissance cellulaire, la différenciation et le développement d'un large éventail de systèmes biologiques. (Fig 61)

En général cette voie est activée par un ligand induit de l'oligomérisation d'un sérine/thréonine récepteur kinase et la phosphorylation cytoplasmique des molécules signales Smad2 et Smad3 pour la voie TGFβ ou Smad 1/5/8 pour la voie BPM (Fig 62).



© 2000-2011 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Figure 61: Synthèse de fonction des gènes TGFbeta, et PDGFC (entre autres) lors de de l'embryogénèse (Zhu X, 2012)

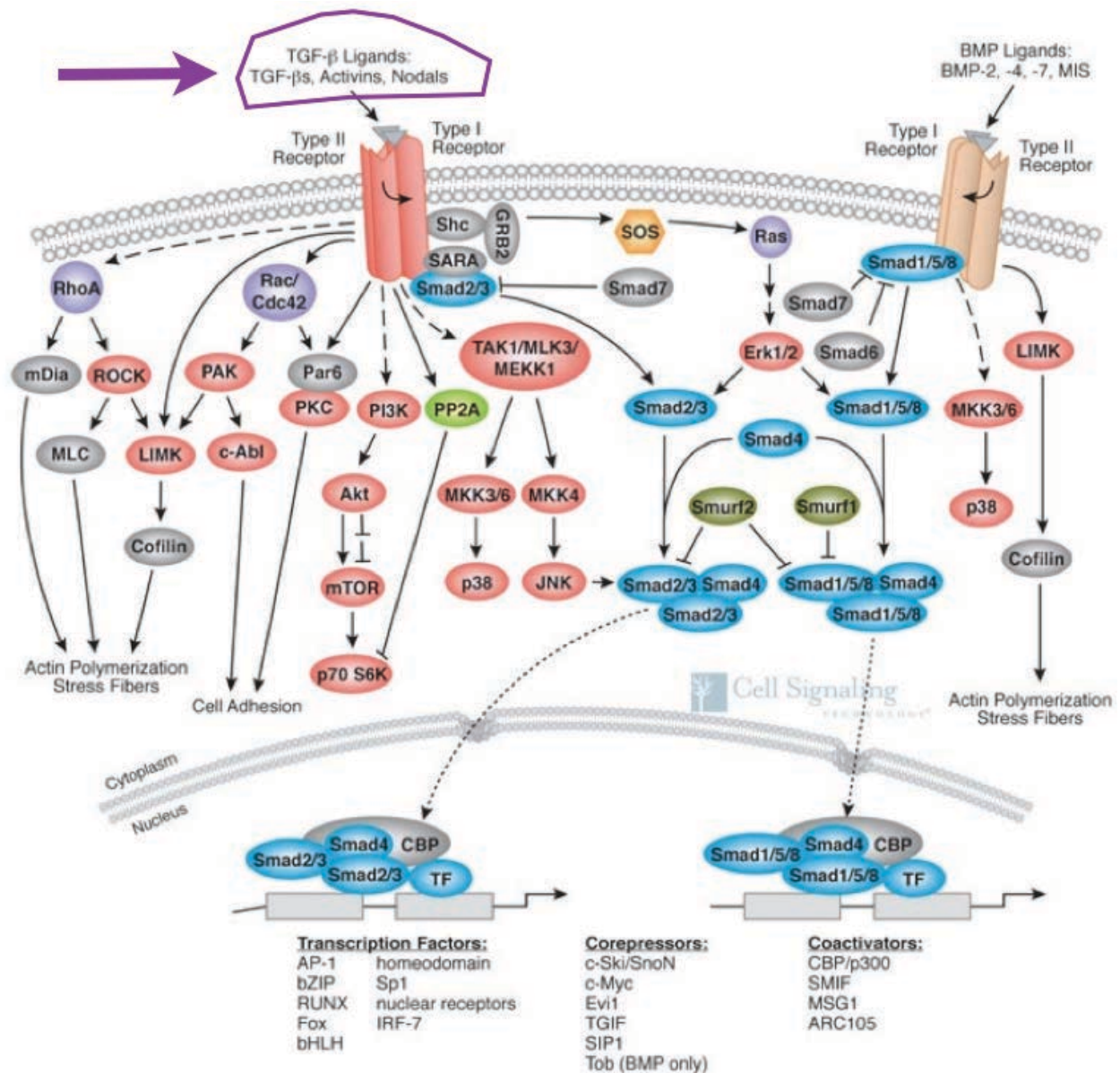


Figure 62: Voie de signalisation TGF Beta et BMP
http://www.cellsignal.com/reference/pathway/TGF_beta.html

La famille des TGF β est composée de plus de 30 protéines (dont les BMP, les cytokines TGF, activines) impliquées dans une grande variété de processus biologiques.

Bien que les trois isoformes de TGF β 1, β 2, β 3 soient hautement conservées entre les espèces (Rotzer D, 2001) et malgré l'identité de séquence de 71-76%, ces isoformes ont des activités spécifiques qui ne peuvent être compensés par autres membres de la famille (Iwata J, 2011).

TGF β 1, β 2, β 3 sont impliqués dans :

- Le cycle cellulaire, la régulation de la prolifération, de la migration, de la survie et de la différenciation cellulaire, dont la différenciation des cellules souches embryonnaires (Massagué J, 2012) (Fig 61) et la transformation des cellules mésenchymateuses en cellules épithéliales (Kohama K, 2002).

- L'apoptose qu'elle induit par différentes voies : la voie SMAD, la voie DAXX, la voie FasL-Fas-Caspase (Huang X, 2011). (Fig 62)
- L'angiogenèse. TGF β ainsi que les autres composants de cette voie de signalisation ont un rôle central et indispensable dans l'angiogenèse. Les anomalies de cette voie sont d'ailleurs connues pour être pourvoyeuses d'anomalies cardio-vasculaires. (Bertolino P, 2005)
- La synthèse de la matrice extracellulaire dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires,
- Le maintien de l'homéostasie vasculaire,
- Certains cancers (pulmonaire, digestif, cavité buccale, thyroïde), le syndrome de Marfan, et le syndrome de Loeys Dietz.

Chaque isoforme a été incriminé dans des tableaux plus spécifiques comme par exemple :

- TGF- β 1 a été impliqué dans hématopoïèse et dans la différenciation endothéliale (Pepper MS, 1997)
- TGF- β 2 dans le développement cardiaque, pulmonaire, cranio-facial (particulièrement les yeux et les oreilles), du système uro-génital, et des membres.
- TGF- β 3 dans la palatogenèse et le développement pulmonaire.

Toutefois toutes les isoformes (1-2-3) ont démontré un rôle essentiel tout au long de la palatogenèse normale et sont exprimés tout au long de la formation (Iordanskaia T, 2011 ; Zhu X, 2012).

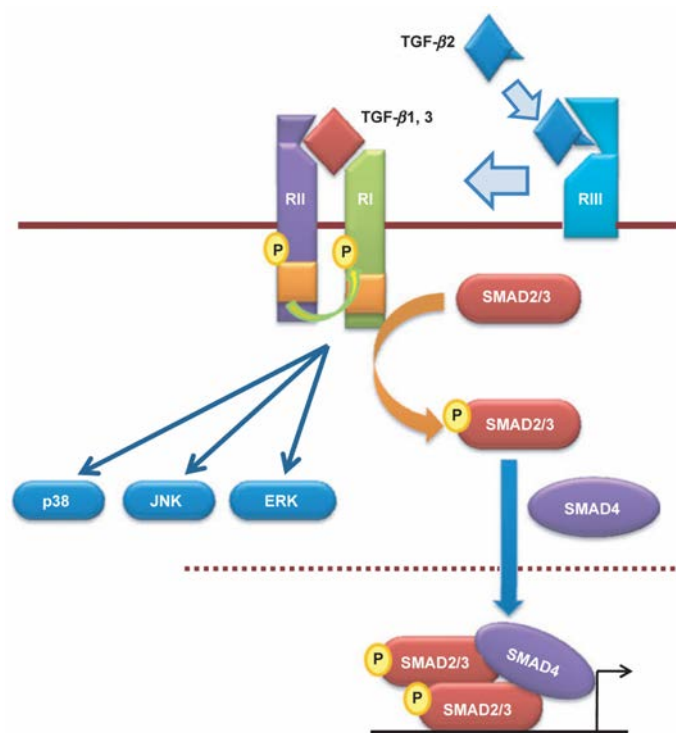


Figure 63: Voie TGF β simplifiée spécifiant l'articulation entre les différentes isoformes (Iwata J, 2011)

Cette voie de signalisation présente des interactions avec un certain nombre d'autres voies de signalisation ou gènes impliqués dans les FP comme par exemple :

- La voie Wnt/catenin. Les travaux de He F et al soulignent que la voie Wnt/catenin contrôle l'expression de *TGFβ3* (He F, 2011).
- La voie des *MMP* (Blavier L, 2001).
- Le gène *FOXE1*. Les mutations de *FOXE1* sont responsables du syndrome de Bamforth-Lazarus (anomalies thyroïdiennes et cranio-faciales dont FP). Les études chez la souris ont souligné son rôle régulateur de *TGFβ3* et de *MSX1* (Venza I, 2011).
- Le gène *SKI*.

En dehors du lien avec d'autres voies de signalisation, *TGFβ* semble pouvoir être influencé par certains facteurs environnementaux tel que les folates (Jugessur A, 2003b ; Yao Z, 2011).

La souris dépourvue du gène *TGFβ3* (*Transforming growth factor-beta-3*) présente une FP liée à un défaut de fusion des bourgeons par défaut d'adhésion. Fait intéressant, l'application exogène de *TGF β3* chez le poulet avec FP induit la fusion palatine (Sun D, 1998). En outre, la voie de signalisation de *TGF β3* est au cœur de la désintégration de l'épithélium du bord médial du palais, de l'induction séquentielle de l'arrêt du cycle cellulaire dans cette même zone, de la migration cellulaire et de l'apoptose à des stades avancés du développement palatin (Ahmed S, 2007).

Chez l'homme, des variants de *TGFβ3* ont été associés aux FL/P NS dans différentes populations (Jugessur A, 2003b; Van Der Put NM, 1995 ; Prescott NJ, 2002 ; Van Rooij IA, 2003 ; Proetzel G, 1995 ; Vieira AR, 2003 ; Lidral AC, 1998; Reutter H, 2008; Suazo J, 2010b; Zhu J, 2010).

Le polymorphisme SfaN1 a été étudié dans l'intron 5 de *TGFβ3* (IVS5+104 A > G). La fréquence de l'allèle G est significative dans la population coréenne de FLP NS (OR 15,92%) (Kim MH, 2003).

Concernant plus spécifiquement *TGFβ1-β2*, Zhu X et al ont étudié *in vivo* sur cultures de cellules mésenchymateuses embryonnaires palatines humaines (1 fœtus humain issu d'un avortement en période d'élévation palatine avant fusion) après traitement par *TGFβ1-β2-β3*, par micro Array, l'expression de 28 869 gènes (Zhu X, 2012). Ils ont mis en évidence 566 transcripts modifiés dont 234 avaient des fonction biologiques cellulaires (croissance, prolifération, développement, morphogénèse, mouvement, cycle cellulaire, apoptose). Parmi

les 234 gènes 11 gènes avaient été identifiés comme gènes de la palatogenèse (*PDGFC*, *PIGA*, *RUNX1*, *SNAI1*, *SMAD3*, *TGF β1*, *TGF β2*, *TGF βR1*, *EDN1*, *INHBA*, *LHX8*) (Zhu X, Ozturk F, 2012). TGFβ1-β2 en régulant l'expression *in vivo* de 234 gènes souligne le fait que la voie des TGFβ jouerait probablement le rôle d'un grand chef d'orchestre pour synchroniser les moments clef de la palatogenèse.

2. PDGFC et PDGFRa

PDGFC et PDGFRa (son récepteur) sont des régulateurs clef du développement embryonnaire et sont requis durant la palatogenèse (Betsholtz C, 2001; Choi SJ, 2009; Ding H, 2004; Han J, 2006 et 2007; Liu L, 2002; Schmahl J, 2007; Soriano P, 1997).

PDGFC (OMIM 608452), *Plaquet Derived Growth Factor C*,

- Est mitogène (Gilbertson DG, 2001) et stimulant des fibroblastes, des cellules musculaires lisses, endothéliales des capillaires et les neurones (Reigstad L J, 2003).
- Est régulateur de la prolifération, de la survie, et de la migration cellulaire.
- Joue un rôle important dans la croissance du tissu conjonctif.
- Participe à la formation et entretien de la matrice extra-cellulaire.

Il a été impliqué dans certains cancers comme le carcinome papillaire de la thyroïde.

PDGFC fait partie de la famille des facteurs de croissance Knot (Knot family of growth factors) qui comprend VEGF, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, PIGF-1 et PIGF-2. Il existe 25% d'homologie entre VEGF et PDGFC mais aucun lien n'a été mis en évidence entre ce dernier et les récepteurs du VEGF (Reigstad L J, 2003).

Chez la souris, PDGFC est un puissant mitogène qui favorise la prolifération des cellules mésenchymateuses palatines en période embryonnaire. Il est indispensable dans la morphogénèse des arcs branchiaux. L'inactivation génétique de PDGFc (*PDGFc*^{-/-}), ou l'inactivation tératogène (acide rétinoïque) (Han J, 2006 et 2007) perturbe la voie des MMP (Robbins JR, 1999) et des TIF au niveau du palais pendant le développement des arcs branchiaux (Jinnin M, 2005).

Chez la souris la présence d'acide rétinoïque (dose dépendante) bloque le PDGFc et entraîne des anomalies de développement cranio-facial. L'adjonction exogène de PDGFc permet quant à elle à l'inverse d'éviter ces anomalies. En présence d'acide rétinoïque (PDGFc inactif) on constate une inhibition de la capacité migratoire des cellules mésenchymateuses dans le 1^{er} arc branchial, par régulation de *MMP2*, *MMP14* et *TIMP2* (Han J 2007).

L'expression de PDGFc est influencée par la voie des *FGF* et de *SUMO1* (Reigstad LJ, 2006). Comme nous le verrons dans le chapitre suivant les altérations de la voie de FGF entraînent des FL/P (Alkuraya FS, 2006 ; Pauws E, 2007). *PDGFc* interagit avec *WT1* et *EGR1*. *SUMO1* et *PDGFc* sont influencés tous deux par les facteurs de risques environnementaux.

PDGFRA (OMIM 173490) *Plaquet-derived Growth Factor Receptor alpha*, a lui aussi un rôle majeur dans la palatogenèse, le développement crânio-facial, le développement des crêtes neurales (Tallquist MD, 2003 ; Xu X, 2005). Des mutations dans le gène *PDGFRA* peuvent à elles seules être responsables de FP (Rattanasopha S, 2012).

En dehors des FL/P *PDGFRA* a aussi été impliqué :

- En embryogénèse dans les défauts de fermeture du tube neural (Joosten PH, 2001). Ainsi les modèles murins avec une modification de l'expression du gène *PDGFRA* entraînent des anomalies congénitales de la formation du tube neural (spina-bifida). Les mutations dans le gène *PAX1* identifiées dans les anomalies de fermeture du tube neural sont responsables de dysrégulation du gène *PDGFRA*.

- Dans les cancers. Xie et al ont souligné le fait que *GLI* (médiateur de la voie SHH) stimulait *PDGFRc* ce qui avait pour effet de déclencher la voie Ras/Erk et de favoriser la prolifération cellulaire dans le carcinome baso-cellulaire (Xie J, 2001).

3. FGF et FGFR

La voie de signalisation FGF joue elle aussi un rôle central dans le développement cranio-facial. Les récepteurs de FGF sont activés par des ligands extra-cellulaires FGF et ont un rôle dans la régulation de la différenciation, la prolifération et de la migration cellulaire. Cette voie est essentielle dans l'induction et la migration des crêtes neurales ainsi que dans la régulation des interactions entre épithélium et mésenchyme lors de la fusion des bourgeons faciaux. La majorité des ligands de la voie FGF et les récepteurs FGF R1 et R2 sont exprimés durant la phase initiale du développement facial (Bachler M, 2001).

Cette voie entretient des liens étroits avec d'autres voies telles que *SHH*, *Wnt*, *BMP*, *TGFβ*, *SOX*, *EGF*, *MSX*, *DLX* qui sont elles aussi impliquées dans le développement cranio-facial (Nie X, 2006). Les ligands et récepteurs FGF ont une chronologie et une topographie d'expression. Ainsi FGF18 est exprimé au niveau du bourgeon frontonasal et plus exactement au niveau de la zone de fusion des bourgeons nasaux latéraux et médial. FGFR1, FGFR2,

FGFR3, FGF10, FGF18 sont exprimés au cours des différents stades du développement du palais secondaire en particulier au niveau de l'épithélium palatin pendant le processus de fusion palatine. Leur inactivation entraîne des FP. Toutefois, le mécanisme d'action de *FGF* reste difficile à préciser. Les études chez les souris déficientes en ligands FGF ne présentent pas particulièrement plus de FL, même s'il existe des FP. Ceci pourrait-être dû d'après les auteurs, aux différences d'embryogénèse entre les rongeurs et l'homme (Stanier P, 2012).

FGFR2 est un des récepteurs de FGF. La voie de signalisation FGF joue un rôle central dans le développement cranio-facial. La majorité des ligands de la voie FGF et les récepteurs FGF R1 et R2 sont exprimés durant la phase initiale du développement facial (Bachler M, 2001). Leur inactivation entraîne des FP. Toutefois, le mécanisme d'action de *FGF* reste difficile à préciser. Les mutations en *FGFR1* et *FGFR2* sont connues dans des formes FL/P S comme le syndrome de Kallmann, mais aussi dans les syndromes de Pfeiffer, d'Apert (Mutation *FGFR2* syndrome d'Apert avec 76% de FP), et de Crouzon. Les études ont montré que le syndrome d'Apert et de Crouzon correspondaient à des variations alléliques d'un même syndrome. De même *FGF8* a été identifié dans les formes syndromiques de FP avec hypogonadisme.

A l'inverse, les mutations de FGF et de ses récepteurs n'ont été retrouvées qu'exceptionnellement en cas de formes NS. (Riley BM, Mansilla AM 2007 ; Riley BM, Murray JC 2007 ; Osoegawa K 2008)

B. Enzymes protéolytiques : MMP et TIMP2

Les métalloprotéases matricielles (MMPs) sont des protéases (enzymes protéolytiques) caractérisées par la présence d'un ion Zn_{2+} lié à 3 résidus histidine, au niveau de leur site catalytique. Elles agissent sur la matrice extracellulaire (MEC). Plus d'une vingtaine de MMP ont été décrites chez l'homme. Chacune étant codée par des gènes différents et produites par de nombreux types cellulaires. Elles sont synthétisées et secrétées sous forme de pro-enzymes inactives. L'activation se fait dans le milieu extracellulaire par protéolyse qui détache le propeptide à l'extrémité N-terminale de la molécule et libère le site actif. Les MMP peuvent dégrader les composants de la matrice extracellulaire à pH physiologique. Elles sont inhibées par l' α -macroglobuline et par des protéines inhibitrices telles que TIMP (Tissue Inhibitors of Matrix Metalloprotease). Les TIMP sont également des facteurs de croissance pour de nombreux types cellulaires.

Les MMP sont en général peu exprimées dans les tissus sains, mais leur expression augmente

lors des processus de remodelage tissulaire physiologique ou pathologique sous l'effet de facteurs capables de moduler l'expression de leur gènes (IL-1, TNF α , prostaglandine, lésion cellulaire...). Dans ces conditions, elles participent à divers phénomènes comme l'angiogenèse, la réparation tissulaire, l'embryogenèse ou encore la cicatrisation cutanée.

MMP 2 et 9 sont particulièrement impliquées dans les processus de cicatrisation et d'angiogenèse. Dans le domaine des FL/P chez l'homme des polymorphismes de MMP3, MMP9 et TIMP2 ont été décrit (Letra A, 2012 ; Letra A, Silva RA. 2007 ; Letra A, da Silva RA, 2007 ; Nikopensius T, 2011). Chez l'animal il existe des liens entre TGF β , les récepteurs de PDGF, TGFA, et la voie des MMP (MMP13, MMP2 et TIMP2). Les MMP sont dans ce modèle responsable de la phase de dégradation protéolytique de la matrice extra cellulaire (Blavier L, 2001 ; Robbins JR, 1999). La voie des MMP fait partie intégrante de la physiopathologie des FL/P.

En conclusion de cette première partie, 95 gènes ont été mis en exergue comme potentiellement impliqués ou identifiés dans les FL/P. Nous avons parmi eux identifié une dizaine de gènes de l'angiogenèse. Cette analyse bibliographique des gènes des FL/P a été la base des travaux réalisés.

2EME PARTIE :
ETUDE RETROSPECTIVE

I. POPULATION D'ETUDE

A. Fente labio-palatine et génétique anténatale

Une étude monocentrique a été réalisée dans le cadre du **CPDPN** (Centre pluri disciplinaire de diagnostic prénatal) du CHU de Reims. Cette étude visait à identifier, répertorier et étudier les patients porteurs d'une FL/P diagnostiqués en prénatal ainsi que FL/P diagnostiqués dans le cadre des examens fœto-pathologique.

Nous nous sommes intéressés aux analyses génétiques anténatales proposées et nous avons étudié les examens fœto-pathologiques en cas d'interruption médicale de grossesse. Cette étude a été menée entre Janvier 2009 et Août 2012, correspondant à la période d'inclusion de notre AOL.

B. Fente labio-palatine et conseil génétique

Nous avons réalisé une étude rétrospective à partir des dossiers des patients opérés d'une FLP (FL, FP ou FLP syndromiques ou non, opérés d'une chirurgie primaire ou secondaire) dans le service de chirurgie pédiatrique du CHU de Reims, entre 2003 et 2008.

Le but de ce travail était l'identification :

- de la fréquence des conseils génétiques dans cette population.
- du type de bilans génétiques proposés (caryotype, Fish 22q11, CGH Array...) et leur indication.
- le cas échéant d'anomalies génétiques. C'est à dire l'identification du type d'anomalies : chromosomique, génomique ou génique mais aussi l'identification de la technique qui a permis la mise en évidence de l'anomalie.
- de formes cliniques ou phénotypiques particulières (association rare, forme familiale...) pour lesquels une piste génétique était suspectée sans pour autant, en l'état actuel des connaissances, avoir identifiées d'anomalies.

II. RESULTATS

A. Fente labio-palatine et génétique anténatale

L'étude rétrospective des dossiers présentés au CPDPN entre janvier 2009 et fin août 2012 a mis en évidence 61 dossiers étudiés pour FL/P soit 2,8% des dossiers étudiés par le CPDPN. (Tableau 12)

Nous constatons que le nombre de dossiers traités en CPDPN augmente au fil des ans mais surtout que proportionnellement le nombre de dossiers traités pour FLP augmentent progressivement (2009 : 2,2%, 2010 : 2,7%, 2011 : 3,2%, et en 2012 : 3,3%). (Tableau 12)

Les analyses génétiques ont été proposées au cas par cas. L'amniocentèse a été réalisée dans environ 56% des cas de diagnostic anténatal de FL/P. Le caryotype a permis la mise en évidence d'anomalies dans 6% des cas. Une interruption médicale de grossesse a été réalisée dans environ 16% des cas (10/61). Il s'agissait toujours de formes polymalformatives.

Dans le même laps de temps 23 des examens foeto-pathologiques ont été réalisés chez des fœtus porteurs de fentes. 10 d'entre eux avaient été diagnostiqués en échographie pour leurs FL ou FLP. Les 13 autres cas étaient des FP non vues en échographie et découvertes à l'examen foeto-pathologique. 17 caryotypes (74% des cas) ont été réalisés sur les fœtus. Ils ont permis de mettre en évidence 5 anomalies (Tableau 13).

Tableau 12: Fentes labio-palatines et conseil génétique anténatal au sein du CHU de Reims 2009-2012

	2009	2010	2011	2012 (jusqu'au 01/09/2012)
Nombre de dossiers staffés au CPDPN	500	560	569	514
Nombre de fentes	11 5/11	15 3/15	18 4/18	17 3/17
Anomalies morphologiques associées	<p>Cas 1: 1 Anomalie rénale (duplicité unilatérale avec urétérocèle et syndrome de jonction pyélo-urétérale controlatérale) et FLP</p> <p>Cas 2: 1 Petit estomac et FLP B</p> <p>3 syndromes polymalformatifs:</p> <p>Cas 3: FLP Gauche et dysmorphie, atrésie choanne droite, dysplasie lobe oreille droite, cardiopathie (ventricule unique droit, atrésie aortique, CIA), absence des canaux semi-circulaires droits, hypoplasie des bulbes olfactifs, hypoplasie vermis cérébelleux</p> <p>Cas 4: FLP B et blépharophimosis, hypertélorisme, dysplasie lobes oreilles, atrésie oesophage, Tétralogie de Fallot, Artère ombilicale unique, et retard de croissance intra-utérin</p> <p>Cas 5: FLP et retard de croissance intra-utérin, hypoplasie cérébelleuse, artère ombilicale unique</p>	<p>Cas 6: FL Gauche et Kystes des plexus choroïdes</p> <p>Cas 7: FLP B et cataracte congénitale bilatérale et microphthalmie</p> <p>1 syndrome polymalformatif:</p> <p>Cas 8: FLP Gauche et Hernie diaphragmatique gauche, atrésie oesophage, anomalies cérébrales (petit cervelet, corps calleux hypoplasique) et hypertélorisme</p>	<p>Cas 9: FLP et Dilatation Pyélocaliciale mineure à 34SA</p> <p>Cas 10: FLP B, malformation cardiaque complexe, agénésie vermine (grossesse gémellaire)</p> <p>2 Syndromes polymalformatifs:</p> <p>Cas 11: Fente faciale complexe et encéphale déstructuré avec dilatation des ventricules latéraux évocatrice d'une bride amiotique associés à des malformations complexes des extrémités (sillons, oligo-syndactylies), des hémivertèbres thoracique, et une asymétrie du nombre de côtes</p> <p>Cas 12: Agénésie du pré-maxillaire, fente faciale, microcéphalie, hypertélorisme, blépharophimosis</p>	<p>Cas 13: FLA gauche et macrosomie, macrocéphalie, organomégalie, hydramnios, micropénis, élargissement modéré des uréters, 13 paires de côtes: Syndrome de Simpson Golabi</p> <p>Cas 14: FLA et pieds talus</p> <p>Cas 15: Agénésie pré-maxillaire anomalie lobulation pulmonaire</p>
Nombre de caryotypes réalisés sur liquide amniotique	5/11 (5FLP dont cas 1 et cas 2)	9 (3FL-6 FLP)	9 (5FLP B, 1 FLP, 2 FL B, 1 FL)	12 (4FL, 7FLP, 1FP) + 2 Echecs de Culture
Nombre d'anomalies identifiées au caryotype sur liquide amniotique	0/5	2/9	0/9	0/12
Type d'anomalies identifiées au caryotype	/	<p>Cas 6</p> <p>45,XY,der(14;15)(q10;q10) Héritée du père Pas de disomie uniparentale</p> <p>Cas 8</p> <p>Trisomie 13</p>	/	/
FISH 22q11	2 (cas 1 et 2) Non del	2 (1FL-1FLP) Non del	7 (4 FLP, 3 FL) Non del	6 (5FLP, 1FL) Non del (dont cas 13)
Interruption médicale de grossesse et mort fœtale	<p>Cas 3: IMG (pas caryo sur liquide amniotique)</p> <p>Cas 4: IMG (pas caryo sur liquide amniotique)</p> <p>Cas 5: mort né (pas caryo sur liquide amniotique)</p>	<p>Cas 7: IMG</p> <p>Cas 8: IMG</p>	<p>Cas 10: IMG sélective (Grossesse gémellaire)</p> <p>Cas 11: IMG</p> <p>Cas 12: IMG</p>	<p>Cas 13: IMG</p> <p>Cas 14: IMG</p> <p>Cas 15: IMG</p>

Tableau 13: Synthèse des examens fœto-pathologiques des FL/P réalisés au CHU de REIMS entre 2009 et 2012

	2009	2010	2011	2012 (jusqu'au 01/09/2012)
Nombre de dossiers traités en fœto-pathologie	115	124	111	68
Nombres de fentes diagnostiquées en fœto-pathologie	6 (3 FLP, 3 FP)	7 (1FLP, 6 FP)	6 (3FP, 1FLP B, 1 agénésie du pré-maxillaire, 1 fente faciale complexe)	4 (1 FLP, 1 FLA, 1 FP, 1 agénésie pré-maxillaire)
Nombre de fentes diagnostiquées à l'échographie anténatale	3	1	3 (cas C, cas D, cas E)	3 (1 FLP, 1 FLA, 1 agénésie pré-maxillaire)
Clinique	Aucune fente isolée	Aucune fente isolée	<p>Cas A: FP et syndrome de Cornelia De Lange (RCIU modéré, dysmorphie (synophris, retrognathisme majeur, hypoplasie mandibulaire, profil pathologique), anomalie complexe Membres (oligodactylie, agénésie cubitale unilatérale), méésentère commun, malposition des reins avec dilatation modérée des uretères)</p> <p>Cas B: FP et Dysmorphie, méningo-encéphalocèle postérieure occipito cervico dorsale haute, main botte radiale droite avec agénésie du pouce et du radius droit, hypoplasie de tout le membre supérieur droit, pentalogie de Cantrell avec coelosomie supérieure, ectopie cardiaque, main botte droite, hypoplasie pulmonaire</p> <p>Cas C: Fente faciale complexe et encéphale déstructuré avec dilatation des ventricules latéraux évocatrice d'une bride amniotique associés à des malformations complexes des extrémités (sillons, oligo-syndactylies), des hémivertèbres thoracique, et une asymétrie du nombre de côtes</p> <p>Cas D: Agénésie du pré-maxillaire, fente faciale, microcéphalie, hyperthélorisme, blépharophimosis</p> <p>Cas E: FP et Encéphalocèle occipitale avec rachischisis, raccourcissement du tronc, microcéphalie, malposition du pied Gauche, hypotrophie surrénalienne secondaire</p> <p>Cas F: FLP B, malformation cardiaque complexe, agénésie vermiennne (grossesse gémellaire)</p>	<p>Cas G: FLA, Simpson Golabi Behmel</p> <p>Cas H: FLP droite et pied talus</p> <p>Cas I: Agénésie pré-maxillaire anomalie lobulation pulmonaire</p> <p>Cas J: FP Retard de croissance majeur harmonieux, agénésie radiale bilatérale, mains bottes, anomalies costales, CIV postérieure, fusion rénale, hypogénitalisme et hypospadias balanique</p>
Nombre de caryotypes réalisés lors de l'examen fœto-pathologique	5/6	7/7	2/6 (cas A et cas D)	3/4 (cas G, I, J)
Nombre d'anomalies identifiées au caryotype	1/5	2/7	0	0
Type d'anomalies identifiées au caryotype	FP 1 Triploïdie 69,XXX FLP, RCIU, hypoplasie cérébelleuse, Artère ombilicale unique 1 délétion du bras court du chromosome 5 46,XX, del(5)(p13)	FP 1 Trisomie 21 FP Pierre Robin 1 délétion interstitielle chromosome 7 (46,XY, del(7)(q22q22) FP 1 discordance de caryotype / organes génitaux : réversion sexuelle (dysplasie campomélique)	/	/
FISH	1 FISH 4p16.3 Non Dél, 1 FISH 22q11 Non Dél	/	7 FISH 22q11 Non Dél, 1 FISH 13 et 21 sans anomalie	6 FISH 22q11 Non Dél
CGH Array	1 Pas d'anomalie retrouvé	/	/	/
Recherche de mutation	CHARGE: pas mutation	/	/	/

B. Fente labio-palatine et conseil génétique

1. Place du conseil génétique : étude rétrospective

100 patients ont été opérés en chirurgie pour FL et/ou P entre 2003 et 2008. Sur ces 100 patients, 31 ont bénéficiés d'un conseil génétique (Consultation). Lors de ces 31 conseils génétiques, 18 patients ont bénéficié d'un examen complémentaire de génétique (après prise de sang). (Fig 64)

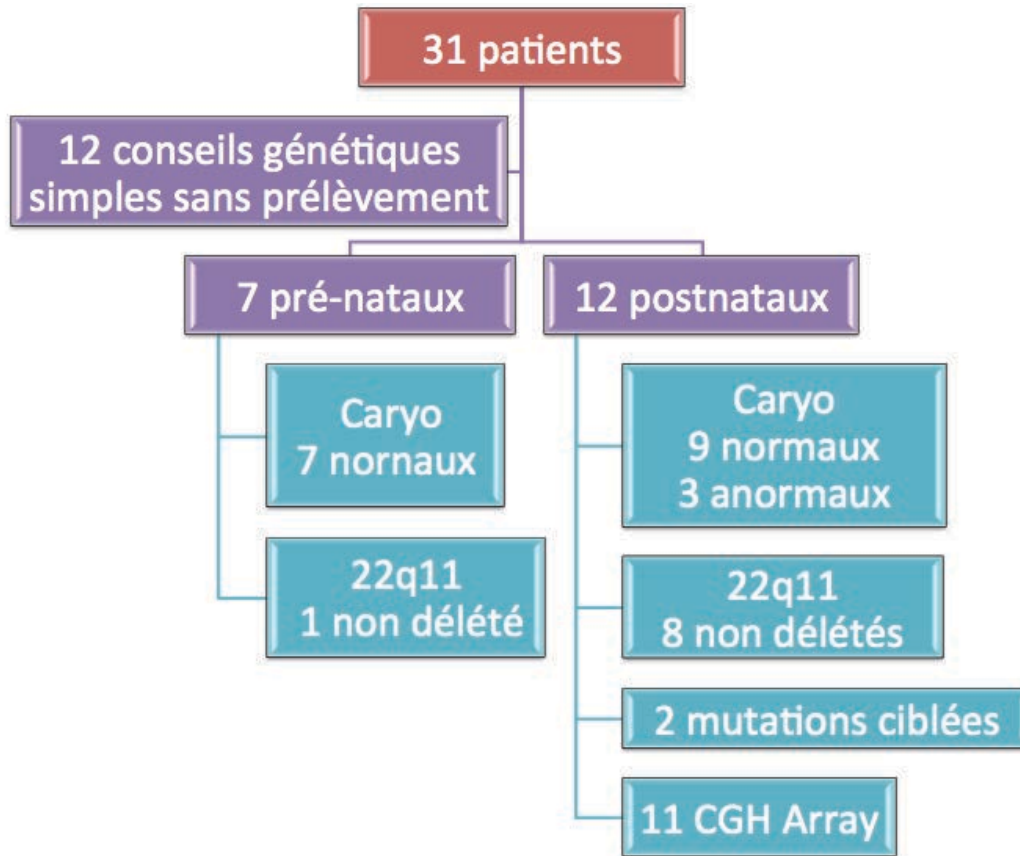


Figure 64: Schéma de synthèse répertoriant le moment du conseil génétique et le type d'analyse et de résultats obtenus

Des syndromes ont été confirmés ou trouvés:

Géniques

- 1 syndrome de Van der Woode
- 1 syndrome de Kallman type II mutation *FGFR1* : diagnostic secondaire dans le cadre d'aménorrhée primaire, chez une patiente porteuse d'une FL considérée jusqu'à lors comme une fente isolée non syndromique.

Chromosomiques

- 46,XX,der(4)t(4;8)(p16.3;p23.1)
Monosomie partielle 4p (Syndrome de Wolf-Hirschhorn) et trisomie partielle 8p dérivée d'une translocation maternelle
- 46,XX,der(18)t(8;18)(q23.1;q22.1) Trisomie partielle 8q et monosomie partielle 18q dérivée d'une translocation paternelle
- Trisomie 8 en mosaïque (70% des cellules)
- Duplication 6q16.3-q21

7 patients ont eu une analyse par CGH Array (Tableau 14) dont 3 pour caractériser une anomalie identifiée au caryotype.

Tableau 14: Résultats des CGH Array réalisées dans le cadre de l'étude rétrospective (2003-2008) des FL/P NS

Clinique	CGH-Array	Taille min	Remarque
Fente palatine, retard psychomoteur, scoliose lombaire, coxa-valga bilatérale	trisomie 8 en mosaïque (70%)		visualisé au caryotype
Fente palatine, CIA, clinodactylie 2ème et 3ème doigts main droite, pied talus, luxation de hanche bilatérale, dysmorphie faciale	der(18)t(8;18) ; dup 8q23.2-q24.3 (111740331-139453265) del 18q22.1-18q23 (61623806-75940259)	34 Mb 14 Mb	visualisé au caryotype translocation paternelle
Fente palatine, retard psychomoteur, ébauche de syndactylie des 2ème et 3ème orteils bilat, colobome irien bilat, surdité de transmission bilat, cryptorchidie bilat, kératose pileaire, pli palmaire transverse unique	RAS		caryotype NI del 2qter région polym (FISH)
Fente palatine, retard mental, clinodactylie, hypotonie, reflux vésico rénal, petite taille, retard psychomoteur	RAS		caryotype ni, FISH 22q11.2 non del
Fente vélaire, fistules lèvre inférieure, hernie ombilicale, trigonocéphalie, dysmorphie faciale	dup 6p25.2-6p25.1 (4009660-4183433)pat dup 18q22.1 (61708088-63799497)mat	173 kb 2 Mb (2 gènes)	caryotype NI parents Nx
Fente palatine, cataracte congénitale, forme familiale	dup Xp21.1 (37007705-37074691)	66 kb (0 gène)	caryotype NI, pas d'étude parentale
Fente palatine, retard psychomoteur, dysmorphie, ataxie, fossette sacrée, troubles du langage	del 22q13.33(46934163-49525130)dn	2,6 Mb	caryotype NI de novo
Séquence de Pierre Robin, retard psychomoteur	RAS		caryotype ni, FISH 22q11.2 non del
Séquence de Pierre Robin, dysmorphie, retard psychomoteur	RAS		caryotype ni, FISH 22q11.2 non del
Fente labio-palatine totale gauche, hypospadias pénien antérieur, hypertélorisme	del 10q21.3 (67742738-67869249)pat del 17q22 (47752430-47845159)pat dup Xp21.3 (25693327-25996084)mat	126 kb (1 gène) 92 kb (0 gène) 302 kb (0 gène)	caryotype NI parents Nx
Fente labiale gauche, obésité	dup 6q16.3-q21 (102328760-109383720)	7 Mb	visualisé au caryotype

Grâce à l'analyse CGH Array 4 nouvelles anomalies ont été découvertes :

-dup Xp21.1 (37007705-37074691).

-del 22q13.33 (46934163-49525130)dn.

-dup 6p25.2-6p25.1 (4009660-4183433)pat, dup 18q22.1 (61708088-63799497)mat.

-del 10q21.3 (67742738-67869249)pat, del 17q22 (47752430-47845159)pat, dup Xp21.3 (25693327-25996084)mat.

Cette étude nous a permis en outre d'identifier deux situations cliniques intéressantes dans l'étude étiologique des FP:

- une forme familiale d'association de FP et cataracte congénitale.

- une association de FP et tératome cervico-faciaux latéraux chez deux de nos patients.

2. Formes cliniques d'intérêts

a) Forme familiale de fente palatine et cataracte

L'analyse rétrospective de nos dossiers a mis en exergue une forme familiale d'association de FP et cataracte congénitale bilatérale (CCB). Nous suivions en chirurgie 4 frères et sœur

- Cas 1 : Le propositus qui était une petite fille, atteinte d'une CCB et d'une séquence de Pierre Robin. Elle présentait cliniquement une fente palatine particulière avec une Fente Sous-Muqueuse (FSM) postérieure et une fistule palatine « suspendue » à la jonction palais dur palais mou de manière congénitale.
- Cas 2 : Une fille présentant une CCB, et une séquence de Pierre Robin (fente vélaire)
- Cas 3 : Une garçon présentant une CCB, bifidité de luvette et FSM
- Cas 4 : Un garçon présentant une CCB, et une bifidité de luvette

La mère est porteuse elle même d'une CCB, d'une clinodactylie, d'une scoliose, et d'une FSM.

L'arbre généalogique de la famille a mis en évidence des anomalies sur 4 générations, avec 21 personnes (des 2 sexes) atteintes de CCB+/-d'atteinte palatine. Le mode de transmission faisait évoquer un mécanisme dominant à expressivité variable.

Le caryotype du propositus n'a pas retrouvé d'anomalie. La CGH Array a mis en évidence une amplification interstitielle observée en Xp21.1 et retrouvée chez : la mère, le propositus (cas 1), mais aussi chez la fille saine, et non retrouvée chez le cas 2.

Notre analyse des ces cas a fait l'objet d'une publication.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Short communication

Cleft palate and bilateral congenital cataract: a familial observation: a new syndrome?

Caroline François-Fiquet^{a,b,c,*}, Olivier Wavreille^d, Marie-Laurence Poli Merol^a,
Martine Doco-Fenzy^{b,c}^a Department of Pediatric Surgery, American Memorial Hospital, CHU, Reims, France^b Department of Genetics, Hôpital Maison-Blanche, CHU, Reims, France^c EA 3801, UFR Medecine, University of Champagne Ardenne, Reims, France^d Department of Ophthalmology, CHU, Lille, France

Accepted 14 November 2011

Available online 6 December 2011

Abstract

We report a family with a rare association of congenital bilateral cataract and cleft palate that has not to our knowledge been previously reported. The lineage has unveiled abnormalities over four generations affecting 21 people with congenital bilateral cataract, with or without cleft palate. The transmission seems autosomal dominant. Four brothers and sisters presented with this defect, and a fifth sister is healthy. The mother has facial dimorphism, congenital bilateral cataract, submucous cleft palate, clinodactyly, and scoliosis. The propositus' karyotype was normal. Array comparative genomic hybridisation (CGH) analysis showed an interstitial amplification in Xp21.1, found in the mother, in all the affected siblings but one, and in the healthy girl. This association is not rare and has been reported in over 50 syndromes but rarely in familial observations. Based on the genetic-clinical discordance we wonder about the deleterious impact of the Xp21.1 amplification that might be a copy number polymorphism.

© 2011 The British Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Cleft palate; Congenital cataract; Genetic syndrome

Introduction

Cleft palate is usually an isolated occurrence, the reported prevalence of which is 0.05–0.1%. More rarely it is part of a clinical association and can be found in more than 400 syndromes.

Non-syndromic congenital cataract has an estimated incidence of 1–6/100 000 live births.^{1,2} Cataracts can be isolated or associated with many different metabolic diseases or genetic syndromes.³ Hereditary cataracts are usually inherited as autosomal dominant traits, but also in autosomal

recessive or X-linked fashion.² The association between cleft palate and congenital cataract has occasionally been reported.

History

We report four brothers and sisters and our observation of their family, which shows a rare association of congenital bilateral cataract and cleft palate. We have established the complete family history and analysed the clinical presentation of the mother, the 4 affected children (cases 1, 3, 4, and 5), and their healthy sister (case 2) (Table 1). None of them had cardiac abnormalities or mental retardation.

The family history has shown abnormalities over four generations, and affected 21 people with congenital bilateral cataract, with or without cleft palate. The transmission seems autosomal dominant (Fig. 1).

* Corresponding author at: Department of Pediatric Surgery, American Memorial Hospital, 43 rue Cognacq Jay, 51 092 Reims Cedex, France.
Tel.: +33 03 26 78 32 94.

E-mail address: caro_mtp@hotmail.com (C. François-Fiquet).

Table 1
Clinical presentations of 5 children and their mother.

	Mother	Case 1	Case 2	Case 3	Propositus case 4	Case 5
Psychomotor development						
Birthweight					3310g	2890 g
Height at birth					49.5cm	49 cm
Head circumference					33 cm	33 cm
Sitting up					6 months	
Standing up					12 months	
Walking		16 months		22 months	15 months	
School		Redid 6th grade (year 7)				
Sexe	Girl	Girl	Girl	Boy	Girl	Boy
Age		13 years	12 years	9 years	3 years	11 months
Height for age	Small	Normal	1m52		Normal	
Weight			52 Kg		- 2 DS	
Head circumference					- 2 DS	
FACE						
Coarse face	X		X			
Facial dysmorphism	X				X	
Oval face	X	X		X	X	X
Bitemporal narrowing	X					X
Large forehead		X		X		X
EYES						
Congenital Bilateral Cataract		X		X	X	X
Unilateral microphthalmia	X right				X left	
Edematous aspect of the upper eyelids	X	X		X		
Epicanthus	X	X			X	X
Mongoloid palpebral fissures	X	X		X	X	
Narrow palpral fissures	X			X	X	X
Bilateral strabism	X			X		
NOSE						
Long	X		X			
Broad	X	X	X	X	X	
MOUTH						
Small mouth	X		X	X	X	X
Thick lower lip	X				X	
Lower lip eversion			X		X	X
Long philtrum						X
Tooth decays +++	X					
PALATE						
Cleft palate	X					
Cleft velum		X		X		
Bifid uvula				X		X
Sub-mucous cleft					X	
Sub-mucous cleft with congenital palate fistula at the junction hard and soft palate					X	
Pierre Robin sequence		X stage I			X	
EARS						
Low implantation	X	X anterior rotation			X anterior rotation	
Attached earlobe		X			X	
Cartilaginous nodule on the helix		X		X	X	
NECK						
Short and large	X					
HAIR						
Red hair			X	X		
HANDS						
Long and thin fingers	X	X	X	X	X	
Hyperextension of the distal interphalangeal joint	X					
Clinodactyly of the middle	X					
SPINE						
Kyphosis-scoliosis	X					

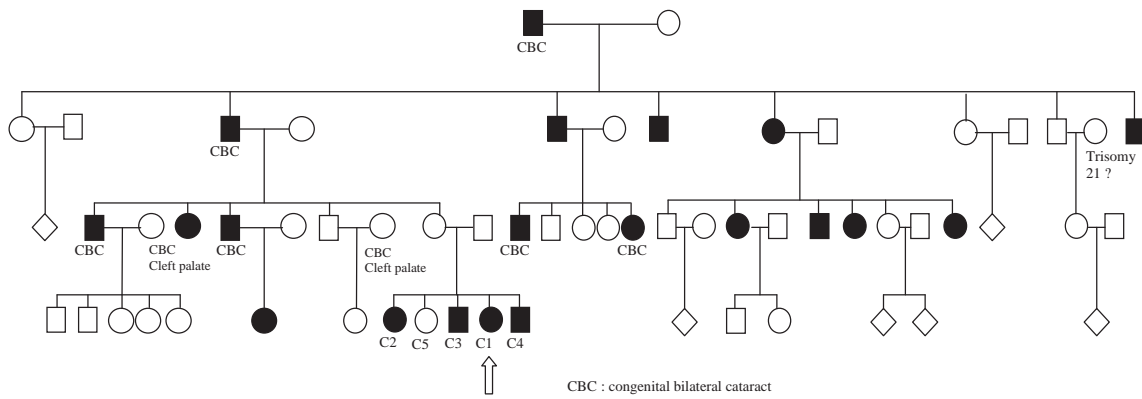


Fig. 1. The pedigree.

Genetic analysis

On genetic analysis: the proband's karyotype is normal, 46,XX. As this original clinical presentation did not match any of the syndromes previously described, we were unable to propose a targeted gene mutation screening to our patients. We decided to search for a chromosomal rearrangement by array CGH in the proband. Array CGH analysis using an Agilent 105k array, with a resolution of 25 kb, showed an interstitial amplification in Xp21.1 loci (Fig. 2). This Xp21.1 amplification was studied in the family by quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR) but the parental results were not relevant to understanding the aetiology of the

association between congenital bilateral cataract and cleft palate. An affected boy did not have this amplification and, conversely, an unaffected girl did.

Discussion

The clinical association of cleft palate and ophthalmic abnormalities is not rare and has been reported in over 50 syndromes, but the association between cleft palate and congenital bilateral cataract is quite rare.

At least 38 pages in the Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), database in human genes and genetics

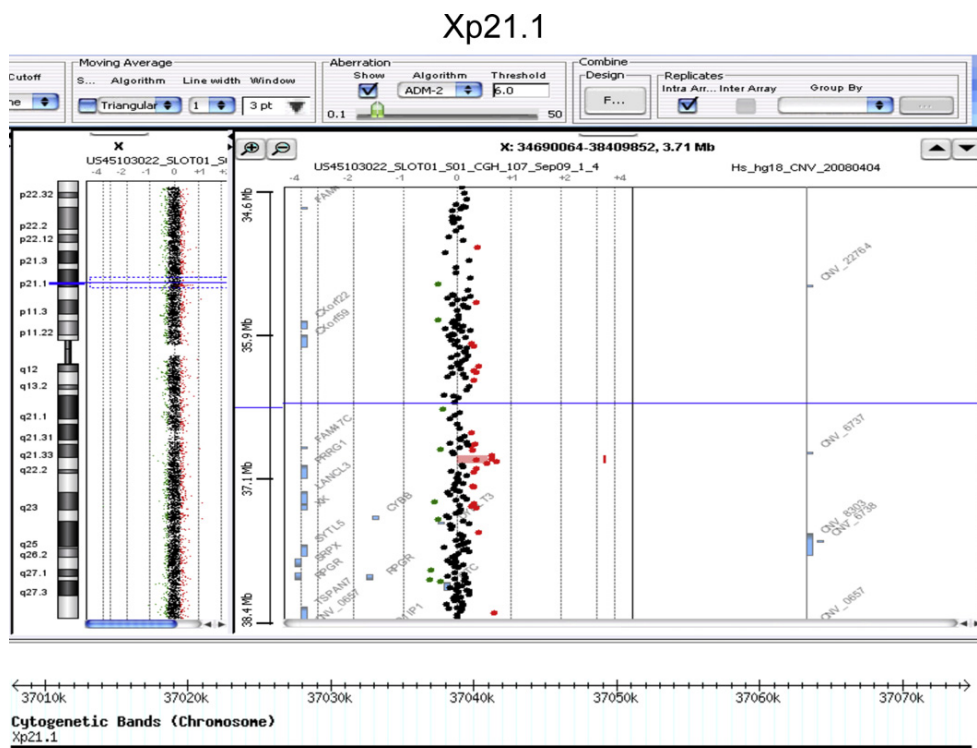


Fig. 2. Array comparative genomic hybridisation (CGH) analysis of the proband.

disorders, underline this association. However, in practice only 14 syndromes present a clinical association: Marshall syndrome, Larsen syndrome, Wagner syndrome 1, branchio-oculofacial syndrome, rhizomelic chondrodysplasia punctata syndrome type 1, Rothmund–Thomson syndrome, Gorlin–Goltz syndrome, Walker–Warburg syndrome, Stickler syndrome type 1, Smith–Lemli–Opitz syndrome, oculofaciocardiodental syndrome, Renpenning syndrome, hydrocephalus as a result of congenital stenosis of the aqueduct of Sylvius, and otopalatodigital syndrome.⁴

In 6 syndromes (Williams–Beuren syndrome, branchio-otorenal syndrome 1, Lenz syndrome II, Kniest disease, Peters syndrome, and Duane radial ray syndrome) the association is only indirect.

The published syndrome closest to this family's clinical characteristics is the oculofaciocardiodental syndrome.^{5,6} However, there are some clinical differences: the lack of cardiac abnormalities in our patients, and the fact that boys are affected. Indeed, oculofaciocardiodental syndrome has been described as being fatal in boys.

To conclude, based on the genetic-clinical discordance, we wonder about the deleterious impact of the Xp21.1 amplification that might be a copy number polymorphism. It seems relevant to conduct further studies on the underlying genetic mechanisms of this association that might be a new syndrome.

Acknowledgments

Acknowledgments for their scientific support: We would like to thank for their assistance (clinical or technical): Emilie

Landais and the professor Dominique Gaillard (Department of Genetics, Hôpital Maison-Blanche CHU Reims France), Aurélie Lorot (ORL CHU REIMS), Hugues Ludot (Pediatric surgery Reims), Philippe Jonveaux and Mylène Béri (EA 4368 University of Nancy, Genetics laboratory Hopitaux de Brabois CHU Nancy).

We would like to thank the family member and *the American Memorial Hospital Foundation Inc (Boston, USA)* for its continuing advice and support.

References

1. Riaño Galán I, Rodríguez Dehli C, García López E, Moro Bayón C, Suárez Menéndez E, Ariza Hevia F, et al. Frequency and clinical presentation of congenital ocular anomalies in Asturias 1990–2004. *Ann Pediatr (Barc)* 2010;**72**:250–6.
2. Sajjad N, Goebel I, Kakar N, Cheema AM, Kubisch C, Ahmed J. A novel HSF4 gene mutation (p.R405X) causing autosomal recessive congenital cataracts in a large consanguineous family from Pakistan. *BMC Med Genet* 2008;**9**:99.
3. Hejtmancik JF. Congenital cataracts and their molecular genetics. *Semin Cell Dev Biol* 2008;**19**:134–49.
4. Kondoh T, Okamoto N, Norimatsu N, Uetani M, Nishimura G, Moriuchi H. A Japanese case of oto-palato-digital syndrome type II: an apparent lack of phenotype–genotype correlation. *J Hum Genet* 2007;**52**:370–3.
5. Gorlin RJ, Marashi AH, Obwegeser HL. Oculo-facio-cardio-dental (OFCD) syndrome. *Am J Med Genet* 1996;**63**:290–2.
6. Oberoi S, Winder AE, Johnston J, Vargervik K, Slavotinek AM. Case reports of oculofaciocardiodental syndrome with unusual dental findings. *Am J Med Genet* 2005;**30**(136):275–7. Erratum in: *Am J Med Genet* 2005;**139**:54.

b) Etude des cas d'association fente palatine et tératomes cervicaux faciaux

Notre analyse de dossiers nous a aussi permis de mettre en évidence une association peu fréquente de FP et de tératomes cervicaux faciaux latéraux.

Les tératomes fœtaux cervico-faciaux sont des tumeurs rares, de découvertes anténatales ou néonatales, souvent bénins. Ils peuvent toutefois engager le pronostic vital à la naissance par obstruction des voies aériennes. Ces tumeurs sont le plus fréquemment isolées, mais de rares cas d'anomalies cranio-faciales associées sont décrits. En cas de tératome de la ligne médiane la présence de la tumeur peut gêner la fermeture du palais lors de la palatogénèse. Toutefois l'association FL et les formes latérales de tératomes cervico-faciaux nous a semblée être une piste intéressante de discussion étiologique.

Deux cas cliniques de ce type ont été pris en charge dans notre service et ont été la base de travail pour la publication ci-dessous.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijporl

Case report

Cleft palate associated with cervico-facial teratoma: Report of two cases and review of the literature

A. Le Saux^a, M.L. Poli Merol^a, D. Zachar^b, P. Josset^c, S. Pezzettigotta^d, M. Doco Fenzy^{e,f}, E. Guyot^g, C. Francois-Fiquet^{a,b,c,d,e,f,*}^a Pediatric Surgical Unit, American Memorial Hospital, CHU Reims, France^b Department of Histopathology (Hopital Maison Blanche), CHU Reims, France^c Department of Histopathology, CHU Armand Trousseau, Paris, France^d Department of Otorhinolaryngology, Hôpital Armand Trousseau, Paris, France^e Department of Genetic, CHU Reims, France^f Laboratory EA 3801, University of Champagne Ardenne, Reims, France^g Department of Pediatric Anesthesia, Hopital Robert Debré, CHU Reims, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 February 2012

Received in revised form 7 May 2012

Accepted 11 May 2012

Available online 4 June 2012

Keywords:

Teratoma

Epignathus

Cleft palate

Pierre Robin sequence

Paediatric surgery

ABSTRACT

We report two original cases of association of cleft palate and lateral cervico-facial teratoma. We discuss the embryological explanation.

The first child presented a cleft palate associated with two cervico-facial localisations of teratoma. The other had Pierre Robin sequence associated with lateropharyngeal teratoma with an extra sub maxillary localisation.

Most reported cases were of midline teratomas, leading different authors to advance a mechanical origin to the cleft. Our cases are different: we could hardly find reported cases of associate lateral tumours and cleft palate, which would suggest two different embryologic mechanisms, or at least a combination of more complicated phenomenons.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Teratoma is a rather frequent paediatric tumour with a ratio of 1/4000 births [1].

Sacrococcygeal location is the most frequent one (45%), followed by gonads, anterior mediastinum, retro-peritoneum and oropharynx [2,3]. Cervical localisation is reported in 2–3% of the cases. Cervico-facial teratoma have a 1/1 sex ratio, except for oropharyngeal area with a 3 girls for 1 boy ratio [4].

Even if teratoma is mostly benign in neonatal period, 5% of the cases have malignity criteria on histopathology [5,6]. No genetic transmissibility has been reported in the literature.

Mobi-mortality is mainly due to the size and the situation of the tumour, with a risk of neonatal aeric obstruction by oropharyngeal lesions.

On an histological point of view, teratoma is a tissue heterotopia. Macroscopically, it may be cystic, solid or both. It is a complex tumour, with components from different embryologic

origin (ectoblast, entoblast, neuroblast or mesoblast) with a variable degree of differentiation. These tumours are developing owe to the unorganized proliferation of totipotent cells which partly differentiate in different tissue in the improper place. They widely vary in their aspect, size, heterogeneity and their maturation [7,8].

Cleft palate is even more frequent, either isolated or associated with other abnormalities (syndromic cases). The association cleft/teratoma (oral or cervical) has already been reported in the literature, but the embryological mechanism of such an association remains disputable.

We report two original cases owe to their localisation (cervical and oro-pharyngeal) and their association with a cleft palate. We then discuss the embryological explanation of this association [9].

2. First case

A 3070-g girl was born after an uneventful pregnancy. She presented with a cleft palate (type I according to Veau classification) reaching the osseous palate. There was no particular familial history. She also had a right 1.5 cm firm and mobile sub maxillary mass. There was no prenatal diagnosis. Ultra sound showed a 1.5 cm × 1 cm cystic isolated lesion.

* Corresponding author at: Pediatric Surgery, American Memorial Hospital, 47 rue Cognacq Jay, 51092 Reims, France. Tel.: +33 06 82 87 38 93/03 26 78 32 94.
E-mail address: caro_mtp@hotmail.com (C. Francois-Fiquet).

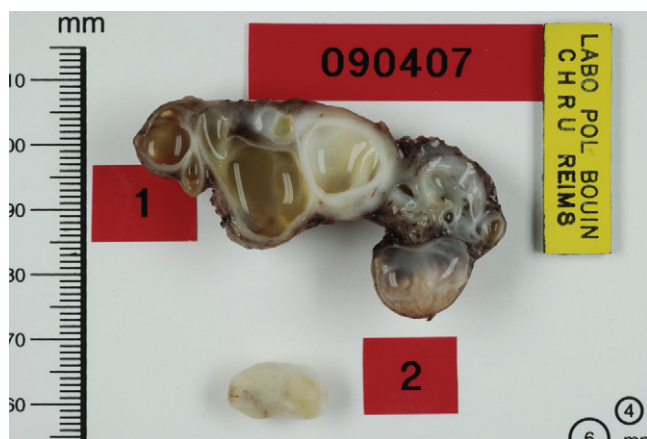


Fig. 1. Macroscopic appearance of the tumour in internal maxillary right multicystic and nasopharyngeal polyp in section slice.

Cystic lymphangioma was evoked and, owe to stability with time, no surgery was proposed initially. The palate was closed around 8-month-old. Ten months later, a residual fistula was noted at the soft palate/hard palate junction. The girl was 18-month-old and the cervical mass at that time seemed to mildly increase in size. We then decided to close the residual bucco-nasal communication and to remove the cervical tumour at the same time.

The cervical tumour was removed without any difficulty. It was a poly-lobed 5 cm × 2 cm multi-cystic lesion with no pejorative aspect. It was apart from the sub-maxillary gland (Fig. 1).

During the palatal surgery, we discovered by chance, after suction in the nasopharynx, a pedicled 1.5 cm long solid mass originated from the posterior floor of the right nasal cavity. It was removed as well at its basis. A complete examination showed no extra abnormalities. The recovery was uneventful.

Histology concluded in a mature cystic teratoma containing bronchial, gastric and muscular heterotopias for the sub-maxillary tumour (Fig. 2), and a mature solid polypoid teratoma for the cavum lesion.

Post operative α foeto protein measurement was normal.

A cervico-facial RMI was also realised in order to have a reference for the follow up, regarding the possible risk of recurrence. There was no residual abnormality, especially at the level of the basis of the nasal polyp.

Clinical evolution is good after 2 years of follow up.

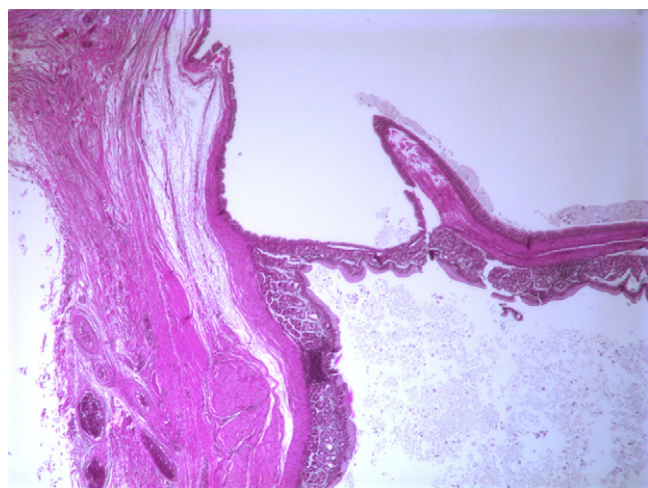


Fig. 2. Mature cystic teratoma in the right mandible (HES 25 \times), wall of a cyst-like bronchial.

3. Second case

A 2800-g baby girl was born after 38 weeks of gestation. At birth, she presented a Pierre Robin sequence and a firm sub maxillary left mass. At oral examination, the mass was protruding in the pharyngeal cavity, with no respiratory distress initially. Ultrasound objectified a partly solid an cystic lesion. MRI showed a 4.2 cm × 2.5 cm poly-lobulated tumour with one mostly parapharyngeal contingent, reaching the left sub temporal fosse, and another one, more caudal, in the sub maxillary area. Heterogeneity of the tumour and localisation justified its removal at 45-day-old.

Histology confirmed a solid a both solid and cystic mature teratoma. The infra temporal part was mostly from glial origin, parapharyngeal part was mostly conjunctive tissue, and finally, the pre laryngeal portion contained gastric, respiratory, pancreatic and glial tissues.

4. Discussion

Incidence of such association is not well determined in the literature. There is no recent published studies with sufficient amount of patient to draw conclusions about its frequency, but isolated cases had been already reported, and several authors underline and wonder about the relationship between the two entities.

In 6% of all cases, cervical teratomas are associated with malformations such as cleft palate, bifid tongue, bifid uvula, microcephaly or primitive carotid atresia [2,10–13].

Different hypothesis have been made regarding the onset of teratomas, but they remain partial and still disputable. Beutel, in 2001, and Benson in 2009 tried to summarize the different hypothesis in three more or less intricate phenomenon which are:

- the parthenogenesis: that germ cells may give rise to teratomas by parthenogenetic development,
- the incomplete twinning or incomplete formation of Siamese twins,
- the totipotent somatic-cell origin. Teratoma derive from totipotent cells sequestered during embryogenesis [14,15].

But many authors are still discussing these hypothesis and it is difficult to explain different localisations or histology of teratomas by a unique process [16]. Schartz et al. in 1992, analysed an epignathus tumour in a fetus born from a mother with a balanced chromosomal translocation. They looked for the translocation both in the non teratomatous fetal tissue and in the teratoma. The teratomatous tissue exhibits both the translocation and triploidy, suggesting that the tumour is not from parthenogenetic origin [17]. Moreover, some authors have already demonstrated in the past, that results of sex chromatine studies in teratomas can be different than host's ones [18]. Our first case presents a double localisation which is difficult to explain by one pathenogenesis or incomplete twinning. Double localisations in cervico-facial teratomas are rare. In our experience, both the tumours were on the same side, but macroscopically and histologically different, and clearly apart from each other. Sequestration of totipotent cells would be a convenient explanation of such a phenomenon, but whether the nasal and the cervical tumour originate from one initial cell contingent secondarily divided or two different ones remains highly disputable.

Considering our experience, we can also question about the association between teratomas and cleft palate.

Such association have been reported in the literature but in these former reported cases, there was a close anatomical interaction between the cleft and the tumour. Most of the cases are of midline teratomas, either originating from the tongue or the

superior area of the hard palate. This anatomical situation can obviously explain a mechanical origin of the cleft, and this is the more frequent advanced explanation of the association. But we could hardly find reported cases of associate lateral tumours and cleft palate, which would suggest two different embryologic mechanisms, or at least a combination of more complicate phenomena.

The second case has to be questioned as well; apart well identified syndromic cases of Pierre-Robin sequence, some publications report a wide range of isolated associated abnormalities [19]. But we could not find any previous description of a lateral teratoma associated with a so called “isolated” Pierre-robin sequence. There is a wide spectrum of proposed genetic variations in onset of Pierre-Robin, suggesting that the mechanism implicated in our second case may be even more complicated than in the first one.

On another hand, considering the rarity of this association of lateral tumour and cleft palate, the possibility that it originates from two different mechanisms (genetic and/or accident developmental accident) cannot be eliminated.

Management: In our two cases, tumours and cleft were treated separately by the well known surgical principles of teratomas radical excision and cleft palate surgery [20]. But in our first case, the nasal lesion was not initially detected and the cervical one misdiagnosed as lymphangioma by ultrasound. The prognosis of these two entities is very different with time. Cervical teratoma in neonates is mostly benign, but in 2–4% of the cases, primitive malignancy or quick secondary transformation with metastasis had been reported, impairing the final prognosis [21]. An accurate initial diagnosis of such cervical lesion is then mandatory and we now think that an MRI could have been useful in the post natal period, making clearer the definition of the cervical lesion and maybe, focusing our attention on the nasal one. In case of respiratory distress or voluminous tumours, appropriate imaging and treatment are done very quickly. In our first case, the size of the lesion, the reassuring ultra sound and the totally asymptomatic child led us to postpone the removal of the tumour.

We now propose a RMI in the exploration of cervical masses in neonates and remove it during the first months of the life.

5. Conclusion

We report two original cases of the association isolated cleft palate/Pierre-Robin sequence and lateral cervical or cervico-facial teratomas. Embryologic process leading to this association cannot be established yet, embryologic knowledge of each of the abnormalities being still only very partial. Our cases had been genetically explored without any specific result so far. We think that the tumour has to be assessed very carefully during the neonatal period, even if non symptomatic, and removed early, not necessarily waiting for the palatal surgery.

Cette étude rétrospective montre que les conseils génétiques permettent de mettre en évidence des mutations ou des remaniements impliqués et cohérents avec les données de la littérature chez des patients initialement non identifiés comme porteurs d'anomalies. Comme par exemple dans le cas du syndrome de Kallman type II qui a posé chez une de nos patientes à l'adolescence grâce à l'identification d'une mutation du gène *FGFR1*. Ce gène fait partie des gènes impliqués à la fois dans les FL/P et dans l'angiogenèse. Nous avons par ailleurs mis en exergue des cas d'intérêt, sans anomalie des gènes de l'angiogenèse, mais dont la discussion étiologique a donné lieu à deux publications.

Ces constatations rétrospectives ont justifié le travail prospectif qui a été réalisé par la suite.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement

We wish to thank the *American Memorial Hospital Foundation Inc. (Boston USA)* for their aid in the field of research on facial clefts.

References

- [1] S.J. Bergé, J.J. von Lindern, T. Appel, B. Braumann, B. Niederhagen, Diagnosis and management of cervical teratomas, *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 42 (1) (2004) 41–45.
- [2] S. Becker, R. Schön, R. Gutwald, J.E. Otten, W. Maier, R. Hentschel, et al., A congenital teratoma with a cleft palate: report of a case, *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 45 (4) (2007) 326–327.
- [3] D. Senen, S. Erol, E. Orhan, A. Sevin, A. Turhan, B. Erdoğan, A teratoma that causes cleft palate, *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 62 (11) (2009) e514–e515.
- [4] E. Abemayor, A. Newman, L. Bergstrom, J. Dudley, J.G. Magidson, B.M. Ljung, Teratomas of the head and neck in childhood, *Laryngoscope* 94 (11 Pt 1) (1984) 1489–1492.
- [5] T. Touran, H. Applebaum, D.B. Frost, R. Richardson, P. Taber, J. Rowland, Congenital metastatic cervical teratoma: diagnostic and management considerations, *J. Pediatr. Surg.* 24 (1) (1989) 21–23.
- [6] K. Clement, P. Chamberlain, P. Boyd, A. Molyneux, Prenatal diagnosis of an epignathus: a case report and review of the literature, *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 18 (2) (2001) 178–181.
- [7] A. Ferlito, K.O. Devaney, Developmental lesions of the head and neck: terminology and biologic behavior, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 104 (11) (1995) 913–918.
- [8] A. Benlyazid, E. Lescanne, A. Marque, A. Robier, P. Beutter, M.J. Ployet, Teratoma of the rhinopharynx and the infratemporal fossa in neonates: report of 3 cases, *Ann. Otolaryngol. Chir. Cervicofac.* 118 (1) (2001) 54–60.
- [9] I.S. Kim, S.Y. Oh, S.J. Choi, J.H. Kim, K.H. Park, H.K. Park, et al., Clinical and genetic analysis of HLXB9 gene in Korean patients with Currarino syndrome, *J. Hum. Genet.* 52 (8) (2007) 698–701.
- [10] K.W. Kang, S.L. Hissong, A. Langer, Prenatal ultrasonic diagnosis of epignathus, *J. Clin. Ultrasound* 6 (5) (1978) 330–331.
- [11] H.C. Slavkin, Incidence of cleft lips, palate rising, *J. Am. Dent. Assoc.* 123 (11) (1992) 61–65.
- [12] A. Richieri-Costa, M.L. Guion-Almeida, Heteropagus epignathus: report on a Brazilian twin, *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* 29 (1) (1993) 383–387.
- [13] E.G. Yapar, E. Ekici, O. Gökmen, Sonographic diagnosis of epignathus (oral teratoma), proencephaly, meromelia and oligohydramnios in a fetus with trisomy 13, *Clin. Dysmorphol.* 4 (3) (1995) 266–271.
- [14] K. Beutel, C.J. Partsch, U. Janig, W. Nikischin, M. Suttrop, Oral mature teratoma containing epididymal tissue in female neonate, *Lancet* 357 (2001) 283–284.
- [15] R.E. Benson, G. Fabbri, J.L. Russell, A large teratoma of the hard palate: a case report, *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 47 (1) (2009) 46–49.
- [16] B. Vandenhoute, E. Leteurtre, M. Lecomte-Houcke, P. Pellerin, J.P. Nuyts, J.M. Cuisset, et al., Epignathus teratoma: report of three cases with a review of the literature, *Cleft Palate Craniofac. J.* 37 (1) (2000) 83–91.
- [17] S. Schwartz, L.J. Raffel, C.C. Sun, E. Waters, An unusual mosaic karyotype detected through prenatal diagnosis with duplication of 1q and 19p and associated teratoma development, *Teratology* 46 (4) (1992) 399–404.
- [18] R. Ricketts, S.W. Gray, J.E. Skandalakis, Teratomas in Skandalakis, in: J.E.S.W. Gray (Ed.), *Embryology for surgeons*, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1994, pp. 1060–1065.
- [19] M. Chariker, R. Ford, C. Morrison, A. Theile, K. Moeller, T. Moriarty, Pituitary duplication with nasopharyngeal teratoma and cleft palate, *J. Craniofac. Surg.* 22 (2) (2011) 755–758.
- [20] R.G. Azizkhan, G.M. Haase, H. Applebaum, P.W. Dillon, A.G. Coran, P.A. King, et al., Diagnosis, management, and outcome of cervicofacial teratomas in neonates: a Childrens Cancer Group study, *J. Pediatr. Surg.* 30 (2) (1995) 312–316.
- [21] B. Kerner, E. Flaum, H. Mathews, D.E. Carlson, S.H. Pepkowitz, H. Hixon, et al., Cervical teratoma: prenatal diagnosis and long-term follow-up, *Prenat. Diagn.* 18 (1) (1998) 51–59.

3EME PARTIE :
ETUDE PROSPECTIVE

I. MATERIEL ET METHODE

Une étude clinique prospective monocentrique (CHU de Reims) a été menée dans le cadre du protocole AOL 2010 CHU Reims intitulé « Fentes labio-palatines : Approche étiologique ». Investigateur principal C.François-Fiquet. (Annexe 1)

L'objectif de ce travail était de préciser la place des gènes de l'angiogenèse dans l'étiologie des FL/P sur le plan constitutionnel mais aussi *in situ*.

Nous avons choisi deux approches :

- La première approche était une approche dite constitutionnelle. Elle visait à rechercher des anomalies génomiques de manière systématique et prospective chez des patients porteurs de FL/P. Nous souhaitons en cas de découverte d'anomalies rechercher un éventuel lien entre ces anomalies et l'angiogenèse.
- La deuxième approche était une approche dite *in situ* c'est à dire au plus près de la malformation et donc au niveau des berges de la FL/P. Cette approche reposait sur :
 - Une analyse anathomopathologique de la région
 - Le développement d'un protocole de culture cellulaire issue des berges des FL/P
 - Le développement d'une technique d'extraction d'ARN sur les berges des FL rentrant dans le cadre du développement d'un modèle d'étude d'expression des gènes de l'angiogenèse directement au niveau de la malformation (berges des FL et/ou P).

A. Population concernée par l'AOL

Il s'agissait d'une étude prospective monocentrique. Ont été inclus de manière consécutive, après information et obtention du consentement de la famille, tous les patients porteurs d'une FL et/ou P opérés d'une chirurgie primaire (labiale ou palatine) au sein du service de chirurgie pédiatrique du Pr ML Poli-Merol de l'Hôpital Américain de Reims entre août 2009 et juin 2012.

Ont été exclus :

- Les patients opérés d'une chirurgie secondaire,
- Les patients dont les parents refusaient le protocole.

B. Prélèvements et matériel d'étude

1. Analyse constitutionnelle : prélèvement de sang circulant

Lors de l'induction anesthésique, au moment de la pose de la perfusion a été réalisé un prélèvement de sang circulant (tube EDTA). La quantité minimale prélevée devait être de 3 ml. Le prélèvement était acheminé au sein du service de génétique du CHU de Reims.

Une extraction d'ADN sur colonne selon le protocole Qiagen (Annexe. I. A) était réalisée.

Après extraction l'ADN était utilisé pour une analyse en CGH Array.

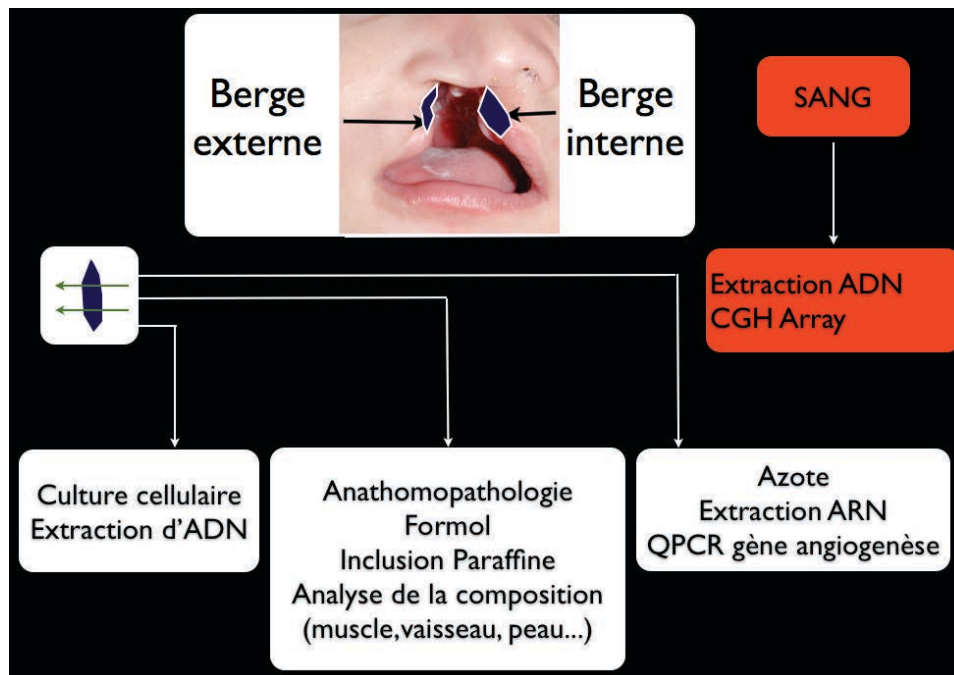


Figure 65: Schéma de synthèse d'objectif d'utilisation des différents prélèvements réalisés au cours de la chirurgie primaire

2. Analyse *in situ* : prélèvement de berge de FL

Pendant la chirurgie primaire de FL selon la technique de Tennison modifiée Malek (Fig 66) ou la technique de Pellerin, après infiltration à xylocaïne adrénalinée à 1% et incision cutanéomuqueuse à la lame froide, les déchets opératoires issus de la plastie de la FL ont été gardés. Les berges labiales externes et internes ont été identifiées.

Chaque prélèvement interne et externe a été ensuite coupé en 3 morceaux (Fig 65) :

- Le 1^{er} morceau était destiné à la culture cellulaire.
- Le 2^{ème} morceau était destiné à l'analyse anatomopathologique.

Ce prélèvement était placé dans du Formol à 10% et adressé au laboratoire d'anatomopathologie Pol Bouin. Cette zone devait être en continuité de la zone suivante. L'analyse devait nous permettre de caractériser la nature des prélèvements (peau, muqueuse, muscle, vaisseau...).

- Le 3^{ème} morceau était destiné à l'extraction d'ARN dans le but de réaliser l'analyse par QPCR de l'expression des gènes de l'angiogenèse. Pour ce faire le prélèvement a été recoupé en morceau d'environ 1 mm³, puis placé dans un cryotube et immédiatement congelée en salle dans l'azote liquide. Les prélèvements étiquetés et numérotés ont été adressés au laboratoire Pol Bouin pour stockage en tumorotheque.

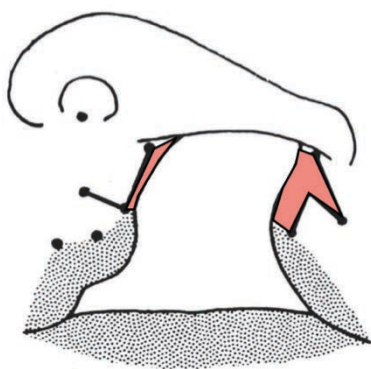


Figure 66 : Schéma opératoire de la chéiloplastie primaire selon la technique de Tennison modifiée Malek. Les déchets opératoires issus de la plastie sont en couleur.

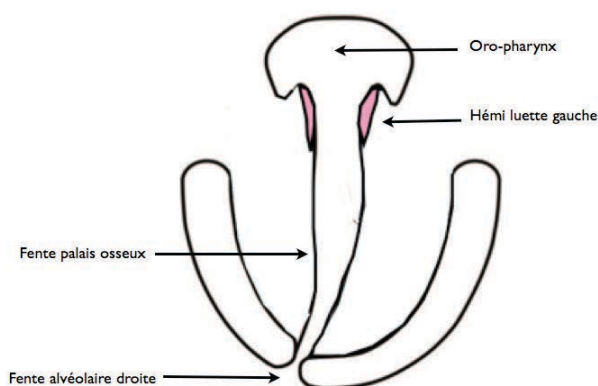


Figure 67 : Schéma opératoire d'une FLP. Les déchets opératoires issus de l'avivement de la luette sont en couleur.

3. Analyse *in situ* : prélèvement de berge de FP

Lors de la chirurgie primaire du voile (Veau Wardill Kilner ou Furlow), après infiltration à xylocaïne adrénalinée à 1%, les déchets opératoires issus de l'avivement de la luette au ciseau ont été gardés. (Fig 67)

Le prélèvement des berges de FP n'a pas été systématique chez tous les patients. Effectivement, ce prélèvement n'était possible qu'en cas de réalisation première d'un

avivement chirurgical des berges des fentes. Ce geste n'a été réalisé que par un seul des deux opérateurs.

Il n'y a pas eu d'identification de berges externes ou internes pour les FP contrairement aux FL.

3 prélèvements ont été identifiés comme pour les échantillons des lèvres :

- 1 pour la culture cellulaire
- 1 pour l'anatomopathologie
- 1 pour la congélation en Azote avant extraction d'ARN.

4. Prélèvements témoins

Afin de réaliser une analyse d'expression des gènes de l'angiogenèse au niveau des berges des fentes dans le cadre du développement du modèle d'étude *in vivo* chez l'enfant, des prélèvements témoins étaient nécessaires.

Pour des raisons éthiques, esthétiques, de lignées cellulaires, et d'appariement en âge nous avons décidé que :

- Les patients porteurs d'une fente unilatérale pouvaient être leur propre témoin. Ceci serait le meilleur moyen pour avoir un appariement en âge optimum sans prise de risque supplémentaire (anesthésie générale déjà réalisée...).
- Le prélèvement a été réalisé au moment de la chirurgie primaire de lèvre et réalisé en intra-buccale (pas de cicatrice visible) au niveau de la région rétrophiltrale du côté non fendu. Cette zone correspondant à la zone anatomique de fusion des différents bourgeons faciaux.
- Ce geste restant invasif il a été décidé de ne prélever qu'un certain nombre de témoins sans appariement systématique de chaque patient.

Un prélèvement unique d'environ 1 mm³ a été réalisé. Il a été placé en salle opératoire dans un cryotube et immédiatement congelée dans l'azote liquide. Les prélèvements étiquetés et identifiés comme « témoin » ont été adressés au laboratoire Pol Bouin pour stockage en tumorotheque. Ces prélèvements ont ensuite été utilisés pour l'extraction d'ARN dans le but de réaliser l'analyse par qPCR de l'expression des gènes de l'angiogenèse.

En raison de la petite taille de ces prélèvements il n'y a pas eu d'analyse histologique ni de culture cellulaire réalisées sur les témoins.

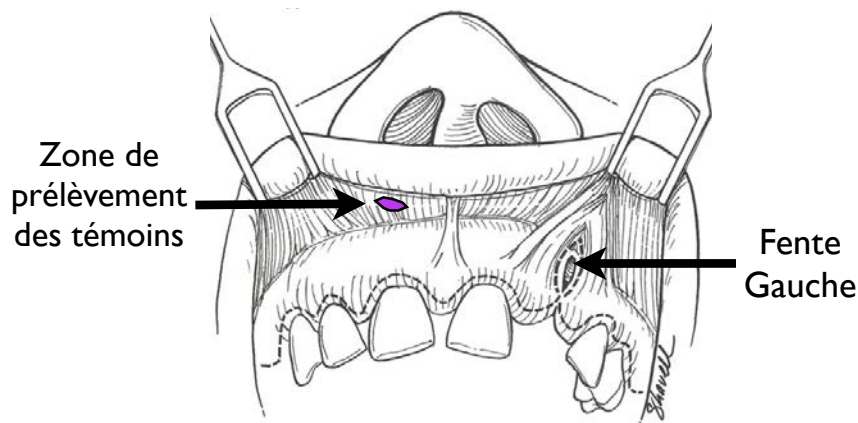


Figure 68: Schéma descriptif de la zone de prélèvement des échantillons témoins lors de la chirurgie primaire de lèvre (cheiloplastie)

C. Exploitation des prélèvements

1. Etude constitutionnelle de l'ADN de sang circulant en CGH Array

a) Extraction d'ADN sur sang circulant

Nous avons utilisé le protocole d'extraction d'ADN suivant le kit QIAGEN®. (Purification of DNA from Whole Blood Using the QIAamp Blood Midi Kit (Spin Protocol)) (**Annexe I.A.**)

Le contrôle de la quantité a été réalisé par vérification de la concentration par analyse au spectrophotomètre. (**Annexe I.A.**)

b) Purification de l'ADN génomique par Traitement à la RNase

L'ADN précédemment obtenu a été traité à la RNase. (**Annexe I.B.**)

c) Contrôle qualité : Migration sur gel d'Agarose 1%

Tous les prélèvements d'ADN avant et après traitement à la RNase ont bénéficié d'une migration sur gel d'agarose. (**Annexe I.C.**)

d) CGH Array

La CGH Array (Array Comparative Genomic Hybridization) est une technique de génétique moléculaire. Au cours des dernières années, elle s'est avérée être une approche efficace pour

identifier les gènes impliqués dans diverses anomalies congénitales (Visser LE, 2005) car les microdélétions et microamplifications ont fréquemment été retrouvées dans ce contexte. (Mefford HC, 2007) Ainsi il semblait utile de réaliser ce type d'examen dans le cadre des malformations congénitales que sont les FL/P. Toutefois, la plupart des publications étudiant les FL/P par technique de CGH Array concernent des études de cas, principalement des formes syndromiques. Ce n'est qu'en 2008 que la CGH Array a été utilisée dans une série de 104 formes NS de FL/P ou FP I (Osoegawa K, 2008). Ceci avait alors permis la mise en évidence de 2 anomalies. Une délétion de 3.2-Mb en 6q25.1 - 25.2 et une délétion de 2.2 Mb en 10q26.11 - 26.13. Ces régions contiennent respectivement les gènes de l'estrogen receptor 1 (*ESR1*) et du fibroblast growth factor receptor 2 (*FGFR2*). Ces deux gènes étant considérés actuellement comme des gènes candidats. En dehors de l'étude de Shi et al en 2009 (Shi M, 2009), peu de travaux utilisent cette technique sur de grandes séries de FL/P, probablement pour des raisons financières. Toutefois, dans le cadre de la recherche étiologique génétique des FL/P la technique de CGH Array semble être une technique prometteuse. Grâce à l'identification de micro-délétions ou amplifications chez les patients porteurs de FL/P, il peut être possible d'affiner de manière indirecte la recherche sur les gènes candidats. C'est dans ce cadre que nous avons souhaité développer notre étude.

Sur le plan technique la CGH Array vise à mesurer les différences entre le nombre de copies d'ADN d'un génome de référence provenant d'un individu sain et l'ADN d'un patient. L'ADN du témoin et l'ADN du patient sont marqués de manière différente par des fluorochromes (rouge/vert). (Fig 69) La mesure du rapport de l'intensité de fluorescence permet d'observer des différences de doses. Il est donc possible grâce à cette technique d'étudier les remaniements chromosomiques à type de délétion ou de duplication. (Fig 70)

Les ADNs sont hybridés sur la puce ADN génomique oligonucléotidique utilisée, comprenant 180 000 sondes (Agilent, 4×180k) (résolution de 25Kb).

Cette technique se déroule en 3 phases :

- Digestion:

Une digestion de l'ADN est réalisée à l'aide d'un mélange (enzymes ALU I et Rsa I, albumine de sérum bovin (BSA) acétylé, tampon C).

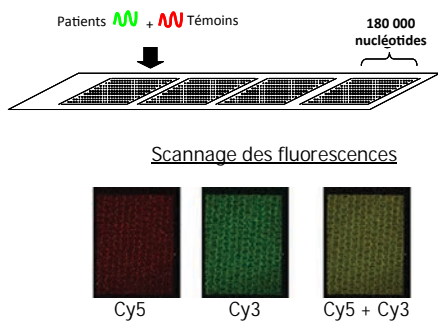


Figure 69 : Schéma descriptif de la technique de CGH-Array

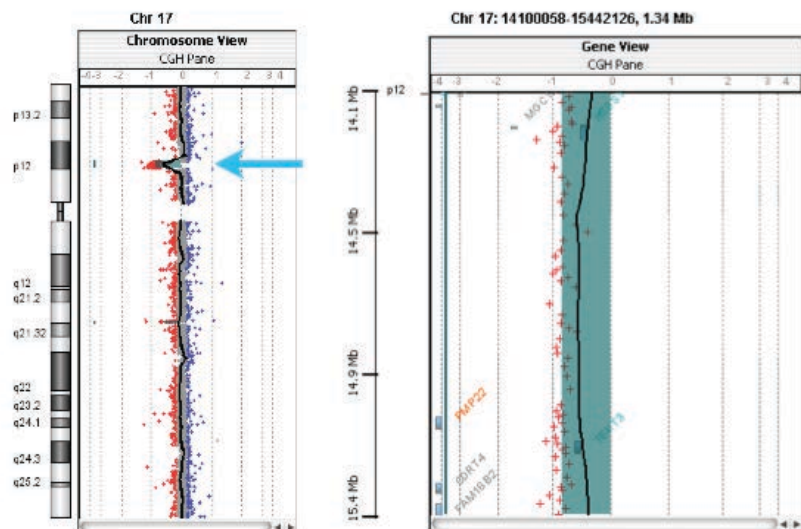


Figure 70: Exemple de résultats de CGH Array. Présence d'une déletion sur le chromosome 17 p12 correspondant à une déletion de 1342pb du gène *PMP22*

- Marquage :

Après incubation, un mélange contenant les dCTP couplés aux cyanines (cyanine 5: témoins et cyanine 3: patients), le tampon 5X, les dNTP 10X, et l'exo-klenow est ajouté. Les échantillons marqués des patients et des témoins sont mélangés sur colonne, puis purifiés. Le mélange est dosé par spectrophotométrie, afin de contrôler l'incorporation des dCTP couplés aux cyanines.

- L'hybridation :

Un mélange contenant le tampon d'hybridation concentré 2X, l'agent bloquant concentré 10X, et l'ADN cot-1 est ajouté. Puis on dépose les échantillons sur les supports (gasket) préalablement placés dans la chambre à hybridation. La lame spottée est ensuite placée sur le support et la chambre d'hybridation refermée et placée dans le four à hybridation avec des mouvements rotatifs (20 rpm) pendant 24h à 65°C.

- Le rinçage et le scannage des lames :

Les lames sont descellées dans un bain de tampon de rinçage W1, puis rincées dans des tampons successifs (W1, W2, acétronitrile, stabilisateur). Les lames sont scannées à l'aide du scanner Agilent® et la qualité des hybridations est analysée par le logiciel « Feature Extraction » (Agilent®).

L'analyse se fait à l'aide du logiciel « DNA analytics » (Agilent®), dont la licence est présente dans le service de génétique, qui réalise un ratio normalisé des fluorescences émises pour chaque oligonucléotide. Ce ratio est visualisé par une représentation graphique des déviations de fluorescence. Ces déviations significatives par rapport à zéro sont évaluées pour

trois points consécutifs par l'algorithme Z-score (limite de déviation de 0,25). La déviation du ratio permet d'identifier une délétion ou une amplification d'une région chromosomique (bornes et gènes).

La CGH Array a été réalisée dans le service de génétique de Reims par M^{elle} E. Landais. Les détails du protocole utilisé ont été décrits dans les annexes (**Annexe I. A.D**).

2. Exploitations des prélèvements des berges des FLP

Trois études ont été menées parallèlement au niveau des berges des FL/P.

a) Développement d'un protocole de culture cellulaire de fibroblaste

L'objectif de ce travail était d'obtenir du matériel en grande quantité et toujours disponible (possibilité de congeler, décongeler, et remettre en culture) issu de prélèvements uniques de petite taille. L'ARN pourrait nous être utile pour les analyses d'expression et l'ADN pour des comparaisons entre les berges et le sang circulant. Même si la culture cellulaire de fibroblastes est une technique bien codifiée pour d'autres indications elle n'avait pas été décrite et protocolisée pour des prélèvements de berges de FL/P.

Ce protocole est décrit dans la section résultats. Ce travail a fait l'objet d'une soumission le 11/11/2012 au BJOMS. « **Fibroblast cell cultures from excised edges of cleft lip or palate: protocol description and DNA extraction.** »

b) L'analyse anatomopathologique des berges de FL/P.

L'objectif de ce travail était la caractérisation de la nature des prélèvements (aspect de la muqueuse, nature du chorion, présence ou non de vaisseaux, de muscles, de nerf, de annexes pilo-sébacées...) pour deux raisons :

La première pour rechercher des anomalies morphologiques ou de répartition de la vascularisation à proximité des berges.

La deuxième comme pré-requis indispensable pour l'analyse d'expression.

Les prélèvements réalisés au bloc opératoire ont été placés dans du Formol puis acheminés en per-opératoire au sein du laboratoire d'histologie de Monsieur le Pr P.Birembaut à Pol Bouin, Hôpital Maison Blanche, CHU de Reims. Ils ont bénéficié d'une fixation, d'une inclusion et d'une coloration HES. (**Annexe. I. E**)

c) Le développement d'un modèle d'étude *in vivo* d'analyse d'expression des gènes de l'angiogenèse chez l'enfant porteur de FL/P.

Les objectifs étaient de :

- Développer une technique d'extraction d'ARN à partir des petits échantillons issus des berges des FL/P

- De sélectionner des gènes d'intérêt

- Développer un protocole technique permettant de comparer par analyse qPCR:

L'expression de ces gènes au niveau de la berge de la fente par rapport au côté sain non fendu.

L'expression de ces gènes entre la berge externe et la berge interne de la FLP.

L'extraction de l'ARN est délicate car ce dernier est extrêmement fragile (sensibilité aux RNases et fragilité intrinsèque). L'obtention d'un ARN de qualité nécessite des règles strictes.

Il faut donc :

- ⇒ Réaliser des manipulations à froid
- ⇒ Manipuler le plus rapidement possible
- ⇒ Utiliser du matériel à usage unique et stérile
- ⇒ Utiliser des inhibiteurs de Rnase
- ⇒ Conserver l'ARN à -80°C et si possible faire les cDNA rapidement et éviter les cycles congélations/décongélations.

L'extraction de l'ARN a été réalisée dans le EA3801 au sein du laboratoire d'hématologie du Pr P.Nguyen. (**Annexe. I. F**)

Cette extraction se réalise en 2 étapes :

- 1^{ère} étape

C'est la phase de lyse cellulaire (noyau + cytoplasme), de dénaturation-inactivation des RNases et d'homogénéisation.

L'homogénéisation mécanique peut-être réalisée selon différents procédés (ceux-ci seront présentés dans les résultats). La lyse par agents dénaturants a l'avantage d'inhiber les RNases.

Les produits utilisés sont :

- L'Isothiocyanate de guanidium 4M : agent dénaturant puissants des protéines.

- Et le β mercaptoéthanol : agent réducteur qui rompt les ponts disulfures des protéines.

- 2^{ème} étape

C'est l'extraction proprement dite. C'est à dire la séparation de l'ARN de l'ADN, des protéines, et des membranes.

Deux étapes sont nécessaires :

- L'usage de solvant organique : phénol saturé en eau à PH 8.

Il existe une répartition différente entre phase aqueuse et phase organique entre les acides nucléiques (phase aqueuse : hydrophile) et les protéines (interphase : composante hydrophobe). En condition acide l'ARN reste dans la phase aqueuse alors que l'ADN précipite et se retrouve avec les protéines à l'interface. L'ajout de chloroforme élimine les traces de phénol présent dans la phase aqueuse. On décante et l'ARN est précipité en présence d'isopropanol.

- L'isolement sur support solide (colonne, bille magnétique) par adsorption à la silice (en présence de thiocyanate de guanidium en milieu alcoolique (isopropanol) et/ou en PH acide et/ou en présence de sel.

L'adsorption sélective d'acides nucléiques sur membrane de gel de silice n'est obtenue que dans les conditions suivantes :

- en présence de concentrations élevées d'agents chaotropiques ou par exemple à force ionique élevée ([NaCl] élevée),
- et en présence d'alcool.

L'agent chaotropique intervient comme compétiteur dans les relations que l'ADN établit avec l'eau. L'agent chaotropique se lie à l'eau et l'ADN devient moins hydraté. L'ADN établit alors des liaisons avec la silice et se fixe au support de la colonne. La colonne est lavé ensuite par de l'éthanol.

L'adsorption de l'ADN à la silice dépend aussi du pH. L'adsorption est généralement de 95% si le pH est < 7,5. Cette absorption est réduite de manière drastique à pH plus élevé. Si le pH mélange de chargement est > 7,5, le pH optimal pour liaison à l'ADN peut être obtenu en ajoutant un petit volume de 3 M de sodium acétate, pH 5,0.

Les acides nucléiques sont "adsorbés" sur la colonne. L'éthanol 70% permet de faire précipiter les AN tout en procurant assez d'eau pour dissoudre les sels des tampons qui eux neutralisent les charges des AN. L'ADN et les protéines résiduelles sont éliminées par les lavages (RW1 et RPE kit Qiagen®). L'éthanol du tampon permet aussi d'éluer sélectivement l'ADN afin de n'obtenir que l'ARN au final.

La reverse-transcription (RT) est l'étape qui consiste à transcrire l'ARN extrait en ADN complémentaire (ADNc). Des amorces aléatoires s'apparient aux ARNm, permettant à une reverse-transcriptase d'assurer l'élongation de l'ADN dans le sens 5' → 3'. La reverse-transcriptase est en fait une ADN-polymérase ARN-dépendante d'origine rétrovirale. Plusieurs enzymes sont disponibles dans le commerce.

Afin de quantifier et de qualifier nos ARN nous avons décidé d'utiliser 3 techniques (**Annexe I.G**)

- Quantification et qualification par Spectrophotomètre
- Qualification de l'ARN par RQI (équivalent du RIN (RNA Integrity Number))
- Qualification de l'ARN par Polymerase Chain Reaction.

Nous présenterons nos résultats dans le chapitre suivant.

II. RESULTATS

A. Etude de cohorte des patients Rémois

Nous avons obtenu un AOL (Appel d'offre local) qui nous a permis d'étudier 72 patients pris en charge pour chirurgie primaire d'une FL, FP, FLP au sein du CHU de Reims dans le service de chirurgie pédiatrique entre 1^{er} septembre 2009 et le 1^{er} septembre 2012.

Ainsi après obtention du consentement éclairé ont finalement été inclus, de manière prospective monocentrique : 30 FLP (42%), 24 FL (33%) et 18 FP (25%). (Fig 71)

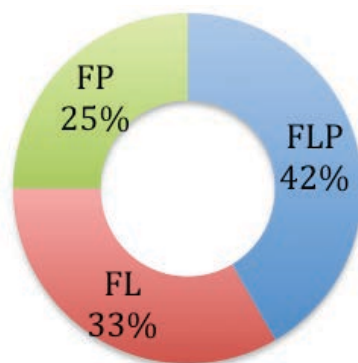


Figure 71: Répartition des formes cliniques de fentes (FL, FP, FLP) inclus dans l'AOL

8 patients supplémentaires ont été exclus de l'étude :

- Pour refus de participation à l'étude : 4 patients

- Pour décès pré-opératoire néonatal : 1 patient (syndrome polymalformatif majeur).

- Pour prise en charge chirurgicale primaire dans un autre centre malgré une consultation anténatale et/ou post-natal au CHU de Reims : 3 patients.

Nous nous sommes intéressés au contexte environnemental prénatal et aux antécédents familiaux de FL/P. (Tableau 15)

Tableau 15: Contexte environnemental prénatal des patients porteurs de FL/P inclus dans l'étude

	Exposition anténatale	Type de Fente	Anomalie associée
Conception			
FIV	1	FLP droite	
Stimulation ovarienne	1	FL	Grossesse gémellaire
Grossesse gémellaire	3 (2 Bichoriale-Biamniotique, 1 mono choriale- mono amniotique)	FLP gauche (MM), FL	
Médicamenteux	2		
Levothyrox	1	FL droite	/
Aténolol	1	FLP bilatérale	/
Toxique	2		
Cannabis, tabac, alcool associé	1	FLP bilatérale	/
Alcoolisme	1	FP	Pierre robin
Alimentaire pré et péri-conceptionnel	1		
Régime Dukan	1	FLP gauche	/

Des antécédents familiaux de FL/P ont été retrouvés chez 21 patients (29%). (Fig 72)

Des antécédents du 1^{er} degré ont été retrouvés chez 9 patients (12,5%) et ils concernaient dans

4 cas les frères et sœurs,

4 cas le père,

et dans un cas la mère.

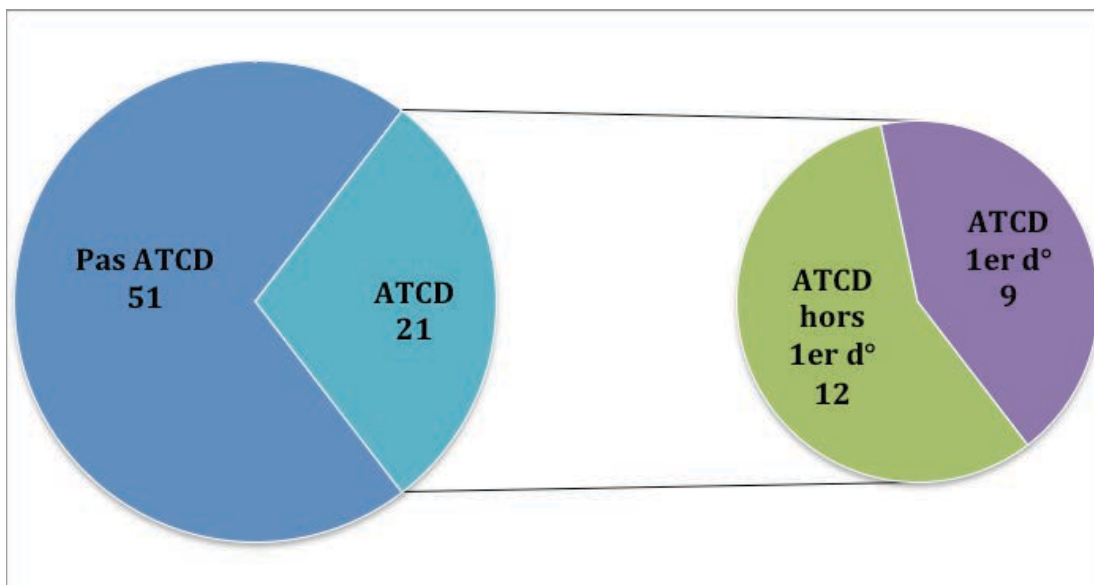


Figure 72: Fréquence et type des antécédents familiaux de FL/P

Toutes formes cliniques confondues (FLP, FL, FP) le diagnostic échographique anténatal de FL/P a été posé dans 61% des cas (44 patients). (Fig 73)

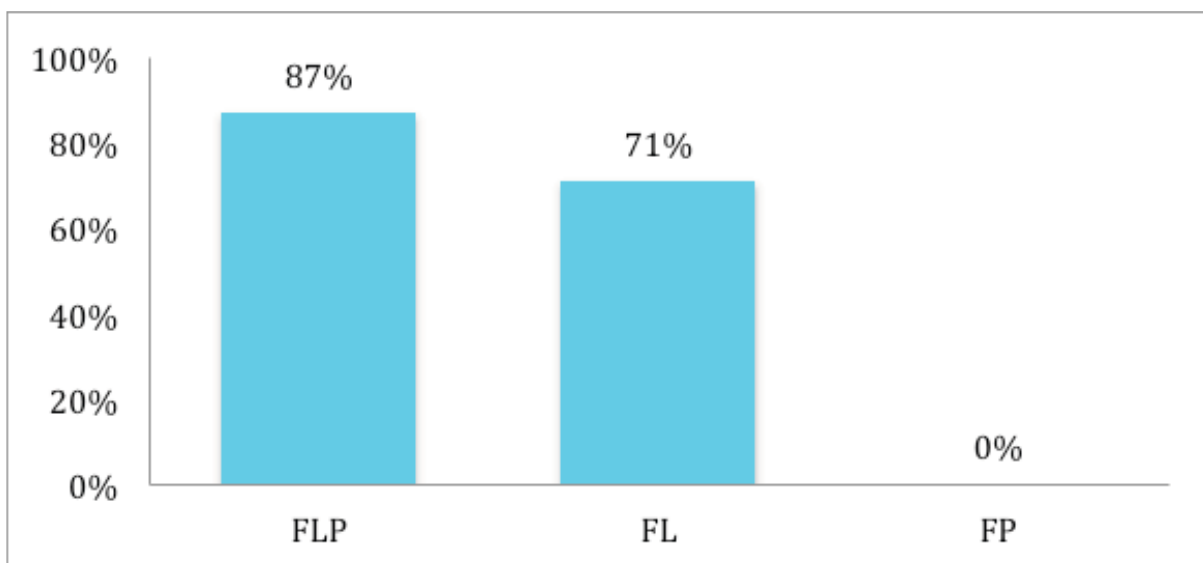


Figure 73: Taux de diagnostic anténatal de FL/P en fonction de la forme clinique

Les formes cliniques post-natales se répartissaient ainsi :

Tableau 16: Synthèse des différentes formes cliniques de FL/P incluses dans l'étude

Nombre total de cas	72
Formes cliniques	30 FLP 24 FL 18 FP
Sexe	30 Filles 42 Garçons (58%)
Diagnostic anté-natal	44 (61%)
Forme Familiale	21 (29%) dont 9 (12,5%) avec des liens du 1er degré
Formes syndromiques	9 (12,5%)
Séquence de Pierre Robin	8

Tableau 17: Description clinique des FLP incluses dans l'étude

	Fente Labio-palatine			
Total (nombre de cas)	30 (42%)			
	Total	Bilatérale	Unilatérale Droite	Unilatérale Gauche
	30	13	10	7
Sexe	11 Filles 19 Garçons	6 Filles 7 Garçons	5 Filles 5 Garçons	0 Fille 7 Garçons
Diagnostic anté-natal	26 (87%)	12	8	7
Forme Familiale	11	4 (3 liens du 1er degré)	3 (2 liens du 1er degré)	1 (pas de lien 1er degré)
Formes syndromiques	3 (10% des FLP)	1	1	1

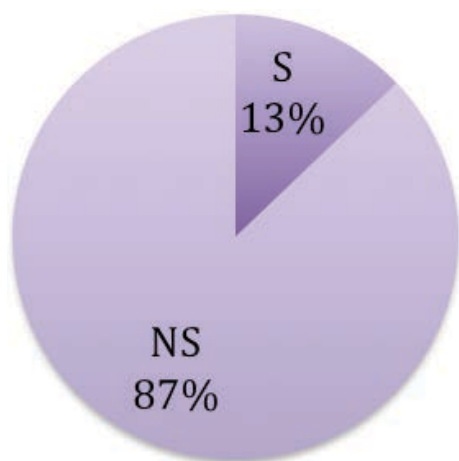
Tableau 18: Description clinique des FL I incluses dans l'étude

	Fente labiale			
Total (nombre de cas)	24 (33%)			
	Total	Bilatérale	Unilatérale droite	Unilatérale Gauche
	24	4	11	9
Sexe	16 Filles 18 Garçons	2 Filles 2 garçons	Filles 3 Garçons 8	Filles 3 Garçons 6
Diagnostic anté-natal	17 (71%)	4	9	4
Forme Familiale	6 (25%)	1 (pas de lien 1er degré)	4 (1 lien du 1er degré)	1 (1 lien du 1er degré)
Formes syndromiques	0 (0%)	0	0	0

Tableau 19: Description clinique des FP I (FV et FVP) incluses dans l'étude

	Fente Palatine		
Total (nombre de cas)	18 (25%)		
	Total	Vélo-palatine (dont veau type 1)	Vélaire
	18	9	9
Sexe	11 Filles et 7 Garçons	6 Filles 3 Garçons	5 Filles et 4 Garçons
Diagnostic anté-natal	0 (0%)	0	0
Forme Familiale	1	1 (1 lien du 1er degré)	0
Formes syndromiques	6 (33% des fentes palatines)	3	3
Séquence de Pierre Robin	8	7	1

Sur les 72 patients, 9 formes syndromiques ont été retrouvées. (Fig 74)



La fréquence des formes syndromiques était de 12,5% toutes formes cliniques confondues, de 33% dans les FP et de 10% dans les FLP. Dans notre série aucune forme syndromique n'a été retrouvée dans FL, mais 6 formes syndromiques ont été identifiées dans le cadre des FP, et 3 dans FLP.

Figure 74: Répartition des formes syndromiques (S) et non syndromiques (NS) dans la population de patients inclus dans l'AOL

Les formes syndromiques se répartissaient ainsi :

- Un tableau poly-malformatif chez une petite fille associant :

Une sténose valvulaire aortique, une trigonocéphalie par fermeture prématurée de la suture métopique, une hernie ombilicale, une clinodactylie des 5^{ème} doigts et orteils des deux membres supérieurs et au niveau de deux membres inférieurs, une fente vélaire, une fistule lèvre inférieure, une dysmorphie faciale, un retard psycho-moteur.

Ce tableau clinique est actuellement toujours en cours de discussion mais il pourrait s'intégrer dans le cadre d'un syndrome oro-digito-facial ou bien d'un syndrome de Kabuki.

- Un garçon porteur d'une fente vélaire associée sur le plan cardiaque à une communication intra-ventriculaire, un retard psycho-moteur, dysmorphie faciale pouvant faire évoquer un syndrome de velo-cardio-faciale (toutefois la recherche de la délétion 22q11 est négative), des caries multiples, agénésie dentaire, surdité de perception. Malgré l'absence d'hématurie cet enfant est en cours de bilan (ophtalmo, rénal) pour un syndrome d'Alport.

- Une fille porteuse d'une fente vélaire dans le cadre d'une séquence de Pierre Robin, qui présentait aussi sur le plan cardiaque une communication intra-ventriculaire musculaire, un retard psycho-moteur, une dysmorphie faciale, et au plan cérébral une polymicrogyrie dominant en frontal et hétérotopies surtout péri-ventriculaire.

- Un garçon porteur d'une fente vélo-palatine (Veau type I) présentant un hypospadias pénien antérieur.

- Un garçon porteur d'une FLP totale gauche associé à une duplicité rénale gauche avec aspect dysplasique et urétérocèle, ainsi qu'un syndrome de jonction pyélo-urétéral droit. L'ensemble des diagnostics avait été porté en anténatal.

- Un garçon porteur d'une FLP totale droite et d'une hexadactylie bilatérale (bord ulnaire) dont la sœur (patiente ci-dessous) est porteuse d'une FLP bilatérale et d'une sténose valvulaire pulmonaire.

- Une fille (sœur du patient précédent) porteuse d'une FLP bilatérale ayant présenté une prématurité avec un terme à 31SA pour un poids de 2kg949, et une sténose valvulaire pulmonaire.

- Une fille présentait une fente vélaire dans le cadre d'une séquence de Pierre Robin associée à un hypertélorisme, un retard de croissance intra-utérin 2kg230, et sur le plan cardiaque une Communication Inter Ventriculaire (CIV).

- Un garçon avec une fente vélo-palatine rentrant dans le cadre séquence de Pierre Robin présenté en association un pied Talus valgus gauche.

Le cas décédé avant la chirurgie était:

Une fille porteuse d'une fente vélo-palatine large, associant une agénésie rénale unilatérale, une communication inter-ventriculaire, une anomalie de l'arc aortique, des enchondromes prétragien bilatéraux, une duplicité du pouce droit et une hexadactylie de la main gauche.

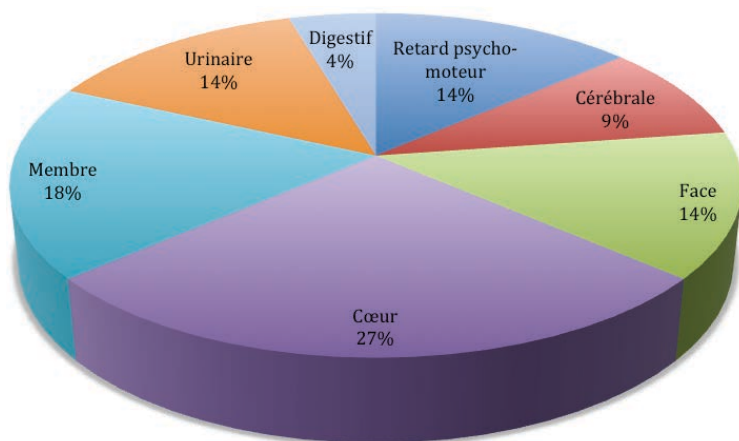


Figure 75: Répartition des anomalies associées en cas de forme syndromique.

Cérébrale	Trigonocephalie Polymicrogyrie
Face	Fistule lèvre inférieure Agénésie bucco-dentaire Surdité Enchondrome prétragien
Cœur	Sténose valvulaire aortique 3 CIV 1 CIV musculaire Sténose valvulaire pulmonaire Anomalie de l'arc aortique
Membres	Hexadactylie bilatérale ulnaire Hexadactylie pouce Duplicité pouce Clinodactylie Pied talus valgus
Urinaire	Agénésie rénale bilatérale Duplicité rénale Syndrome de jonction Hypospadias antérieur
Digestif	Hernie ombilicale

Tableau 20: Description des anomalies cliniques rencontrées dans les formes syndromiques selon leur origine.

D'autres formes ont été considérées pour le moment comme non syndromiques mais sont en cours de bilan, ou à réévaluer :

- Un garçon porteur d'une FVP (Veau Type I) présentant une dysphagie au solide.
- Un garçon porteur d'une FL droite qui a présenté des convulsions post-opératoires immédiates.

Deux chirurgiens (Pr ML Poli Merol et le Dr C François-Fiquet) ont opéré ces enfants.

- 60 patients ont bénéficié de prélèvements des berges de fentes labiales et/ou palatines et d'un prélèvement sanguin.
- 12 patients n'ont bénéficié que d'un prélèvement sanguin, sans prélèvements de berges de fentes. Il s'agissait de FP I prise en charge par un chirurgien ne réalisant pas d'avivement de l'arc labial lors de sa technique de fermeture palatine.

Tableau 21: Age moyen, minimum et maximum de la chéiloplastie et de la staphylorrhaphie

	Cheiloplastie	Staphylorrhaphie
Age moyen de la chirurgie	54 jours	13 mois et 26 jours
Age minium	13 jours	4 mois et 2 jours
Age Maximum	673 jours	75 mois et 17 jours

B. CGH Array sur sang circulant

Sur les 72 patients ayant eu un prélèvement de sang circulant, au moment de la rédaction de la thèse, 48 patients avaient bénéficiés d'une analyse par CGH Array. (Tableau 22)

Tableau 22: Description des formes cliniques des patients porteurs de FL/P ayant bénéficiés d'une analyse par CGH Array

Nombre CGH Array	48
Sexe patients	21F, 27G
Type de fente	21 FLP (10 D, 6 G, 5 B) 15 FL (8 D, 4 G, 3 B) 12 FP (2 FPV, 3 Veau type I, 7 FV)
Formes syndromiques	6 syndromiques (CIV, incompetence vélo-pharyngée) (hypospadias) (duplicité rénale) (suspect de syndrome de Kabuki) (alcoolisme fœtal et Pierre Robin) (hexadactylie)
Pierre Robin	2

1. Analyse descriptive globale

La CGH Array a mis en évidence 737 variations du nombre de copies (CNV) chez 46 cas de FL/P (2 non détaillés). En moyenne, chaque patient présentait 16 CNV. La majorité de ces CNV était des variations répertoriées dans les bases de données de population contrôle (exemple Database of Genomics Variants) et sont considérés comme polymorphes.

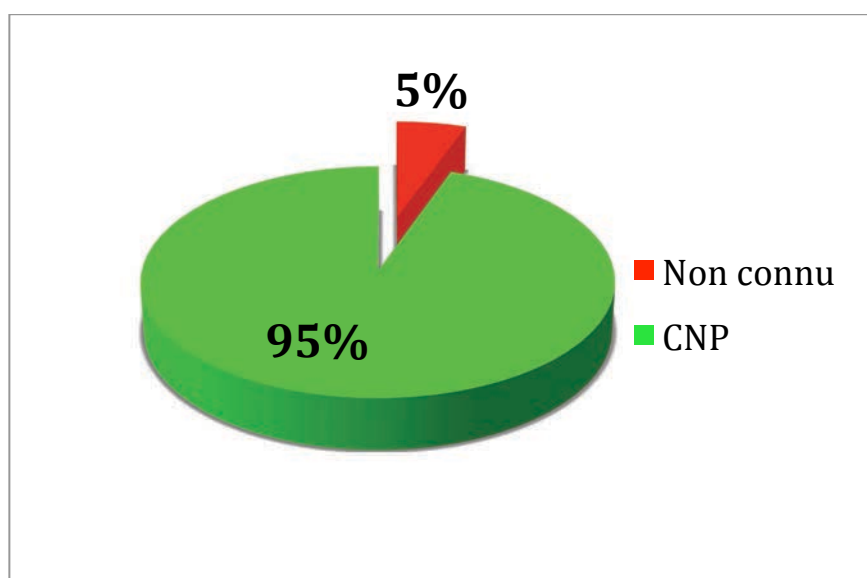


Figure 76: Répartition du type d'anomalies retrouvées en CGH Array d'après le logiciel d'analyse chez 46 FL/P (puces 180k)

Tableau 23: Description du type et de la fréquence des anomalies (délétions et amplifications) retrouvées en CGH Array chez 46 cas de FL/P

46 patients documentés	CNV	CNP (polymorphisme)	Non connu
Total	737	697	40
Moyenne	16,0	15	0,90
Mini	7	6	0
Maxi	29	28	5
Ecart type	4,5	5	0,9

Des variations non connues comme polymorphiques (ou polymorphe) ont été retrouvées chez 30/48 patients. 43 variations avaient été mises en évidence mais 3 faux positifs ont été exclus après vérification par QPCR. La synthèse des 40 anomalies retrouvées chez nos 30 patients est présentée dans le tableau 23.

Tous les patients porteurs d'anomalies significatives confirmées en QPCR ont été convoqués en consultation de génétique pour annonce du diagnostic, conseil génétique, et étude familiale.

Tableau 24: Synthèse des 40 variations non connues comme polymorphiques CGH Array sur sang circulant de 30 cas de FL/P S et NS

Légende :

En vert : les amplifications

En rouge : les délétions

Patient	Type de Fente	sexe	Syndromique	type	début cyto	fin cyto	taille kb	début hgt19	fin hgt19	Gènes
1	FLP G	G	non	A	16q12.2	16q12.2	109	54856235	54965732	<i>IRX5</i>
2	FLP D	G	non	A	17q25.3	17q25.3	23	76498608	76521660	Un peu à distance de <i>TIMP2</i> . 2 patients avec en 17q25.3 A distance de <i>OFD1, MID1</i>
3	FP	F	oui alcoolisme foetal Pierre Robin	A	Xp22.2	Xp22.2	54	15729675	15783383	<i>GFRAL</i>
4	FL D	G	non	D	6p12.1	6q16.1	38	55237894	55276098	<i>MANFA</i>
5	FL G cicatricielle	F	non	A	22q12.3	22q12.3	31	33831671	33862603	<i>LARGE</i> , Un peu à distance de <i>MYH9</i>
6	FP (FV)	G	non	A	7p14.3	7p14.3	341	29212013	29552759	non décrit comme polymorphe, contient le gène <i>CHN2</i> <i>TERT, CLPTM1L</i> . 2 patients avec anomalie en 15.3 <i>GPHN</i>
7	FLP D	F	non	A	5p15.33	14q23.3	110	1266618	1376527	<i>GPHN</i>
8	FP (FV veau type I)	G	non	D	14q23.3	14q23.3	75	67044478	67119215	<i>KIAA2022</i>
9	FLP G	G	non	A	Xq13.3	Xq13.3	169	73930502	74099384	<i>SUPT3H</i> juste avant <i>RUNX2</i> Déletion <i>PMP22</i> <i>ZMYM4, KIAA0319L</i>
10	FL G	G	non	D	6p21.1	6p21.1	21	45116871	45137877	non décrit comme polymorphe. Cette région contient en partie le gène <i>CANM4</i>
11	FP (FV veau type I)	F	non	A	17p12	17p12	1342	14100118	15442066	<i>RAB7A, ACAD9, KIAA1257</i>
12	FLP B	F	non	A	1p34.3	1p34.3	212	35741475	35953399	<i>LOC100133308</i>
13	FLP G	G	non	D	5p15.33	5p15.33	97	723194	820424	<i>ZDHHCL1</i> , 2 patients avec anomalies en 15.3 rem caryo: translocation robertsonienne avec fusion des chromosomes 13 et 14 (héritée de la maman)
14	FP (FV veau type I)	F	non	D	9p23	9p23	64	9 423 588	9 487 845	<i>MAP2K7, SNAPC2, CTXN1...</i>
15	FP (FV)	F	non Pierre Robin	A	19p13.2	19p13.2	21	7970607	7991691	<i>CXCR2P1, RUFY4</i>
16	FLP D	F	non	D	2q35	2q35	22	218903828	218926019	<i>CDK5, SLC4A2</i>
17	FP (FV)	F	non	A	7q36.1	7q36.1	17	150754875	150771579	<i>OR1D2, ORIG1</i>
18	FP (FV)	F	non	A	17p13.3	17p13.3	104	2995336	3099469	<i>COL17A1, C10orf78, C10orf79</i>
19	FLP D	F	non	D	10q25.1	10q25.1	87	105806279	105893423	<i>AGF1</i>
20	FLP G	G	non	A	2q36.3	2q36.3	30	228363706	228394127	<i>NPAS4, MRPL11, PEL13...</i> un peu avant <i>TBX10</i>
21	FLP G	G	non	D	11q13.2	11q13.2	137	66193635	66330974	<i>RIN3, LGMN</i>
22	FL B	F	non	D	14q32.12	14q32.12	40	93140301	93180742	<i>PARK2</i>
23	FL B (cicatricielle D)	G	non	D	6q26	6q26	98	162454653	162552378	<i>GALNT13</i>
24	FLP D	G	oui (hexadactylie bilatérale)	D	2q24.1	2q24.1	23	155031664	155054769	déletion SHOX
25	FL D	F	non	A	Xp22.33/Yp11.32	Xp22.33/Yp11.32	315	441640	736390	<i>MAST2, PIK3R3</i>
26	FL G	G	non	A	6q14.3	6q14.3	886	86754494	87640392	non décrit comme polymorphe en délétion mais décrits comme variants dans les amplifications
27	FL G	F	non	D	1p34.1	1p34.1	348	46233612	46581255	<i>CDH19, DSEL</i>
28	FP (FV)	F	oui	A	2q21.1	2q21.1	216	130928976	131144665	<i>SKI, MORN</i>
29	FLP D	G	non	A	6p25.2	6p25.1	174	4 064 661	4 238 434	MSX2
				A	18q22.1	18q22.1	2091	63557 108	65 648 517	<i>TTYH1</i>
				A	1q36.33	1q36.33	35	2239438	2273879	<i>TRPM2</i>
				A	5q35.2	5q35.2	41	174144190	174184859	<i>TNFRSF13C, CENPM, LOC339674</i>
				A	19q13.42	19q13.42	27	54911070	54938174	<i>TBCD</i> . A distance de <i>TIMP2</i> . 2 patients avec anomalie en 17q25.3
				A	21q22.3	21q22.3	46	45796489	45842463	
				A	22q13.2	22q13.2	46	42309233	42355629	
30	FLP B	F	non	A	17q25.3	17q25.3	45	80806566	80851207	

2. CNV bénins ou CNV pathogéniques ?

Les analyses par CGH Array permettent de découvrir de nombreux CNV mais le challenge reste dans l'interprétation de leur caractère bénin ou pathogénique. Certains principes simples peuvent nous aider dans cette analyse.

Les CNV pathogènes sont plus fréquemment des délétions que des amplifications.

La taille de l'anomalie est un argument à prendre en compte. Les CNV pathogéniques sont plus souvent :

- supérieurs à 150Kb pour les délétions
- supérieurs à 200Kb pour les duplications

Chez nos 30 patients 3 présentent des délétions supérieures à 150Kb et 6 présentent des amplifications supérieures à 200Kb.

Tableau 25: Synthèse des anomalies de plus de 150 Kb en cas de délétion et de 200Kb en cas d'amplification

Patient	Type de Fente	sexe	Syndromique	type	début cyto	fin cyto	taille kb	début hg19	fin hg19	Gènes
5	FL G cicatricielle	F	non	A	7p14.3	7p14.3	341	29212013	29552759	non décrit comme polymorphe, contient le gène <i>CHN2</i>
8	FP (FV veau type I)	G	non	D	17p12	17p12	1342	14100118	15442066	Délétion <i>PMP22</i>
9	FLP G	G	non	A	1p34.3	1p34.3	212	35741475	35953399	<i>ZMYM4, KIAA0319L</i>
11	FP (FV veau type I)	F	non	A	3q21.3	3q21.3	221	128485064	128706557	<i>RAB7A, ACAD9, KIAA1257</i>
24	FLP D	G	oui (hexadactylie bilatérale)	D	Xp22.33/Yp11.32	Xp22.33/Yp11.32	315	441640	736390	délétion <i>SHOX</i>
25	FL D	F	non	A	6q14.3	6q14.3	886	86754494	87640392	
26	FL G	G	non	A	1p34.1	1p34.1	348	46233612	46581255	<i>MAST2, PIK3R3</i>
27	FL G	F	non	D	2q21.1	2q21.1	216	130928976	131144665	non décrit comme polymorphe en délétion mais décrits comme variants dans les amplifications
28	FP (FV)	F	oui	A	18q22.1	18q22.1	2091	63557 108	65 648 517	<i>CDH19, DSEL</i>

Ces anomalies ont été découvertes de manière fortuite et ne sont pas décrites dans la littérature comme liée aux FL/P. Ainsi ont été mis en évidence chez :

- Le patient 5 une amplification interstitielle de 341kb en 7p14.3 (confirmée en PCR) non décrite à ce jour comme polymorphe. Cette région contient en partie le gène *CHN2* (*OMIM 602857*). A ce jour les connaissances sur ce gène (fonction, implication...) restent assez limitées.

- Le patient 8 une délétion *PMP22* (confirmée en PCR) en 17p12 de 1342 pb (Fig 77)

Le gène *PMP22* code pour la protéine PMP22 de 22kDA (produite principalement par les cellules de Schwann) composant majeur de la myéline dans sa portion compacte dans la quasi-totalité des fibres myélinisées du système nerveux périphérique.

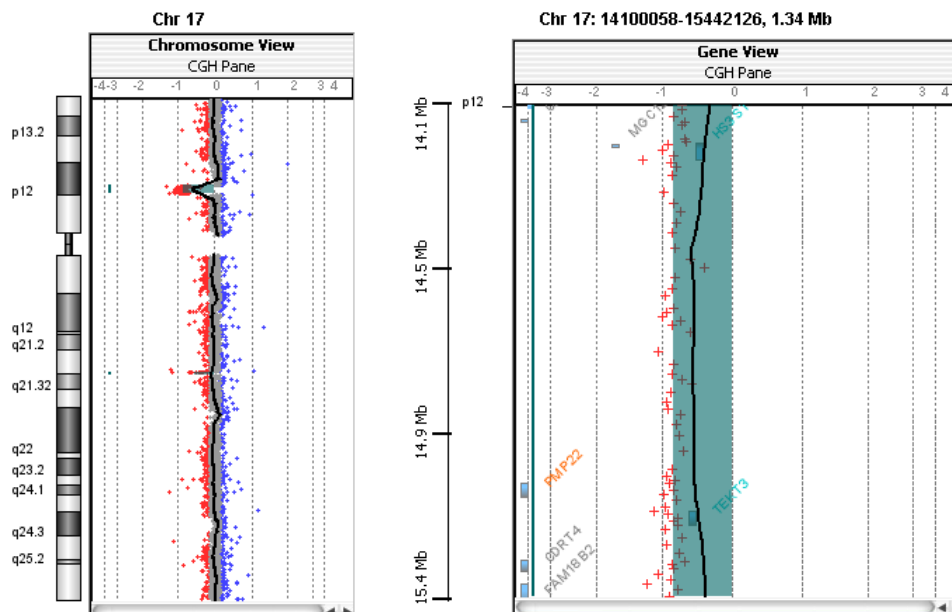


Figure 77: Délétion en 17p12 de 1342pb gène *PMP22* (CGH Array Puces 180k)

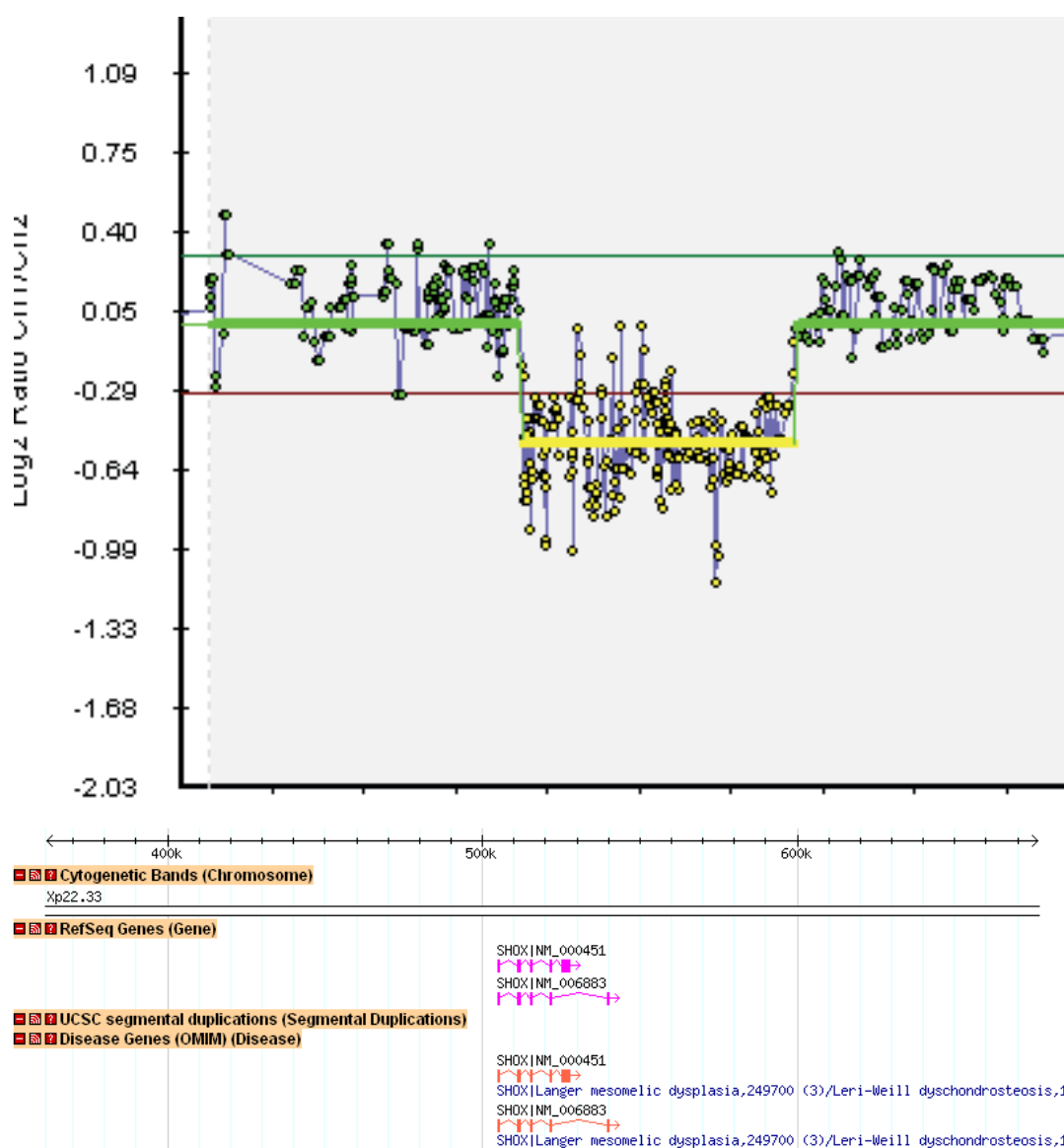
Ce gène pourrait avoir un rôle dans le développement des tumeurs malignes chez les patients atteints de neurofibromatose et dans les maladies de Charcot-Marie-Tooth type 1A (microduplication, autosomique dominant), type 1E, type 3. Ce gène a aussi été impliqué dans la Neuropathie héréditaire avec hypersensibilité à la pression (HNPP) (microdélétion, autosomique dominant). La HNPP est une neuropathie sensitivomotrice héréditaire, focale et récurrente. Les premiers symptômes apparaissent rarement avant l'âge de 20 ans. Cette affection est caractérisée par la survenue d'accès paralytiques et paresthésiants dans le territoire bien défini d'un tronc nerveux. Ces accès, souvent secondaires à un traumatisme minime ou à une compression prolongée de la région, régressent le plus souvent mais les rechutes sont fréquentes, touchant le même territoire ou un territoire différent. Une paralysie peut s'installer de manière définitive. Sur le plan électrophysiologique, cette affection est caractérisée par un allongement des latences motrices distales supérieures à 3,8 millisecondes au niveau des zones de compression : canal carpien. La biopsie nerveuse, lorsqu'elle est réalisée, montre un aspect caractéristique de zones d'épaississement de la myéline en forme de saucisses (tomacula). La HNPP se transmet sur le mode autosomique dominant et la lésion génétique est, dans 80% des cas, une délétion de 1,5 mégabases dans la région 17p11.2 incluant le gène *PMP22*. La région délétée est la même que celle qui est dupliquée dans la maladie de Charcot-Marie-Tooth type 1A. La mise en évidence de cette délétion permet de confirmer le diagnostic. Une mutation ponctuelle de *PMP22* a pu être mise en évidence dans

de rares cas de HNPP. Le traitement est symptomatique et préventif : prévention des compressions nerveuses.

Le gène *PMP22* a aussi été décrit dans la polyradiculonévrite démyélinisante inflammatoire aiguë, le Syndrome de Dejerine-Sottas et le Syndrome de Roussy-Levy.

Nous allons donc poursuivre les investigations pour ce patient porteur d'une FV considérée comme NS. Ce d'autant que ce patient présente en plus une deuxième anomalie en CGH Array correspondant à une délétion de 21pb en 6p21.1 dans le territoire du gène *SUPT3H* qui se situe juste en avant du gène *RUNX2* (connu comme gène d'intérêt des FL/P).

- Chez le patient 24 une délétion *SHOX* (confirmée en PCR) (Fig 78)



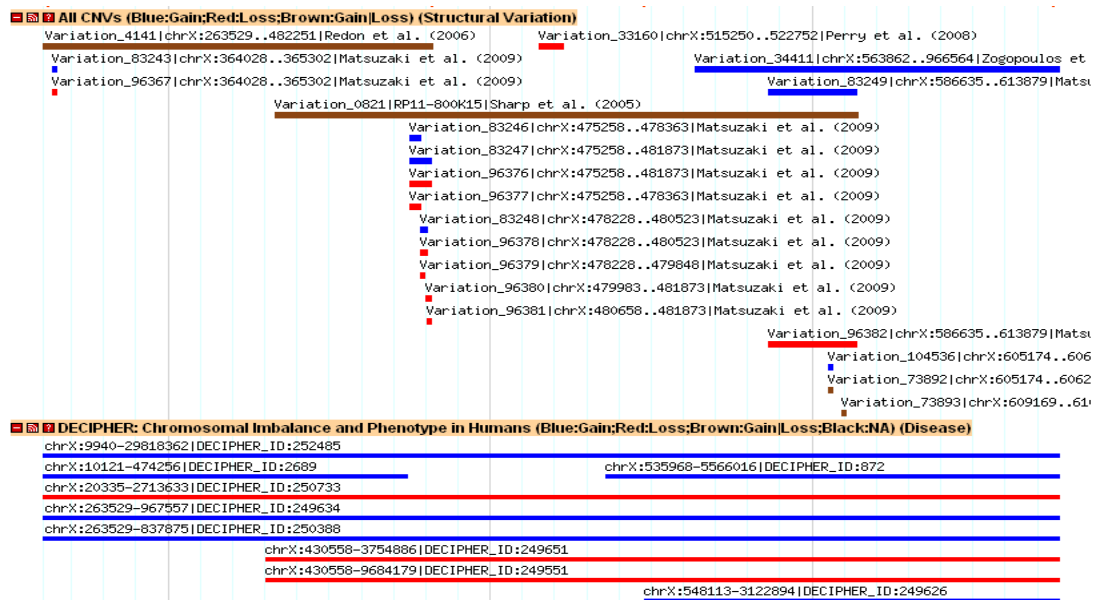


Figure 78: Délétion Xp22.33/Yp11.32 de 315kb gène *SHOX* (CGH Array Puces 180k)

Le gène *SHOX* (*short stature homeobox*) fait partie des gènes impliqués dans la petite taille. Il est exprimé dans le muscle squelettique, le placenta, le pancréas, le cœur et les fibroblastes de la moelle osseuse. 3 pathologies sont liées à une atteinte du gène *Shox* :

- La petite taille idiopathique familiale (OMIM 300582)
- La dyschondrostéose de Léri-Weill (OMIM 127300). Il s'agit d'une dysplasie squelettique marquée par une petite taille disproportionnée et une déformation de Madelung caractéristique. La prévalence est inconnue. La petite taille est présente dès la naissance avec un raccourcissement mésomélique des membres (touchant les segments médians des avant-bras et des jambes). La déformation de Madelung ne peut n'être détectée qu'à la puberté. La déformation du poignet, bilatérale, se caractérise par des radius et des cubitus courts et arqués avec luxation dorsale du cubitus distal et limitation des mouvements du poignet et du coude. L'expression de la maladie est variable mais les signes cliniques sont en général plus sévères chez les filles. Les garçons ont une morphologie athlétique due à une hypertrophie musculaire sans maladie musculaire sous-jacente. L'intelligence est normale. Dans 70% des cas environ, la maladie est due à une haplo-insuffisance du gène contenant une séquence impliquée dans le contrôle de la taille (*SHOX*), localisé dans la région pseudoautosomale 1 (*PAR-1*) des chromosomes sexuels (Xp22.33 et Yp11.32). L'haplo-insuffisance est due à des mutations hétérozygotes et des délétions du gène *SHOX* ou de la région *PAR-1* située en aval (où se trouvent des éléments activateurs de *SHOX*). Dans les autres cas (30%) l'anomalie moléculaire demeure inconnue. La prévalence des mutations *SHOX/PARI* est estimée à 1/1 000.
- La dysplasie mésomélique type Langer (OMIM 249700)

Le patient porteur de cette anomalie présente cliniquement une FLP totale droite et une hexadactylie bilatérale des bords ulnaires des mains. La mère de notre patient présente elle aussi une petite taille. Nous n'avons pas pu établir d'arbre généalogique précis car cette dernière a été adoptée (les antécédents familiaux ne sont pas connus). Nous allons poursuivre le bilan génétique de ce patient avec une étude familiale chez sa mère mais aussi chez sa sœur porteuse d'une FLP B sans anomalie des membres.

Ces pathologies ne sont pas habituellement décrites comme associées aux FL/P.

- Chez le patient 25 une amplification interstitielle à type de tripllication de 886kb en 6q14.3 (confirmée en PCR) non décrite comme polymorphe. L'étude parentale va être réalisée.

- Chez le patient 27 une délétion interstitielle de 216kb en 2q21.1 (confirmée en PCR) non décrite comme polymorphe en délétion. En revanche des amplifications dans cette région ont été décrites comme polymorphes dans la Database of Genomics Variants. L'étude parentale va être réalisée.

Dans la majorité des cas les CNV pathogéniques sont dit *De Novo*. C'est-à-dire non hérités soit non retrouvés chez les parents. Ceci justifie la place clef des études familiales. Les CNV bénins ou polymorphiques sont le plus souvent hérités. Toutefois, des CNV hérités peuvent être pathogéniques si le CNV contient un gène soumis à empreinte ou si le CNV contient un gène muté sur l'autre allèle. Les CNV bénins *de Novo* représente moins de 0,2% des cas (Redon R, 2006).

Dans notre série les études familiales sont actuellement en cours et nous ne pouvons malheureusement pas pour le moment aller plus avant dans la description du caractère hérité ou *De Novo* des anomalies. Cet élément sera un élément important pour l'analyse finale du caractère bénin ou pathogénique.

La distinction entre CNV pathogéniques et bénins reste la conséquence d'une synthèse de plusieurs faisceaux d'arguments. Ceux ci sont en faveur du caractère pathogénique quand :

- Le CNV est dans une région connue pour causer le phénotype du patient

Nous avons constaté chez deux de nos patients des anomalies de petites tailles qui restent liées à trois gènes d'intérêt des FL/P.

La première anomalie est une amplification en 1p36.33 de 35 pb correspondant au territoire du gène *SKI* (OMIM 164780). (Fig 79)

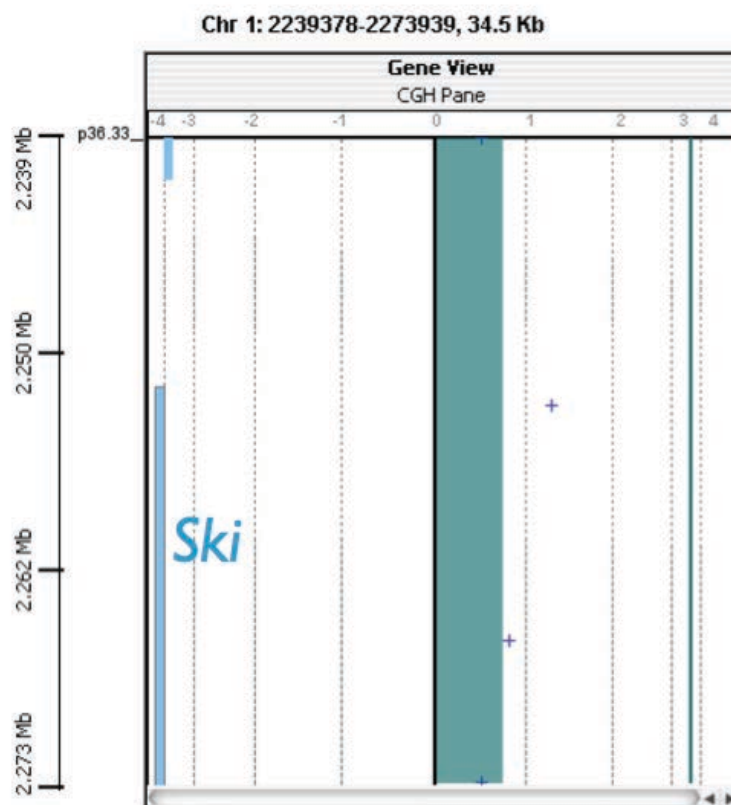


Figure 79: Amplification en 1p36.33 de 35 pb gène *SKI* (CGH Array Puces 180k)

Le gène *SKI* est connu sur le plan pathologique dans le cadre de délétion. La monosomie 1p36 est un syndrome délétionnel défini au cours des dernières années. C'est une des délétions chromosomiques les plus fréquentes avec une incidence estimée entre 1/5 000 et 1/10 000 naissances vivantes. Le point de rupture cytogénétique est variable. Il concerne une bande située entre 1p36.13 et 1p36.33. Un retard de croissance, souvent important est observé. Des difficultés comportementales et une auto-agressivité ont été décrites. Une hypotonie, des problèmes nutritionnels avec une dysphasie orolaryngée sont souvent rencontrés. Les épilepsies sont fréquentes. D'autres manifestations dysmorphiques, cardiaques, visuelles et auditives ont été décrites.

Concernant les amplifications, *SKI* a été impliqué dans les reins fibrokystiques (Yang J, 2003) et les cancers colo-rectaux (Buess M, 2004).

La deuxième anomalie retrouvée est une amplification en 5q32.2 de 42 pb correspondant au territoire du gène *MSX2*. (Fig 80) Ce gène a été impliqué dans les craniosynostoses type Boston. Il participe au développement cranio-facial et à la formation osseuse en interagissant avec la voie de signalisation Ras, *Dlx3* et 5, *ostéocalcine*, *Runx2*.

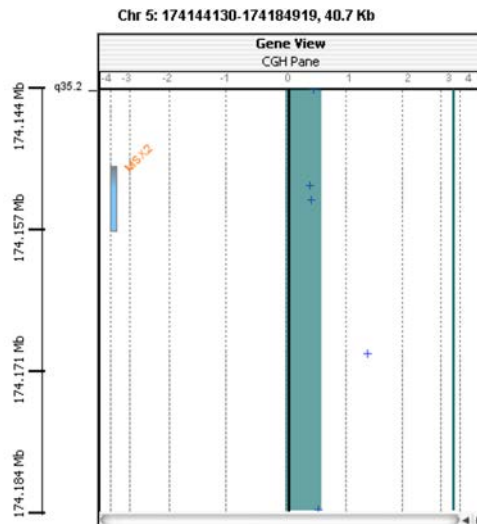


Figure 80: Amplification en 5q32.2 de 42 pb gène *MSX2* (CGH Array Puces 180k)

Les deux anomalies décrites précédemment ont été retrouvées chez le même patient. Celui-ci était porteur d'une FLP totale droite NS et ne présentait pas d'antécédent familiaux de FL/P. Toutefois, il est à noter un antécédent d'interruption médicale de grossesse pour dysplasie kystique rénale bilatérale. Une étude familiale est en cours.

La troisième anomalie concerne le gène *LARGE*. Il s'agit d'une délétion interstitielle de 31kb en 22q12.3 (confirmée en PCR) non décrite à ce jour comme polymorphe. Cette région contient une partie intronique du gène *LARGE*. Ce dernier (OMIM 603590) est connu pour être impliqué dans plusieurs syndromes associant des dystrophies musculaires, des malformations cérébrales et ophtalmiques, et des retards mentaux. Un des syndromes décrits est le syndrome de Walker-Warburg. Celui-ci est connu pour être lié aux FLP. Mais plusieurs gènes ont été impliqués dans ce syndrome comme le gène *LARGE* mais aussi le gène *POMT1*.

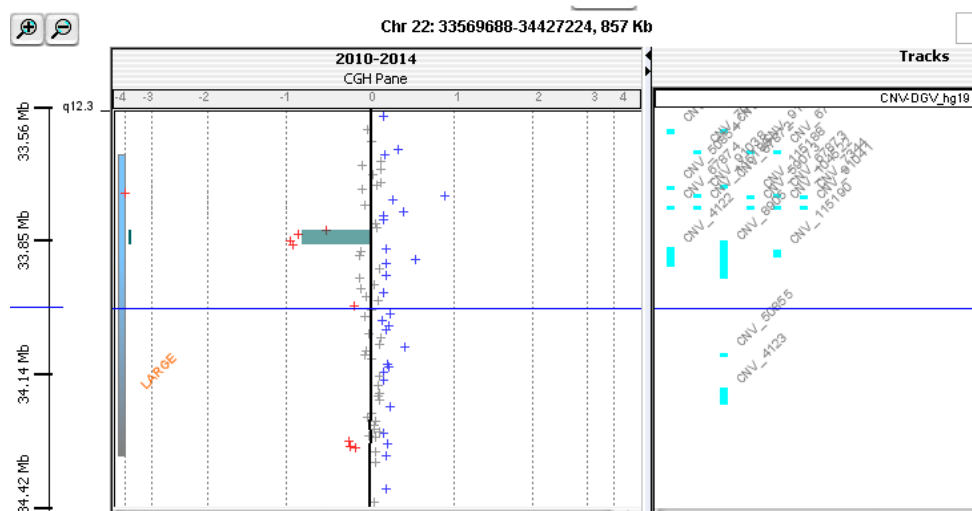


Figure 81: Délétion de 31kb en 22q12.3 gène *LARGE* (CGH Array Puces 180k)

L'étude familiale est en cours.

- Les gènes présents dans ces régions ont une fonction qui pourrait expliquer la pathologie du patient
- Les gènes présents dans ces régions sont de la même famille ou dans la même voie de signalisation que des gènes connus pour être mutés dans les phénotypes de la pathologie

On peut penser que le CNV n'est pas pathogénique quand le CNV est dans une région référencée par les bases de données comme un CNV polymorphique.

L'analyse des résultats de CGH Array de la cohorte d'environ 750 patients porteurs d'une déficience intellectuelle syndromique ou non (CGH Array réalisées au sein du service de génétique du CHU de Reims entre 2005 et 2013) fait penser que les anomalies ci-dessous sont probablement des polymorphismes :

- Amplification 3q21.3 (*ACAD9*) (Patient 11)
- Amplification 1p34.1 (*MAST2*) (Patient 26)
- Délétion 14q23.3 (*GPHN*) (Patient 6)
- Délétion 6p21.1 (*SUPT3H*) (Patient 8)
- Délétion 6q26 (*PARK2*) (Patient 22)
- Délétion 2q24.1 (*GALNT13*) (Patient 23)

Deux CNV restent incertains :

- Amplification 7p14.3 (*CHN2*) qui a été retrouvé chez le patient 5 et surtout chez 2 patients de la même famille.
- Amplification interstitielle de 169kb en Xq13.3 (*KIAA2022*) (Patient 7), confirmée en PCR non décrite à ce jour comme polymorphe. (Fig 82) Cette région contient en partie le gène *KIAA2022*.

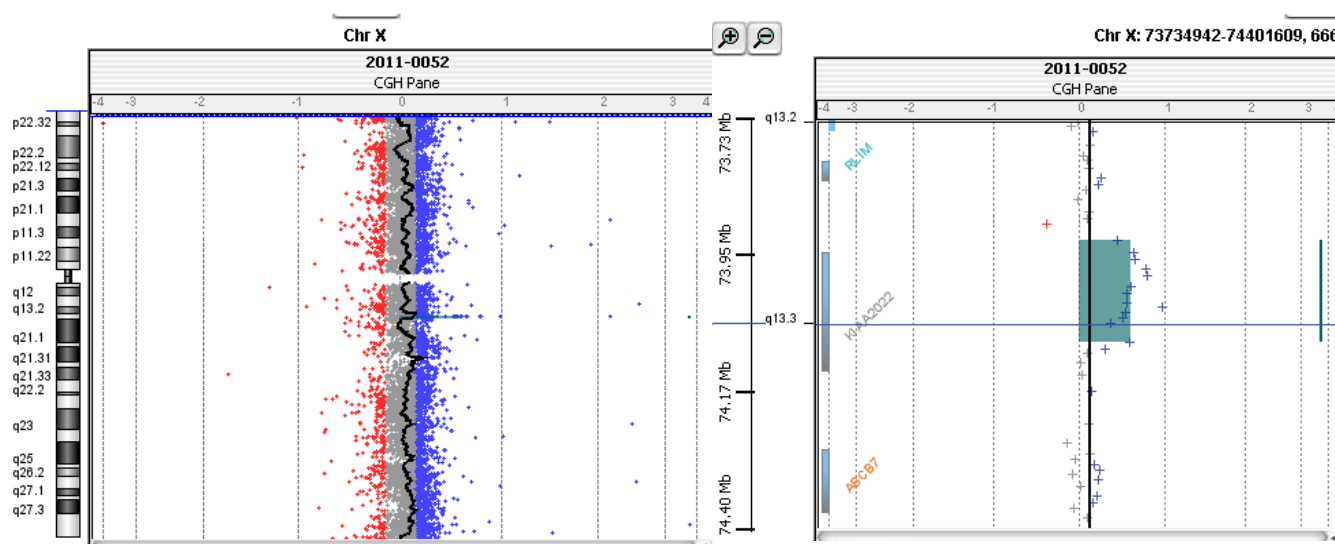


Figure 82: Amplification interstitielle en Xq13.3 gène *KIAA2022* (CGH Array Puces 180k)

Cette étude nous a permis de mettre en évidence chez le patient 14 une délétion interstitielle de 64kb en 9p23 (héritée du père) associée à une translocation robertsonnienne avec fusion des chromosomes 13 et 14 (héritée de la mère) mis en évidence au caryotype. La PCR de *TBX1* n'avait pas mis en évidence de délétion ni d'amplification.

En conclusion nous continuons ce travail par les études familiales pour nos 30 patients (40 CNV) en commençant par les variations de grandes tailles. Nous nous focaliserons ensuite sur les anomalies retrouvées dans les locus des gènes impliqués dans les FL/P, puis aux autres variations de petites tailles.

C. Analyse ciblée au niveau des berges

3. Anatomopathologie

Une analyse anatomopathologique a été réalisée chez 60 patients. Au total 135 prélèvements ont été effectués au bloc opératoire dont 111 berges de FL (berges externes et/ou internes) et 24 berges de FP. Les résultats seront présentés de manière distincte pour les prélèvements de lèvre et de palais.

a) Berge de FL

Ont été étudiés pour chaque prélèvement (de la superficie vers la profondeur) :

Le versant cutané : épiderme, derme, Annexes pilo-sébacées

Le versant muqueux : muqueuse malpighienne, chorion, glandes salivaires

Les muscles, les vaisseaux, les nerfs

Et l'inflammation.

Les résultats sont présentés dans le tableau 26.

Tableau 26: Résultats des analyses histologiques des berges de FL

	Nombre de prélèvements	Lèvres totales	Lèvres berges externes	Berges internes		Fente cicatricielle frustrée (Berge partiellement inexistante)
				Lèvres berges internes	Lèvres bourgeons médians	
		98	49	30	16	3
Versant cutané						
	Epiderme	21 Hyperplasies	10 Hyperplasies hyperkératosiques	6 Hyperplasies	6 Hyperplasies	/
	Annexes pilo-sébacées	23 Hyperplasies 2 Dystrophique 2 Parakératose	12 Annexes sébacées hyperplasiques	9 Hyperplasiques 1 Parakératose	2 Hyperplasiques 1 Dystrophique	3 (1 hyperplasique)
	Muqueuse malpighienne	18 Hyperplasiques 1 Orthokératosique	16 Hyperplasiques	2 Hyperplasiques 1 Orthokératosique	/	/
Versant muqueux						
	Chorion	17 Fibreux 1 hypercellulaire	9 Fibreux	5 Fibreux	3 Fibreux et 1 Hypercellulaire	/
	Glandes salivaires	33	19	9 (dont 1 dystrophique)	5	0
	Muscle	49 Muscles striés 4 Muscles lisses	29 Muscles striés (épais dans 3 cas, dystrophique dans 1 cas), 3 Muscles lisses (dystrophique dans 1 cas)	16 Muscles striés (dont 1 épais) 1 Muscle lisse	3 Muscles striés	1 Muscle strié
	Vaisseaux (nombre de prélèvements où des vaisseaux ont été identifiés)	38	18 (dont un micro-angiome)	16	3 (2 à paroi épaisse)	1
	Nerf (nombre de prélèvements où des éléments nerveux ont été identifiés)	23	14 (3 Hypertrophiques)	9 4 Hypertrophiques	1 rares filets nerveux	1 filet nerveux
	Inflammation	19	12	4	4	0

L'épithélium malpighien a été retrouvé comme hyperplasique dans 18% des cas. (Fig 83)
Ceci ne semblait pas être significatif car cet épithélium est physiologiquement décrit comme plus épais du côté buccal (Dubreuil 1967).



Figure 83: Aspect berge externe de fente labiale unilatérale (HES x 63) : versant muqueux / surface / muqueuse (épithélium) malpighienne hyperplasique et chorion fibreux

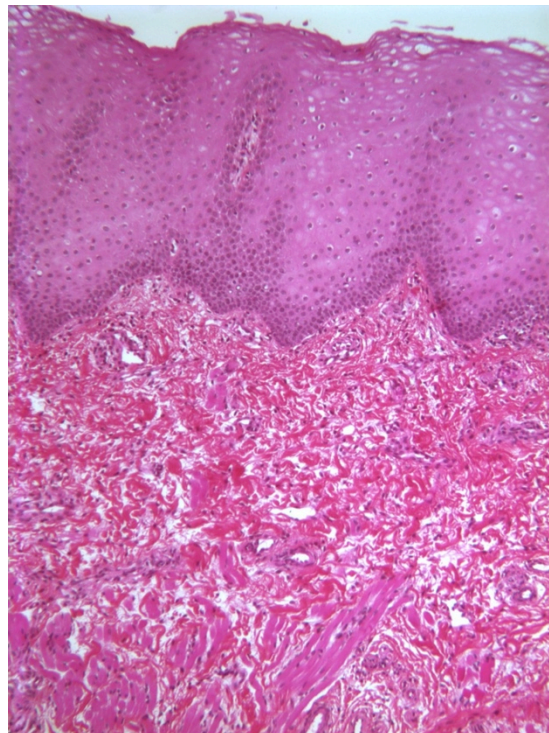


Figure 84: Aspect berge externe fente labiale (HES x 100) : hyperplasie de l'épithélium malpighien muqueux, chorion fibreux, et en profondeur muscle strié en coupe longitudinale.

De même l'hyperplasie des glandes sébacées (Fig 85 et 86) retrouvée dans 22% des cas semblait elle aussi ne pas être significative des FL/P car elle est fréquemment retrouvée dans d'autres contextes.

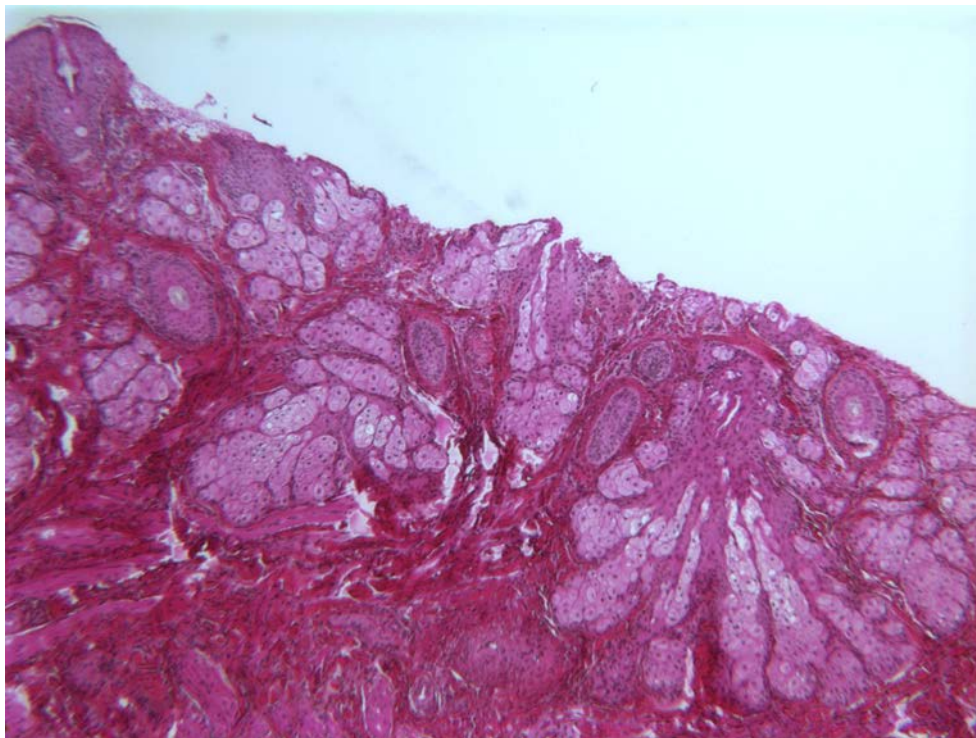


Figure 85: Hyperplasie sébacée (HES x 63) sur prélèvement de berge externe de fente labiale (NB : présence d'un peu d'épiderme tout en haut à gauche)

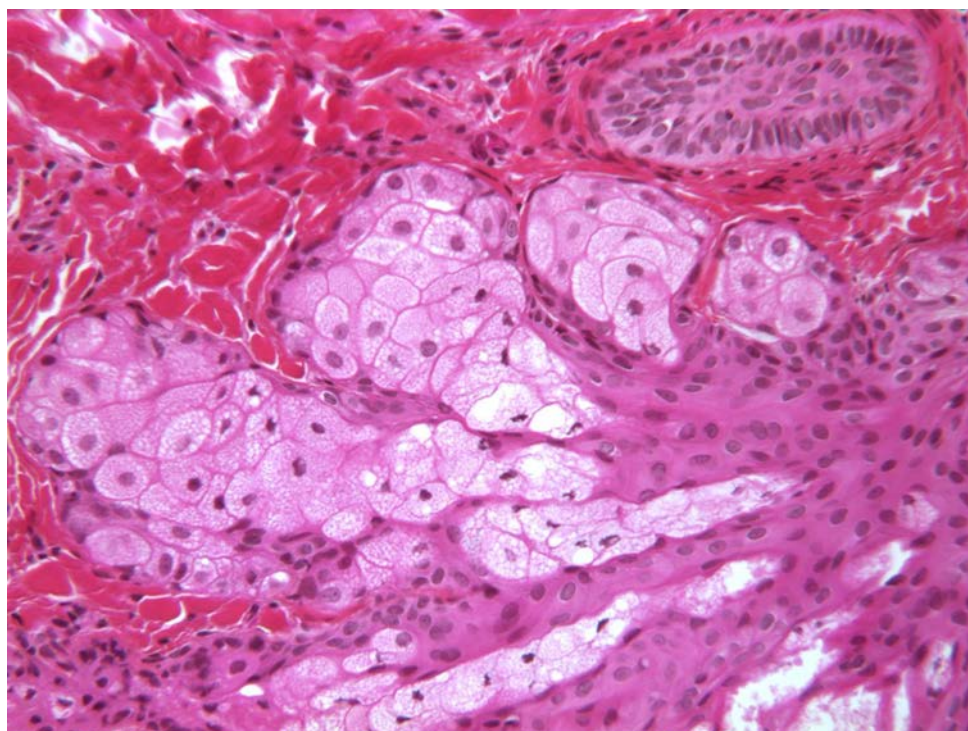


Figure 86: Hyperplasie sébacée au fort grossissement (HES x 250) sur prélèvement de berge externe de FL (NB : une petite tige pileuse en haut à droite).

L'orbiculaire a été retrouvé sur les coupes. C'est un muscle strié. (Fig 87-88)

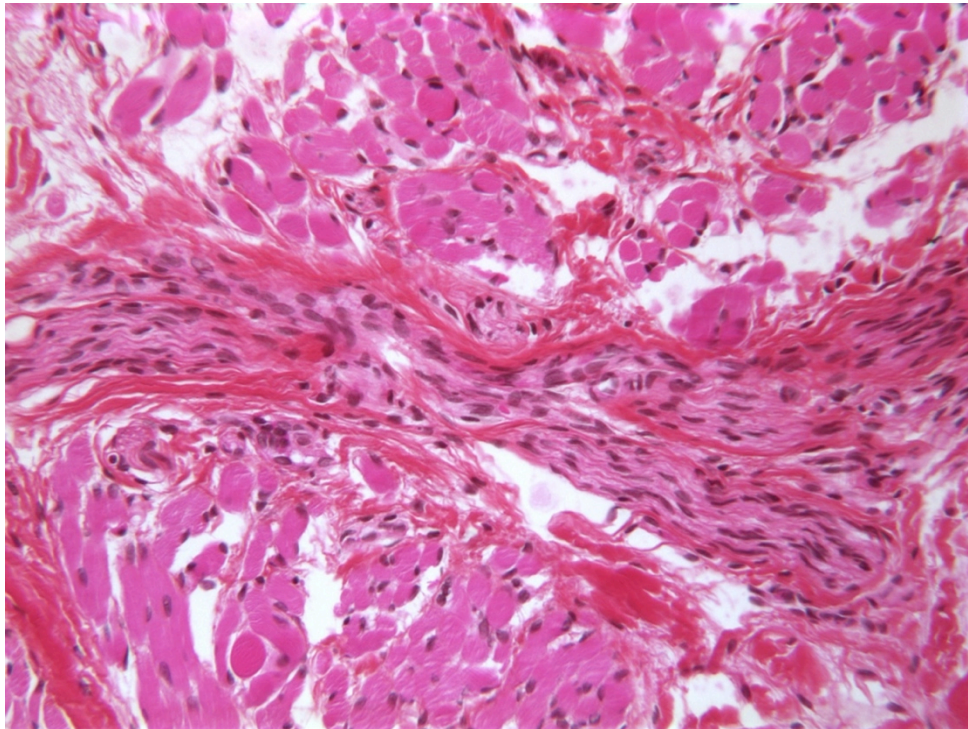


Figure 87: Plan musculaire strié bien constitué avec présence en profondeur d'un nerf hypertrophique (HES x 250) (FL berge externe)

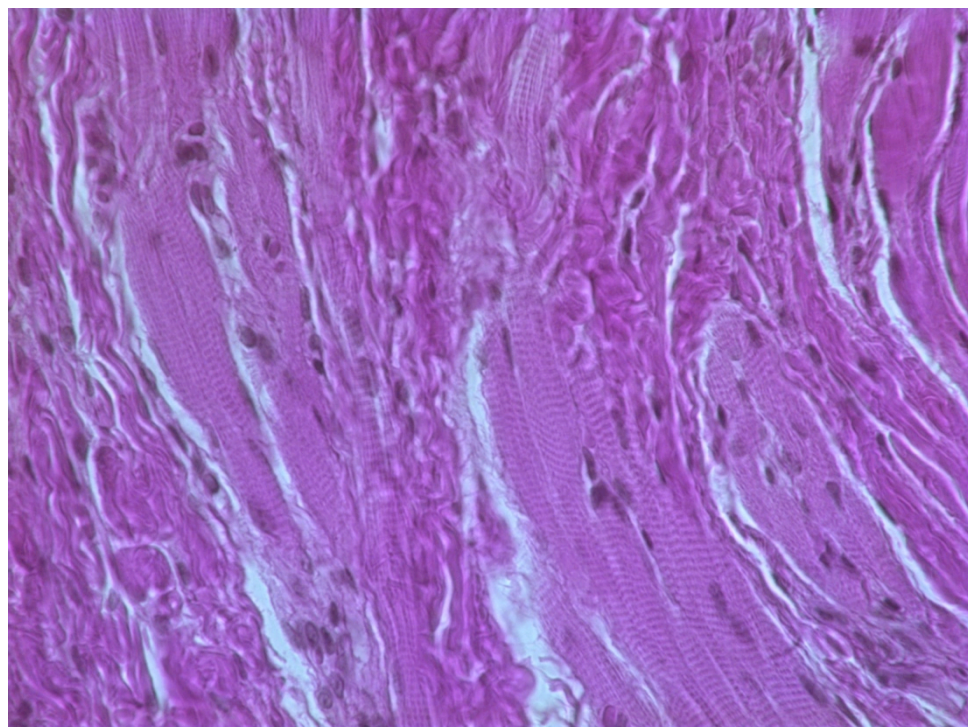


Figure 88: Aspect du muscle strié (striations croisées) sur berge de FL. (coupes longitudinales HES X400)

La présence de muscle lisse sur quelques rares prélèvements est un phénomène un peu surprenant. Cette anomalie méritera vérification.

Des nerfs ont été mis en évidence sur les prélèvements de berges externes et internes dans le cas des formes unilatérales. Pouvant être dans certains cas hypertrophiques (Fig 89). Ils ont été rarement retrouvés au niveau des bourgeons médians des formes bilatérales.

Il n'existe pas de différence significative sur le plan anatomique entre les berges externes et internes même pour la répartition des vaisseaux. Ceux-ci ont été identifiés dans 38% des cas (toutes formes confondues, 36/94) dont 36% (17/47) en berges externes et 54% (15/28) en berges internes dans les FL unilatérales et 18% (3/16) au niveau des bourgeons médians dans les formes bilatérales (soit 41% pour les berges internes de toutes formes confondues uni et bilatérales).



Figure 89: Berge interne de fente labiale (HES x 100) : versant cutané / surface / épiderme, annexe pileuse bien orientée, hyperplasie sébacée, 2 gros vaisseaux en profondeur.

Un micro-angiome a été identifié sur un prélèvement. (Fig 90)

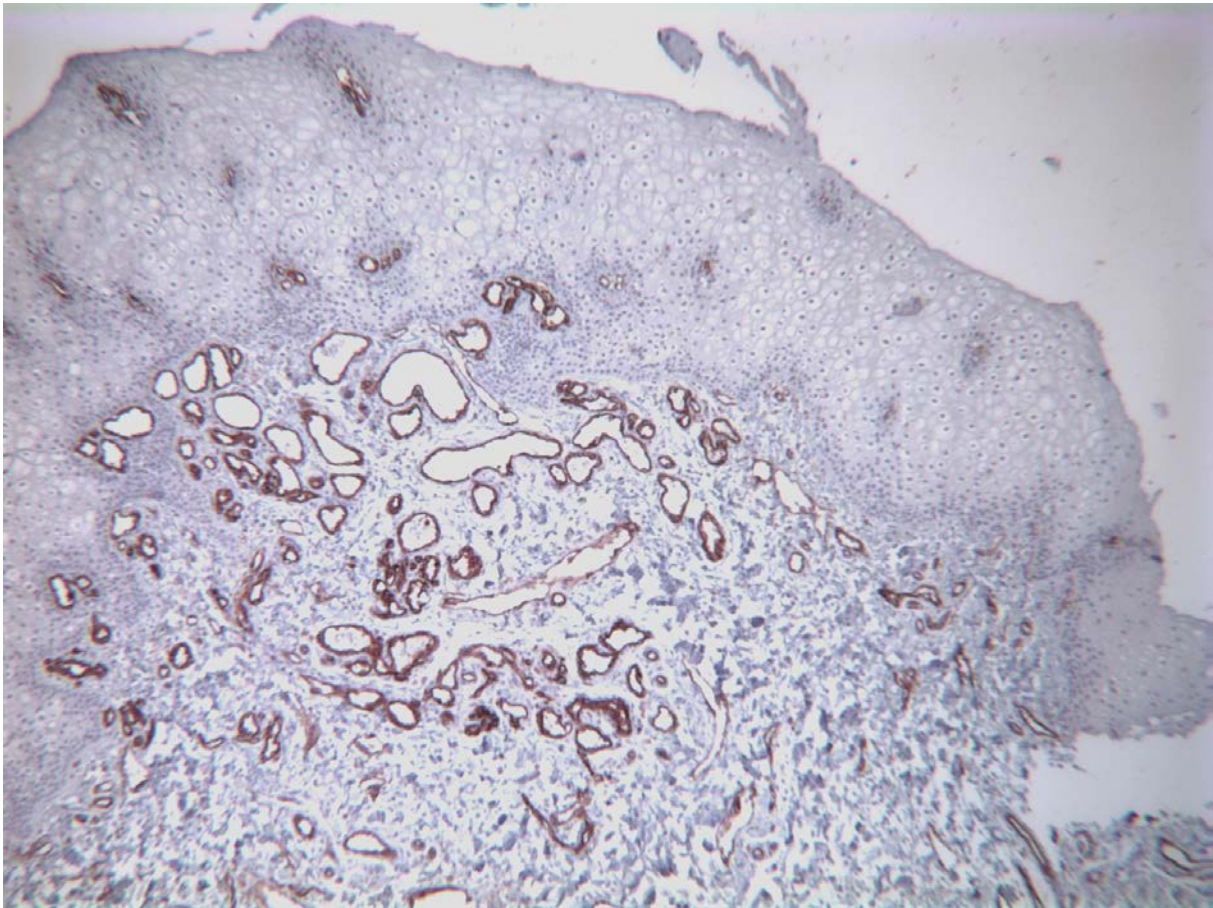


Figure 90: Immunomarquage anti-CD31 x 63 (sur l'automate Ventana Benchmark XT) confirmant la présence d'une malformation capillaire selon la classification ISSVA (aspect histologique de microangiome capillaire) au niveau d'un prélèvement de fente labiale gauche berge externe.

Les différences de fréquence des vaisseaux peuvent être dues dans un premier temps à la taille du prélèvement. Effectivement, en cas de reconstruction pour FL bilatérale, il a été réalisé des plasties économes au niveau du bourgeon médian. Toutefois l'origine vasculaire ne doit pas être négligée et sera discutée ultérieurement.

b) Berge de FP

Les prélèvements analysés étaient issus des avivements des luettes. En l'absence de fente, le voile du palais (dans sa partie membraneuse) et la luelette qui le prolonge dans sa ligne médiane sont constitués par une double lame de muscles striés composée du muscle pharyngostaphylin (transversal du côté buccal) et du muscle palato-staphylin (longitudinal du côté pharyngien). Sur les deux faces de ce plan musculaire, on trouve une couche presque continue de glandes

salivaires. La muqueuse proprement dite est formée par un épithélium malpighien épais du côté buccal et beaucoup plus mince du côté pharyngien.

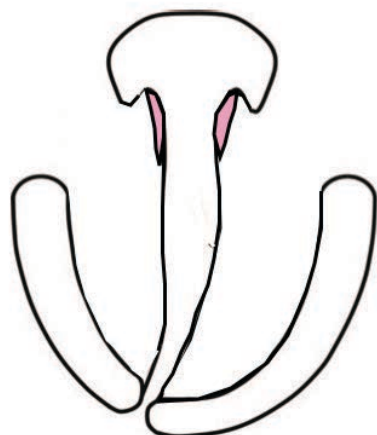


Figure 91 : Schéma opératoire d'une FLP. Les déchets opératoires issus de l'avivement de la lèvre sont en couleur.

Les résultats des analyses histologiques des 24 cas de FP sont présentés dans le tableau 27.

Tableau 27: Synthèse des résultats anatomopathologiques des 24 cas de berges de FP analysées.

Nombre de prélèvements analysés de palais		24 patients
Muqueuse	Face buccale oropharyngée: Malpighienne	5 parakératoses discrètes (21%) 6 hyperplasies (25%) 1 dystrophie (4%)
	Face naso-pharyngée (malpighienne, intermédiaire et respiratoire)	
Chorion		13 oedématisés(54%) 3 congestifs (12,%) 7 fibreux (29%)
Vaisseaux		Vaisseaux présents 18/24(dont 4/18 d'aspect normal) 5 Congestifs (21%) 4 ectasies (17%) 5 béants (21%) 2 dilatés (8%) 1 microthrombus fibrineux endocapillaire
Nerf		Présents 2/24
Glandes salivaires accessoires		Présentes 7/24 (29%)
Muscle		Cellules musculaires striées 8/24 (33%) dont 4 sans plan musculaire structuré et 1 dystrophique
Inflammation		Signes d'inflammation 17/24 (71%)

La muqueuse était hyperplasique 1 fois sur 4. (Fig 92)

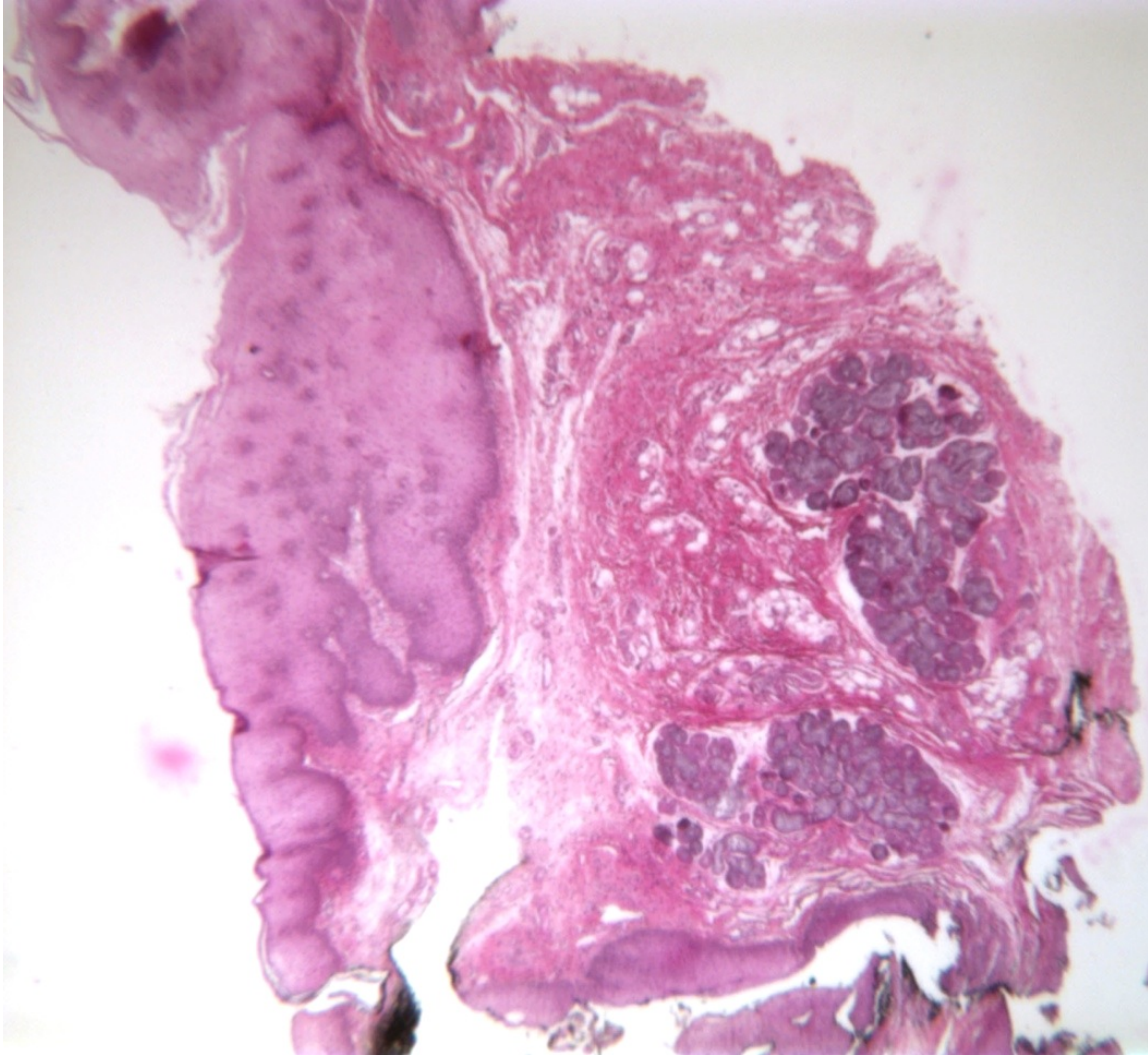


Figure 92: Hyperplasie de l'épithélium malpighien muqueux, 2 lobules salivaires accessoires en profondeur dans le chorion fibreux dans le cadre de prélèvement de berge de fente vélaire HES x 25

Le chorion était fréquemment œdématié. Ceci s'explique en partie par l'infiltration à la xylocaïne adrénalinée. Ce type d'anomalie n'a pas été constaté aussi fréquemment au niveau des lèvres. Ceci est dû à un volume habituel d'infiltration (quantité de xylocaïne en fonction du poids de l'enfant) plus important au niveau du palais et diffusant moins (espace « clos »).

Le seul moyen d'éliminer complètement la part de l'infiltration dans ce mécanisme serait de réaliser des prélèvements sans infiltration ce qui n'est pas envisageable à l'heure actuelle (Douleur, saignement).

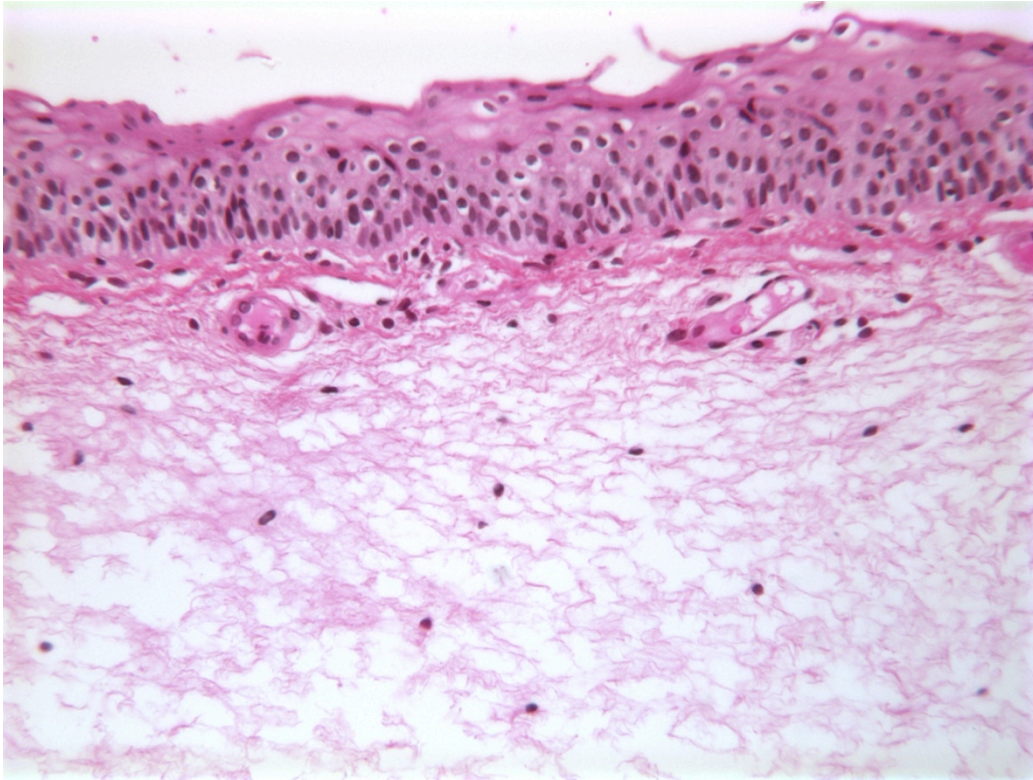


Figure 93: Œdème du chorion sur berges de fentes vélo-palatines (Veau type I) (HES x 250)

Dans un cas a été mis en évidence une hyperpigmentation muqueuse d'origine ethnique.

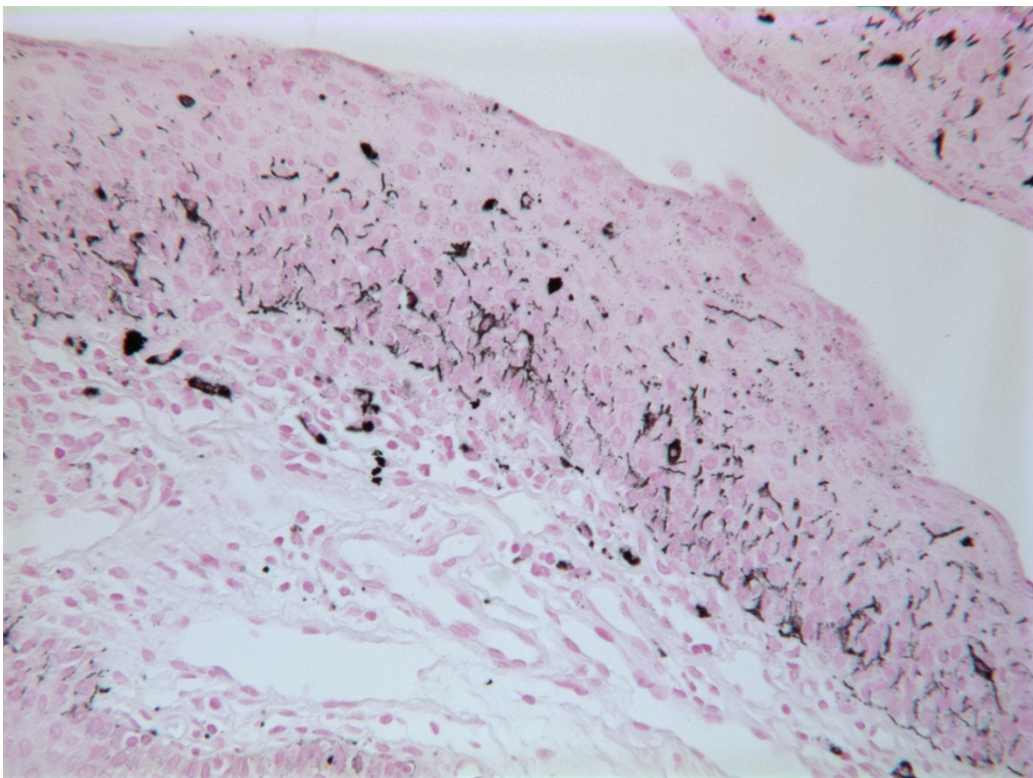


Figure 94: Hyperpigmentation muqueuse associant des mélanocytes dendritiques intra-épithéliaux et des mélanophages dans le chorion. (Fontana X 250) chez une patiente à peau noire porteuse d'une fente vélaire

La présence de muscle (33%) au niveau des prélèvements est inconstante. Ceci peut s'expliquer par :

- La topographie de la zone prélevée (pouvant être distale),
- L'angle de prélèvement (tangential)
- Mais aussi à la FP qui a elle seule est pourvoyeuse d'anomalie topographique des muscles du voile.

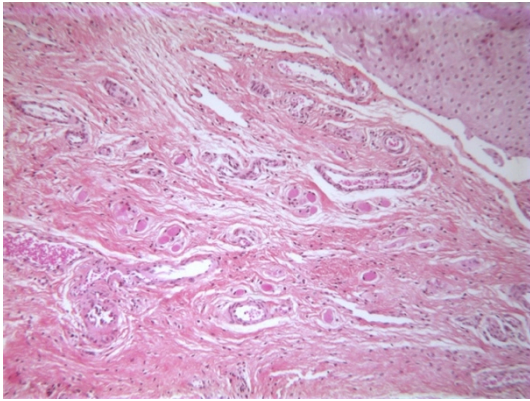


Figure 95: Aspect d'hypoplasie musculaire sur prélèvement de FVP. Quelques myocytes striés en coupe transversale dans du chorion fibreux, sans plan musculaire constitué. Capillaires superficiels sous l'épithélium, en profondeur vaisseaux de moyen calibre (artérioles et veinules). HES x 100

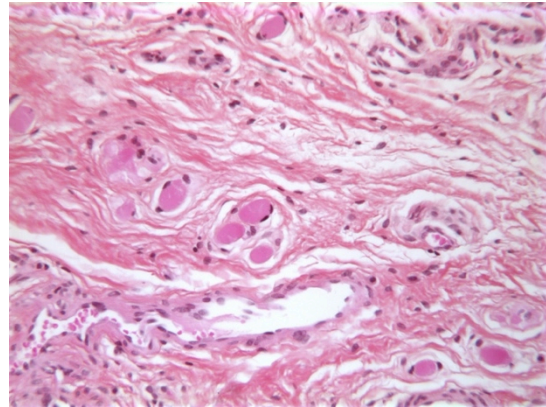


Figure 96: Aspects des myocytes striés en coupe transversale dans du chorion fibreux (HES x 250)

Les vaisseaux sanguins et lymphatiques ont été retrouvés fréquemment congestifs. (Fig 97-98) Ce sont des capillaires sanguins et lymphatiques dilatés à paroi normale et sans anomalie de nombre. L'infiltration de xylocaïne per-opératoire n'explique que partiellement ce phénomène.

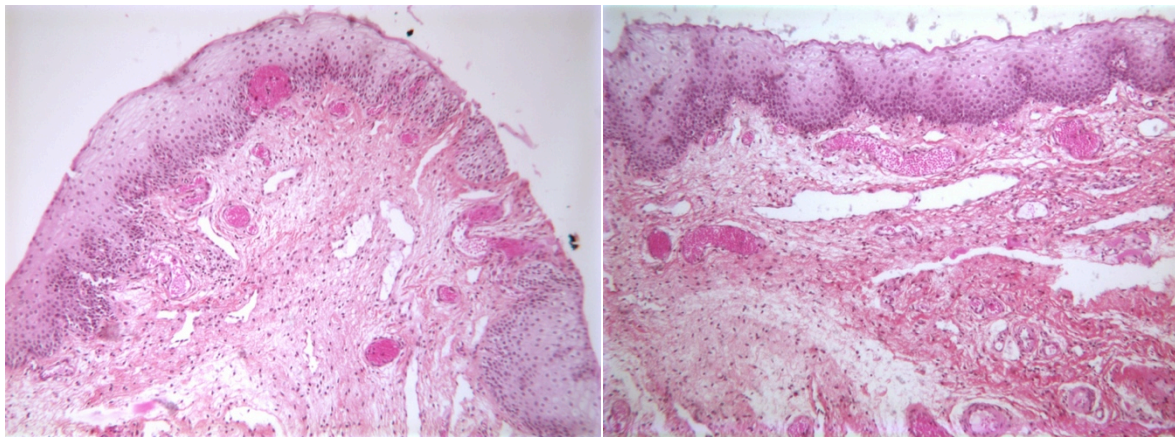


Figure 97 et Figure 98: Aspect des capillaires superficiels, sanguins congestifs et lymphatiques dilatés dans un chorion fibro-œdémateux dans le cadre de prélèvements de berge de fente vélo-palatine (Veau Type I) HES x 100

Les glandes salivaires étaient retrouvées 1 fois sur 3. (Fig 99) Leur présence dépendait principalement de la largeur et de la proximalité du prélèvement.

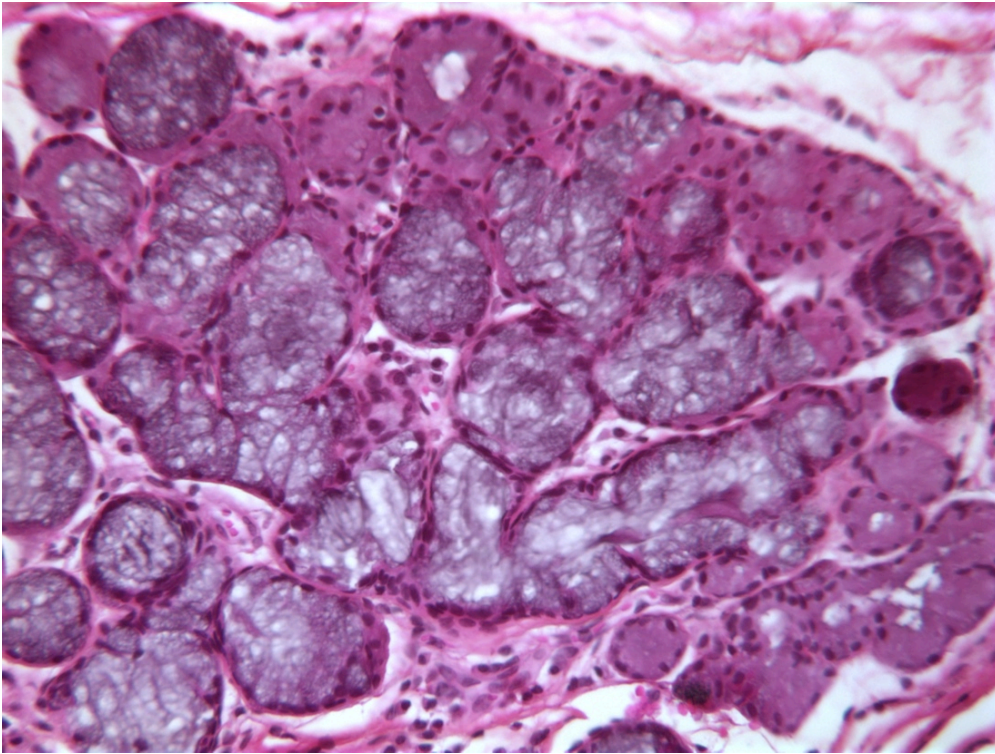


Figure 99: Aspect des glandes salivaires séromuqueuses dans le cadre de prélèvement de berge de fente vélaire HES x 250. Acini séreux rouges, acini muqueux bleuâtres, acini mixtes.

L'inflammatoire (assez modérée) était présente dans 71% des cas. Ceci est un phénomène intéressant pour deux raisons :

- Cette situation peut être délétère pour la cicatrisation post-opératoire.
- La physiopathologie de cette inflammation doit être recherchée. Les patients porteurs de fentes palatines ont un terrain propice aux infections comme les otites séro-muqueuses de part les dysplasies des méats des trompes d'Eustache. Toutefois ce n'est pas ce mécanisme qui peut expliquer l'inflammation. Les chirurgies palatines ont été réalisées tout au long de l'année, aussi bien en été qu'en hiver et aucun caractère saisonnier n'a été mis en évidence éliminant l'étiologie virologique hivernale.

En conclusion de ce chapitre sur l'analyse histologique, plusieurs éléments mériteront d'être discutés. Ainsi la composition vasculaire de nos prélèvements (fréquence, taille, morphologie), la répartition des vaisseaux entre berges externes et internes mais aussi la présence d'un micro-angiome seront autant de pistes de réflexions que nous aborderons dans le chapitre discussion.

4. Culture cellulaire sur prélèvements de berges de fentes faciales

Elsevier Editorial System(tm) for The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Fibroblast cell cultures from excised edges of cleft lip or palate: protocol description and DNA extraction

Article Type: Full Length Article

Keywords: Fibroblast culture cell, cleft lip, cleft palate, DNA extraction, genetic

Corresponding Author: Dr Caroline Francois-Fiquet, M.D

Corresponding Author's Institution: American Memorial Hospital CHU and EA 3801, UFR Medecine, University of Champagne Ardenne Reims

First Author: Caroline Francois-Fiquet, M.D

Order of Authors: Caroline Francois-Fiquet, M.D; Emilie Landais, MD; Laurence Lafon; Nathalie Ta Phi Than ; Christelle Mangeonjean; Pauline Feucher; Dominique Gaillard, MD; Marie-Laurence Poli-Merol, MD; Philippe N Guyen, MD; Martine Doco-Fenzy, MD, PHD

Manuscript Region of Origin: FRANCE

Abstract: Cleft lip and cleft palate (CLP) have multiple causes, one of them being genetics. Target genes were clearly identified. An interesting way for research is to analyze the expression of these genes in regards to the non-fusion of maxillary and nasal processes. As grounding bases for this work, the objective of this study was to accurately describe a simple, reliable and reproducible technique for fibroblast cell cultures from surgically excised cleft lip/palate edges during primary cleft repair surgery.

This monocenter, prospective study was conducted during primary repair of cleft lip/palate with tissue specimens extracted from surgically excised cleft edges. We then performed fibroblast culture cell and DNA extraction (QIAGEN® column Spin Protocol). Furthermore, we studied volume, concentration quantity and quality of DNA obtained (Agarose 1% gel).

After having collected their informed consent forms, 48 patients were included consecutively. We performed 107 fibroblast cell cultures (84 lip edges, 23 palate edges). In total we observed 5 cell culture failures. The mean duration of cell cultures was 18 days. We performed 102 DNA extractions. The average amount of DNA obtained post-extraction was 42.31 µg per sample, for a mean volume of 312.98 µl and concentration of 133.17 µg/µl.

Fibroblast cell culture from edges of CLP is an interesting methodology for obtaining good quality DNA in large quantities.

Our study shows that this technique is simple, reliable, and reproducible. This makes it a very useful tool for work on animal and fetal models but also for RNA extraction and expression analysis.

Introduction

Cleft lip and/or palate are the most common congenital craniofacial abnormalities. There are multiple causes (e.g. toxic, genetic, and environmental) to their etiology.

Fogh-Andersen was the first one in 1942 to underline the role of genetics in facial clefts. Since then several approaches have been used to refine this role: animal models, analysis of chromosomal rearrangements (karyotype) linkage studies, clinical-genetics studies, sequencing candidate genes... [1]

Many recent reviews of the literature reported the state of knowledge on gene mapping for cleft lip/palate and the identified candidate genes. [2-3-4-5] These recent discoveries were possible thanks to advances in genetic techniques, such as high-speed gene sequencing, but also international partnerships.

Most genetic results on this topic were obtained by blood analysis. Conversely, very few studies focused on tissue specimens from cleft lip/palate edges. However, this area seems a very promising ground for cytogenetic analyses, especially gene expression.

However, this zone remains difficult to access and samples are unique, small and extremely precious and can only be obtained during primary surgical repair. Fibroblast cell culture is a good alternative to obtain good quality DNA or RNA in proper quantity and in a simple manner. This technique, standardized for skin tissue samples has not been codified for clefts even if some authors referred to it in their studies. [6-7-8-9]

The objective of this work was the development and precise description of a simple, effective and reproducible protocol for fibroblast cell culture from excised edges of cleft lip or palate.

Material

Patients

This monocenter, prospective study included all patients operated for primary repair of cleft lip/palate in our department (started in January 2010 and still ongoing)

The target population was comprised of patients with cleft lip, cleft lip-palate (uni or bilateral) and cleft palate undergoing primary surgical repair of the lip or palate. The exclusion criteria were: patients undergoing secondary surgery or patients who refused genetic analysis.

The protocol was reviewed and approved by the Ethics Committee and patients were included in the study after their parents received complete information and signed an informed consent form.

Specimen extraction

During the surgical procedure for cleft lip-palate primary repair (Tennison modified Malek or Millard), human tissue specimens were taken from the surgically excised cleft lip/palate edges.

After lidocaine hydrochloride epinephrine injection at 1% and cold scalpel blade incision of the skin and mucous membrane, the excised edges remaining after primary surgical repair were kept (Fig 1). Inner and outer edges were differentiated.

During primary soft palate surgery (Veau Wardill Kilner or Furlow), after lidocaine hydrochloride epinephrine injection at 1%, leftover excised tissues, from scraping the uvula with scissors, were kept (Fig 2).

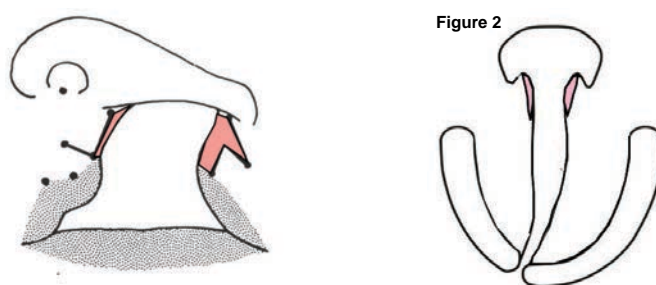


Figure 1: Representation of the primary cheiloplasty. Leftover tissues from excised edges are indicated in red.

Figure 2: Surgical drawing of a cleft lip-palate. Leftover excised tissues from scraping the uvula are indicated in color.

Method

Transport

In the operating room, tissue specimens were directly placed into sterile vials filled with medium (HAM/DMEM F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/F-12), Ultrosor G, and antibiotics (Penicillin/ streptomycin and gentamycin)) and transported directly to the genetics lab.

Cell cultures

All manipulations were conducted in a sterile environment.

At the lab, specimens were fragmented with a scalpel.

Then they were put into an enzyme substrate to trigger cell dissociation at 37°C.

This enzyme solution consisted of:

Type II Collagenase from clostridium histolyticum - Sigma Aldrich ®): one 1g vial

DNase (Deoxyribonuclease I from bovine pancreas - Sigma Aldrich ®) : two 100mg vials

Reconstitution with 720ml of culture medium

Addition of 72ml (10%) of fetal calf serum

This mixture was filtered and transferred into 100ml tubes (possibility of freezing if necessary)

The duration of cell detachment depended on the size of the tissue samples (i.e. between 1 and 4 hours).

Once the cells had detached, we proceeded with washing the mixture down with HAM/DMEMF12 and fetal calf serum to inhibit the action of Collagenase.

The samples were centrifuged at 1,000 rpm for 10 minutes.

After decantation, the bottom of the tubes was seeded with 6-7ml of growth medium (HAM/DMEM 12) in 25cm² dishes (GREINER type, Dominique Dutscher ®).

The growth medium was made of:

- DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/F-12) + Glutamax (1xconcentrate) GIBCO (Fischer Bioblock Scientific ®) supplemented with 4% of ULTROSER G (PALL FRANCE®) and reconstituted with 20ml of injectable saline solution.

- One vial at 0.5% of penicillin-streptococcus (20 ml "InVitrogen" vial, Fischer Bioblock ®, 10,000 units/ml of penicillin and 10,000 mg/ml of streptococcus.)

- One vial at 0.1% of gentamycin, 20 ml gentamycin and 0.50 mg/ml GIBCO, (Fischer Bioblock ®)

Dishes were placed in a tri-gas incubator (5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂) in a damp atmosphere at 37°C and in the dark.

The growth medium for cell culture was replaced at D5, and consisted in slowly emptying the dishes thus eliminating the dead cells left in suspension. We then added 8 ml of "fresh" growth medium.

Starting at D8, dishes were observed with the reversed microscope (magnifying x 40) in order to evidence and appreciate the size of the fibroblast cell clusters after the first week of culture. If the number and importance of these fibroblast clusters (80% of confluence) were satisfactory, the culture was amplified. If not, the dishes were replaced in the incubator for another day and observed daily until a possible exploitation of the cell clusters. The culture medium was then changed every two days from D9.

Culture amplification consisted in detaching the cells from the clusters where the mitotic activity only happened in the outside of the cluster. Once detached, the cells were put back

into culture as previously described. The objective was to obtain a uniform cell repartition over the entire dish surface and thus increasing cell divisions. Cell detachment was conducted with trypsin-EDTA (5%) (X10 concentrate) GIBCO (Fisher Bioblock®) diluted at 1:10 in Phosphate Buffered Saline (Biomerieux ®) pH7.2 (sterile saline solution of 1 PBS vial diluted into 1 liter of water). The day after trypsinization we studied cell confluence with the reversed microscope. The growth medium was then replaced by 8ml of HAM/DMEM+UG (ULTROSER G). Generally, the day after, cell confluence would reach 70 to 80% sign of an intense mitotic activity.

Some samples were frozen at this stage to study the feasibility of cell culture after thawing (as described in the protocol below). Other samples were used for DNA extraction.

Protocol for freezing, thawing and further cell culture

For cryopreservation, after dish trypsinization, the cells placed in the growth medium were centrifuged and the suspended ones discarded. We added a cryoprotective agent, the Recovery Cell Culture Freezing Medium InVitrogen (F GIBCO ®) containing DMSO (recovery cell culture freezing medium), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), FBS (bovine fetal serum), and calf serum. After suspension (vortex), the medium was placed 24 hours in the refrigerator at 4°C. Then, the sample was transferred into cryotubes (1.8ml cryotubes NUNC® by Dutscher or Thermo Scientific ® ref 127968) and placed into the freezer at -80°C for at least 48 hours. For long-term conservation we used liquid nitrogen.

For thawing, once the cryotube was taken out of the liquid nitrogen, it was thawed quickly in 37°C water. Once thawed, growth culture and bovine calf serum were added drop by drop and centrifuged. The resulting product was put into suspension, transferred into dishes and placed in the incubator at 37°C. At D1, the growth medium was changed and afterwards the protocol was strictly similar to the initial cell culture.

DNA extraction

DNA extraction from cell cultures was conducted with QIAGEN® column (Spin Protocol).

Control

For each harvesting we studied volume, concentration in µg /ml (NanoDrop 1000™ Spectrophotometer ®) and quantity of DNA obtained. DNA quality control was evaluated by Agarose 1% gel (after and before RNase treatment).

Results

After having collected their informed consent forms, 48 patients were included consecutively. 108 tissue samples were done (23 edges of cleft palate and 85 edges of cleft lip).

Out of the 108 samples, 107 were used for cell culture (in the operating room 1 specimen was not correctly placed into the container).

There were 4 culture failures for the first protocol and 1 culture failure in the second protocol (after primary culture, freezing, thawing and trying to put back into culture).

There was no significant difference regarding the frequency of failure between both types of tissue specimens (palate or lip) (Fisher test $p=0.5825$).

The mean duration of cell cultures (Fig 3) was 18 days. (Table 1) There was no significant difference in cell culture duration between external and internal edges of cleft lip (Student-t Test $p=0.52$).

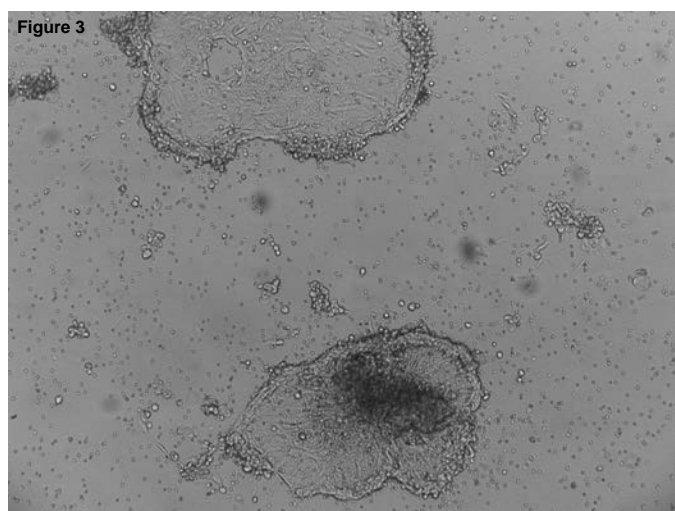


Figure 3: Fibroblast cell carpet observed under the reversed microscope after trypsination at D15 of cell culture (specimen taken from cleft lip edge)

Table 1: Table presenting cell culture results: mean duration of fibroblast cell culture and DNA extraction (quantity, concentration and volume) on edges of cleft lip and palate.

Table 1 Type of specimen	Number of specimen	Mean duration of cell culture	Number of DNA extraction	DNA quantity in µg	DNA concentration in ng/µl (nanodrop)	Volume (µL)
Total (lip+palate)	108	18 days (7-54d)	102	42.31 (1.92 – 191.08)	133.17 (9.62 -273.64)	312.98 (100- 1000)
Edge of cleft palate	23	17 days (8-39d)	23	47.81 (3.53 – 95.77)	154.51 (23.52 – 273.64)	308.50 (150 -500)
Edge of cleft lip	85	18 days (7-54d)	79	40.90 (1.92 – 191.08)	127.69 (9.62 -248.23)	314.19 (100 – 1000)
External edge of cleft lip	42	19 days (7-54d)	40	44.74 (1.92 – 191.08)	126.54 (9.62 – 205.42)	334.21 (100 -1000)
Internal edge of cleft lip	43	17 days (7-45d)	39	36.73 (11.84 – 74.47)	127.80 (52.24 – 248.23)	292.86 (100 -450)

Sixteen specimens out of the 108 initial ones benefited from the Freezing/thawing/Culture/Extraction protocol. The duration of the secondary culture was 8 days (5-17d).

We performed 102 DNA extractions. (Table 1). The average amount of DNA obtained post extraction was 42.31 μg per sample, mean volume of 312.98 μl and concentration of 133.17 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. DNA quality was satisfactory after RNase treatment (Figure 4-5)

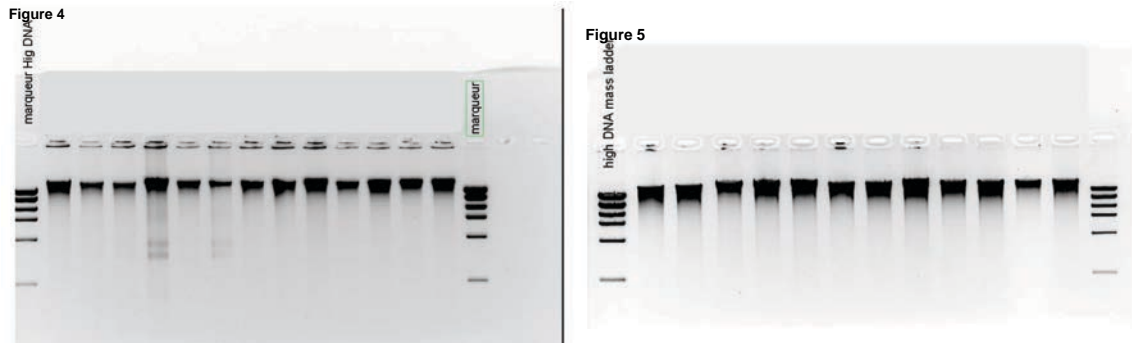


Figure 4: DNA quality control by migration on Agarose gel before

Figure 5: DNA quality control by migration on Agarose gel after RNase treatment. DNA migrations are cleaner after treatment.

Discussion

History of cytogenetics and cell culture

In 1900, a new science emerged that will later on be called cytogenetics. Human cytogenetics became medical science in 1959 when Lejeune, Gautier and Turpin discovered trisomy 21. The history of cell culture began in 1912 when Carrel designed tissue culture. Later on in 1956, Tjio and Levan used human fetal tissue culture and hypotonic shock technique to observe 46 chromosomes in somatic cells. [10] The basis for all works were chromosome preparations, obtained directly on tissues undergoing rapid cell division such as bone marrow, testicular tissue and neoplastic tissue ; but also cell culture. These cells could be for example lymphocytes (easy to harvest), fibroblasts, or amniotic cells. Several culture methods have been described, however the lymphocyte culture technique used nowadays is still derived from the one described in 1960 by Moorhead et al. [11]

The first fibroblast cell cultures were initially conducted on skin biopsies. Secondarily several other tissues were used such as aponeuroses, muscles, kidney and animal sexual organs. [12]

Due to the mixed nature (skin, mucous membrane and sometimes muscle) of our cleft edges specimens, the choice of fibroblast culture seemed the most appropriated. We were inspired by the skin tissue fibroblast culture to develop our protocol.

Thanks to cell culture, the small size of our surgically excised specimen was not a limiting factor. Thus, these rare and precious tissues became a good quality, accessible and above all reusable source of DNA available in sufficient quantity. In fact, these cultures can be reused on demand since the cells can be put back into culture.

Culture failure

We analyzed our culture failures.

Four cell culture failures were accounted for during primary culture (without freezing). Three happened during the same week including two specimens from the same patient. These failures can be linked to poor handling of the cultures. However, other tissue specimens excised at the same time and handled in the same manner progressed correctly. One factor that contributed to the success of the technique was the initial size of the population sample.

We want to underline that these cultures were conducted by different technicians with the same success rate, thus underlining the reproducibility of the technique.

We noted one cell culture failure after the freezing/thawing process. The risk is well known but it would seem relevant to conduct larger series with the freezing/thawing followed by culture to precisely study the frequency of these failure types.

DNA quantity and quality

The quality and quantity of our DNA extractions are very interesting for conducting cytogenetic techniques such as CGH Array. We also have the possibility of freezing the cell cultures in order to have a simple access to DNA from facial cleft edges to conduct further research studies for gene mutation.

Perspectives

Cleft lip-palate is the result of a fusion defect of the primitive tissue lobes (Frontonasal, Maxillar and Mandibular Prominences). The resulting birth defect reflects the locations and severity of individual fusion failures. Several mechanisms can be involved individually or in association during cleft genesis such as cell migration, proliferation, cell differentiation and/or apoptosis defect.

Several elements have been identified as essential to the fusion: epithelial-mesenchymal interactions and signaling molecules: FGFs, BMPs, TGFs, MSX, DLX, PAX, TBX. [2]

Gene expression analysis at fusion site seems an interesting pathway for research.

Thanks to the validation of this protocol we are now able to pursue RNA extractions with fibroblast cell culture from excised cleft edges.

Conclusion

Fibroblast cell culture from edges of cleft lip and or palate is an interesting methodology for obtaining good quality DNA in large quantities.

Our study shows that this technique is simple, reliable, and reproducible. This makes it a very useful tool for further studies on animal and fetal models but also for RNA extraction and expression analysis.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement

We wish to thank the American Memorial Hospital Foundation Inc. (Boston USA) for their help in the field of research on facial clefts.

Our sincere thanks to Laurence, Daniel, Christelle and Pauline for their technical help and patience in transmitting their knowledge on cell culture and DNA extraction.

Finally, we want to thank Bénédicte CLEMENT for her expertise in medical translations and her precious help these last years.

References

- [1] Fogh-Andersen P. Inheritance of harelip and cleft palate. Nyt Nordisk Forlag. Arnold Busk. Copenhagen, 1942: Dissertation.
- [2] Rahimov F, Jugessur A, Murray JC. Genetics of nonsyndromic orofacial clefts. *Cleft Palate Craniofac J* 2012;49(1):73-91.
- [3] Stuppia L, Capogreco M, Marzo G, La Rovere D, Antonucci I, Gatta V, Palka G, Mortellaro C, Tetè S. Genetics of Syndromic and Nonsyndromic Cleft Lip and Palate. *J Craniofac Surg* 2011;22(5):1722-6.
- [4] Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon MJ, Shaw WC. Cleft lip and palate. *Lancet* 2009;374:1773–85.
- [5] Singh Kohli S, Singh Kohli V. A comprehensive review of the genetic basis of cleft lip and palate. *Oral Maxillofac Pathol.* 2012 ;16(1) :64–72.
- [6] Baroni T, Bellucci C, Lilli C, Pezzetti F, Carinci F, Lumare E, Palmieri A, Stabellini G, Bodo. M. Human cleft lip and palate fibroblasts and normal nicotine-treated fibroblasts show altered in vitro expressions of genes related to molecular signaling pathways and extracellular matrix metabolism. *J Cell Physiol* 2010;222(3):748-56.
- [7] Bueno DF, Sunaga DY, Kobayashi GS, Agüena M, Raposo-Amaral CE, Masotti C, Cruz LA, Pearson PL, Passos-Bueno MR. Human stem cell cultures from cleft lip/palate patients show enrichment of transcripts involved in extracellular matrix modeling by comparison to controls. *Stem Cell Rev* 2011;7(2):446-57.
- [8] Bosi G, Evangelisti R, Valeno V, Carinci F, Pezzetti F, Calastrini C, et al. Diphenylhydantoin affects glycosaminoglycans and collagen production by human fibroblasts from cleft palate patients. *J Dent Res* 1998;77(8):1613-21.
- [9] Marinucci L, Balloni S, Bodo M, Carinci F, Pezzetti F, Stabellini G, et al. Patterns of some extracellular matrix gene expression are similar in cells from cleft lip-palate patients and in human palatal fibroblasts exposed to diazepam in culture. *Toxicology* 2009;257(1-2):10-6.
- [10] Longo LD. Classic pages in obstetrics and gynecology. The chromosome number in man. Joe Hin Tjio and Albert Levan. *Hereditas*, vol. 42, pp. 1-6, 1956. *Am J Obstet Gynecol.* 1978 Mar 15;130(6):722.
- [11] Moorhead PS, Nowell PC, Mellmann WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* 1960 ;20 :613.
- [12] De Grouchy J, Roubin M, Billardon C. *Ann. Genet* 1970;13:141-143.

5. Développement d'un modèle d'étude *in vivo* chez l'enfant d'analyse d'expression des gènes de l'angiogenèse dans les FL

a) Développement d'une technique d'extraction d'ARN sur prélèvements de berges de FL/P chez l'enfant

Il n'existe pas dans la littérature de description technique d'extraction d'ARN sur berges de FL/P. Il était donc indispensable, en prérequis, de valider une technique d'extraction d'ARN sur ce type de prélèvements.

Nous avons identifié 2 difficultés principales :

La taille des échantillons

La nature histologique des échantillons

Taille des échantillons

Avant de travailler sur l'extraction d'ARN sur les berges des FL, il fallait optimiser notre technique d'extraction sur des échantillons de même taille (petit). Pour des raisons de facilité d'accès, nous avons décidé de réaliser ces manipulations sur des ganglions (déchets de la tumorotheque, provenant de patients chez qui un diagnostic de lymphome avait été suspecté puis infirmé).

Nature histologique des échantillons

Après optimisation de la technique en fonction de la taille du prélèvement, une deuxième série de manipulations a été nécessaire pour optimiser l'extraction d'ARN sur des échantillons de même composition (cutanéomuqueux). Pour des raisons d'accessibilité nous avons choisi de réaliser ces manipulations sur des prélèvements de prépuce. Il s'agissait de prélèvements anonymisés obtenus à partir des déchets opératoires d'une posthécotomie totale.

La lyse cellulaire est une étape clef. Effectivement, la composition cutanéomuqueuse des prélèvements de berge de fentes faciales allait être un problème.

Plusieurs moyens de lyse cellulaire étaient disponibles:

- Pilon-mortier ou broyeur en présence d'azote
- Broyage : appareil automatique/ bille de céramique
- Pilon-mortier miniaturisé à usage unique
- Passage contraints dans des aiguilles de diamètres de plus en plus petits
- Passage d'amas cellulaires dans des colonnes Qiashredder

Nous avons souhaité débiter avec des techniques les plus simples (dissociation par mortier versus la dissociation au scalpel) et monter en complexité en fonction des résultats.

- *Optimisation de l'extraction d'ARN sur petit échantillon (ganglion et prépuce)*

Dans un premier temps nous avons optimisé de l'extraction d'ARN sur des échantillons de même taille, mais de nature différente : ganglions. (Tableau 28) Les principes des techniques d'extractions sont décrits dans **l'annexe I.F.**

Tableau 28: Synthèse des techniques, protocoles, résultats et modifications apportées dans le cadre des premières extractions d'ARN sur ganglions visant à optimiser la technique d'extraction

Type de manipulation/ Série de manipulation		Manipulation n°1	Manipulation n°2	Manipulation n°3	Manipulation n°4
But de la manipulation		Visualiser la taille du prélèvement	Optimiser le broyage et éviter la décongélation	Optimiser le rendement et qualité de l'ARN	Tester différents types d'extraction Trizol/ qiaschreder avec et sans Dnase
Nature du prélèvement		Ganglion	Ganglion	Ganglion	Ganglion
Technique de broyage utilisée		Scalpel	Mortier mis au congélateur	Mortier mis au congélateur	Mortier mis au congélateur+ homogénéisation à la seringue
Type d'extraction		Colonne Qiagen	Colonne Qiagen	Colonne Qiagen	Trizol +/- qiaschreder ou RLT+ β mercapto+/-qiaschreder puis colonne Qiagen pour tous
Proteinase K		Selon protocole laboratoire soit 40 μ l pendant 4h	Selon protocole Qiagen soit 10 μ l pendant 20 minutes	Selon protocole laboratoire soit 40 μ l pendant 4h	Trizol +/- qiaschreder NON RLT+ β mercapto+/-qiaschreder OUI
Dnase		Pas de traitement Dnase	oui	Pas de traitement Dnase	+ / -
Reverse Transcriptase		Non réalisée	Non réalisée	Non réalisée	RT Biorad
Résultats	[C] ARNng/ μ l	133 dans 40 μ l	2 dans 40 μ l	70 dans 40 μ l	Trizol +/- qiaschreder 117 ds 30 μ l/ 137 ds 30 μ l RLT+ β mercapto+/-qiaschreder 249ds 30 μ l/ 360 ds 30 μ l
	DO260/280	1,63	2,51	1,6	Trizol +/- qiaschreder 1,49/1,57 RLT+ β mercapto+/-qiaschreder 1,67/1,65
	qPCR ABL (nb copie)	Non réalisé	Non réalisé	Non réalisé	Trizol +/- qiaschreder 2364/439 RLT+ β mercapto+/-qiaschreder 789/1692
	Commentaires/synthèse	Contamination par ADN? Problème de décongélation du prélèvement pendant le broyage: Dégradation de l'ARN?	Floshes +++: pas assez de proteinase K Pas d'ARN Problème avec la Dnase?	Quantité et durée d'incubation protéinase K validée Toujours problème de décongélation du prélèvement pendant le broyage	Gel d'agarose: ARN dégradé en absence de Dnase Trizol: pb DO260/280 ou qPCR nb de copies insuffisant Méthode adoptée RLT+ β mercapto Toujours problème de décongélation du prélèvement pendant le broyage

Lors de l'étape de dissociation des tissus, les premières quantités d'ARN obtenues étaient assez bonnes avec 5 320 ng au scalpel et 2 800 ng au mortier. Nous avons toutefois suspecté la possible contamination par de l'ADN. Afin d'assurer une meilleure pureté des extractions et éliminer une éventuelle contamination par l'ADN, il a été décidé de réaliser un traitement à la DNase. Ceci a confirmé nos craintes puisqu'il ne persistait plus que 80 ng d'ARN.

Parallèlement au travail de purification de nos échantillons, nous avons décidé de changer la nature de nos prélèvements et ainsi de travailler sur du prépuce qui avait l'avantage d'avoir une nature et une taille plus approchante des prélèvements de lèvres. (Tableau 29)

Tableau 29: Synthèse des techniques, protocoles, résultats et modifications apportées dans le cadre de la deuxième phase d'extraction d'ARN réalisé sur prépuce (après la première phase d'optimisation sur des prélèvements ganglionnaires) visant à optimiser la technique d'extraction

Type de manipulation/ Série de manipulation	Manipulation n°5	Manipulation n°6	Manipulation n°7	Manipulation n°8	
But de la manipulation	Essai prépuce sans décongélation	Eliminer la contamination ADN	Confirmer la manip n°6	Confirmer la manip n°6	
Nature du prélèvement	Prépuce	Prépuce	Prépuce	Prépuce	
Technique de broyage utilisée	Pistolet Azote	Pistolet Azote	Pistolet Azote	Pistolet Azote	
Type d'extraction	RLT+ β mercapto+quiashreder + colonne qiagen	RLT+ β mercapto+quiashreder + colonne qiagen	RLT+ β mercapto+quiashreder + colonne qiagen	RLT+ β mercapto+quiashreder + colonne qiagen	
Proteinase K	oui (20 μ l pdt 20mn)	oui (20 μ l pdt 20mn)	oui (20 μ l pdt 20mn)	oui (20 μ l pdt 20mn)	
Dnase	non	oui	oui	oui	
Reverse Transcriptase	RT biorad	RT biorad RT Applied	Non fait	RT Applied RT VILO	
Résultats	[C] ARNng/μl	122 ds 30 μ l	108 ds 30 μ l	0 ds 30 μ l	31 ds 30 μ l
	DO260/280	1,3	1,54	0	1,54
	qPCR ABL (nb copie)	Non fait	RT biorad 4 000 RT Applied 34 000	Non Fait	RT Applied 19 224 RT VILO 17 595
	Commentaires/synthèse	Gel agarose: ARN visible mais contamination ADN importante Pistolet azote permet un broyage efficace et sans décongélation	Pas contamination ADN ARN présent non dégradé RT Applied + efficace que Biorad	Ethanol 70% en eau DEPC au lieu ethanol 100% ? Ou tissu très pauvre en ARN?	Qté ARN très faible : * d'où RT sur 0,4 μ g et non 1 μ g comme d'habitude * augmenter taille tissu? * essai sur Berge fente car rendement ARN variable en fonction du tissu

Le passage à la pulvérisation au pistolet associé à une diminution du temps d'action de la protéinase K et une homogénéisation par colonne QIAshredder a donné de meilleurs résultats avec des quantités d'ARN extrait allant de 930 à 3240 ng.



Figure 100: Pistolet de pulvérisation utilisé pour le temps de lyse cellulaire (première phase de l'extraction d'ARN)

- *Extraction d'ARN sur une première série de berges de FL*

La méthode d'extraction manuelle finale optimisée a été appliquée sur les prélèvements de berges de FL chez 10 de nos patients. (Tableau 30)

Les critères de qualités que nous nous sommes fixés étaient :

Pour la qualité : Valeur seuil RQI (équivalent du RIN pour l'expérian) :

Idéale entre 7-10 (vert)

Moyenne entre 5-7 (jaune)

Mauvais <5 (rouge)

Pour la PCR ABL, un nombre de copies :

Excellent si > 20 000

Bon si > 10 000

Suffisant si > 5 000

Insuffisant si < 5 000

Pour la quantité nécessaire :

Quantité globale : 100 ng d'ARN

Concentration : Nécessité d'avoir une concentration élevée pour pouvoir réaliser sans problème les manipulations à volume fixe (Ex RT)

Tableau 30: Synthèse des résultats d'extraction d'ARN sur berges de fentes labiales chez 10 patients

Patients	Type de berge de fente labiale	Spectrophotomètre			Experion				PCR	
		Concentration ARN (ng/µl)	Quantité ARN (ng)	Ratio DO 260/280	Concentration ARN (ng/µl)	Quantité ARN (ng)	Ratio 28S/18S	RQI	ABL	qté ARN (µg) pour RT vilo
1	Interne	54	1620	1,618	46,08	1382,4	0,38	2,7	7526	0,76
	Externe	72	2160	1,619	53,47	1604,1	1,41	2,8	8666	1
2	Interne	33	990	1,617	29,94	898,2	1,18	3,3	4448	0,46
	Externe	40	1200	1,581	25,16	754,8	1,03	7,3	7013	0,56
3	Interne	365	10950	1,628	277,4	8322	0,71	5,9	13169	1
	Externe	107	3210	1,632	71,82	2154,6	0,79	6	7056	1
4	Interne	308	9240	1,635	291,93	8757,9	1,17	7,4	7945	1
	Externe	483	14490	1,626	376,99	11309,7	0,97	6,8	13439	1
5	Interne	92	2760	1,577	62,24	1867,2	0,67	5,7	10827	1
	Externe	54	1620	1,645	54,19	1625,7	0,93	6,5	4554	0,75
6	Interne	97	2910	1,66	93,34	2800,2	0,78	3,6	6683	1
	Externe	170	5100	1,694	131,18	3935,4	0,86	6,3	14981	1
7	Interne	150	4500	1,573	196,59	5897,7	1,01	7,1	7215	1
	Externe	405	12150	1,646	439,15	13174,5	1,04	8,2	17929	1
8	Interne	92	2760	1,669	110,55	3316,5	0,81	2,9		1
	externe	60	1800	1,724	59,28	1778,4	1,39	3		0,84
9	Interne	166	4980	1,517	6344,13	190323,9	0	3,2	27130	1
	Externe	315	12600	1,627	168,8	6752	1,01	7	25401	1
10	Interne	145	4350	1,313	68,81	2064,3	0,95	6,6	19005	1
	Externe	161	4830	1,321	158,98	4769,4	0,53	3,2	12880	1

Cette première série a été pour nous encourageante malgré une hétérogénéité des résultats.

Concentrations et quantité d'ARN

Les concentrations obtenues étaient comprises entre 25 et 6344 ng/µL, et les quantités entre 150 et 14 490 ng. Concernant l'analyse quantitative de nos prélèvements, il existait une bonne corrélation entre les concentrations d'ARN données par le spectrophotomètre et celles du bio-

analyseur (expérior) sauf pour le patient 9. Nous avons donc décidé de choisir les valeurs de l'expérior comme référence.

La quantité d'ARN en ng n'est pas un facteur suffisant ; effectivement, les concentrations peuvent dans certains cas être un facteur limitant pour la suite des manipulations (même si la quantité semble correcte) car effectivement, des concentrations trop faibles peuvent empêcher la réalisation d'analyses nécessitant un volume fixe faible.

Qualité des ARN

Les ratios étaient très homogènes (1,6 correspond à 2 en nanodrop). Il existait par contre une hétérogénéité dans la qualité des extractions. Nous n'avons pas pu identifier de lien entre la qualité de l'ARN et l'origine des prélèvements (patients) ni entre qualité et moment (série, jour) de manipulation. Seulement 25% (4/16) des prélèvements étaient de bonne qualité (RQI>7), et parmi ces prélèvements, seulement 75% d'entre eux (3/4) avaient une quantité suffisante (>100ng) pour les manipulations ultérieures.

En abaissant notre seuil de qualité de l'ARN (RQI>5), 62% des prélèvements (10/16) pouvaient avoir une qualité suffisante pour la poursuite des manipulations. Parmi ces 10 prélèvements, seulement 6 avaient une quantité d'ARN suffisante (>100ng et de bonne concentration) pour les manipulations ultérieures. Il n'y avait pas forcément de corrélation entre quantité d'ARN et qualité de l'ARN.

Analyse des résultats

Les « échecs » d'extraction (concentration faible, et RQI<5) ont concerné 6 prélèvements. Les RQI étaient dans ce cas extrêmement bas et toujours inférieurs à 3,6 et les concentrations faibles (moyenne de 65 ng/μL expérior). Il n'existe pas toujours de corrélation entre quantité et qualité.

Concernant l'analyse de nos échecs d'extraction nous n'avons pu mettre en évidence qu'un seul facteur prédictif. Effectivement, même si les échantillons n'ont pas été pesés (pour limiter le risque de décongélation) leur taille (ou volume de l'échantillon) semblait être proportionnelle aux quantités obtenues. Nous en avons conclu que pour obtenir une quantité d'ARN de 1 μg, il fallait un prélèvement de la taille minimum d'un grain de riz.

En conclusion :

Actuellement nous avons réussi à développer une technique d'extraction d'ARN sur les déchets opératoires issus des plasties de la chéiloplastie primaire. Toutefois, quelques

problèmes subsistent. Effectivement les résultats en qualité et quantité d'ARN restent hétéroclites pour plusieurs raisons.

- La taille des échantillons.

Nous avons remarqué que la quantité obtenue d'ARN était clairement dépendante de la taille des échantillons. Nous ne pourrions toutefois pas augmenter la taille de nos prélèvements sans avoir de conséquences sur la reconstruction esthétique de la lèvre. Nous ne pourrions donc pas faire varier ce facteur.

- La stabilité de la température (congélation-décongélation-congélation) lors de l'extraction d'ARN.

Nous avons constaté au début de notre expérience la conséquence désastreuse des variations thermiques sur les extractions d'ARN. Afin de limiter ce problème une solution s'offre à nous par le biais de l'extraction d'ARN automatisée. Cette technique d'extraction, dont nous n'avions pas la jouissance au début de l'étude, présente plusieurs avantages que sont la stabilité thermique et le gain de temps. Effectivement, l'extraction manuelle d'ARN se caractérise par des manipulations extrêmement techniques et chronophages limitant les capacités d'analyse en grande série. Devant la possibilité actuelle de pouvoir travailler sur ce type de machine nous avons décidé de tester ce type d'extraction. Nous travaillerons par étapes. Tout d'abord, comme nous l'avions fait précédemment, avec des prélèvements de prépuce de taille identique à nos prélèvements. Puis secondairement, en cas de réussite de l'extraction d'ARN sur le prépuce, nous testerons ce type d'extraction sur des prélèvements de berges de FL. Cette extraction automatisée d'ARN devrait grandement nous aider dans nos manipulations aussi bien sur le versant quantitatif que qualitatif.

Nous avons décidé d'arrêter là l'extraction de l'ARN des autres prélèvements de berges jusqu'à obtention d'ARN de bonne qualité et quantité sur nos prélèvements témoins.

- *Extraction d'ARN sur les prélèvements témoins*

Nous avons réalisé une première série d'extraction d'ARN sur prélèvements témoins. (Tableau 31)

Tableau 31: Synthèse de la 1^{ère} série de résultats d'extraction d'ARN sur prélèvements témoins patients

Témoins	Spectrophotomètre			Experion				PCR	
	Concentration ARN (ng/µl)	Quantité ARN (ng)	Ratio DO 260/280	Concentration ARN (ng/µl)	Quantité ARN (ng)	Ratio 28S/18S	RQI	ABL	qté ARN (µg) pour RT vilo
1	20	600	1,629	16,5	495	1,44	3	1335	0,28
2	10	150	1,586					50	0,14
3	14,4	144	1,735	10,7	321	1,19	2,7	325	0,2

Nous avons eu un échec de l'extraction sur cette série. Après analyse, nous avons conclu que la taille de ces prélèvements était probablement trop petite. Le rôle des témoins étant primordial pour la suite du projet il fallait trouver une alternative :

- Prélèvement d'un morceau plus gros. Cette alternative n'était pas envisageable car un prélèvement plus important en taille aurait eu un préjudice sur un plan esthétique et donc éthique.
- Prélever dans un autre contexte (pas un patient porteur de fente). Par exemple, pourquoi ne pas prélever un morceau de lèvre lors d'un parage pour morsure (chien, cheval...). Cette alternative ne semblait pas réalisable pour au moins deux raisons :

La difficulté d'appariement en âge

Mais aussi la difficulté dans le cadre de l'urgence (nuit, week-end...) de réaliser la mise en azote en salle (disponibilité de l'azote) des prélèvements et le stockage en tumorotheque.

- Prélèvement de sang (déjà disponible dans le cadre du protocole). Cette proposition ne nous a pas semblé satisfaisante en raison de la nature différente des lignées cellulaires : cellules sanguines, et fibroblastes.
- Les prélèvements n'ayant pas été appariés, il semblait possible de pooler les prélèvements témoins pour espérer avoir une quantité d'ARN exploitable. C'est donc cette alternative que nous avons choisie.

Nous avons ensuite réalisé une deuxième série d'extraction sur prélèvements témoins. Ainsi les 3 prélèvements témoins restant ont été poolés. (Tableau 32)

Tableau 32: Synthèse de la 2^{ème} série de résultats d'extraction d'ARN sur pool de prélèvements témoins

Témoins	Spectrophotomètre			Experion				PCR
	Concentration ARN (ng/μl)	Quantité ARN (ng)	Ratio DO 260/280	Concentration ARN (ng/μl)	Quantité ARN (ng)	Ratio 28S/18S	RQI	ABL
Pool de témoins	115	3450	1,601	55,89	1676,7	0,9	2,9	4841

A la suite de cette extraction nous n'avons pas eu d'ARN en quantité et en qualité suffisante pour poursuivre les manipulations.

Deux solutions vont être développées afin de remédier à ce problème :

- Réalisation de nouveaux prélèvements identiques aux précédents (même taille, même contexte), mais réalisation d'un pool de témoin contenant un plus grand nombre d'échantillons (au moins 5).
- Extraction d'ARN à partir de cultures de fibroblaste issues de cultures cellulaires de peau saine de témoins appariés en âge.

b) Choix bibliographique des gènes d'intérêt et perspectives

La sélection des gènes d'intérêt s'est faite grâce à :

- L'expertise de notre laboratoire de recherche (EA3801) dans le cadre de l'expression des gènes de l'angiogenèse dans le cadre du protocole BALI sur les ischémies des membres inférieurs.

- A notre analyse sur les gènes de l'angiogenèse et sur les FL/P (cf Chapitre III de la 1^{ère} partie). Nous avons décidé de sélectionner des gènes de l'angiogenèse ayant des liens « directs » (gènes identifiés) mais aussi quelques gènes ayant des liens un peu plus « indirects » avec les FL/P (Ex VEGF, ...). Nous présentons dans le tableau ci-dessous la liste de ces gènes d'intérêt (Tableau 33) qui seront analysés sur le plan de l'expression de manière *in situ* au niveau des berges de FL/P.

Tableau 33: Gènes d'angiogenèse d'intérêt sélectionnés pour analyse d'expression au niveau des berges de fentes labio-palatines

Gene Symbols (NCBI)	Alternative titles, Symbols	OMIM	Références bibliographiques
Facteurs de croissance angiogénique			
<i>TGFBeta3</i>	<i>Transforming Growth Factor Beta 3</i>	190230	Reiter R, 2012 ; Saleem S, 2012 ; Lidral AC, 1998; Reutter H, 2008 ; Suazo J, 2010b ; Zhu J, 2010; Jugessur A, 2003b ; Yao Z, 2011
<i>TGFBeta2</i>	<i>Transforming Growth Factor Beta 2</i>	190220	Zhu X, 2012
<i>TGFBeta1</i>	<i>Transforming Growth Factor Beta 1</i>	190180	Zhu X, 2012
<i>TGFA</i>	<i>Transforming Growth Factor alpha</i>	190170	Ardinger HH, 1989; Shiang R, 1993; Shaw GM, 1996 et 1998 ;Jugessur A, 2003a et 2003b; Zeiger JS, 2005; Sull JW, 2009
<i>FGF2</i>	<i>Fibroblast growth factor 2 (FGFB), βFGF</i>	134920	Stanier P 2012, Riley BM 2007, Jansen RG 2009, Wang H 2013, Pauws E 2007
<i>PDGFC</i>	<i>Fallotein</i>	608452	Wu D 2012, Choi SJ 2009
<i>VEGFA</i>	<i>VEGFA, VEGF165 isoform</i>	192240	Patyna S 2009
Enzymes protéolytiques			
<i>MMP2</i>	<i>Collagénase type IV-A, Gélatinase A</i>	120360	Krivicka-Uzkurele B 2008
<i>MMP9</i>	<i>Collagénase type IV-B, Gélatinase B</i>	120361	Letra 2007
Cytokines			
<i>IL6</i>	<i>Interféron Béta-2, BSF2</i>	147620	
Inhibiteurs angiogéniques			
<i>THBS1</i>	<i>Trombospondin 1, TSP-1 (se fixe sur CD36 et CD47)</i>	188060	Heinonen TY 2009
<i>TIMP2</i>	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase 2</i>	188825	Letra 2012, Nokopensus 2011
Marqueurs angiogéniques			
<i>PECAMI</i>	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule -1 (CD31)</i>	173445	Muraoka N 2005 , Bueno DF 2009
Cibles angiogéniques			
<i>PDGFRA</i>	<i>PDGF receptor alpha, CD140a</i>	173490	Rattanasopha S 2012
<i>KIT</i>	<i>KIT tyrosine kinase receptor, CD117, c-kit</i>	164920	Abkowitz JL 1991
<i>KITLG</i>	<i>KIT ligand, Stem cell factor (SCF), Mast cell growth factor</i>	184745	Grefte S 2012, Cartens MH 2005
<i>KDR</i>	<i>VEGF-R2, Kinase insert domain receptor</i>	191306	
Autres			
<i>CXCR4</i>	<i>LPS-associated protein-3, CD184</i>	162643	Jakobsen LP 2009
<i>CD14</i>	<i>Monocyte differentiation antigen</i>	158120	Bueno DF 2009
<i>CD34</i>	<i>Hematopoietic progenitor cell antigen</i>	142230	Bueno DF 2009
<i>NOS3</i>	<i>eNOS, nitric oxide synthase 3</i>	163729	Shaw GM 2005, Blanton SH 2011
<i>FLT4</i>	<i>FMS Like Tyrosine Kinase 4</i>	136352	
<i>SKI</i>	<i>V-ski avian sarcoma viral oncogene homolog</i>	164780	Mangold E 2012, Lu W 2005
Contrôle gène de ménage			
<i>B2M</i>	<i>β 2 microglobuline</i>	109700	
<i>GAPDH</i>	<i>glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase</i>	138400	

c) Développement du protocole technique

Afin de réaliser l'analyse d'expression de ces gènes au niveau des berges de FL/P par rapport au côté sain non fendu nous avons décidé de faire réaliser des plaques à « Façon » chez Qiagen. Ces plaques seront composées d' :

- Un puits par gènes d'intérêt
- Un puits par gènes de ménages (2 gènes de ménages)
- Un puits ADNg
- Un puits RT (Reverse Transcription control)
- Un puits PPC (Positive PCR control)

La présence de ces trois derniers puits permettant d'éviter d'étudier les cas en duplicats ou triplicats.

L'ARN de qualité extrait sera placé sur ces plaques et passer dans l'appareil 7500 Fast Applied. L'objectif sera de comparer par analyse Q-PCR :

- L'expression des gènes au niveau de la berge de la FL par rapport d'un témoin (pool de côté sain non fendu ou culture cellulaire de fibroblaste issue de peau saine).

- L'expression de ces gènes entre la berge externe et la berge interne de la FL.

Les données seront exportées en format Excel© puis traitées par le logiciel Applied.

En conclusion sur cette dernière partie, l'élaboration de notre modèle nous conduit à présent à préférer des fragments plus importants aux dépens de ceux initialement destinés à l'analyse histologique. Notre modèle d'extraction, bien qu'encore soumis à quelques difficultés, nous permet aujourd'hui d'envisager la poursuite de l'étude par l'analyse d'expression des gènes de l'angiogenèse.

DISCUSSION

La physiopathologie des fentes labiales ne se limite pas à un simple problème de « cicatrisation ». Les mécanismes pouvant expliquer le défaut de fusion des bourgeons faciaux sont complexes. Deux mécanismes principaux, indépendants ou pouvant être associés, ont été mis en exergue. Il s'agit soit d'un défaut de développement tissulaire, et/ou d'un défaut d'apoptose pouvant intervenir sur des tissus normaux ou déficitaires. L'objectif de notre travail était de répondre à cette interrogation : « Est-il pertinent de penser que les FL/P puissent être en relation avec les mécanismes de l'angiogenèse ? » Grâce à notre étude méthodologique « exhaustive » de l'implication des gènes dans les FL/P, et à nos études rétrospectives et prospectives, nous discuterons dans ce chapitre de la place des gènes de l'angiogenèse dans les FL/P ainsi que des perspectives de recherche dans ce domaine.

Place des gènes de l'angiogenèse dans l'étiopathogénie des fentes labiales et/ou palatines

Voie des $TGF\beta$

Epithélium : Ces 20 dernières années, les différents mécanismes pouvant être incriminés au niveau de l'épithélium des berges médiales du palais lors de la fusion palatine (FuP) ont été un sujet de controverse. Les études suggèrent que la disparition de l'épithélium lors de la fusion au niveau de la ligne médiane est un processus complexe impliquant la mort cellulaire, des mécanismes de transition mésenchymato-épithéliale et de migration épithéliale. L'expression du $TGF\beta3$ au niveau de l'épithélium des berges médiales du palais lors de la FuP et de l'épithélium de la pointe de la cloison nasale est observée juste avant la réorientation des lames palatines et persiste jusqu'à la fusion (Iseki S, 2011).

Palais en formation : Les anomalies de $TGF\beta$ et de sa voie de signalisation sont responsables de FP en partie liées au défaut d'apoptose. Contrairement à la fusion labiale, que nous décrirons dans quelques lignes, et en l'état actuel des connaissances, aucune anomalie vasculaire issue de cette voie de signalisation n'a été clairement décrite comme impliquée dans la FuP.

Lèvre : Le facteur $TGF\beta3$ a été localisé par un immunomarquage au site de fusion labiale chez la souris (souris Fraser : incidence de 25% de FL). Il agit comme « accélérateur » de la fusion labiale et augmente le nombre de capillaires. Une concentration élevée de $TGF\beta3$ au niveau labial est un facteur favorisant de l'angiogenèse médié par FIK1 et CD31 (marqueurs des précurseurs des cellules endothéliales). $TGF\beta3$ est aussi un promoteur de la prolifération cellulaire comme le montre l'augmentation de l'expression de cycline D1 en présence de $TGF\beta$ (Muraoka N, 2005).

En conclusion $TGF\beta3$ est un gène pro-apoptotique au niveau du palais et pro-apoptotique

mais aussi pro-angiogénique (effet dose) au niveau de la lèvre. Il pourrait être impliqué aussi bien dans les hypothèses mécanistiques de défaut de fusion par défaut d'apoptose (mécanisme principal au niveau du palais), que de défaut de développement consécutif à un défaut d'angiogenèse (mécanisme se surajoutant au précédent au niveau de la lèvre). Le rôle précis de *TGFβ* concernant le développement du système vasculaire au niveau du palais n'a pour l'instant pas été étudié. Cette thématique pourrait être intéressante afin de préciser la place de *TGFβ* comme facteur angiogénique dans la genèse des FP.

Les anomalies de *TGFβ* ne se limitent pas au niveau des berges. Des polymorphismes constitutionnels ont été décrits dans la littérature au sein de cohortes de FL/P NS (Reiter R, 2012 ; Saleem S, 2012 ; Lidral AC, 1998; Reutter H, 2008 ; Suazo J, 2010b ; Zhu J, 2010). Nous n'avons pas retrouvé, dans notre série, d'anomalie quantitative par CGH Array de *TGFβ3*. Cette approche ne permet pas d'aborder les mutations ou les polymorphismes. Dans les années à venir, les études d'analyses d'expression de *TGFβ* au niveau des berges sur modèle embryonnaire animal vont se développer (Pelikan RC, 2013). Ceci nous encourage à poursuivre notre projet d'analyse d'expression de *TGFβ3* au niveau des berges chez l'enfant.

Nous n'avons pas retrouvé, dans notre série, d'anomalie de la voie des *TGFβ* mais nous avons observé une amplification du gène *SKI* chez un de nos patients. *SKI* est impliqué dans l'embryogenèse, il intervient à un stade très précoce du développement de l'aorte proximale par le biais de la régulation de la signalisation *TGFβ* (Doyle AJ, 2012). *TGFβ1* induit la phosphorylation et la translocation nucléaire de SMAD3, ainsi que l'association de SMAD3 avec la protéine SKI (Sun Y, 2009). *SKI* est un composant de la voie de signalisation *TGFβ*. Des études sur la surexpression de *SKI* suggèrent que ce gène est impliqué dans le développement du tube neural et de la différenciation musculaire (Amaravadi, 1997; Kaufman, 2000). Il a été souligné récemment chez l'animal (Li J, 2013) que *SKI*, en tant que corépresseur de la voie TGF-β/SMAD, jouait un rôle dans la progression des cellules musculaires lisses après une plaie vasculaire. De même *SKI* et *TGFβ3/SMAD* sont impliqués dans la différenciation des chondrocytes (Kim KO, 2012). Pour toutes ces raisons l'exploration de la voie des *TGFβ* dans l'étude de la place des gènes de l'angiogenèse dans les FL/P doit inclure le gène *SKI*. De plus chez le patient porteur de l'amplification de *SKI* il convient maintenant de poursuivre avec l'analyse d'expression des gènes *SKI* et *TGFβ* *in situ*.

TGFA, PDGFC et PDGFRA, Voie des FGF, MMP et TIMP2

La plupart des publications récentes et de ces dernières années concernant *TGFA* traitent des polymorphismes (Zhu J, 2010; Ehlers Bertoja A, 2008 ; Vieira AR, 2006 ; Passos-Bueno MR, 2004) ou des interactions de ce gène avec les facteurs environnementaux comme

le tabagisme maternel et les facteurs nutritionnels vitaminiques (Folates) (Shaw GM, 1996 et 1998 ; Jugessur A, 2003a et 2003b; Zeiger JS, 2005; Sull JW, 2009). Contrairement à d'autres gènes d'intérêt il y a peu de travaux sur le mode d'action de ce gène dans la genèse des FL/P. Cette voie n'ayant pas été explorée, il s'agit d'une piste intéressante pour les études mécanistiques. Il semble utile de préciser, chez l'animal, la place de ce gène dans l'embryogenèse et son lien et ses interactions avec d'autres gènes car *TGFA* interagit avec *IRF6* qui pourrait être impliquée dans 1 à 10% des FL/P (Letra A, Fakhouri W, 2012).

PDGFC et *PDGFRA* jouent chacun un rôle majeur dans la palatogenèse et donc dans la genèse des FP. Ils présentent des liens forts avec d'autres voies de l'angiogenèse également impliquées dans les FL/P (*TGFβ*, *MMP*, *TIMP2*, *FGF*). Les recherches dans ces domaines sont à développer afin de préciser la place de l'angiogenèse dans la formation des FL/P.

Dans notre étude rétrospective, un diagnostic de syndrome de Kallmann a été posé devant la présentation phénotypique du patient et grâce à l'identification d'une mutation du gène *FGFR1*. Les mutations en *FGFR1* et *FGFR2* sont observées dans plusieurs syndromes associés à des FL/P, comme le syndrome de Kallmann, Pfeiffer, d'Apert (Mutation *FGFR2* : syndrome d'Apert avec 76% de FP), et de Crouzon. La voie des *FGF*, qui est une voie indispensable et ubiquitaire, a fait la preuve de son implication dans les formes cliniques syndromiques de FL/P, mais l'étude de son implication dans le cadre de l'angiogenèse reste encore à préciser. Ces zones d'ombres seront probablement éclaircies dans les années à venir avec les analyses de séquençage de l'exome et les études d'association génomique.

MMP et de *TIMP2* sont des candidats sérieux dans l'étude de l'angiogenèse dans les FL/P. Ainsi, des polymorphismes de *MMP3*, *MMP9* et *TIMP2* ont été décrits chez l'homme (Letra A, 2012 ; Letra A, Silva RA. 2007 ; Letra A, da Silva RA, 2007 ; Nikopensius T, 2011).

MMP 2 et *9* sont connus pour leur rôle dans les processus de cicatrisation et d'angiogenèse. Les *MMP* ont été identifiées comme liées à la phase de dégradation protéolytique de la matrice extra-cellulaire (Blavier L, 2001 ; Robbins JR, 1999) et il existe des liens entre *MMP13*, *MMP2* et *TIMP2* et *TGFβ*, les récepteurs de PDGF, *TGFA*. Même si les mécanismes ne sont pas pour l'instant établis précisément, cette voie de recherche mérite elle aussi d'être développée.

TBX1* et *VEGF

Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) est une protéine ayant un rôle primordial dans l'angiogenèse. Comme son nom l'indique, VEGF agit essentiellement sur les cellules de l'endothélium vasculaire. Toutefois, il exerce aussi une action sur un nombre limité d'autres

cellules comme par exemple lors de la stimulation de la migration monocyte/macrophage. *In vitro*, le VEGF stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Il augmente également la perméabilité microvasculaire. Il est d'ailleurs parfois nommé facteur de perméabilité vasculaire. Cinq formes ont été identifiées, VEGF-A à VEGF-D ainsi que le PlGF (placental growth factor). *VEGF-A* est connu pour son rôle dans le développement des cancers. Il n'a pas été directement décrit comme lié aux FL/P ; toutefois, deux pistes de recherche ont un intérêt pour la discussion :

- Une étude chez le rat et le lapin concernant les effets tératogènes du Sunitinib malate (SU11248, SUTENT®, Pfizer, a potent VEGF signaling inhibitor with multi-targeted angiogenic activity) a révélé que ce traitement entraînait l'apparition de FL et de FP chez le lapin pour des doses \geq à 1mg/kg/jour. Toutefois, l'effet tératogène sur la lèvre et le palais n'était pas isolé (Patyna S, 2009) et concernait aussi d'autres organes.

- Plusieurs travaux sur TBX1 ont suggéré un lien indirect dans le cadre des FP S. La famille T-box joue un rôle dans la formation des tissus et des organes durant l'embryogenèse. La protéine TBX1 est nécessaire au développement artériel du cœur, de la face, du cou, du thymus et de la thyroïde. Le gène codant pour cette protéine se situe sur le chromosome 22 en *22q11.21* (Yagi H 2003). Les microdélétions dans ce locus sont responsables du syndrome de Digeorge. Dans les travaux de Yagi la piste de la pathologie micro-vasculaire embryologique avait été évoquée. Chez l'animal (souris, zebrafish), il a été constaté que l'expressivité du syndrome de Digeorge et l'expression de TBX1 étaient fonction des isoformes de VEGF. Ainsi, la diminution de la quantité de VEGF aggravait les malformations artérielles induites par l'inactivation de TBX1 (Stalmans I. 2003). De même chez l'homme, l'allèle -1154G->A de VEGF est préférentiellement lié aux cas de délétion 22q11 ayant les anomalies cardiovasculaires sévères. Toutefois, la présence d'une FP n'est pas constante dans le syndrome de Digeorge. Il existe entre autre des formes avec incompetence vélo-pharyngée sans fente. Et à l'inverse, il existe de nombreux patients ayant un phénotype Digeorge-like sans délétion de *TBX1*. Il reste des précisions phénotype-génotypes à apporter dans le cadre de ce syndrome. Mais actuellement, nous ne pouvons affirmer que VEGF a réellement une place dans la genèse des FP. Il semblerait que ce gène soit uniquement un marqueur des anomalies vasculaires du syndrome de Digeorge. Les études chez les animaux se sont focalisées sur les anomalies vasculaires mais peu ou aucun élément n'a émergé sur la fréquence et la corrélation avec les phénotypes FP. Il semble indispensable de développer des modèles d'étude concernant l'analyse spécifique sur la place du VEGF (par l'intermédiaire du TBX1) dans la genèse des FP et non uniquement dans le syndrome de Digeorge.

Certaines observations soulignent le fait que les voies de signalisations du *VEGF* jouent un rôle dans le développement osseux par leurs actions activatrices du développement vasculaire durant la formation osseuse endochondrale, et régulatrices sur la survie et l'activité des cellules chondrogéniques et ostéogéniques. Le *VEGF* jouerait un rôle direct sur les chondrocytes pour les protéger de l'hypoxie. Il participe aussi au remodelage osseux post-fracturaire par le biais des mêmes mécanismes. Les capacités de développement osseux du *VEGF* font de ce facteur de croissance une piste intéressante de travaux dans le cadre de la chirurgie nécessitant un remodelage osseux (lors des greffes osseuses par exemple).

En conclusion de ce chapitre nous savons donc aujourd'hui que les facteurs de croissance *TGF β* , *FGA*, *PDGFc*, *PDGFRa*, *FGF*, *FGFR1*, *FGFR2* et les enzymes protéolytiques MMP et TIMP2 sont impliqués dans la genèse des FL/P (P>L). Le rôle de *VEGF* reste encore à préciser. Par ailleurs 18 gènes impliqués dans les FL/P interagissent aussi avec ceux de l'angiogenèse. Au total 1/3 des gènes potentiellement impliqués ou identifiés dans les FL/P S ou NS sont soit des gènes de l'angiogenèse soit en lien avec eux. (Fig 101) Même si les principaux gènes de l'angiogenèse impliqués dans la formation labio-palatine sont des gènes participant à de nombreuses activités biologiques (Fig 61), et que leur implication n'est peut-être pas toujours synonyme de défaut d'angiogenèse, ils restent toutefois une voie de recherche indéniable. De plus, leurs interactions avec les facteurs environnementaux en font de bons candidats dans le domaine de la prévention.

Schéma de synthèse de l'articulation entre les différents gènes de l'angiogénèse impliqués dans la gènèse des FL/P

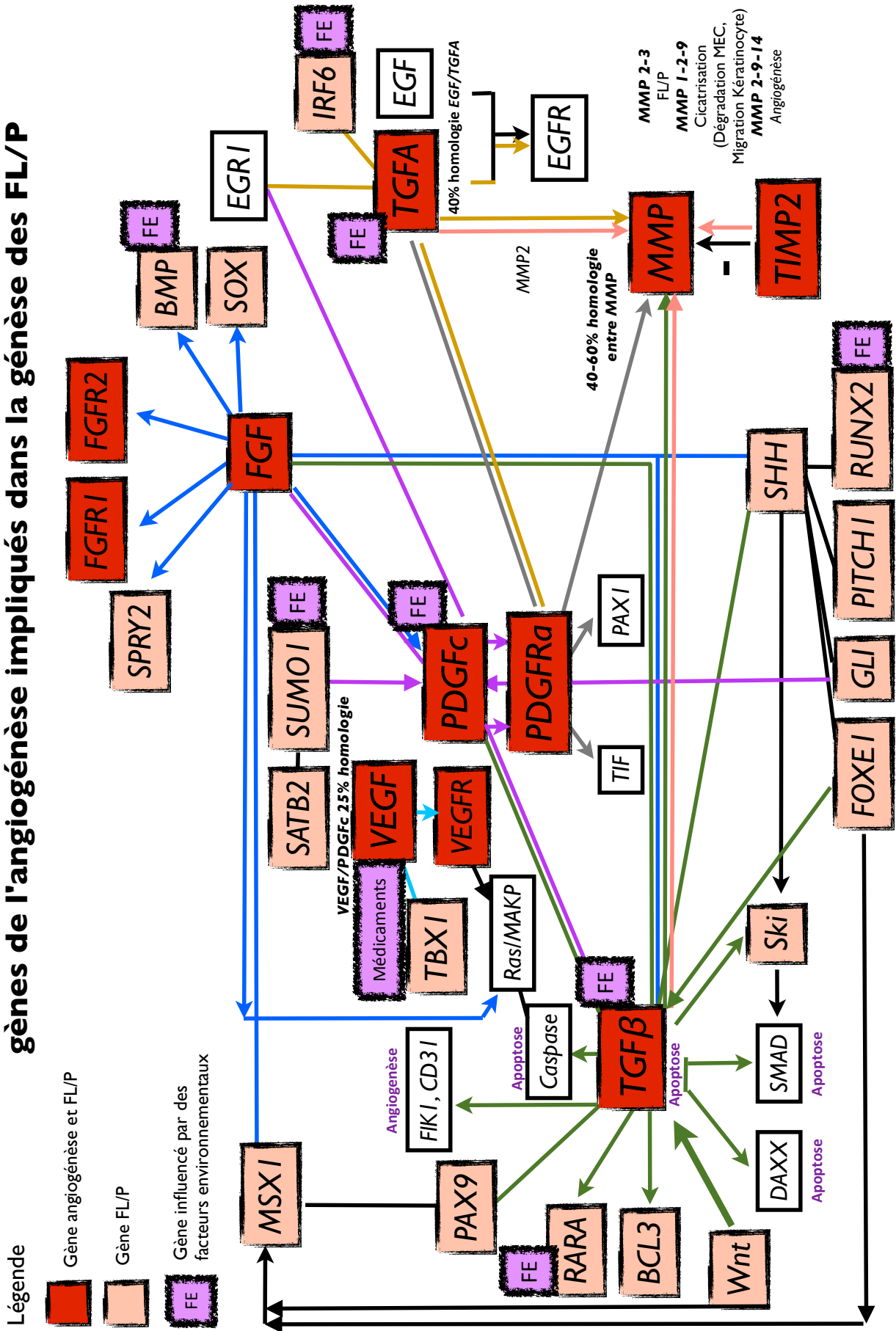


Figure 101: Schéma de synthèse de l'articulation entre les différents gènes de l'angiogénèse impliqués dans la gènèse des FL/P

Anomalies vasculaires et FL/P

Nous nous sommes intéressés au nombre de vaisseaux en regard des berges des fentes labiales ou palatines. Victor Veau décrit la berge interne comme « aplatie et déficiente car il manque du muscle. Au contraire, la berge externe est constituée par une lèvre charnue. » (Veau V, 1938) Sur un plan chirurgical, ces observations nous ont conduit à développer des techniques de plastie visant à ramener du tissu de la berge externe (charnue) dans la berge interne (hypoplasique). Une de nos hypothèses de travail est basée sur cette constatation clinique. La berge interne hypoplasique pouvait être la conséquence d'un défaut vasculaire lié à l'angiogenèse. Dans le cadre de nos analyses anatomopathologiques sur ces berges, lieu du passage théorique de l'arcade vasculaire philtrale (Fig 36), les vaisseaux n'ont été retrouvés que dans 40% des cas. Il n'y avait pas de différence significative quant à la fréquence des vaisseaux entre berge interne (53% en cas de fente unilatérale) et berge externe (37% en berge externe toutes formes confondues). La présence plus fréquente des vaisseaux au niveau des berges internes dans les formes unilatérales dans notre étude est contradictoire avec l'hypothèse morphologique évoquée plus haut. Cependant cette constatation peut être la conséquence de nombreux facteurs.

- L'orientation précise des vaisseaux par rapport aux berges de la fente n'est pas identifiée dans notre série. Cette analyse anatomique vasculaire est peu décrite dans la littérature. (Millard RJ, 1977 ; Zhang KQ, 1994) Il existe donc de grandes incertitudes sur la répartition et la qualité des vaisseaux au niveau des berges des fentes. L'analyse anatomique sur des patients non opérés pourrait être intéressante mais l'accessibilité à ce type de dissection est évidemment très limitée. L'étude tomodensitométrique de la vascularisation des berges de la fente, outre les limites dues à la taille des enfants, n'a pas de place de façon prospective d'un point de vue éthique. Il existe cependant dans certaines équipes une imagerie réalisée antérieurement qui pourrait éventuellement être réanalysée dans ce sens.

- La nature même de nos prélèvements (muqueuse et/ou peau). La description des vaisseaux a été faite dans seulement 40% des cas toutes formes confondues, mais faut-il conclure que 60% des cas avaient une déficience vasculaire ? Probablement non, car nous avons aussi constaté que le versant muqueux était souvent plus vascularisé que le versant cutané. Les deux versants n'étaient pas toujours représentés sur les prélèvements, ces derniers étant probablement inconstamment transfixiants par le fait d'un prélèvement tangentiel. L'économie cutanée sur la berge interne explique la prédominance du versant muqueux sur ce site et ainsi notre biais d'échantillonnage.

Au niveau du palais nous avons surtout constaté des anomalies morphologiques. Les capillaires veineux ou lymphatiques étaient anormaux dans 78% des cas (congestifs, béants,

dilatés... mais toujours à paroi normale). (Fig 103) L'infiltration à la xylocaïne adrénalinée ne pouvait expliquer qu'en partie cette situation et l'hypothèse d'une déficience tissulaire locale ne pouvait être exclue. Il existe une corrélation entre l'aspect histologique constaté dans notre série et celui observé dans certaines malformations capillaires bénignes de l'enfant, comme par exemple l'aspect des capillaires des angio-kératomes. (Fig 102) Il s'agit de malformations capillaires bénignes associant des capillaires ectasiques dans le derme et une hyperkératose épidermique. Nos analyses ne se situent pas dans un contexte cutané mais au niveau d'une muqueuse en position intra-buccale toutefois cette ressemblance reste un élément intéressant.

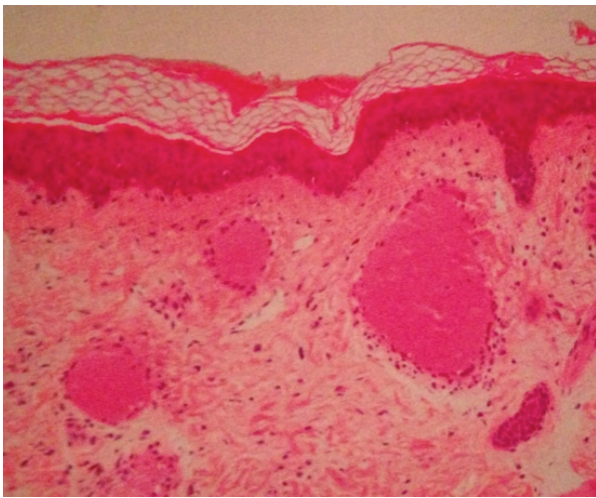


Figure 102: Aspect histologique de malformation capillaire chez l'enfant dans le cadre des angio-kératomes

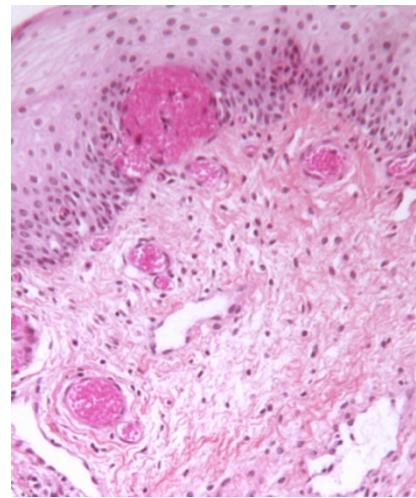


Figure 103: Aspect histologique berge palatine (HES) (Enjolras O, 2007)

Dans le modèle murin, en cas de fentes chez les embryons de souris, on retrouve un réseau vasculaire dilaté dans la région antérieure naso-palatine correspondant à la persistance d'une structure vasculaire plus primitive. Les vaisseaux sanguins palatins étant sous-développés et immatures dans les FLP (Amin N, 1994), la formation du palais est donc la conséquence de plusieurs phases successives :

- Dans un premier temps, avant la réorientation des lames palatines, les vaisseaux doivent être en quantité suffisante, avec un plexus vasculaire plus dense sur le plan oral que nasal.
- Dans un deuxième temps doivent apparaître d'importantes dilatations terminales dans le plexus vasculaire au niveau de l'extrémité du bord médial des lames palatines en cours d'élévation.
- Puis pour finir, un changement doit se produire au niveau de la paroi des capillaires (maturation des vaisseaux) au niveau du bord des lames palatines au moment de l'extension médiale et lors de la fusion.

Les anomalies que nous avons constatées sur nos lames pourraient correspondre à un état immature décrit dans la genèse de la formation du palais. Il reste toutefois difficile de connaître les mécanismes qui sont responsables de l'arrêt de l'évolution naturelle de ces capillaires. Des disparités de calibre de l'artère palatine ont été décrites chez l'animal comme pouvant être éventuellement responsable d'un apport sanguin insuffisant dans la région nasopalatine dès les premiers stades embryonnaires. Ces disparités de calibre pourraient être responsables de l'arrêt du développement. Nous n'avons pas ici réalisé d'analyse anatomique ni histologique des vaisseaux d'amont. Cette analyse conjointe mérite d'être proposée dans des études ultérieures.

Enfin la présence du micro-angiome au niveau d'une berge externe de lèvre chez une de nos patientes mérite également d'être soulignée. Il n'est pas rare de retrouver sur les ponts cutanés des petites télangectasies ou des petits angiomes qui sont enlevés lors de la chirurgie. L'association FL/hémangiome a déjà été décrite dans la littérature (Morioka D, 2003 ; Sarifakioglu N, 2003 ; Ratageri VH, 2002). Il est possible d'envisager que l'hémangiome puisse être le reflet de l'hypoplasie tissulaire par défaut de vascularisation, elle-même responsable du défaut de fusion. Nous ne pouvons conclure sur un seul cas mais des hypothèses sont possibles. La recherche dans ce domaine reste ouverte.

Perspectives de recherches étiologiques

L'un des objectifs principaux de ce travail était de réaliser une approche étiologique génétique des FL/P.

- Analyse des gènes impliqués ou potentiellement impliqués dans les FL/P.

Ce travail de sélection bibliographique nous a permis de mettre en exergue 95 gènes d'intérêt. Pour chaque gène nous avons précisé sa spécificité phénotypique (forme syndromique ou non, FL/FP/FLP/FL/P), le type d'anomalie génétique identifiée (mutation, délétion, variant...), ses éventuelles interactions avec d'autres gènes ou facteurs environnementaux, mais aussi l'existence de modèles animaux. Ce travail de fond et ces connaissances nous permettent dès à présent d'affiner nos analyses génétiques au quotidien mais aussi d'envisager de nouveaux projets de recherche. Un certain nombre d'anomalies (délétion, amplification) ont été retrouvées grâce à la CGH Array. Toutefois, cette dernière ne permet qu'une étude quantitative des anomalies génomique et ne détecte pas les mutations. Afin de compléter notre travail et grâce à la « collection » biologique que nous avons constituée, nous avons déposé un projet d'étude multigénique ciblée s'appuyant sur le protocole d'étude ici développé (**Annexe II. B**). Ce travail nous permettrait d'analyser en un temps l'ensemble des 95 gènes

que nous avons identifiés et notamment les gènes de l'angiogenèse. Le projet jeune chercheur faisant appel à un sous traitant a été déposé et a été refusé pour des raisons financières. Un nouveau projet a été déposé sous forme d'AOL. La discussion de l'intérêt de l'analyse multigénique ciblée ou de l'analyse Whole exome reste d'actualité. Si notre choix s'est porté sur la première, la rapidité d'évolution des techniques de séquençage et la diminution des coûts inhérents à celle-ci nous conduira sans doute à utiliser le Whole exome. Nous avons déposé un premier projet dans le cadre de l'appel d'offre de « High throughput sequencing and rare diseases, Mutation platform initiative » (**Annexe II. C.**) Ce dernier n'a pas été retenu pour le caractère hétérogène de la population d'étude initialement proposée. Nous allons travailler sur un nouveau projet plus ciblé concernant les études familiales de formes syndromiques non étiquetées comme par exemple pour notre forme familiale de cataractes congénitales bilatérales et de fentes palatines.

- Etude prospective d'analyse génomique constitutionnelle.

Au sein de notre cohorte, 48 patients ont déjà pu bénéficier d'une CGH Array. 18 n'avaient pas d'anomalies significatives, 30 patients (62,5%) étaient porteurs d'une ou plusieurs variations non connues comme polymorphiques. L'étude familiale de nos cas est indispensable afin de pouvoir préciser le caractère hérité ou *De Novo* de ces variations. Ce n'est qu'après cette étape que nous pourrons affiner l'analyse entre CNV bénins et pathologiques, ces derniers étant le plus souvent *De Novo*. Dans le cadre de notre étude nous avons dans un premier temps réalisé une approche monogénique. Toutefois il semble intéressant d'envisager de réaliser une étude polygénique. Ce type d'approche a déjà été développé dans le cadre d'autres pathologies comme par exemple l'autisme. Elle vise à déceler la présence d'un terrain génétique qui en cas d'association de plusieurs variants génétiques abouti au phénotype. Dès à présent certaines variations, certes de petites tailles, ont attiré notre attention car elles sont en lien avec des gènes impliqués dans les FL/P (*SKI, LARGE, MSX2*). Ces variations devront être étudiés avec attention.

Dans les années à venir l'augmentation de la taille de notre cohorte nous permettra d'enrichir ce travail et de rechercher la possibilité d'une récurrence des variations, préciser le caractère polygénique et/ou de découvrir de nouveaux *loci*.

- Etude prospective chez l'enfant d'analyses in situ:

- Le protocole de culture cellulaire de fibroblaste que nous avons réalisé sur les berges nous conduit aujourd'hui à une expérience de plus d'une centaine de cultures. Nous avons optimisé

et nous maîtrisons une technique fiable et reproductible. Grâce cette cohorte de patients une grande quantité de matériel est disponible pour de prochains travaux. Nous avons de l'ADN extrait des cultures, mais ces dernières peuvent également être une source d'ARN pour les analyses d'expression.

- L'analyse histologique des berges de FL/P sur 135 prélèvements issus de la cohorte a déjà été discutée dans le paragraphe précédent.

- L'établissement du modèle d'étude *in vivo* chez l'enfant de l'expression des gènes de l'angiogenèse aux niveaux des berges des FL nous a permis de progresser dans nos types de prélèvements, nos techniques d'extraction d'ARN, notre choix des gènes d'intérêt, et dans notre protocole d'analyse d'expression. La phase d'étude de l'expression des gènes de l'angiogenèse qui constitue l'aboutissement d'une partie de nos travaux est en cours. Il sera source d'éléments de discussion sur la place des gènes de l'angiogenèse au niveau des berges des FL/P chez l'enfant.

Perspectives thérapeutiques

Nous avons déjà vu que 30% des gènes des FL/P en relation avec l'angiogenèse sont influencés par des facteurs environnementaux (Fig 103). Dans notre étude nous avons relevé comme facteurs environnementaux possiblement en rapport avec la malformation une FIV, une stimulation ovarienne, deux prises médicamenteuses (Tableau 15). L'analyse de la littérature ne nous a pas permis de retrouver concernant ces dossiers de facteurs de risques établis (Petersen K, 1989; Yokoyama E, 2007). Par ailleurs, nous avons identifié deux prises de toxiques (Alcool, et association alcool-cannabis-tabac) connu comme des facteurs favorisant. Enfin un cas de régime Dukan en pré et péri-conceptionnel peut nous faire poser la question du déficit nutritionnel vitaminique, mais il reste délicat de conclure sur un seul cas.

Afin d'étudier plus précisément l'impact des facteurs environnementaux et des facteurs de risque dans le cadre des FL/P nous avons mis en place localement un recueil de données par questionnaire. Ce dernier s'adressant aux parents est actuellement rempli par notre conseillère en génétique au cours d'une consultation après la naissance de l'enfant. Il répertorie les antécédents et la présence ou non d'exposition à certains facteurs de risque. Ce travail est long et fastidieux (nombreuses variables, nombreux biais, chronophage...) est primordial afin que nous puissions obtenir des données exploitables en terme d'épidémiologie.

En dehors de l'action thérapeutique par prévention des facteurs environnementaux, une première étude chez la souris vient d'attirer notre attention. Cette dernière vise à « traiter » la FP au moment de sa formation *in utero* grâce à un transfert de gène *TGFβ* en intra amniotique (Wu C, 2013). Comme nous l'avons souligné précédemment, *TGFβ* favorise la fusion palatine. Ainsi, grâce à un transfert de gène *TGFβ* en intra amniotique, l'équipe de Muraoka a montré qu'il était possible d'obtenir une fusion palatine chez une souris *TGFβ*^{-/-}. Même si l'idée semble séduisante, il reste encore de nombreux obstacles à franchir. Au delà de tous les débats philosophiques et éthiques, le problème du diagnostic précoce de la FP chez un fœtus de 7 SA persiste. Il s'agit d'un vrai challenge quand on sait que la fréquence du diagnostic prénatal de FP I est actuellement de 0 à 20% et qu'au plus tôt ce diagnostic est posé au 2^{ème} trimestre de grossesse (Maarse W, 2010).

Il convient aussi de souligner l'intérêt des facteurs promoteurs de la cicatrisation. Dans le cadre de la chirurgie reconstructrice des FL/P, nous avons parfois la nécessité de « créer » de l'os. Comme par exemple en cas de fente alvéolaire où il est nécessaire d'apporter de l'os au niveau inter-maxillaire pour assurer la stabilité de l'arcade dentaire et la pose d'implants. La greffe osseuse avec prélèvement le plus souvent d'os spongieux au niveau de la crête iliaque (plus rarement au niveau du tibia et du crâne) reste la technique de référence. Mais tous les chirurgiens sont à la recherche d'un moyen permettant de « stimuler » cette « régénération » osseuse sans avoir besoin d'une greffe. C'est ainsi que certains auteurs ont eu l'idée d'utiliser des facteurs de croissance lors de la chirurgie secondaire des fentes alvéolaires mais aussi dans le traitement des fistules récurrentes du palais. L'utilisation de ces facteurs a pour but de favoriser la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, l'ostéogénèse et le remodelage osseux.

- Des études ont été menées chez l'homme au niveau de la fente alvéolaire par le biais des BMP. Rappelons que la super famille des *TGFβ* code pour 12 membres dont TGFB1-2-3 mais aussi pour les BMP (Bone Morphogenic protéine) (BMP 2A-2B (4), 3 et 6). Le BMP2 a démontré qu'il était un excellent pourvoyeur d'os chez l'animal comme chez l'homme. Mais actuellement une seule étude a testé son efficacité pour la réossification d'une fente alvéolaire sans apport osseux (sans greffe). Les résultats étaient encourageants concernant la formation d'un os de bonne qualité mais malheureusement aux dépens d'effets secondaires (gencives) ayant conduit à l'arrêt précipité de l'étude (Neovius E, 2013).

- Gonzalez-Sanchez JG et al ont proposé pour le traitement de fistules palatines une technique utilisée en chirurgie stomatologique et maxillo-faciale, et orthopédie basée sur l'utilisation de plasma riche en facteurs de croissance de sang autologue associé à une greffe osseuse

(González-Sánchez JG, 2011). Leurs résultats concernant la cure de la fistule étaient bons mais le problème de ce type de travaux est toujours de savoir à quoi est due la correction de la fistule :

- La bonne réparation chirurgicale indéniable et indispensable aussi bien pour la fermeture de la fistule que pour la prise de greffe.

- La présence de la greffe ou de n'importe quelle interface comme du cartilage (Technique canadienne, Caoutte-Laberge L) ou de la greffe de périoste (Technique Amiennoise, Nieva C, 2012).

- Ou réellement la présence du plasma riche en facteur de croissance.

- Une autre piste de recherche thérapeutique se développe à partir des cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse. Les travaux dans ce domaine ne sont actuellement développés que chez l'animal et ne sont pas encore utilisés en thérapeutique (Chung VH, 2012 ; Yoshioka M, 2012).

En conclusion, en l'état actuel des connaissances, l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses ou l'utilisation de facteurs de croissance (mixte de plasma, ou facteur identifié BMP) ne sont pas des techniques « au point » pour permettre la régénérescence osseuse en pratique clinique quotidienne. La piste la plus intéressante et la plus facile d'utilisation reste le concentré plaquettaire qui avec peu de morbidité (prélèvement sanguin dans le même temps que la pose de la voie d'abord de l'anesthésie générale) peut être un bon additif lors de la réalisation de la greffe pour permettre son remodelage et favoriser une croissance osseuse de bonne qualité.

CONCLUSION

L'étiopathogénie des FL/P reste un sujet très discuté. Les évolutions génétiques et les travaux de plus en plus poussés dans ce domaine ont permis aux différents auteurs, au cours des dernières années, de s'accorder sur une origine multifactorielle. La composante génétique est largement mise en avant, même s'il est impossible, aujourd'hui, de déterminer de façon exhaustive les gènes impliqués et les voies d'interaction concernées dans la constitution de la fente.

Notre étude visait à préciser la place que pouvaient occuper les gènes de l'angiogenèse dans les FL/P. Grâce à une analyse exhaustive de la littérature des gènes impliqués dans les FL/P et l'angiogenèse, il a été établi une liste des gènes d'intérêt (gènes déjà identifiés comme intervenant dans la constitution des fentes ou fortement suspectés et interagissant avec les voies de l'angiogenèse). Ceci ayant été établi, nous avons élaboré et validé un protocole d'extraction d'ARN à partir des prélèvements des berges. Ce protocole a nécessité plusieurs ajustements étant donné la nature même du matériel à étudier. Même si la littérature a bien mis en avant une implication des phénomènes angiogéniques dans la constitution des FL/P par le biais des facteurs de croissance (*TGF β* , *PDGF C et Ra*, *FGF*, *TGFA*, *FGFR1*, *FGFR2* ; *VEGF*) et des protéases (*MMP/TIMP2*), nos résultats ne sont pas encore exploitables. Les extractions sur l'intégralité de la cohorte sont actuellement en cours. L'ensemble de ces manipulations nous permet aujourd'hui de disposer du matériel nécessaire pour l'étude de l'expression des facteurs impliqués dans l'angiogenèse sur les berges des fentes. Nul doute qu'au terme de l'étude une analyse efficace de l'expression des gènes de l'angiogenèse, au niveau des berges (*in vivo* chez l'homme) pourra être menée. Ces résultats devront, bien sûr, être exposés et analysés au cours d'un travail ultérieur.

D'autre part nous avons mis au point une technique de culture de fibroblastes d'origine humaine à partir de prélèvements des berges. Nous avons optimisé et nous maîtrisons cette technique qui est à présent fiable et reproductible. Une grande quantité de matériel est ainsi disponible pour de prochains travaux. Nous avons de l'ADN extrait des cultures, mais ces dernières peuvent également être une source d'ARN pour les analyses d'expression.

Parallèlement, l'étude génomique constitutionnelle en CGH Array a permis de retrouver des variations non connues comme polymorphiques chez 62% de nos patients. Des études familiales vont compléter notre travail. Elles permettront de savoir si ces CNV sont héritées

ou *De Novo* et ainsi de préciser leur caractère bénin ou pathologique. La présence chez un même patient de deux variations (même de petites tailles) dans les locus de gènes d'intérêt dans les FL/P nous donne à penser qu'une approche polygénique de nos résultats est sûrement à envisager. L'identification d'une amplification, même de petite taille, du gène *SKI* (gène lié à la voie des TGF β) nous encourage dans la poursuite de nos recherches d'anomalies constitutionnelles des gènes de l'angiogenèse dans les FL/P.

Dans le cadre de notre étude, la CGH array s'est révélée être une technique qui nous a paru utile et fiable en terme de « scanning » et de dépistage. Par ailleurs, nous avons dès à présent, et dans le cadre d'une nouvelle étude, la possibilité de réaliser dans notre cohorte une analyse multigénique ciblée à la recherche de mutations dans les 95 gènes d'intérêts.

En ce qui concerne les conséquences de nos résultats sur la pratique clinique, la découverte des anomalies préalablement certainement sous estimées par les cliniciens doit nous mener à une nouvelle réflexion sur le conseil génétique et sur l'utilité dans l'avenir d'un dépistage plus systématique. Ceci n'aura d'intérêt que couplé à une étude épidémiologique extrêmement précise ; étude qui pour les cas qui nous concernent est actuellement réalisée de façon rétrospective pour compléter nos données.

ANNEXES

I. PROTOCOLES DE LABORATOIRE

A. Extraction d'ADN selon le protocole Qiagen

Il se réalise à partir de 2 ml minimum de sang prélevé sur tube EDTA.

- 1) Vérification de la température du laboratoire qui doit être comprise entre 15 et 25°C. Allumer le bain marie (Bioblok scientific®) à 37°C. Prévoir un nombre de tube paire pour l'analyse, afin d'équilibrer la centrifugeuse.
- 2) Mettre le contenu du tube EDTA dans un tube BD falcon® 15ml. Mélanger par vortex.
- 3) Réalisation de la Lyse cellulaire pour libérer l'ADN. Mettre 200µL de Qiagen Protéase pour 2ml de sang issu du tube EDTA. Mélanger par vortex.
- 4) Ajouter 2,4ml Buffer AL (tampon de lyse). Mélanger par vortex.
- 5) Incubation 10 min à 70°C. (Fig 39). Remarque : le maximum de la lyse est obtenu au bout de 10 min



Figure 104: Bain Marie 70°C

- 6) Pendant l'incubation préparer les colonnes du Kit Qiagen.
- 7) Précipitation. Toujours dans le tube BD falcon®, ajouter 2ml Ethanol 100. Mélanger par vortex +++
- 8) Verser la moitié du contenu du tube BD falcon dans le tube colonne.
- 9) Mettre 3 minutes dans la centrifugeuse Jouan/GR 422® à 3000 tours/minute

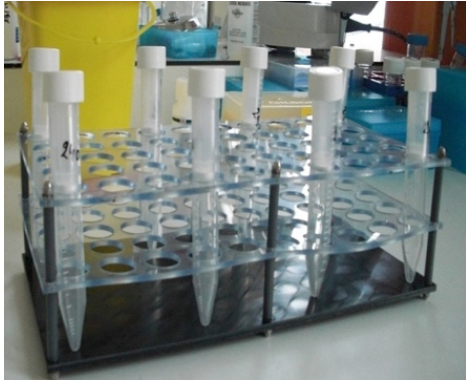


Figure 105: Colonne Qiagen extraction ADN



Figure 106: Centrifugeuse Jouan GR 4 22

- 10) Verser la deuxième moitié du tube BD Falcon dans le tube colonne, puis remettre 3 minutes dans la centrifugeuse à 3000 tours/minute
- 11) Enlever la colonne du tube et vider tout le contenu du tube dans les tubes BD Falcon. Jeter les tubes BD Falcon. Remettre la colonne dans le tube blanc
- 12) 1^{er} lavage : mettre 2 ml de Buffer AW1 (Wash buffer 1 95ml concentrate Qiagen)
Centrifugation 1 minute à 4000 tours/minute
- 2^{ème} lavage : mettre 2ml de Buffer AW2 (Wash buffer 2, 66 ml concentrate Qiagen)
Centrifugation 15 minutes à 4000 tours/minute
- 13) Préparation du tube propre Kit Qiagen. Sortir de la centrifugeuse en manipulant avec précaution pour éviter tout contact entre le liquide centrifugé et le bas de la colonne. Prendre la colonne et mettre dans un tube propre.

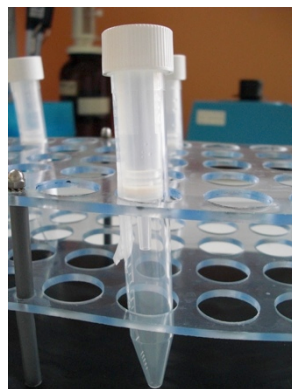


Figure 107: Aspect de la colone d'extraction du protocole Quiagen

- 14) Mettre 300-350µL de fresh buffer AE ou de l'eau distillée
Fermer le bouchon et laisser à température ambiante 5 minutes.
Puis centrifugation 5 minutes à 4000 tours/minute
- 15) On récupère le liquide au fond et on le remet sur la colonne.

On ferme le bouchon et on attend 5 minutes à température ambiante.

Centrifugation 5 minutes à 4000 tours/minute

16) On prélève le liquide au fond du tube et on le met dans des tubes de stockage.

Mélanger.

17) Vérification de la concentration par analyse dans le spectrophotomètre

Faire une première analyse avec une goutte d'eau 1-2 μ L. Puis mettre une goutte à analyser.

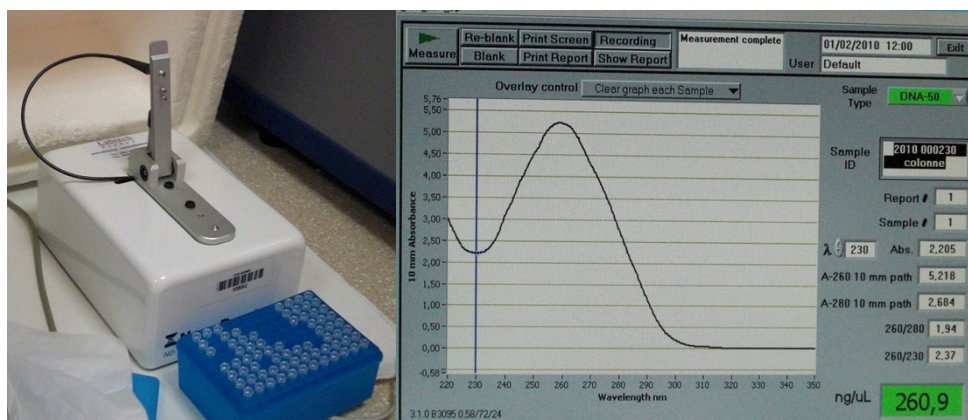


Figure 108: Nanodrop spectrophotomètre 1000TM

Figure 109: Aspect de courbe typique d'ADN pur après extraction (analyse au Nanodrop)

Etudier les rapports :

Le rapport 260/280 doit être inférieur à 2

Le rapport 260/230 doit être supérieur à 2.

Le but étant d'obtenir une concentration d'ADN comprise entre 100 et 200 ngramme/ μ L

18) Moyen de conservation

L'ADN ainsi extrait a été conservé soit 4°C soit congelé à -80°C selon la rapidité de réalisation des manipulations suivantes

B. Purification de l'ADN génomique par Traitement à la RNase

L'ADN précédemment obtenu a été traité à la RNase. Le protocole a été décrit dans les annexes.

1) Ajouter à 200 μ L d'ADN génomique (dilué dans du TE 1X), 10 μ L de solution de RNaseA à 1 μ g/ μ L puis incubé dans un BM à 65°C pendant 10 min.

2) Ajouter 0.4 vol (= 84 μ L) de solution d'acétate d'ammonium 7.5M pour précipiter la RNaseA. Mélanger par retournement. Incuber à 4°C pendant 30 min puis centrifuger à 15 000 tour/min pendant 30 min.

- 3) Transfert le surnageant contenant l'ADN dans un nouveau tube (à l'aide d'une pipette) et précipiter en ajoutant 1 mL d'éthanol 100% froid. Mélanger par retournement. Incuber à -20°C pendant 30 min puis centrifuger à 15 000 g pendant 20 min.
- 4) Eliminer le surnageant et incuber le culot avec 100 µL de wash buffer (76% ethanol, 0.01M acétate d'ammonium) pendant 5 min puis centrifuger 5 min à 15 000 tour/min.
- 5) Laver le culot d'ADN par 200 µL d'éthanol 70% puis centrifuger à 15 000 tour/min pendant 5 minutes. Eliminer le surnageant.
- 6) Sécher à l'air le culot pendant 15 minutes.
- 7) Re-suspendre le culot dans 20-100 µL de TE.

C. Contrôle qualité de l'ADN par Migration sur gel d'Agarose 1%

Ce contrôle a été réalisé sur tous les prélèvements d'ADN avant et après traitement à la RNase.

Préparation du support de gel

Le support de gel est nettoyé à l'eau tiède, à l'eau distillée puis à l'alcool pour ôter tous les résidus éventuels du gel précédent (conserver à l'abri de la poussière).

Réglage la hauteur du peigne en maintenant l'épaisseur d'une lame porte-objet entre le support et le niveau inférieur des dents du peigne.

Préparation du gel Agarose 1%

Peser la poudre d'agarose dans un erlen en Pyrex. Y ajouter un barreau magnétique stérile pour l'utilisation de bain-marie.

Chauffer jusqu'à ce que l'agarose soit limpide.

Laisser la température redescendre entre 40 à 50°C (au bain-marie éventuellement)

Ajouter du BET à 1% p/v à raison de 5µl / 100ml de gel.

Couler dans le support après avoir positionné le peigne.

Laisser solidifier à température ambiante.

Il est important de penser à éliminer les bulles formées à la suite du coulage avant la solidification du gel. Ceci peut être réalisé à l'aide d'un cône ou d'une lame porte-objet stérile, en chassant les bulles vers l'extérieur.

Le gel peut être coulé la veille mais il faut dans ce cas le préserver du dessèchement en recouvrant la surface solidifiée de quelques millilitres du tampon de migration x1. Ce gel doit

ensuite être conservé à l'abri de la poussière et de la lumière. Il doit être recouvert d'une feuille d'aluminium type alimentaire ou d'un film plastique et gardé à température ambiante 20/25°C. Il ne doit surtout pas être congelé.

Préparation des échantillons

- Si le vol à analyser est inférieur ou égal à 5µl : Ajouter à l'échantillon du tampon de charge dilué la quantité suffisante pour 20µl selon le volume des dents du peigne que l'on a prévu.
- Si le vol est supérieur à 5µl mais inférieur à 20µl : ajouter 5µl de bleu de Bromophénol stock et du tampon de charge x1 qsp 20 à 25 µl (toujours en fonction du volume permis par les dents du peigne)
- Préparation des marqueurs de taille ou de calibration dilués en tampon de charge
- Préparation de la fiche « échantillons /puits du gel »
 - Choisir le sens des dépôts et ne plus en changer
 - Ordonner sur le portoir des échantillons les tubes tests et les marqueurs à déposer.

Migration

- 1) Dans le fond de la cuve déposer le tampon de migration x1 jusqu'à une hauteur de 0,5 à 1 cm au dessus du gel, après avoir ôté le peigne et positionné les puits du côté du pôle noir.
- 2) Déposer le volume nécessaire de chaque échantillon à travers le tampon, en utilisant évidemment un cône par échantillon, et en respectant l'ordre des dépôts établis.
- 3) Mettre le couvercle de la cuve en plaçant le pôle Noir (-) du côté des puits. (Fig 45)
Brancher les câbles sur le générateur. Régler les paramètres d'énergie électrique
Lancer le courant. Pour savoir si le courant passe bien on doit visualiser des bulles sur l'électrode.
- 4) Laisser migrer en surveillant le déplacement du traceur (Bleu de Bromophénol)



Figure 110: Migration sur gel d'Agarose 1% dans le cadre du control qualité après extraction d'ADN

Quand le déplacement du traceur est jugé suffisant

Arrêter le courant

Sortir avec précaution le support de gel du tampon

Analyse du gel

Déposer le gel dans le tiroir du lecteur de gel.

Réalisation systématique d'une photo du gel

Si le résultat est insuffisant, remettre le gel à migrer.

En fin de migration le tampon est vidé dans un récipient pour les déchets. La cuve est lavée à l'eau distillée et mise à sécher à l'air (retournée) Le support et le peigne seront lavés dans un détergent type RBS pour l'élimination des traces de BET

D. Protocole d'analyse du sang circulant par CGH ARRAY

Equipements nécessaires

Etapes	Nom	Fournisseur	Référence
Digestion enzymatique	<input type="checkbox"/> AluI (10U/μL) <input type="checkbox"/> RsaI (10U/μL) <input type="checkbox"/> 10X buffer C <input type="checkbox"/> Acetylated BSA	Promega Promega Promega Promega	R628A R637A R003A fourni avec les enzymes R396D
Marquage de l'ADN par random priming	<input type="checkbox"/> Agilent Genomic DNA Enzymatic Labeling kit <input type="checkbox"/> FLS dUTP/oligo (32 rxns) <input type="checkbox"/> Cyanines 3 et 5	Agilent BlueGnome Agilent/ BlueGnome	5190-0453 4134b fournies avec les kits
Hybridation sur lame	<input type="checkbox"/> Lames Sure Print G3 Hmn CGH 4*180K <input type="checkbox"/> Lames cytochip CGH ISCA 4*180K <input type="checkbox"/> Lames « gasket » <input type="checkbox"/> Agilent Oligo aCGH hybridization kit <input type="checkbox"/> FLS dUTP/oligo (32 rxns)	Agilent BlueGnome Agilent/ BlueGnome Agilent BlueGnome	G4449A BG4080 Fournies avec les lames CGH-array 5186-5220 4134b
Incubateur	<input type="checkbox"/> Chambre d'hybridation <input type="checkbox"/> Four à hybridation	Agilent	
Lavages post-hybridations	<input type="checkbox"/> Oligo aCGH Wash Buffer 1 <input type="checkbox"/> Oligo aCGH Wash Buffer 2 <input type="checkbox"/> Stabilization and Drying solution	Agilent Agilent Agilent	5188-5221/5188-5226 5188-5222/5188-5226 5185-5979 et 5190-0423
Lecture de lames	<input type="checkbox"/>		
Divers	<input type="checkbox"/> Centrifugeuse miniSpin plus <input type="checkbox"/> Thermocycleur <input type="checkbox"/> Amicon ultra centrifugal filtrer (AU-30k membrane)	Ependorff Techné Millipore	CHR Reims/ 0502584 PHC-3 UFC503096 96Pk

Préparation des ADN

Pour 8 patients (format 2x et 4x) :

- Faire migrer les ADN sur un gel d'agarose à 0,8% afin de vérifier la qualité des échantillons. Les ADN ne doivent pas être dégradés.
 - Doser les ADN au Nanodrop (cf Technique). Les ratios DO260/280 et des DO230/260 doivent être respectivement supérieurs à 1,8 et 2.
 - Diluer les échantillons d'ADN afin d'avoir 1 µg d'ADN dans 20,2 µL d'eau (prendre de l'eau pure nucléase free).
 - Préparer pour chaque échantillon, un échantillon d'ADN témoin de même sexe (mix 180A hommes* et mix 180A femmes*).
- * Mix 180A hommes et femmes : patients avec résultats RAS passés sur des puces 4*180A Agilent dans le cadre du projet PECAMORE.
- Préparation des tableaux de recueil de données.

Tableau 34: Tableaux de recueil de données pour 8 patients

N°tube	Nom-Prénom	N° Dossier	Sexe	Concentration (ng/µL)	R 260/230	R 230/260	Vol ADN (1µg) µL	Vol H2O (qsp 20,2 µL) µL	Type d'extraction
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									

N°tube	Nom-Prénom	N° Dossier	sexe	Concentration (ng/µL)	R 260/230	R 230/260	Vol ADN (1µg) µL	Vol H2O (qsp 20,2 µL) µL	Type d'extraction
H	Mix 180A H	/	H						col
F	Mix 180A F	/	F						col

Digestion enzymatique

- Préparer le mix suivant :

Tableau 35: Quantité de réactifs nécessaire pour la préparation du mix utilisé pour la digestion enzymatique

Réactifs	Quantité (format 2x ou 4x) 1 run	Quantité (format 4x) 16 runs* (8 patients)	Quantité (format 4x) 32 runs* (16 patients)
Nuclease free water	2,0 µL	33,6 µL	67,2 µL
10X buffer C	2,6 µL	43,7 µL	87,4 µL
Acetylated BSA	0,2 µL	3,4 µL	6,8 µL
AluI (10U/µL)	0,5 µL	8,4 µL	16,8 µL
RsaI (10U/µL)	0,5 µL	8,4 µL	16,8 µL
Volume final	5,8 µL	97,5 µL	195 µL

* master mix avec 5% d'excès

- Vortexer et centrifuger rapidement le mix de digestion.
- Ajouter 5,8 µL (format 4x) du mix à chaque échantillon d'ADN génomique (patient et témoin) afin d'avoir un volume total de 26µL. Mélanger par pipettage.
- Transférer les tubes dans un thermocycleur et lancer le programme suivant :

Thermocycleur Techné, Programme 44

Tableau 36: Synthèse des différentes étapes température, temps selon le type de lames utilisées

Etapes	Température	Temps (Lame Agilent)	Temps (Lame BlueGnome)
1	37°C	2 heures	2 heures
2	65°C	20 minutes	10 minutes
3	4°C	Infini	Infini

- Etape facultative :

Prendre 2 µL d'échantillon d'ADN digéré et faire migrer sur un gel d'agarose à 0,8% afin de vérifier la bonne digestion des ADNs (la digestion enzymatique est une étape importante pour les SNP array). La majorité des produits digérés doivent être de taille inférieure à 500pb.

Marquage de l'ADN par random priming

Important : Toutes les étapes de marquage doivent être réalisées dans la glace !

Kits utilisés :

	Lame Agilent	Lame BlueGnome
Nom Kit	Agilent Genomic DNA Enzymatic Labeling kit	FLS dUTP/oligo (32 rxns)
Référence	5190-0453	4134 a
Commentaires	Kit complet	Kit complet

- Faire décongeler sur la glace les différents réactifs du kit.
- Ajouter 5 µL d'amorces randomisées (random primers) à chaque échantillon d'ADN. Vortexer doucement et centrifuger rapidement.

Tableau 37: Récapitulatifs des réactifs utilisés pour la CGH Array

Réactifs	Couleur capucon		Marquage Cy3 1 run	Marquage Cy3 8 runs	Marquage Cy3 16 runs	Marquage Cy5 1 run	Marquage Cy5 8 runs	Marquage Cy5 16 runs
	Agil	BG						
H2O*	vert	Blanc	(2 µL)			(2 µL)		
5X buffer	vert	Jaune	10 µL	84 µL	168 µL	10 µL	84 µL	168 µL
10X dNTP	vert	Vert	5 µL	42 µL	84 µL	5 µL	42 µL	84 µL
Cy3 dUTP	rouge	Rouge	3 µL	25.2 µL	50,2 µL	/	/	/
Cy5 dUTP	bleu	Bleu	/	/	/	3 µL	25.2 µL	50,2 µL
Exo-klenow fragment	violet	Rouge	1µL	8,4 µL	16,8 µL	1µL	8,4 µL	16,8 µL
Total			19 µL (21µL)	159,6 µL	319,2 µL	19 µL (21µL)	159,6 µL	319,2 µL

- Incuber les échantillons à 95°C pendant 5 minutes (programme 95- Thermocycleur Techné) (ou 10 minutes sans digestion enzymatique) puis transférer rapidement à 4° (dans la glace) pendant 5 minutes.

- Centrifuger les échantillons 1 minutes à 6000g.

- Préparer le mélange de marquage suivant :

* Rajouter 2 µL d'eau pure si l'électrophorèse a été réalisée afin de vérifier la digestion enzymatique

- Ajouter 19 µL (ou 21 µL) du mix de marquage Cy3 ou Cy5 à chaque échantillon d'ADN.

Important : Les échantillons d'ADN test (patient) sont marqués avec la Cy3. Les échantillons d'ADN référence (témoin) sont marqués avec la Cy5.

- Transférer les tubes dans un thermocycleur et lancer le programme suivant :

Thermocycleur Techné, Programme 44 (programme de base- 10 minutes à 65°C).

Etapas	Température	Temps (Lame Agilent)	Temps (Lame BlueGnome)
1	37°C	2 heures	2 heures
2	65°C	10 minutes	10 minutes
3	4°C	Infini	Infini

- Les échantillons peuvent être conservés à -20°C pendant un minimum de 1 mois.

Purification des ADNs marqués et combinaison

- Mélanger les échantillons « patient » et « témoin ». Puis ajouter 380 µL de TE 1x (pH 8) à ce mélange.

- Mélanger doucement par pipettage puis transférer la totalité du volume sur la colonne (présente sur le tube collecteur) sans toucher les bords de la colonne. Centrifuger 10 minutes à 14 000 g (14 500 rpm- MiniSpin plus) à température ambiante.

- Jeter le filtrat. Ajouter 480 μL de TE 1x (pH 8). Centrifuger 10 minutes à 14 000 g (14 500 rpm- MiniSpin plus) à température ambiante.
- Retourner la colonne dans un nouveau tube collecteur. Centrifuger pendant 1 minute à 1000g (4000 rpm- MiniSpin plus) à température ambiante.
- Mesurer le volume collecté et compléter à 40 μL . Puis transférer le volume dans un tube eppendorf.
- Prélever 1 μL d'échantillon d'ADN marqué pour faire un dosage au Nanodrop afin de déterminer la concentration d'ADN, l'incorporation en cyanine et activité spécifique pour chaque échantillon.
- Les échantillons peuvent ainsi être conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

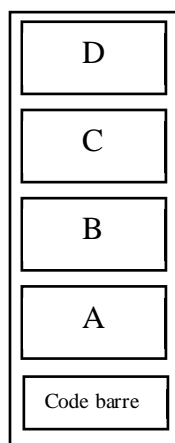
Hybridation génomique comparative sur lame

- Ajouter pour chaque échantillon les volumes des réactifs suivants :

Tableau 38: Quantité des réactifs utilisés pour l'hybridation génomique comparative sur lame selon le type de lame utilisée

	Agilent	BlueGnome
Nom Kit	Agilent Oligo aCGH hybridization kit	FLS dUTP/oligo (32 rxns)
Echantillon d'ADN marqués (combinés)	39 μL	39 μL
COT human DNA	5 μL	5 μL
10X blocking agent	11 μL	11 μL
2X hybridization buffer	55 μL	55 μL
Total	110 μL	110 μL

- Incuber pendant 3 minutes à 95°C puis transférer rapidement dans un bain-marie à 37°C pendant 30 minutes. Refroidir à température ambiante puis centrifuger rapidement avant le dépôt sur lame.
- Mettre une lame « gasket » propre dans la chambre d'hybridation d'Agilent (fournie avec le four à hybridation)
- Déposer 100 μL au centre de la zone correspondant en évitant de faire des bulles en se référant au schéma suivant :



N°tube	N°Dossier	N°Lame	N° zone d'hybridation
1		1	A
2		1	B
3		1	C
4		1	D
5		2	A
6		2	B
7		2	C
8		2	D

- Placer la lame de CGH-array (côté array) sur la lame « gasket ». Côté code barre vers l'extérieur. Côtés étiquette Agilent (array) face étiquette Agilent (gasket).

« **Agilent** » regarde « **Agilent** »

- Placer le couvercle de la chambre d'hybridation puis bien fermer en vissant le plus possible afin d'éviter les fuites.

- Retourner la chambre d'hybridation plusieurs fois afin de regarder si le liquide se déplace sur la totalité de la zone d'hybridation (absence de bulles fixes/mobilité des bulles). Frapper au besoin la chambre d'hybridation sur la paume de la main ou une surface dure afin de faire bouger les bulles stationnaires.

- Placer les chambres d'hybridation dans le four à hybridation pré-chauffé à 65°C puis agiter à 20 rpm pendant 24 heures à 65°C.

Lavages post-hybridations

Préparer les bains suivants :

Tableau 39: Composition des bains utilisés pour le lavage post-hybridation

Bains	volume	Temp	Agitation	Tampon
1- désassemblage	400 mL	Ambiante	Aucune	Oligo aCGH Wash Buffer 1
2	400 mL	Ambiante	Aimant/	Oligo aCGH Wash Buffer 1
3*	400 mL	37°C*	Aucune	Oligo aCGH Wash Buffer 2

* Le bain « 3 » doit être préchauffé au minimum 30 minutes (si possible toute la nuit- pour cela, faire préchauffé le tampon dans un flacon de 500 mL et le bac avec de l'eau miliQ)

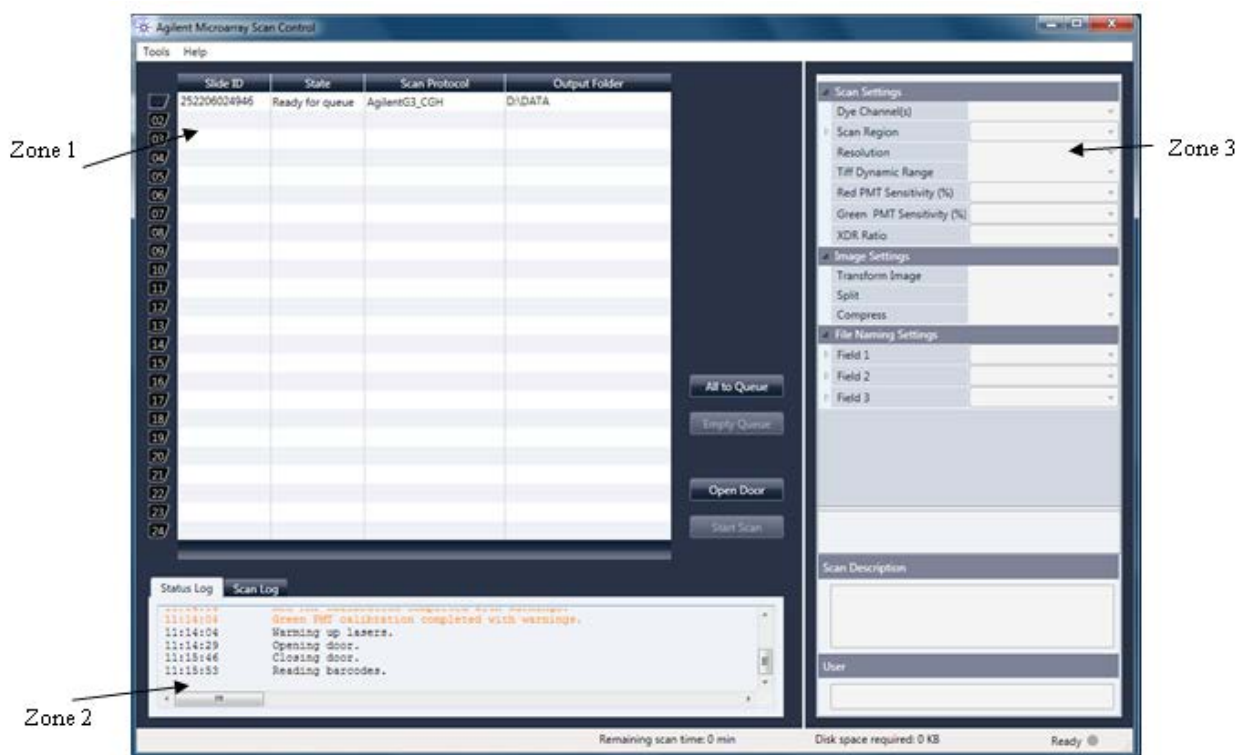
- Désassembler la chambre d'hybridation puis désassembler les deux lames (array et gasket) dans le bac avec du tampon Oligo aCGH Wash Buffer 1 (bain n°1). Puis mettre les arrays dans un second bac contenant du Oligo aCGH Wash Buffer 1 (bain n°2) sous agitation pendant 5 minutes. Pendant ce temps, aller chercher le bain n°3.
- Transférer le portoir contenant les lames dans un bac contenant le tampon Oligo aCGH Wash Buffer 2 (bain n°3). Laisser 1 minutes (sans agitation).
- Sortir doucement le portoir afin que les lames sèchent directement. Cette étape prend environ 10 à 12 secondes.
- Mettre chaque lame dans la « slide holder » afin de les préserver d'une dégradation des cyanines par la présence d'ozone.

Scanner

- Démarrer l'ordinateur. Mettre en marche le scanner
- Ouvrir le logiciel par le raccourci sur le bureau

Une fenêtre s'ouvre divisée en 3 zones :

- zone 1 : liste des lames dans le portoir
- zone 2 : statut de l'appareil et Log
- zone 3 : paramètres des scans



- Positionnement des lames : Mettre les lames à scanner dans les cassettes fournies par Agilent, pour cela, ouvrir la cassette et positionner la lame en mettant le coté actif vers soi et le code barre de la lame vers les gonds.



Figure 111 : Positionnement de la lame dans les cassettes

Ouvrir la porte du scanner. Positionner les cassettes dans les emplacements, une LED bleue s'allume au niveau de la position de la lame (zone 1)

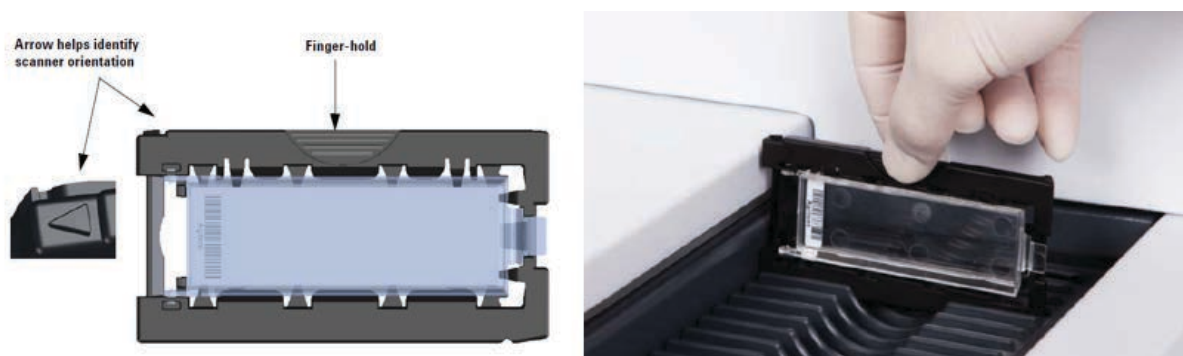


Figure 112 : Mise en place des cassettes dans le scanner pour analyse CGH Array

Fermeture de la porte du scanner. Les lames sont immédiatement reconnues dans leurs emplacements respectifs et sont identifiées dans la zone 1.

- Paramètres de lecture

Dans la zone 1 :

- Choisir le protocole de lecture dans le menu déroulant de la colonne « Scan Protocol ».

Différents protocoles sont proposés par le fournisseur selon l'application du microarray, par exemple pour les expériences de CGH-array, choisir :

Agilent HD_CGH lames de densité moyenne

Agilent G3_CGH lames de haute densité

Par défaut, le nom de l'image scannée de la lame correspond à :

- N° de l'instrument (Instrument SN)

- code barre de la lame (Slide ID)

- Choisir l'emplacement de l'enregistrement des données avec la colonne « output folder » D:\DATA\n°UF

Ajouter les lames dans la liste de lecture en cliquant sur « All to Queue ».

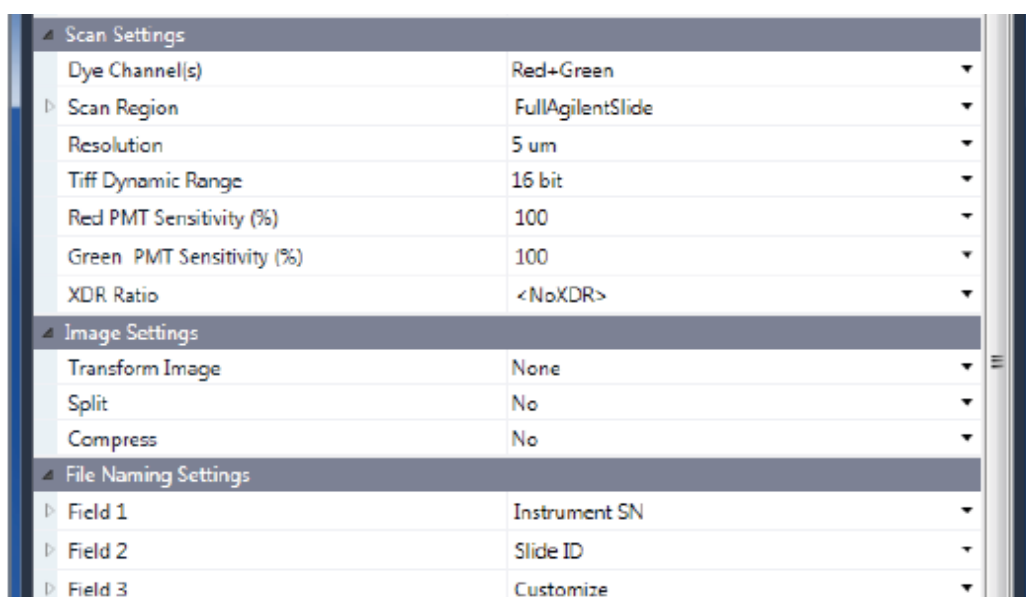
Un message apparaît demandant de confirmer, cliquer sur Yes.

L'état « State » change de « Ready to queue » à « In Queue 1, 2, ... ». A cette étape, il est possible de modifier l'ordre de lecture des différentes lames dans le menu déroulant.

- Création d'un programme de scan ou modification d'un programme existant

Dans la zone 3 :

- Choisir les paramètres du scanner :



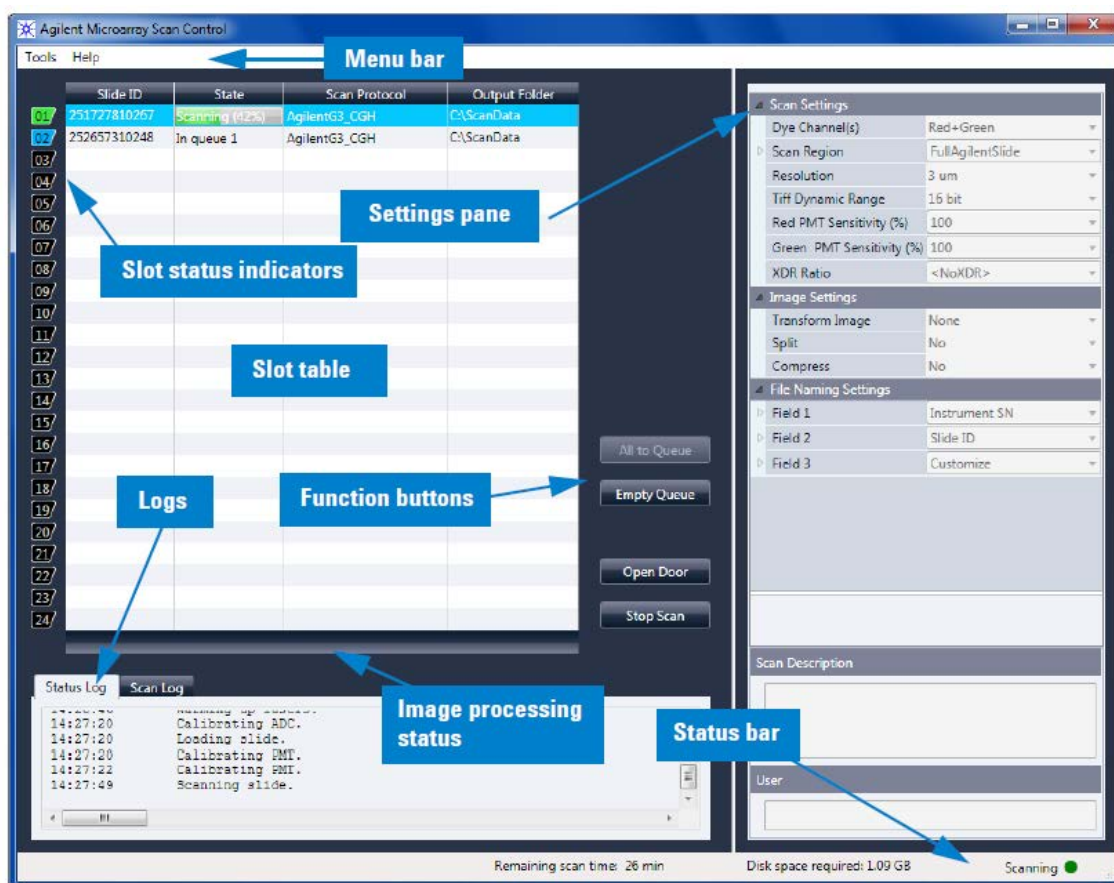
Dye channel permet de choisir une lecteur d'une ou des deux couleurs rouge (Cy-5 dye) ou vert (Cy-3 dye) . Scan region determine l'aire scannée sur la lame (par exemple, pour des lames Agilent, choisir FullAgilentSlide). Resolution, le G2600D permet de lire aux résolutions suivantes : 2, 3, 5 ou 10 microns. Par exemple, choisir 5µm pour des lames de densité moyenne (exemple : 4x60k, 2x105k, 1x244k), 3µm pour des lames de haute densité (4x180k).

TIFF Dynamic Range règle le range dynamic range à 16-bit (exemple : puce de CGH-array) ou 20-bit (exemple : puce d'expression).

- Choisir les paramètres de l'image : Permet de transformer ou de retourner l'image (par exemple, si on utilise des puces d'autres fournisseurs).
- Choisir les paramètres du nom de fichier : Permet de composer le nom du fichier image généré.

- Lancement du scanner

Lancer la lecture en cliquant sur l'onglet « Start scan ». Dans la zone 2, les différentes étapes réalisées par le scanner apparaissent.



Tous les logs dans la **zone 2** sont sauves dans C:\ProgramData\Agilent\ MicroArrayScanner\Logs folder

A la fin de la lecture, pour récupérer les lames, cliquer sur « Open door ».

Fermer la porte du scanner « Close door », attendre que le scanner soit au repos (onglet « open door » en surbrillance) puis quitter l'application et éteindre le scanner.

Analyse des résultats

L'analyse a été réalisée à l'aide du logiciel « DNA analytics » (Agilent®). (Licence présente dans le service de génétique CHU Reims) Ce logiciel a permis de réaliser un ratio normalisé des fluorescences émises pour chaque oligonucléotide. Ce ratio était visualisé par une représentation graphique des déviations de fluorescence. Les déviations significatives par rapport à zéro ont été évaluées pour trois points consécutifs par l'algorithme Z-score (limite de déviation de 0,25). La déviation du ratio permettait ainsi d'identifier une délétion ou une amplification d'une région chromosomique (bornes et gènes).

Nous avons réalisé un recueil de l'ensemble des gains et pertes ainsi que de la récurrence de ces anomalies. La composition des zones délétées ou amplifiées a été analysée afin d'identifier les gènes impliqués dans ce territoire chromosomique.

E. Analyses anatomopathologiques des berges de FLP

Le matériel qui a été utilisé pour les manipulations est le suivant :

- Fixation : formol stabilisé à 10% (Diapath)

- Déshydratation/imprégnation :

Automate Excelsior ES (THERMO SCIENTIFIC)

Alcool à 95°, 100° (PROLABO),

Xylène (fournisseur : VWR, Fontenay-Sous-Bois, France)

Paraffine Paramat en pastilles (GURR)

- Inclusion : station d'enrobage Tissue-Tek TEC (SAKURA)

- Coupe : Microtome : HM 340E (Microm)

- Étalement : Lames (CML)

- Coloration :

Hématoxyline Papanicolaou 1b en solutionS (Merck)

Erythrosine (Merck)

Safran (RAL)

- Milieu de montage : Pertex (Histolab)

Fixation

Le fixateur utilisé est du formol stabilisé à 10%. Le formol stabilisé à 10% ne précipite pas les protéines, fixe les lipides complexes, est réducteur et donc incompatible avec le bichromate de potassium, et ne contracte pas mais durcit. La durée de fixation est de 24-48 heures pour l'immunohistochimie.

Inclusion

Le but de l'inclusion est de donner à la pièce la consistance ferme nécessaire à la coupe en tranches fines au microtome. Le milieu d'inclusion choisi est la paraffine. La pièce est préalablement déshydratée par l'alcool puis imprégnée par un solvant de la masse d'inclusion (xylène). Puis la pièce est transférée dans la paraffine qui deviendra solide par refroidissement.

Protocole d'inclusion :

- Formol 2 bains de 30 minutes
- La déshydratation est effectuée par des bains successifs dans l'alcool à 95° trois fois 30 minutes, puis dans 3 bains de 30 minutes d'alcool à 100°(1h-1h30-1h30)
- Une imprégnation par un solvant de la masse d'inclusion est ensuite réalisée par trois bains successifs dans le xylène (1h-1h30-1h30)
- les pièces sont plongées dans trois bains successifs de paraffine à 56°C d'1H20 chacun;
- le bloc est alors réalisé.

Microtomie

Les coupes de paraffine, d'une épaisseur de 4µm, sont effectuées grâce au microtome. Le bloc est préalablement taillé pour éliminer toute paraffine superflue autour de l'objet. Les rubans de coupe sont disposés dans l'ordre de recueil, puis les coupes sont disposées sur chaque lame, flottant sur de l'eau distillée. La lame légèrement chauffée voit les coupes se déplier. Après écoulement de l'eau distillée, les lames sont séchées quelques minutes sur une platine chauffante.

Coloration Hématoxyline-Erythrosine-Safran (HES)

Le but de la coloration HES est de permettre la révélation des composants tissulaires et cellulaires. C'est une coloration trichromique, à double coloration nucléaire et cytoplasmique. L'HES colore les noyaux en violet, le cytoplasme en rose, les hématies et les fibres musculaires en rouge vif. Les fibres de collagène apparaissent jaune d'or, le mucus, la substance fondamentale du cartilage ou de l'os étant également colorés en jaune. Par ailleurs les lames élastiques sont colorées en rose.

Avant toute coloration, il est nécessaire de déparaffiner les lames et d'hydrater les coupes. On plonge successivement la lame dans 2 bains de 3 minutes de xylène, puis dans 2 bains d'alcool à 100° pendant 1 minute, suivis par 1 bain d'alcool à 50° de 1 minute chacun.

Protocole de coloration à l'HES (automate Autostainer XL):

- les noyaux sont colorés à l'hématoxyline pendant 3 à 5 minutes ;
- lavage à l'eau ordinaire. En cas de surcoloration, on peut différencier légèrement dans l'alcool chlorhydrique pendant quelques minutes avant de laver à l'eau ;
- bleuir dans une solution alcoolique saturée de carbonate de lithium ou dans une solution ammoniacale faible (quelques gouttes d'ammoniaque dans de l'eau);
- alcool 95°;
- bain dans une solution alcoolique à 1% d'érythrosine pendant 1 minute;
- rincer à l'alcool 100°;
- colorer par le safran en solution alcoolique pendant 3 minutes ;
- passer très rapidement dans l'alcool 100° (2 bains);
- passage dans le xylène (2 bains);
- milieu de montage : résine synthétique avec un indice de réfraction proche de celui du verre sur lequel sera déposé une lamelle de verre. En se solidifiant, le milieu de montage protégera la préparation et en assurera la conservation. Cette coloration trichromique permet de mettre en évidence l'architecture tissulaire. Ainsi dans notre étude cette analyse nous permettra de connaître avec précision la composition des berges au niveau de la zone d'analyse (QPCR et gène de l'angiogénèse).

F. Protocoles d'extraction ARN

Extraction ARN sur colonne Qiagen

**RNeasy Mini
Procedure**

**RNeasy Protect
Mini Procedure**

**RNeasy Plant
Mini Procedure**

Cells

Animal tissue

Plant or fungal
material

RLT
350 µl
GTC
β Mercapto
Triton X100

**Lyse et
dénaturation**



lyse and
homogenize



RNA/later
RNA
Stabilization
Reagent



lyse and
homogenize



Grind and lyse



Homogenize with
G/Ashredder



Add ethanol

Ethanol
350 µl
**Favorise fixation des acides
nucléiques**



Bind total RNA
Total RNA

700 µl
Transféré sur la
colonne



Wash 3x

700 µl Tampon RW1
GTC en petite qté, éthanol, eau
Lave et élimine l'ADN
500 µl Tampon RPE [X2]
éthanol 25%
tampon aqueux
Lavage



Elute
Total RNA

Extraction ARN sur colonne Qiagen avec Dnase

RNeasy Mini Procedure

RNeasy Protect Mini Procedure

RNeasy Plant Mini Procedure

Cells

Animal tissue

Plant or fungal material

RLT
350 µl
GTC
βMercapto
Triton X100
Ou après Trizol
Lyse et dénaturation



lyse and homogenize



RNA/later
RNA
Stabilization
Reagent



Grind and lyse



lyse and homogenize



Homogenize with
G1Ashredder



Add ethanol

Ethanol
350 µl
Favorise fixation des acides nucléiques

700 µl
Transféré sur la
colonne



Bind total RNA
Total RNA

350µl Tampon RW1
GTC en petite qté, éthanol, eau
80 µl d'un mélange **DNase** (10µl)
et tampon RDD (70 µl)
incubation 15° min à TA
350µl Tampon RW1

500 µl Tampon RPE [X2]
éthanol 25%
tampon aqueux
Lavage



Wash 3x



Elute
Total RNA

TE (30-50 µl)
Elution ARN

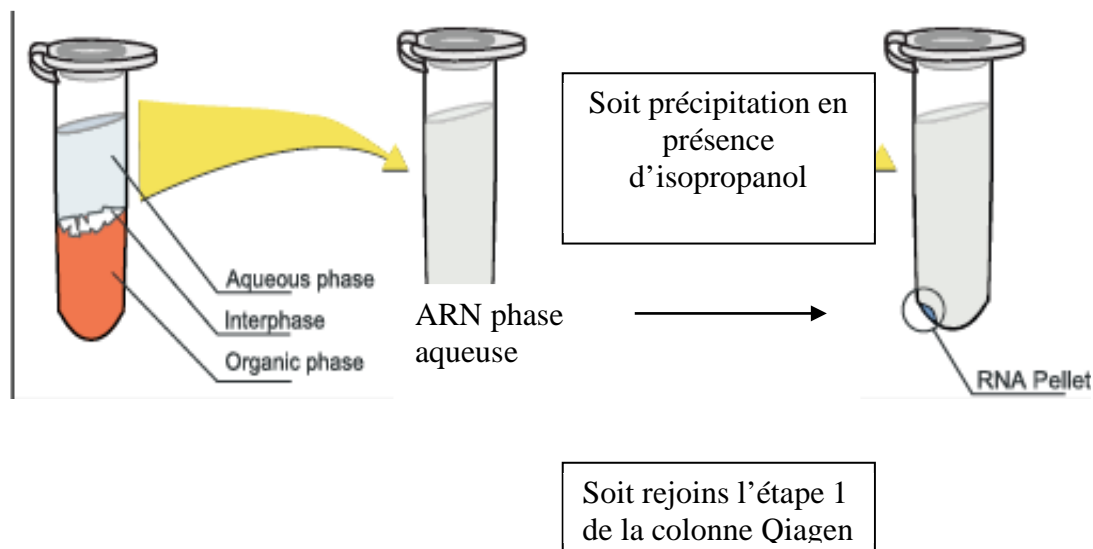
Extraction ARN au Trizol

Ajout de 350 μ l de Trizol

Isothiocyanate de guandidium (agent dénaturant qui favorise également l'extraction spécifique d'ARN)

Phénol et chloroforme : phase organique (chloroforme permet une frontière nette entre les deux phases)

Acétate de Na : PH 4,2 : Le pH proche de 4 retient préférentiellement l'ARN en phase aqueuse.



G. Quantification et qualification de l'ARN

Afin de savoir si les extractions réalisées étaient de bonne qualité il a été indispensable de quantifier et vérifier la qualité l'ARN. Nous avons choisi 3 techniques de validation de nos résultats.

Quantification et qualification par Spectrophotomètre

Les bases puriques et pyrimidiques absorbent fortement la lumière dans l'ultraviolet à 260nm. Il est donc possible d'estimer la concentration des acides nucléiques purs et en solution homogène via un spectrophotomètre qui mesure l'absorbance à 260 nm. Une unité d'absorbance à 260 nm correspond à une concentration d'ARN de 40 μ g/mL. Le spectrophotomètre nous permet par ailleurs d'évaluer la pureté de notre solution. En effet, les protéines absorbent également à 260 nm, mais leur maximum d'absorption se situe en revanche à 280 nm. En calculant le rapport A_{260nm} / A_{280nm} , on peut apprécier une éventuelle contamination de notre solution d'ARN. Si le rapport se situe entre 1,8 et 2, la solution est considérée comme exempte de protéine, et donc « pure ».

Qualification de l'ARN par RQI (équivalent du RIN (RNA Integrity Number))

La qualité de l'ARN peut être déterminée par le calcul de l'indice RQI. Cet indice est obtenu par électrophorèse sur micropuce sur bioanalyseur Experion™ de Biorad (plateforme PRBI). Cet appareil mesure en temps réel l'intensité de fluorescence émise en fonction du temps de rétention des ARN au sein du microréseau. Les résultats sont visualisés sous forme d'électrophorégrammes dont l'ensemble des différents pics et régions sont intégrés dans l'algorithme du logiciel pour le calcul de cet indice. Les valeurs obtenues sont exprimées entre 1 et 10. 1 correspond à de l'ARN complètement dégradé et 10 à l'ARN intact.

Les intérêts de cette technique sont que:

Les résultats obtenus sont indépendants de la concentration d'ARN et de l'interprétation individuelle.

C'est une technique économe en échantillon et en réactif (sauf en puce).

C'est le standard permettant la comparaison entre différents échantillons et entre différents laboratoires (études multicentriques).

Cette technique a été choisie comme référence pour choisir nos échantillons d'intérêt pour l'analyse transcriptomique. Idéalement seuls seront conservés les ARN extraits avec un RQI supérieur à 7.

Qualification de l'ARN par Polymerase Chain Reaction

La qualité de l'extraction d'ARN tissulaire est contrôlée à un dernier niveau par l'étude en PCR d'un gène ubiquitaire le gène Abelson (Abl). La Polymerase Chain Reaction (PCR ou réaction en chaîne par polymérisation) est un procédé d'amplification génique in vitro permettant de copier en grand nombre une séquence d'ADN connue, à partir d'une faible quantité initiale.

Les ADNc étant mis en solution avec les amorces et la sonde spécifiques des gènes cibles, des dNTPs et des ADN polymérasés, la réaction repose sur la répétition de cycles de transition de température. En PCR quantitative, chaque cycle contient deux grandes étapes :

- à 95°C : Dénaturation, permettant de déshybrider les ADN et les polymérasés
- à 60°C : Hybridation des amorces et élongation

La quantité de produits de PCR croît très rapidement (théoriquement X 2 à chaque cycle). Le système TaqMan® est un système de détection en temps réel qui visent à quantifier le nombre de copies effectuées. Il repose sur la fluorescence de sondes spécifiques d'une région des gènes étudiés. Ces sondes contiennent un fluo-rapporteur à leur extrémité 5' et un fluo-

quencher à leur extrémité 3'. Elles s'hybrident à 60°C. Lors de l'élongation, on utilise l'activité 5'->3' exonucléasique de la Taq polymérase pour dégrader les sondes hybridées, et ainsi obtenir une augmentation de la fluorescence après séparation du rapporteur et du quencher.

L'endogène Abelson a été quantifié de manière « absolue » à partir d'une gamme d'étalonnage commercialisée.

Nos amorces proviennent d'Eurogentec S.A, leur séquence était :

- brin sens : TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT
- brin anti-sens : GATGTAGTTGCTTGGGACCCA

II. PROTOCOLES DE RECHERCHE

A. AOL 2010



**APPEL D'OFFRES LOCAL 2010
PROTOCOLE DE RECHERCHE « HORS MEDICAMENT »**

1. INFORMATIONS GENERALES**VERSION DU 31 Décembre 2010 – 1^{ème} version après acceptation**

N° d'enregistrement délivré par l'AFSSAPS	NB : Ne sera délivré qu'avant le dépôt du dossier
Promoteur :	
Titre de la Recherche :	« Fentes labio-palatines : Approche étiologique »
Titre abrégé	Fente labio-palatine, étiologie
Code étude	
Type de la Recherche :	<input type="checkbox"/> Evaluation d'examen ou de procédure à visée diagnostique x Etude Etiologique <input type="checkbox"/> Etude Pronostique <input type="checkbox"/> Essai de Prévention <input type="checkbox"/> Evaluation de Pratique
Investigateur Coordonnateur :	Docteur Caroline FRANCOIS-FIQUET née le 19/10/1976 , Inscrite en thèse à l'école doctorale de REIMS , rattachée au laboratoire d'accueil EA3801 du Pr P.NGUYEN
Service et Adresse :	Service de chirurgie pédiatrique American Memorial Hospital 47 rue Cognacq Jay 51092 REIMS CEDEX
Investigateurs et Centres associés : <i>(si applicable)</i>	Professeur Martine DOCO-FENZY Professeur Philippe NGYUEN Professeur Marie-Laurence POLI-MEROL Docteur Coralie BARBE Professeur Philippe BIREMBAUT Professeur Dominique GAILLARD Docteur Emilie LANDAIS
Comité de surveillance indépendant	<input type="checkbox"/> Oui x Non
Date théorique de début de la Recherche : 01/06/2011	
Date théorique de fin de la Recherche : 01/06/2013	
Durée de participation d'un patient : Ponctuelle	
Nombre de sujets inclus dans la Recherche : 40	
Recherche relevant de la Loi de Recherche Biomédicale : <input type="checkbox"/> Oui X Non Si oui, description succincte de la balance Bénéfice /Risque	

Résumé
<p>Nom des auteurs et Services concernés : Docteur Caroline FRANCOIS-FIQUET 1-3 Professeur Martine DOCO-FENZY 2 Professeur Philippe NGYUEN 3 Professeur Marie-Laurence POLI-MEROL 1 Docteur Coralie BARBE 4 Professeur Philippe BIREMBAUT 5 Professeur Dominique GAILLARD 2 Docteur Emilie LANDAIS 2</p> <p>1 CHU American Memorial Hospital- service de chirurgie pédiatrique-REIMS 2 CHU-Hopital Maison Blanche - service de génétique et biologie de la reproduction-Reims 3 EA 3801- Université de Reims champagne Ardenne 4 CHU - Coordination de la recherche clinique 5 CHU- Laboratoire Pol-Bouin-anatomopathologie</p>
<p>Titre de la Recherche : « Fentes labio-palatines : Approche étiologique »</p>
<p>Objectifs :</p> <ul style="list-style-type: none"> - <u>Principal</u> : recherche de facteurs impliqués dans la constitution des fentes labio-palatines (remaniements chromosomiques de type délétion ou duplication, gènes de l'angiogénèse et facteurs environnementaux). - <u>Secondaire</u> : bilan épidémiologique (fréquence, répartition selon sexe, la forme, la sévérité, terrain et pathologies associées...) des patients porteurs de fente pris en charge au CHU de Reims.
<p>Matériel et Méthodes: <u>Schéma expérimental</u>: étude cas-témoins à inclusion prospective unicentrique <u>Population / patients</u>:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Patients porteurs de fentes labio-palatines (les « cas ») : inclusion de tous patients porteurs de fente faciale pris en charge dans le service de chirurgie pédiatrique de l'American Memorial Hospital du CHU de Reims, opérés d'une chirurgie primaire de fente faciale (labiale, palatine, ou labio-palatine) entre Juin 2011 et Juin 2013 (40 enfants attendus). - Patients non porteurs de fentes labio-palatines (les « témoins ») : inclus parmi le pool de patients pris en charge pour une pathologie bénigne sans étiologie génétique avérée (hernie de l'ovaire, hernie inguinale, abcès de marge anale, invagination intestinale aiguë...) et n'ayant pas d'antécédent personnel et familial de fente faciale. (10 prévus) <p><u>Plan d'Investigation</u>:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pour les « cas » : <ul style="list-style-type: none"> o information sur les objectifs et les modalités de l'étude lors de la consultation anténatale et/ou préopératoire et recueil du consentement éclairé des titulaires de l'autorité parentale au moment de la chirurgie. o réalisation des prélèvements : prélèvement de sang circulant lors de l'induction anesthésique et récupération des déchets opératoires de la plastie reconstructrice des berges des fentes labio-palatines. o recueil de données épidémiologiques par un questionnaire auprès des parents.

- Pour les « témoins » :
 - information sur les objectifs et les modalités de l'étude lors de la prise en charge de leur pathologie sans étiologie génétique avérée et recueil du consentement éclairé des titulaires de l'autorité parentale.
 - réalisation des prélèvements : prélèvement salivaire par frottis buccal
 - Les ADNs des 10 témoins seront poolés, afin de constituer un « témoin » biologique homogène, comme le recommande le guide de bonne pratique pour la CGH-array. Aucune anomalie génomique ne sera recherchée chez les témoins.
- Gestion des prélèvements :
 - CGH Array pour comparaison de l'ADN des berges des fentes labio-palatines à l'ADN du sang circulant des cas et pour comparaison de l'ADN des berges des fentes labio-palatines à l'ADN salivaires des témoins
 - Recherche des gènes de l'angiogénèse en comparant leur expression entre la berge externe et la berge interne de la fente labio-palatine et entre la fente labio-palatine et le coté sain.

Calendrier :

- Inclusion : Juin 2011-Juin 2013
- Analyse des données de manière progressive tout au long de l'étude et globale durant l'été 2013
- Fin étude théorique décembre 2013

Plan d'Analyse Statistique

- analyse qualitative des données sera réalisée pour les facteurs génétiques (remaniements chromosomiques et gènes de l'angiogénèse).
- description des caractéristiques cliniques des enfants seront réalisées.

B. Projet PHRC Jeune chercheur 2013

Page 1 sur 6



**ANALYSE MULTI-GENIQUE CIBLEE DE PATIENTS
PORTEURS DE FENTES LABIO-PALATINES.**

**PHRC INTERREGIONAL JEUNES CHERCHEURS
PROTOCOLE DE RECHERCHE « HORS MEDICAMENT »**

ANNEE 2013

INFORMATIONS GENERALES

N° d'enregistrement délivré par l'AFSSAPS	NB : Ne sera délivré qu'avant le dépôt du dossier	
Promoteur :	CHU Reims	
Titre de la Recherche :	Analyse multi-génique ciblée de patients porteurs de fentes labio-palatines	
Titre abrégé	FLAG (Fente Labio-palatine Analyse Génique)	
Code étude		
Type de la Recherche :	<input type="checkbox"/> Evaluation d'examen ou de procédure à visée diagnostique <input checked="" type="checkbox"/> Etude Etiologique <input type="checkbox"/> Etude Pronostique <input type="checkbox"/> Essai de Prévention <input type="checkbox"/> Evaluation de Pratique	
Investigateur Coordonnateur :	Docteur Caroline FRANCOIS-FIQUET Chef de clinique assistant chirurgie infantile et plastique née le 19/10/1976 Tel 06 82 87 38 93 Affiliée à l' EA 3801 du Pr P Nguyen Faculté de médecine, SFR CAP santé, Reims	
Service et Adresse :	Service de chirurgie pédiatrique American Memorial Hospital 47 rue Cognacq Jay 51092 REIMS CEDEX	
Investigateurs et Centres associés	Professeur Martine DOCO-FENZY Professeur Marie-Laurence POLI-MEROL Professeur Dominique GAILLARD Docteur Camille LEROY Docteur Elisabeth ALANIO Docteur Jean-Paul BORY Professeur Nathalie BEDNAREK	
Collaborateurs scientifiques	Professeur Philippe NGYUEN Docteur Emilie LANDAIS Docteur Coralie BARBE Docteur KRAJECKY	
Comité de surveillance indépendant	<input type="checkbox"/> Oui	<input checked="" type="checkbox"/> Non
Date théorique de début de la Recherche : 01/03/2013		
Date théorique de fin de la Recherche : 01/03/2014		
Durée de participation d'un patient : Non applicable (collection biologique)		
Nombre de sujets inclus dans la Recherche : 50		
Recherche relevant de la Loi de Recherche Biomédicale : <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Si oui, description succincte de la balance Bénéfice /Risque		

Résumé

Nom des auteurs et Services concernés :

Docteur Caroline FRANCOIS-FIQUET 1-3
Professeur Martine DOCO-FENZY 2
Professeur Marie-Laurence POLI-MEROL 1
Professeur Philippe NGYUEN 3
Professeur Dominique GAILLARD 2
Docteur Emilie LANDAIS 2
Docteur Camille LEROY 2
Docteur Elisabeth ALANIO 4
Docteur Jean-Paul BORY 4
Professeur Nathalie BEDNAREK 5
Docteur Emilie LANDAIS 2
Docteur Coralie BARBE 6
Docteur KRAJECKY 7

1 CHU American Memorial Hospital service de chirurgie pédiatrique-REIMS
2 CHU Hôpital Maison Blanche Service de génétique et biologie de la reproduction-Reims
3 EA 3801- Université de Reims champagne Ardenne
4 CHU CPDPN
5 CHU service de neurologie pédiatrique
6 CHU Coordination de la recherche clinique
7 SFR Cap santé Reims Amiens service informatique

Titre de la Recherche :

Analyse multi-génomique ciblée de patients porteurs de fentes labio-palatines

Contexte médical :

Les fentes labiales et/ou palatines (FL et/ou P) sont l'anomalie cranio-faciale congénitale la plus fréquente. Elles peuvent être sporadiques ou familiales, syndromiques ou non. Leur étiologie est multifactorielle (toxique, génétique, environnementale...). Dans le cadre du bilan de cette pathologie les investigations génétiques comportent dans un premier temps un caryotype qui peut être complété par une recherche d'une délétion 22q11. En cas de syndromes suspectés cliniquement, une recherche de mutation ciblée (sur un seul gène) peut être proposée. Toutefois dans la majorité des cas aucune anomalie génique n'est identifiée.

Le CHU de Reims recense actuellement en moyenne un nouveau cas de FLP par semaine (centre de diagnostic prénatal (CPDPN), Chirurgie infantile, génétique et pédiatrie).

En 2010 nous avons obtenu un financement dans le cadre d'un AOL (CHU de Reims) pour une étude intitulée «Fentes labio-palatines : Approche étiologique » (investigateur Caroline François-Fiquet). Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'identification des remaniements génomiques grâce à la technique de CGH-Array. Actuellement 50 patients ont déjà été inclus. Les résultats sont en cours d'exploitations. Cependant cette analyse par CGH Array ne permet pas d'identifier les mutations géniques comme nous avons pu le constater chez au moins 50% des patients.

Plus d'une centaine de gènes ont été identifiés comme associé aux FLP syndromiques ou non syndromiques. Plusieurs articles très récents de la littérature ont fait un état des lieux des connaissances actuelles sur la cartographie d'une partie de ces gènes. Cependant, faute de moyens, tous ces gènes ne peuvent pas être étudiés de manière systématique chez chaque patient.

Objectifs :Principaux :

- Analyse multi-génique ciblée par technique de séquençage haut débit NGS (Next Generation Sequencing) des 94 gènes actuellement considérés comme impliqués avec les FLP
- Identification de mutations et analyse de leur fréquence

Secondaires :

- Poursuite du travail de recherche clinique initié par l'AOL 2010 concernant les remaniements génomiques
- Amélioration du conseil génétique aux patients ainsi qu'à leurs apparentés
- Avancée de la recherche clinique dans le domaine de l'étiologique des fentes labio-palatines

Matériel et Méthodes

Schéma expérimental : Recherche sur collection biologique.

Ce projet fait suite à l'étude « Fentes labio-palatines : Approche étiologique ». Il s'agissait d'une étude mono-centrique avec inclusion entre 2010 et 2012 de 50 patients opérés au CHU de Reims, d'une chirurgie primaire pour fente labiale, labio-palatine et palatine. Une collection biologique (ADN) a ainsi pu être constituée.

Tous les patients patients ont déjà bénéficié d'une analyse CGH Array (résultats en cours d'exploitation).

Population / patients :

Les patients inclus dans cette étude seront l'ensemble des patients inclus dans l'étude intitulée «Fentes labio-palatines : Approche étiologique » financée dans le cadre de l'AOL 2010 du CHU de Reims c'est à dire 50 enfants porteurs de fentes labio-palatines pris en charge dans le service de chirurgie pédiatrique de l'American Memorial Hospital du CHU de Reims pour chirurgie primaire de FL, FP, FLP.

Pour tous ces patients, une information sur les objectifs et les modalités de l'étude a été donnée lors de la consultation anténatale et/ou préopératoire et un consentement éclairé des titulaires de l'autorité parentale a été obtenu. UN prélèvement sanguin a été réalisé lors de l'induction anesthésique de la chirurgie primaire. L'ADN extrait du sang a été analysé par technique CGH Array.

Plan d'Investigation :

- Vérification de la qualité de l'ADN.
- Analyse des ADNs par la technique NGS de séquençage haut débit

Les patients présentant une histoire familiale de FLP seront analysés en priorité afin d'optimiser l'identification de mutation délétère.

Le séquençage sera ciblé sur 94 gènes déjà identifiés comme impliqués dans les FLP. La taille du génome correspondant à ces gènes a été calculée et des devis concernant la réalisation de ce séquençage ont déjà été reçus. L'intégralité des gènes sera séquencée en une seule fois.

L'analyse biologique (NGS) des ADNs sera sous-traitée et l'analyse bio-informatique sera réalisée par le laboratoire de génétique du CHU de Reims.

Le recueil des mutations, délétions ou insertions sera établi pour chacun des gènes analysés. Les contrôles de rigueur (à type de séquençage ciblé) seront effectués.

Critères de jugement :

Les critères de jugement pour cette étude seront :

- la qualité de l'ADN,
- la qualité de la séquence.
- l'aspect délétère ou non des variations de séquence observées homozygotes ou hétérozygotes

Conduite de l'étude :

Les consentements génétiques ont été obtenus, les ADNs sont déjà extraits et à disposition.

Sous-traitance pour la réalisation de l'analyse génique ciblée de 94 gènes référencés dans la littérature comme pouvant être des gènes candidats des fentes faciales, des devis concernant la réalisation de ce séquençage ayant déjà été reçus.

Analyse bio-informatique sera réalisée par le laboratoire de génétique du CHU de Reims.

Calendrier :

- Mars 2013 : envoi des ADNs (l'inclusion des patients et la constitution de la collection biologique ayant déjà été réalisés).
- Juin 2013 : réception des résultats (10 semaines étant nécessaires pour la réalisation du séquençage haut débit par le sous-traitant).
- Juin 2013 - Mars 2014 : les résultats seront analysés, confirmés et corrélés au phénotype ou signes cliniques par le porteur du projet, l'équipe du service de génétique et la plateforme de biologie innovante PRBI. Les études familiales seront menées en cas d'anomalie délétère observée. Tous les résultats seront expliqués aux familles au cours d'une consultation.

Plan d'Analyse Statistique :

Analyse qualitative des données. Recensement des mutations et variations de séquences

Résultats attendus et perspectives :Résultats attendus :

- Les mutations observées de ces gènes responsables de FLP seront répertoriées. Leur fréquence, qui n'a jamais été évalué par une telle analyse multigénique dans cette population, pourra être calculée. Cette information sera intéressante pour la population de notre région. Les retombées sont à la fois diagnostiques et scientifiques.
- Identification clinique de syndromes présents chez nos patients grâce à l'identification de mutations.
- Amélioration des conseils génétiques pour les futurs frères et sœurs de nos patients mais aussi pour leur propre descendance.
- Pour certains gènes analysés, le phénotype précis associé aux différentes mutations est inconnu et pourra ici être rapporté.

Perspectives :

- Amélioration de la prévention : L'analyse des anomalies géniques en rapport avec des gènes connus pour leur interaction avec les facteurs environnementaux pourrait être une piste intéressante de l'amélioration de la prévention.
- Analyse ciblée : Les fentes sont un panel de formes cliniques (unilatérale, bilatérale, labiale, palatine, labio-palatine, partielle ou totale...). Grâce à ce travail nous pourrions répertorier les mutations en fonctions de la morphologie des fentes pour proposer secondairement des analyses fondamentales plus ciblées afin de mieux comprendre la physiopathologie de ces malformations.

C. Projet séquençage haut débit 2012



**Open Call for proposals 2012
High throughput sequencing and Rare Diseases
“Mutation Platform” initiative**

***High throughput sequencing and Rare Diseases
Call for proposals***

1 - Project Identification form

Project title (maximum 120 signs)

Identification of the genes responsible for facial cleft.

Keywords: Cleft lip; cleft palate; facial cleft; exome sequencing

Rare diseases project: Yes No

Exome sequencing: Yes No **Number of samples:**

Region specific sequencing: Yes No **Number of samples:**

Monogenic disorder: Yes No **Multifactorial disorder:** Yes No

Genetic heterogeneity: Yes Likely No

Mode of inheritance of the disease: Ascertained Anticipated Unknown

- Autosomal dominant Autosomal recessive X-linked dominant X-linked recessive

Mail	caro_mtp@hotmail.com	
Complete address	Service de chirurgie pédiatrique American Memorial Hospital 47 rue Cognacq Jay 51092 REIMS CEDEX	
Tel	06.82.87.38.93	Fax

Laboratory (complete name)					
Service de génétique et de biologie de la reproduction-CECOS-Laboratoire Pol Bouin Centre de référence anomalies du développement et syndromes malformatifs					
Hopital maison blanche 45 rue Cognacq Jay 51092 Reims cedex FRANCE					
EA3801 du Pr P.NGUYEN UFR Médecine 51 rue Cognacq Jay 51092 Reims cedex FRANCE					
N° Unit (Dept) (if any)	Génétique UF 6131.....				
Name, First name of the lab. Director : Pr Dominique GAILLARD					
Team (complete name)					
Genetics					
Name, First name / head of the team : Pr Martine DOCO FENZY					
Complete address of the laboratory					
Service de génétique et de biologie de la reproduction-CECOS-Laboratoire Pol Bouin Centre de référence anomalies du développement et syndromes malformatifs					
Hopital maison blanche 45 rue Cognacq Jay 51092 Reims cedex FRANCE					
City	REIMS	Zip code	51092	Region	MARNE, FRANCE
Administration					
CHU Reims FRANCE					
EA3801, UFR Médecine Reims P.NGUYEN					

A2-Other partners

<i>Mr, Ms</i>	<i>Last name</i>	<i>First name</i>	<i>Laboratory (complete name/address)</i>	<i>Role and contribution</i>
Ms	LANDAIS	Emilie	plateforme PRBI (plate-forme régionale de biologie innovante) Hôpital Maison blanche CHU REIMS FRANCE	Engineer
Pr	POLI-MEROL	Marie-Laurence	Service de chirurgie pédiatrique American Memorial Hospital 47 rue Cognacq Jay 51092 REIMS CEDEX	Pediatric surgeon

Pr	NGUYEN	Philippe	EA3801 UFR Médecine 51 rue Cognacq Jay 51092 Reims cedex FRANCE	Director of a Research Laboratory
Dr.	ALANIO	Elisabeth	Service de histologie CHU Reims	Fetal – pathologist and ultrasound specialist CPDPN
Pr	BIREMBAUT	Philippe	Service Pol Bouin Hôpital Maison Blanche 47 rue Cognacq Jay 51092 Reims cedex FRANCE	Histological analysis and tumor database filing for facial cleft buds

Number of personnel involved in the project (person-months):

8 persons full-time

I hereby declare that all information in
this document are correct

Stamp from the laboratory
director

Read and approved,
December 20th, 2014 .
Caroline FRANCOIS-FIQUET, MD
Project coordinator

Pr. Dominique Gaillard
December 20th, 2011

II – Description of the project

Abstract (Not exceeding 1000 characters)
(objectives, strategy, expected results)

Cleft lip with or without cleft palate (CL/P) is among the most common congenital birth defects, amounting to approximately 1 in 600 live births.

Although the presence of a genetic component both in syndromic and non-syndromic CL/P has clearly been demonstrated, only in a few cases have the genes involved been identified, and in many cases, to date the mechanisms leading to the craniofacial defects in the presence of a specific gene alteration remain unknown.

The aim of this work is to sequence 50 genes each reported as associated (monogenic) with this pathology in 51 patients with facial clefts after primary surgery.

This original study will allow for evaluating in our population the genes most prone to mutations. To our knowledge the expected number of mutations cannot be evaluated.

The identified mutations will then be searched for in a large cohort of patients recruited within the reference centers (multi-centers).

1. Objectives: (1 page maximum, arial 11, single space)

Situate the project in its scientific context with indications 1/ on the targeted disease(s) and available knowledge, 2/ acquired or preliminary results obtained by the applicant(s), 3/ Objectives.

Include 3 general references (reviews, articles directly dealing with the questions addressed by the project).

Cleft lip with or without cleft palate (CL/P) is among the most common of all human congenital birth defects, and approximately 1 in every 600 newborns worldwide is affected (1/500 CL and CLP, 1/2000 CP Pr Vikkula 2009). CL +/- CP is typically classified into syndromic and non-syndromic forms. Syndromic forms (presence of a specific malformation pattern involving other associated abnormalities in addition to CL/P) are mostly due to monogenic diseases or chromosomal disorders, although in some cases, the origin of the disease is of environmental nature. Non-syndromic CL/P are more frequent (>70%) and consist of isolated, nonspecific malformations and show a multifactorial etiology due to the interaction of genetic background susceptibility associated with environmental factors.

Although the presence of a genetic component both in syndromic and non-syndromic CL/P has been clearly demonstrated, in only a limited number of cases have the genes involved been identified, and in many cases, only preliminary data are available regarding the underlying mechanisms leading to the craniofacial defects in the presence of a specific gene alteration.

There are 314 OMIM references for « cleft lip and cleft palate », including 56 reporting loci and genes. All were not directly imputed to facial clefts. Some were however considered as targeted genes:

TGFA, TGFB3 (Growth factors); MSX1, IRF6, TBX22 (Transcription factors); CYP1A1, GSTM1, NAT2 (xenobiotics metabolism); MTHFR (folic acid intake), RARA (vitamin A intake) (nutritional metabolism); PVRL1, IRF6 (immune response); EPHX1, GSTM1, GSTT1, NAT1, NAT2, CYP1A1 (smoking, drug habit, occupational exposure); SOX9, PVRL1, GAD1 (Pierre Robin sequence); and several other genes: MTHFR, D4S175,

F13A1, D17S250, APOC2, HDH1C (alcohol), RFC1 (folic acid intake), TP63, PITCH1, ABCA4, PARG1, KIAA1598, VAX1, KCNK18, NOG, DGKE, MAFB, PAX7, ZFP36L2, THADA, SCG5, GREM1, FMN1, PIK3R5, PIK3R6, NTN1, JAG2, MMP13, TIMP2, TGFB2, TFAP2A...

In the framework of a prospective monocenter approach within an AOL (« cleft lip-palate : etiological approach, investigator Caroline FRANCOIS-FIQUET, MD) and a thesis doctorate, we have included in a consecutive manner 51 patients operated at the Reims hospital for primary surgery of cleft lip and/or palate, between August 2009 and November 2011. We did a complete blood work after informed genetic consent from our patients. The DNA was extracted, controlled and stored in the genetics department.

Objectives:

The objective of this work was to sequence at least the 50 genes previously listed as associated with cleft lip and/or palate. This study will permit to evaluate in our population the genes most often in mutation. Furthermore, the identified mutations can be researched on a larger cohort of patients recruited within reference centers such as the *Reference Centers for Development Abnormalities* (les Centres de référence anomalies du développement et syndromes malformatifs de l'Est) coordinated by Pr. Laurence FAIVRE) where facial clefts are a common reason for consulting (256 consultations for facial clefts, syndromic or not (CEMARA: between January and June 2011).

Secondarily, this work has been completed by the expression analysis on biological samples of facial clefts (already available and stocked for patients)

References :

Mossey PA, Little J, Munger RG, et al. Cleft lip and palate. *Lancet* 2009;21:1773Y1785.

Genetics of syndromic and nonsyndromic cleft lip and palate. Stuppia L, Capogreco M, Marzo G, La Rovere D, Antonucci I, Gatta V, Palka G, Mortellaro C, Tetè S. *J Craniofac Surg*. 2011 Sep;22(5):1722-6.

Breakthroughs in the genetics of orofacial clefting. Mangold E, Ludwig KU, Nöthen MM. *Trends Mol Med*. 2011 Dec;17(12):725-33.

2. Description of samples available for the study (1 page)

Describe a) patients that will be analyzed in this project (family cases / trios / sporadic cases, etc.), with precise information on clinical phenotyping, pedigree, linkage studies; b) numbers of biological samples, quantity of available DNA (please make sure that the DNA shows a smearless high MW band on agarose gel).

Informed consent from patients as well as the DNA samples (with quality checked) **MUST be available at the time of project submission!**

We included 51 patients operated for primary surgery for cleft lip and/or palate between August 2009 and November 2011 at the CHU of Reims. Inclusions were consecutive after collecting the patients' genetic consent

Exclusion criteria:

- Complex syndromic types where the cleft was only part of the clinical picture
- Patients who already had a genetic diagnosis (e.g. Van Der Woude)
- Patients previously identified for teratogenic etiology (medications, toxics: fetal alcoholism syndrome)

	Number of patients	first degree familial form (brothers and sisters/ parents children)	2nd degree familial form	other history
cleft lip-palate	23 including 7 bilateral types	4	4	2 patients 1 associated bilateral kidney malformation 1 with six fingers on each hand
cleft lip	12 including 2 bilateral types	1	2	/
cleft palate	16 includingt 6 Pierre Robin sequences	5		4 patients 1 anterior penile hypospadias 3 congenital cataracts
all types included	51	10	6	3

Table 1 : summary of clinical pictures for our cohort, with available DNA

After informed genetic consent, we extracted DNA from 51 of our patients on blood samples as well as for some family members in case of familial forms.

The quality and quantity of our DNA samples were validated on the PRBI platform.

All samples were stained with Agarose gel and analyzed with a spectrophotometer (Nanodrop®)

In all our patients, biological cleft skin samples were kept from the surgery. They were frozen in liquid nitrogen in the OR than stocked for further transcription studies. (cf. AOL 2010)

3. Strategy: genes, genomic region, cumulated size or exome sequencing (1 page)

Important: Clearly state and **JUSTIFY** the choice of strategy (targeted regions or exome sequencing) and the choice of patients included in the study (trios, number of affected sibs, controls...) - Specifically mention the following criteria: modes of inheritance, family/sporadic cases, genetic heterogeneity, etc. in the choice of strategy -.

In case of sequencing of targeted regions, please justify the size of the regions to be sequenced (number of genes to be sequenced, size of intervals to be sequenced, coding vs. non-coding regions, miRNAs etc).

In case of Exome sequencing, would Whole Genome Sequencing, if available, be a more appropriate solution for your project? Justify in one sentence.

Within this project framework we would like to sequence all genes associated with cleft lip and/or palate.

We looked at performing an entire analysis of a whole exome but we identified 50 genes and two targeted areas (D4S175 and D17S250) which seem accessible for targeted sequencing.

According to the number of patients, this solution seems the most reasonable even if the whole exome remains the ideal solution allowing for a quick analysis, in one process of all known genes, it would also permit to look for new mutations and new genes involved..

Even if facial clefts are quite commonly seen and if several genes have been identified, it is quite difficult to establish a precise etiological diagnosis when they are non-syndromic (70% of cases). The targeted genes for facial clefts are not routinely sequenced. We would therefore like to propose an evaluation of the genes most often in mutations on a cohort of patients from the Reims region.

We would like to work on the following targeted genes:

Including regions of chromosomes 1, 2, 4, 6, 8, 10, 13, 15, 14, 17, 19, 20, X

Growth factors: *TGFA*, *TGFB3*

Transcription factors: *MSX1*, *IRF6*, *TBX22*

Genes involved in metabolism of xenobiotics: *CYP1A1*, *GSTM1*, *NAT2*

Genes involved in the nutritional metabolism: *MTHFR* (folic acid intake), *RARA* (vitamin A intake)

Genes involved in immune response: *PVRL1*, *IRF6*

Genes involved in smoking, drug intake, and occupational exposure: *EPHX1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *NAT1*, *NAT2*, *CYP1A1*

Pierre Robin sequence: *SOX9*, *PVRL1*, *GAD1*

Other genes:

MTHFR, *F13A1*, *APOC2*, *HDH1C* (alcohol), *RFC1* (folic acid intake), *TP63*, *PITCH1*, *ABCA4*, *PARG1*, *KIAA1598*, *VAX1*, *KCNK18*, *NOG*, *DGKE*, *MAFB*, *PAX7*, *ZFP36L2*, *THADA*, *SCG5*, *GREM1*, *FMN1*, *PIK3R5*, *PIK3R6*, *NTN1*, *JAG2*, *MMP13*, *TIMP2*, *TGFBR2*, *TFAP2A*...

Other loci : D4S175, D17S250

4. Expertise of the laboratory in analysis, annotation and interpretation of sequences to be produced in this project and strategy for validation of mutations (1/2 page)

Indicate how the interpretation of the data of high throughput sequencing will be managed and provide details on the collection of samples that, when warranted, will be used for the identification of other mutations to confirm the results from this sequencing project.

We are used to analyzing mutation on Sanger DNA sequencing and array-CGH.

Data analysis will be managed by colleagues already involved in high throughput sequencing (i.e. Cedric Le Caignec) but of course we will need help because it is our first experiment in this field.

We will confirm the mutations in our center on the genomic PRBI platform (www.prbi-ca.fr), on the same patients and on subsequently recruited patients.

We will also work with partners in the Easter Region of France “Centre de référence anomalies du développement et syndromes malformatifse, and the network of Reference centers for rare craniofacial malformations (Pr P. PELLERIN Lille, France) and rare malformations of the face and oral cavity (Pr MP VAZQUEZ, Paris, Fance) in order to recruit more patients to confirm the genes and mutations observed on a larger population.

The interpretation of the mutation will be based on the literature and completed by “local” expression analysis done on the material collected on the clefts.

5. Briefly describe the downstream research you intend to perform, including possible collaboration, for which this sequence information is a pre-requisite (1/2 page)

The future outcomes and perspectives of this project are :

Regarding fundamental research:

- Identify mutations ou polymorphisms in order to establish an overview of mutations in already known genes, knowing that there are no statistics on the frequency of these mutations in sporadic cases.
- Analyze expression profiles on cleft surgical materials. Establish a relationship between these various data.
- Analyze these genes' expression on embryo tissues and thus improve the comprehension of facial tissue development.

On a clinical level:

- Be able to identify a mutation to explain cleft etiology. Improve genetic counseling.
- Eventually in accordance with the CPDPN (centre pluridisciplinaire de diagnostic pré-natal-Multidisciplinary Center on prenatal diagnosis) envision prenatal diagnosis in case of syndromic type.

- Work on a list of genes to start pre-screening the most frequent mutations to be validated on cohorts recruited in reference centers.

Existing partnerships:

- Local ones CHU and EA 3801: expression analysis regarding angiogenesis pathway on facial clefts samples (AOL call for projects)
-
- PRES Reims-Amiens: Institut Faire Face (Pr. Devauchelle)
- In the Eastern regions with genetic consultations in the reference centers for development abnormalities and malformation syndromes - des Centres de référence anomalies du développement et syndromes malformatifs de l'Est (coordinator Pr. Laurence FAIVRE): i.e. 256 consultations for orofacial clefts, syndromic or not (CEMARA: on the first six months of 2011).
- But also with the reference centers on facial clefts in Lille under the supervision of Pr. P.Pellerin but also in Paris with the team supervised by Pr. MP Vazquez. (with surgical mobility already completed or soon to be)
- On an international level with the Plastic surgery team of Beijing (China) and the team of the Sainte Justine Hospital in Montréal (Canada), with surgical mobilities planned for 2012.

6. Existence of similar and/or competing projects (1/2 page)

Situation of the project in the international competition, international coordination; priority of the project.

As far as we know this project is the first of its kind on throughput sequencing about cleft lip and palate.

This pathology is common but the number of genes involved and the influence of some environmental factors underline the difficulties for establishing a diagnosis.

ARTICLE

The 2q37-deletion syndrome: an update of the clinical spectrum including overweight, brachydactyly and behavioural features in 14 new patients

Camille Leroy^{1,2,3}, Emilie Landais^{1,2,4}, Sylvain Briault⁵, Albert David⁶, Olivier Tassy⁷, Nicolas Gruchy⁸, Bruno Delobel⁹, Marie-José Grégoire¹⁰, Bruno Leheup^{3,11}, Laurence Taine¹², Didier Lacombe¹², Marie-Ange Delrue¹², Annick Toutain¹³, Agathe Paubel¹³, Francine Mugneret¹⁴, Christel Thauvin-Robinet^{3,15}, Stéphanie Arpin¹³, Cedric Le Caignec⁶, Philippe Jonveaux^{3,10}, Mylène Beri¹⁰, Nathalie Leporrier⁸, Jacques Motte¹⁶, Caroline Fiquet^{17,18}, Olivier Brichet¹⁶, Monique Mozelle-Nivoix^{1,3}, Pascal Sabouraud¹⁶, Nathalie Golovkine¹⁹, Nathalie Bednarek²⁰, Dominique Gaillard^{1,2,3} and Martine Doco-Fenzy^{*,1,2,3,18}

The 2q37 locus is one of the most commonly deleted subtelomeric regions. Such a deletion has been identified in > 100 patients by telomeric fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis and, less frequently, by array-based comparative genomic hybridization (array-CGH). A recognizable '2q37-deletion syndrome' or Albright's hereditary osteodystrophy-like syndrome has been previously described. To better map the deletion and further refine this deletional syndrome, we formed a collaboration with the Association of French Language Cytogeneticists to collect 14 new intellectually deficient patients with a distal or interstitial 2q37 deletion characterized by FISH and array-CGH. Patients exhibited facial dysmorphism (13/14) and brachydactyly (10/14), associated with behavioural problems, autism or autism spectrum disorders of varying severity and overweight or obesity. The deletions in these 14 new patients measured from 2.6 to 8.8 Mb. Although the major role of *HDAC4* has been demonstrated, the phenotypic involvement of several other genes in the deleted regions is unknown. We further refined the genotype–phenotype correlation for the 2q37 deletion. To do this, we examined the smallest overlapping deleted region for candidate genes for skeletal malformations (facial dysmorphism and brachydactyly), overweight, behavioural problems and seizures, using clinical data, a review of the literature, and the Manteia database. Among the candidate genes identified, we focus on the roles of *PRLH*, *PER2*, *TWIST2*, *CAPN10*, *KIF1A*, *FARP2*, *D2HGDH* and *PDCD1*.

European Journal of Human Genetics advance online publication, 17 October 2012; doi:10.1038/ejhg.2012.230

Keywords: 2q37-deletion syndrome; genotype–phenotype correlation; intellectual disability; overweight; brachydactyly; AHO-like syndrome

INTRODUCTION

Deletions of the distal 2q37 region involve the last cytogenetic band on the long arm of chromosome 2, which is divided into three sub-bands: 2q37.1, 2q37.2 and 2q37.3. The last sub-band notably contains a small subtelomeric region, 2qtel, which displays non-deleterious polymorphic deletions or duplications. 2q37 Deletions have been described in > 115 patients in the literature, associated clinically with intellectual deficiency, brachydactyly, obesity and short stature, ie, the so-called Albright's hereditary osteodystrophy-like (AHO-like) syndrome (OMIM: brachydactyly-mental retardation syndrome no.

600430; <http://omim.org/>). A precise mapping of the deleted regions is not often available, as most published cases have been characterized by conventional cytogenetics, subtelomeric fluorescence *in situ* hybridization (FISH) or microsatellite markers, and array-based comparative genomic hybridization (array-CGH) has only been used in a few studies.^{1–10}

At least 197 genes are located in the 2q37 region (230.7–243.2 Mb; Hg19; NCBI map viewer <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>). Of these, 11 have been reported as being potentially related to the 2q37-deletion phenotype so far,^{5,10–17} but the phenotypic implications of

¹CHU-Reims, HMB, Service de génétique, Reims, France; ²UFR de médecine, SFR-CAP SANTE, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France; ³Centre de Référence Maladies Rares « Anomalies du Développement et Syndromes Malformatifs » de la Région Est, France; ⁴CHU-Reims, HMB, Plateforme Régionale de Biologie Innovante, Reims, France; ⁵CHR-Orléans, Service de génétique, Laboratoire d'Immunologie et Neurogénétique expérimentales et moléculaires, Hôpital de la Source, UMR 7355, CNRS—Université d'Orléans, Orléans, France; ⁶CHU-Nantes, Service de génétique médicale, Nantes, France; ⁷Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC)-Illkirch, CNRS (UMR 7104), Inserm (U964), Université de Strasbourg, Illkirch, France; ⁸CHU-Caen, Département de génétique, Hôpital de la Côte de Nacre, Caen, France; ⁹CHU-Lille, Centre de génétique chromosomique, Hôpital Saint Vincent de Paul, Lille, France; ¹⁰CHU-Nancy, Laboratoire de cytogénétique et génétique moléculaire, Hôpital Brabois, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France; ¹¹CHU-Nancy, Service de médecine infantile 3 et de génétique clinique, Hôpital Brabois enfants, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France; ¹²CHU-Bordeaux, Service de génétique médicale, Laboratoire MRGM, Hôpital Pellegrin, Université de Bordeaux, Bordeaux, France; ¹³CHRU-Tours, Service de génétique, Hôpital Bretonneau, Tours, France; ¹⁴CHU-Dijon, Laboratoire de cytogénétique, Plateau technique de Biologie, Dijon, France; ¹⁵CHU-Dijon, Centre de génétique, Hôpital du Bocage, Equipe d'accueil GAD, IFR 100 Santé STIC, Université de Bourgogne, Dijon, France; ¹⁶CHU-Reims, American Memorial Hospital, Service de Pédiatrie A, Reims, France; ¹⁷CHU-Reims, American Memorial Hospital, Service de Chirurgie pédiatrique, Reims, France; ¹⁸Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France; ¹⁹CHU-Reims, Service de psychothérapie de l'enfant et l'adolescent, Hôpital Robert Debré, Reims, France; ²⁰CHU-Reims, American Memorial Hospital, Service de Pédiatrie B, Reims, France

*Correspondence: Professor M Doco-Fenzy, CHU-Reims, HMB, Service de Génétique, 45 rue Cognacq Jay, EA3801, Reims 51092, France. Tel: +33 3 26 78 85 82; Fax: +33 3 26 78 41 45; E-mail: mdocofenzy@chu-reims.fr

Received 23 May 2012; revised 21 August 2012; accepted 11 September 2012

most of them remain unknown. Among the candidate genes with a known phenotype, *HDAC4* has notably been established as being responsible for brachymetaphalangy and intellectual disability.¹⁰ *HDAC4* (MIM 605314) is a class II histone deacetylase that functions as a corepressor for DNA-binding transcription factors. It is a member of a group of enzymes that catalyses the removal of the acetyl group from lysine residues in histones and nonhistone proteins, resulting in the repression of transcription. They are ubiquitously expressed and have a role in transcriptional regulation, cell cycle progression and developmental events. *HDAC4* is critical for proper skeletogenesis and chondrogenesis as well as neuronal survival.¹⁰

To obtain optimal genotype–phenotype correlations for other candidate genes, a collaborative study was initiated within the telomere network of the Association des Cytogénéticiens de Langue Française (Association of French Language Cytogeneticists, ACLF), enabling us to investigate 14 patients with a 2q37 deletion. The proximal breakpoint of the deletions, the parental origin of the deleted allele and the presence of the 2qtel polymorphism were analysed. The genotype–phenotype correlation analysis was then focused on some of the clinical features often associated with the 2q37 deletion, such as facial dysmorphism, brachydactyly, obesity, intellectual disability, seizures and behavioural disorders of the autistic spectrum (ASD). We used the data mining tool Manteia (<http://manteia.igbmc.fr/>), and notably the rodent database (Mouse Genome Informatics (MGI)), to optimize the search for candidate genes in a region of nearly 9 Mb corresponding to our longest deletion (P1) from 2q37.1 to the telomere. This tool enabled us to propose a map of genes of interest for the main clinical features.

MATERIALS AND METHODS

Population

A collaborative study was set up to collect patients from seven centres for genetics (2002–2011). Informed consent was obtained for all patients tested. We recruited 14 patients (6 males and 8 females) with a known 2q37 deletion. Their ages ranged from 4 to 39 years. In total, 12 patients had terminal deletions, including 9 with purely distal deletions (P1–4, P6, P7, P10, P11 and P13) and 3 with a deletion due to translocation (P8, P9 and P12). One patient had an interstitial 2q37.2 deletion (P5) and one patient had a 2q37 del/dup rearrangement (P14).

Methods

All samples were obtained and analysis performed with the required consent from patients or their parents.

Karyotyping

Conventional cytogenetic analyses were performed on peripheral blood lymphocytes using the 550-band and/or 850-band level, including GTG and RHG banding for family members.

Fluorescence *in situ* hybridization

Academic and commercial probes were used. Among them RP11-341N2, GS-1011O17 and RP11-789L24 were used for diagnosis and to test the 2qtel polymorphism in parents and probes RP11-574K22 (P10), RP11-35112 (P4) and RP11-332L11 (P4) for 2q37-deletion mapping. DNA for noncommercial probes was extracted from BAC and PAC colonies (N Carter, Sanger institute, Cambridge, UK), amplified with the illustra TempliPhi amplification kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) and labelled with Cyanine3-dCTP or Biotin-dNTP using a nick translation method (BioNick™ DNA Labeling System, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Hybridizations with commercial subtelomeric probes were performed according to the manufacturers' recommendations. Deletions were detected or confirmed by FISH in all 14 cases.

Array-CGH

Genomic DNA samples were extracted from peripheral blood using the QIAamp DNA Blood Midi kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Array-CGH was performed in all patients using the Agilent 60 k (one patient) or 180 k (nine patients) oligoarrays (Human Genome CGH Microarray Kit, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) or a BlueGnome (Cambridge, UK) BAC/PAC microarray (four patients). Random primer labelling and hybridization were carried out with sex-matched reference DNA according to the manufacturer's recommendations. Images were acquired using an Agilent or Axon scanner (Axon, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Data were processed with Genepix 6.0 (Axon), BlueFuse (BlueGnome) or Feature Extraction (v9.5.3.1) software (Agilent Technologies), and results were analysed with the CGH Analytics software (v3.5.14; Agilent Technologies) using the ADM2 algorithm and a three-point filter.

Quantitative PCR

Quantitative PCR was performed in three patients (P8, P9 and P14) to clarify the position of the proximal breakpoint. Primers for the *COL6A3* and *HDAC4* genes were designed and tested using standard procedures (Eurogentec, Seraing, Belgium) on a LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

Genotyping

DNA genotyping of family members was performed by PCR amplification using standard procedures, with a panel of five sequence-tagged site microsatellite primers specific to chromosome 2 (region 2q37.3): D2S125, D2S2985, D2S2988, D2S2986 and D2S2585 (Eurogentec).

Data-mining software manteia

Manteia is a database integrating different kinds of data generated from human and animal models within a single framework, for *in silico* data mining. The system permits all experimental results and annotations from animal models to be linked to the human genome, making it possible to take advantage of data not available for humans to look for candidate genes responsible for genetic disorders. To highlight genes from the 2q37 deletion that could be responsible for each clinical feature observed in patients, we used Manteia to select those known to lead to obesity, abnormal behaviour or bone abnormalities in humans or mice. The MGI mouse data set were used because it contains numerous annotations including those from knockout experiments to provide genotype–phenotype correlations not available for humans.

RESULTS

Clinical characteristics

The clinical features of the patients are summarized in Tables 1 and 2.

The skeletal phenotype in the 2q37-deletion syndrome is well known and characteristic. In this series, 13/14 patients had a specific facial dysmorphism and 10/14 displayed brachydactyly type E (brachymetacarpus and/or brachymetatarsus). The facial dysmorphism was remarkable for frontal bossing (5/13), uncombable hair with a low frontal hairline (6/13), thin eyelids (10/13), thin palpebral fissures (8/13), a small nose with a V-shaped tip (11/13), protruding cheekbones (5/13), a small mouth with thin lips (12/13), smooth philtrum (11/13), low-set ears (8/13) and a large chin (7/13; Figure 1). Bilateral AHO-like brachydactyly was present in 10/14 patients and detected as early as 4 years of age. Brachymetacarpus was present in 9/13 patients, always present and more severe in the fourth digital ray. The fifth digital ray was also shortened in four patients, and both the third and fourth digital rays in one patient. Brachymetatarsus was present in 6/11 patients. The fourth and fifth digital rays were most often shortened compared with the second and third digital rays. Broad halluces and asymmetrical legs were present in six and two patients, respectively, (Figure 1, Tables 1 and 2). Three patients

Table 1 Clinical features of patients with purely distal 2q37 deletions

Patient	P1	P2	P3	P4	P6	P7	P10	P11	P13	Total cases (pure)
2q37 Deletion size ^a (Mb)	8.8	8.6	8.5	8.2	6.5	5.2	4.2	4.1	3.5	
Cytogenetic localization	del(2)(q37.1)	del(2)(q37.1)	del(2)(q37.1)	del(2)(q37.1)	del(2)(q37.1)	del(2)(q37.2)	del(2)(q37.3)	del(2)(q37.3)	del(2)(q37.3)	
Parental origin of deleted allele	Pat	NA	Pat	Pat	NA	Mat	Pat	Mat	NA	4 Pat/2 mat
Sex	F	F	F	F	F	M	F	F	M	2 M/7 F
Age at evaluation (years)	39	18	17	9	4	17	9	11	14	
Global developmental delay	Moderate	Moderate	Moderate, language gauge conserved	Moderate, lan- severe, language absent	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate, language absent	Mild, dyscalculia	9/9
Hypotonia	–	–	–	Axial Stereotypies, refusal to make eye contact	Axial Echolalia	–	–	–	–	3/9
Autistic spectrum disorders	NA	–	NA	Frustration intolerance, self-biting	Enuresis, frustration intolerance, AD	Physical touch repulsion	Echolalia, bright lights attraction	Whistling and rocking stereotypes	–	5/7
Other behavioural problems	NA	Strangeness, restlessness	NA	–	–	Ag. opposition, coprophagy, polyphagy	–	–	Voluble, talkative, very friendly, AD	5/7
<i>Growth parameters</i>										
IUGR	+	NA	–	–	–	+	+	–	–	3/8
Short stature (< –2 SD)	–	+	–	–	–	–	–	+	–	2/9
Thinness vs obesity/overweight										
BMI-for-age ^b	Obesity 36 (> +2 SD)	Overweight 26.4 (+1.5 SD)	Overweight 26.6 (+1.5 SD)	Overweight 19.5 (+1.5 SD)	Overweight 17 (+1SD)	Suspected overweight	–	Severe thinness 12.8 (< –3 SD)	Obesity 29.8 (> +2 SD)	Overweight or obesity 6/8
<i>Skeletal abnormalities</i>										
Brachydactyly (hand/foot rays)	4, 5/NA	4/4	4/3, 4, 5	3, 4, 5/3, 4, 5	NA/4, 5	4, 5/NA	–	4/NA	–	7/9
Broad hallux	–	+	–	+	+	–	–	–	–	3/9
Joint hypermobility	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1/9
Asymmetrical limbs	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1/9
<i>Facial dysmorphism</i>										
Low and uncombable frontal set hair	+	+	+	+	–	+	–	–	+	6/9
Frontal bossing	–	–	–	+	–	–	+	–	–	2/9
Thin and arched eyebrows	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9/9
Narrow palpebral fissures	+	+	+	+	+	+	+	–	+	8/9
V-shaped appearance of nasal tip	+	+	+	+	+	–	+	+	+	8/9
Hypoplastic alae nasi	–	–	–	+	+	+	+	+	–	5/9

Table 1 (Continued)

Patient	P1	P2	P3	P4	P6	P7	P10	P11	P13	Total cases (pure)
Smooth philtrum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8/9
Thin upper lip	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8/9
Broad and square chin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6/9
Full cheeks	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4/9
Deep-set ears	NA	+	+	+	+	+	+	+	+	6/8
Other	Lower limbs lymphoedema, thrombopenia, hyperthyroidism			Ectopic kidney	Constipation, febrile seizures	Stretch marks	Clubfeet, sacral dimples, scoliosis, long and thin fingers, DSP	Seizures, urinary reflux, umbilical H, APA, cleft palate, Feilty syndrome, DBD	Astigmatism, anaemia, haematoma	

Abbreviations: AD, attention deficit; Ag, aggressiveness; APA, abnormal placement of anus; BMI, body mass index; DBD, diffuse bone demineralization; DSP, decreased sensibility to pain; F, female; Feilty's syndrome, neutropenia, large spleen and juvenile chronic arthritis; H, hernia; IUGR, intrauterine growth retardation; NA, not available; M, male; Mat, maternal; Pat, paternal.
^aMinimal deleted region.
^bWHO reference curves 2007.

displayed short stature, <2 SD below the mean (P2, P8 and P11). Four patients had normal growth and stature (P9, P10, P12 and P14).

The body weight of the patients was evaluated and three categories defined: normal, overweight (a body mass index (BMI), higher than 1 SD above the mean) and obesity (BMI > 2 SD), according to BMI-for-age reference curves (WHO 2007). Five patients > 4 years of age were overweight (P2, P3, P4, P6 and P8), and three patients > 7 years of age were obese (P1, P5 and P13). For patient P7, the BMI was not available but clinical abdominal adiposity was described with a suspicion of overweight. One patient (P11) displayed delayed growth, with both BMI and height < 3 SD below the mean.

Some patients had a past history of hypotonia (5/14). All patients had global developmental delays or mild to severe intellectual deficiencies according to their age. A lack of language acquisition was noted in two patients (9 years and 11 years). In total, 10 of 12 patients (not available for 2 patients) displayed abnormal behaviour, 7 displayed ASDs (7/12) and 4 displayed attention deficit or hyperactivity disorder (4/12). Seizures were present in 3/14 patients.

Malformations were also observed in 6 patients, including hernias (3/14), cryptorchidism (2/14), clubfeet (2/14) and cleft palate (1/14).

Deletion mapping

Among the 14 patients, 13 (P1–4, P6–14) had distal 2q37 deletions ranging from 2.6 to 8.8 Mb. The largest encompassed 120 genes. The proximal breakpoints (Hg19) were distributed among the three sub-bands, 2q37.1, 2q37.2 and 2q37.3 (Table 3). Nine patients had purely distal deletions (P1–4, P6–7, P10–11 and P13). Three patients had a 2q37 deletion derived from translocations: der(2)t(2;6)(q37.3;p25.3) for P8, der(2)t(2;3)(q37.3;q29) for P9 and der(2)t(2;21)(q37.3;qter) for P12. P5 had an interstitial 2q37.2 deletion of 1.1 Mb and P14 a der(2)dup(2)(q37.2q37.3)del(2)(q37.3) rearrangement. The results of the mapping are summarized in Figure 2 and Table 3.

Parental analysis

We performed segregation analysis to correlate the phenotype with the origin of the 2q37-deleted chromosome (paternal or maternal) and to explore the hypothesis that the 2qtel polymorphism could be a predisposing deletion in the parents.

Both parental samples for genotyping were available in nine families. Microsatellite markers ascertained a paternal origin of the 2q37 deletion in five patients and a maternal origin in four patients. We used FISH to search for the 2qtel polymorphism in eight families, and detected it in the three normal fathers of P2, P3, and P8. P2's mother was deceased. In the family of P3, the 2q37 deletion was of paternal origin and the father had a 2qtel polymorphism, but we could not ascertain if this polymorphic chromosome was transmitted. In the family of P8, the 2q37 deletion was of maternal origin. According to data from the fathers of P2, P3, and P8 and 14 other normal subjects (data not shown), the length of the so-called polymorphism or polymorphic 2qtel deletion was < 500 kb. Therefore, among the parents tested, none had the same deletion as their child.

Genotype-phenotype correlation

We classified the pathological clinical features observed in the patients into three main groups: 'skeleton' for facial dysmorphism/brachydactyly, 'weight' for overweight/obesity and 'behaviour' for ASD/behavioural problems. To clarify the role of each of the deleted genes in the three groups, we listed candidate genes for these clinical features in

Table 2 Clinical features of patients with interstitial or associated distal 2q37 deletions.

Patient	P8 ^a	P9 ^a	P12 ^a	P14 ^a	Total cases (associated)	P5 (interstitial)
2q37 Deletion size ^b (Mb) Cytogenetic localization	5 der(2)(2:6)(q37.3;p25.3)	4.8 der(2)(2:3)(q37.3;q29)	3.9 der(2)(2:2:1)(q37.3;qter)	2.6 der(2)dup(2)(q37.2q37.3) del(2)(q37.3)	1.1 del(2)(q37.2q37.2)	1.1 del(2)(q37.2q37.2)
Parental origin of deleted allele	Mat	NA	Pat	Mat	1 Pat/2 Mat	NA
Sex	M	M	F	M	3 M/1 F	M
Age at evaluation	7 years 10 months	16 years	16 years 1/2	7 years 10 months	4/4	7 years 10 months
Global developmental delay	Moderate	Mild	Moderate	Mild	2/4	Mild
Hypotonia	Axial	Distal muscular weakness	—	—	2/4	—
Autistic spectrum disorders	Stereotypies, light obsession	—	Obsessive disorders	—	2/3	—
Other behavioural problems	Ag. frustration intolerance, AD, sleeping difficulties	ADHD, sleeping difficulties	NA	—	—	—
<i>Growth parameters</i>						
IUGR	—	—	+	—	1/4	—
Short stature (< -2 SD)	+	—	—	—	1/4	—
Thinness vs obesity/overweight	Overweight	—	—	—	Overweight 1/4	Obesity
BMI-for-age ^c	18.3 (+1.5 SD)	—	—	—	—	20.7 (> +2 SD)
<i>Skeletal abnormalities</i>						
Brachydactyly (hand/foot rays)	3, 4/4	3, 4, 5/2, 3, 4, 5	4/4, 5	—	3/4	—
Broad hallux	+	+	—	+	3/4	—
Joint hypermobility	+	+	—	+	2/4	—
Asymmetrical limbs	—	+	—	—	1/4	—
<i>Facial dysmorphism</i>						
Low and uncombable frontal hair	—	—	—	—	0/4	—
Frontal bossing	+	+	—	+	3/4	—
Thin and arched eyebrows	+	—	—	—	1/4	—
Narrow palpebral fissures	—	—	—	—	0/4	—
V-shaped appearance of nasal tip	+	+	+	—	3/4	—
Hypoplastic alae nasi	—	—	—	—	0/4	—
Smooth philtrum	+	+	+	+	3/4	—
Thin upper lip	+	+	+	—	4/4	—
Broad and square chin	—	—	+	—	1/4	—
Full cheeks	+	—	+	—	1/4	—
Deep-set ears	+	+	—	—	1/4	—
Other	Cryptorchidism, inguinal H, pyloric stenosis, WSN, congenital torticollis, clubfoot, oculomotor dyspraxia	Abnormal teeth enamel, umbilical H	Seizures	Cryptorchidism, left megaureter, long fingers, livedo	2/4	Retrocerebellar cyst

Abbreviations: AD, attention deficit; ADHD, attention deficit hyperactivity disorder; Ag, aggressiveness; BMI, body mass index; F, female; H, hernia; IUGR, intrauterine growth retardation; M, male; Mat, maternal; NA, not available; Pat, paternal; WSN, wide-spaced nipples.

^aNon-isolated 2q37 deletion.

^bMinimal deleted region.

^cWHO reference curves 2007.

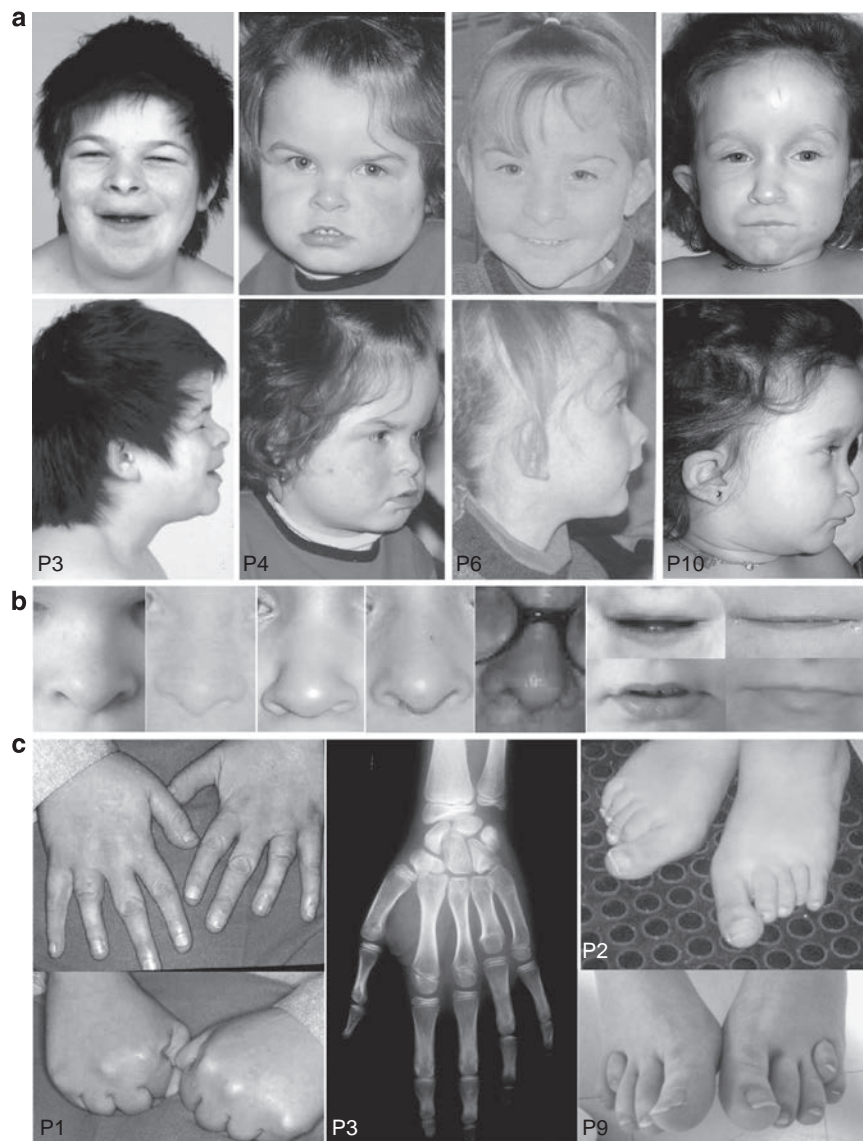


Figure 1 (a) Photographs of patients P3, P4, P6, and P10 at 17, 2, 4 and 4.5 years of age, respectively. (b) Photographs of the nose showing the V-shape of the nasal tip; photographs of the mouth showing the thin upper lip and smooth philtrum. (c) Photographs and X-rays of the hands and feet of patients P1, P3, P2 and P9, showing brachydactyly type E affecting the fourth digital ray (P1, P2 and P3) and second, third, fourth and fifth digital rays (P9).

the 14 patients and in the literature and used the Manteia database to compare them to genes from the homologous region of the mouse genome associated with a similar phenotype (Figure 3). To find genes related to skeletal abnormalities, we searched the database using the terms ‘skeletal phenotype’, ‘abnormal axial skeleton morphology’ and ‘craniofacial phenotype’. We also included the terms ‘brachydactyly’ and ‘abnormal paw/hand/foot morphology’, however, no candidates related to these terms could be found. We searched for obesity-related genes using the term ‘increased body weight’ in the phenotype data set. For abnormal behaviour, we looked for genes related to ‘abnormal social interaction’, ‘abnormal behaviour’ or ‘seizure’ phenotypes. Two genes, *PER2* (MIM 603426) and *HDAC4*,¹⁰ were found to be involved in all three groups. However, in this cohort, some patients without brachydactyly displayed an *HDAC4* deletion, and this discrepancy needs to be explored. Thereby, to correlate the candidate genes of the Literature and Manteia with the phenotypes of our patients, we

established three maps named ‘skeleton’, ‘weight’ and ‘behaviour’ (Figure 4).

DISCUSSION

Mapping

Subtelomeric deletions associated with developmental delays account for 2.5% of the aetiology of learning disabilities. In the largest study of the kind, in which the telomeres of 11 688 individuals were investigated, the 2qtel subtelomeric deletion was a frequently encountered variation, observed in seven patients as a pure deletion.¹⁸ In the study by Ravnan *et al*, near half of the phenotypically altered patients had terminal 2q deletions, but it was not explicitly indicated whether the 2q deletion was a deleterious del 2q37 or only the common polymorphism. Indeed, the first subtelomeric FISH probes used encompassed the polymorphic loci.¹⁹ In the literature, >115 patients with 2q37 deletions were described between 1983 and

Table 3 2q37 Deletion mapping results and associated CNVs obtained by array-CGH (Hg 19)

Patient	2q Cytoband	End of last probe still present (bp)	Start of first deleted probe (bp)	Minimal size (Mb)	Associated CNV	Comments
P1	q37.1q37.3	234 394 188	234 429 660	8.77	No	
P2	q37.1q37.3	234 436 218	234 605 832	8.59	No	
P3	q37.1q37.3	234 655 746	234 670 367	8.53	No	
P4	q37.1q37.3	235 022 777	235 036 825	8.16	No	
P6	q37.2q37.3	236 665 772	236 716 581	6.48	dup(10)(p21.1p21.1) 197 kb chr10:26 797 312–26 993 952 bp	Encompasses the 12 last exons of APBB1IP not involved in the clinical features of the patients (P1-14)
P7	q37.3	237 985 224	238 000 056	5.2	No	
P10	q37.3	238 798 998	238 996 422	4.2	No	
P11	q37.3	239 084 078	239 105 871	4.09	del(4)(q22.1q22.1) 142 kb chr4:92 550 144–92 692 347 bp	Encompasses a partial part of FAM190A (intron)
P13	q37.3	239 636 287	239 665 010	3.53	dup(7)(q36.2q36.2) 285 kb chr7:153 332 127–153 617 280 bp	Encompasses the first exon of DPP6 (polymorphic region)
P8	q37.3	237 554 113	238 258 614	4.94	dup(6)(p25.3) 1.21 Mb chr6:145 997–1 356 756 bp	6p25 Duplication associated with low birth weight, mental retardation, obesity, facial dysmorphism and seizures ⁴⁰
P9	q37.3	238 410 947	238 440 095	4.76	dup(3)(q29) 1.87 Mb chr3:195 932 835–197 803 820 bp	3q29 Duplication syndrome associated with mental retardation, microcephaly, obesity and facial dysmorphism (OMIM no. 611936)
P12	q37.3	239 275 210	239 307 975	3.89	dup(21)(qter)	Absence of variation on chromosome 21 with array-CGH
P14	q37.3	240 548 464	240 575 606	2.62	dup(2)(q37.2q37.3) 3.51 Mb chr2:237 038 297–240 548 464 bp	No reported patient with pure and similar 2q37 duplication and described phenotype (DECIPHER and literature)
P5 interstitial	q37.2	Maximal deleted region 235 670 886–236 827 204	Minimal deleted region 235 744 424–236 817 126	1.07	No	DECIPHER patient 251750 with similar interstitial deletion (autism and developmental delay)

Abbreviations: CGH, comparative genomic hybridization; CNV, copy number variation.

2012. Among them, 74 had pure 2q37 deletions (71 distal and 3 interstitial), and 41 showed associated rearrangements (37 reciprocal translocations and 4 inv/dup deletions)^{1–10,13–17,20–33} (Table 4). A precise mapping of the deletions, however, was carried out in only a few studies (27/115 patients).^{1–10,13,14,24,25,30,32} The patients with purely distal deletions (seven females, three males) included in the DECIPHER database (<http://decipher.sanger.ac.uk/>) had various deletion sizes ranging from 3 to 9.9 Mb. Unfortunately, clinical features were only mentioned for 2 of the 10 patients. However, clinical data were included for four females with rearranged distal deletions ranging in size from 1.59 to 5.78 Mb. In our series, we proceeded to carefully map the deletions of all patients, and observed the typical 2q phenotype regardless of the size of the deletion, which ranged from 8.8 Mb (P1) to 2.6 Mb (P14).

Parental analysis

In accordance with the report by Ravnan *et al*¹⁸ showing that the majority of chromosomal terminal deletions were *de novo* (48/60 familial studies), we confirmed in our series that, strictly speaking, no

patient had inherited the 2q37 deletion from his/her parents. The 2q polymorphism is a common condition in the population (5%).³⁴ Indeed, three parents (out of eight families tested) had the 2q polymorphism. Moreover, considering the possible role of the 2q polymorphism as a predisposing factor for the largest distal 2q deletion, the family of P8 illustrates the opposite trend. Indeed, the deleted 2q37 region was of maternal origin whereas the 2q polymorphism was found in the father. Parental origin did not seem to interfere in the phenotype, as an analysis of the ratio of paternal (five) to maternal (four) origin showed no bias.

Phenotype–genotype correlation

The 2q37 deletion or 2q subtelomeric microdeletion is a condition that overlaps a recognizable ‘2q37-deletion syndrome’ with an AHO-like phenotype. Table 4 shows similarities between the literature and this study for clinical findings, such as developmental delays, abnormal behaviour, brachydactyly type E and dysmorphic features, but discrepancies can be noted with respect to weight, as discussed in a later paragraph. There was no obvious difference in phenotype

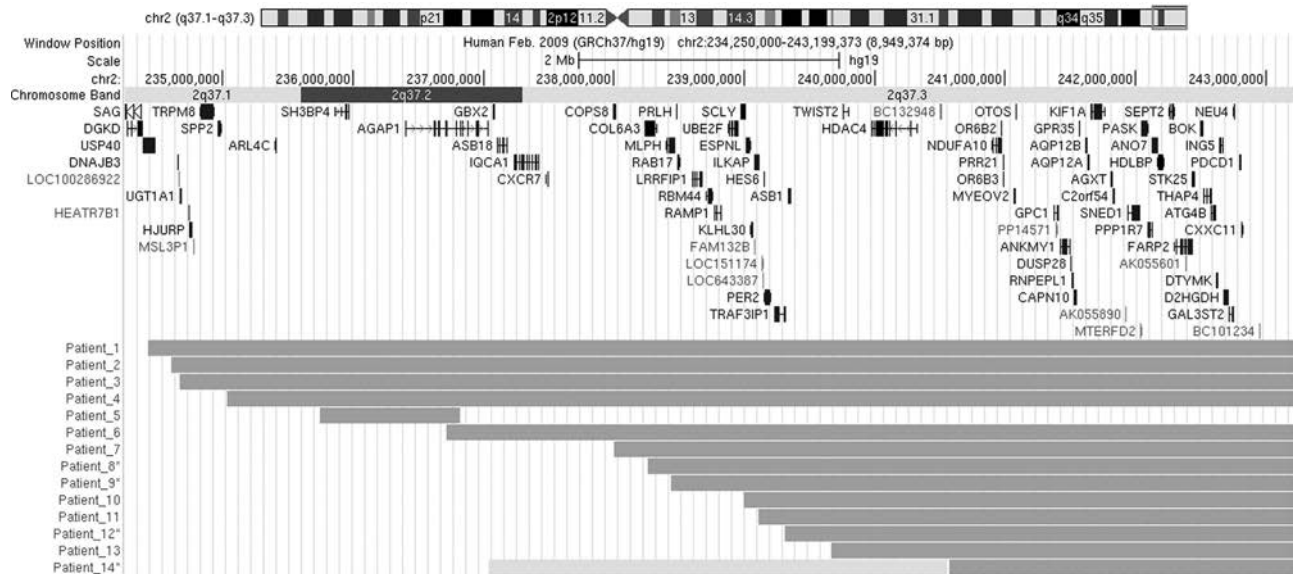


Figure 2 Map of 2q37 deletions in the 14 patients (dark grey) and of the duplicated region in P14 (light grey), with the included genes (UCSC genome browser: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>).

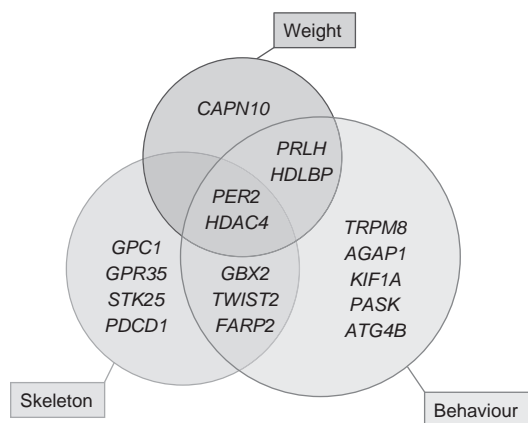


Figure 3 Graphical representation of candidate genes reported in the literature and deduced from the Manteia database for the three groups of features (skeleton, behaviour and weight).

between global (pure and associated) and pure 2q37 deletions. A sex ratio bias observed in the literature (65 females/44 males for global 2q37 deletions and 42 females/26 males for pure deletions) was confirmed in this study (8 females/5 males and 7 females/2 males, respectively; Table 4). Previously reported malformations were rare in this study and might have been coincidental, as they were more frequent when the 2q37 deletion was associated with another chromosomal imbalance (P8, P9, and P14; Tables 1 and 2). The cardiac malformation previously reported in 20% of patients¹² was absent in the 14 patients of our cohort.

Skeleton

Among the 66 patients reviewed by Casas *et al.*²³ 23% had a short stature (<2 SD below the mean), as did 3 patients in this study (21%; Tables 1 and 2). Morphological dysmorphisms like brachydactyly type

E and facial features were the most easily recognizable symptoms of 2q37 syndrome. Facial dysmorphism was present in all patients except patient P5, which could be explained by the interstitial deletion (Figure 1). The characteristic dysmorphic facial features have been previously described in detail (see for review Falk and Casas¹²) and include the shape of the nose, the appearance of the philtrum, arched eyebrows, a prominent forehead, a small mouth with thin lips and sparse hair. In our cohort, the most frequent features were the V-shaped appearance of the nasal tip, thin arched eyebrows, thin palpebral fissures, a thin upper lip with a smooth philtrum, low set ears, a large chin and hair set low on the forehead. The oldest patient (P1: 39 years) still displayed these characteristic and easily recognizable features. Candidate genes for facial dysmorphism shared by all patients and located between 240.6 Mb (P14 breakpoint) and 242.7 Mb at 500 kb from the telomeric region (Hg19) were identified as *GPC1*,^{15,16} *GPR35*,¹⁴ *FARP2*, *STK25*¹¹ and *PDC1*.

Brachydactyly has been previously described in about half of all patients.^{12,20,23} In our series, 10 of 14 patients had brachydactyly type E. The ‘skeleton’ map (Figure 4) is consistent with Figure 3 and shows that all patients with brachydactyly had deletions of the same ‘skeleton’ candidate genes such as *PER2*, *TWIST2*, *HDAC4*,¹⁰ *GPC1*,^{15,16} *GPR35*,¹⁴ *FARP2*, *STK25*¹¹ and *PDC1*. *HDAC4* remains the major candidate, as reported by Williams *et al.*¹⁰ but curiously, patients P10 and P13, who did not show brachydactyly, still had deletions of *HDAC4*. This could be the result of variable expressivity or an incomplete penetrance of haploinsufficiency. As a matter of fact, P13 and P10 had other skeletal disorders, such as facial dysmorphism, as well as clubfeet, sacral dimples and scoliosis in P10. The gene *TWIST2* (MIM 607556) is involved in various skeletal malformations such as short limbs, abnormal vertebrae and altered craniofacial morphology in humans and rodents (OMIM, Manteia). *FARP2* has been described in abnormal bone trabecular morphology related to abnormal osteoclast function (Manteia). Knockout mice for the *PDCD1* gene display large spleens, lupus-like proliferative arthritis³⁵ (Manteia), and abnormal myelopoiesis and leukopoiesis. This

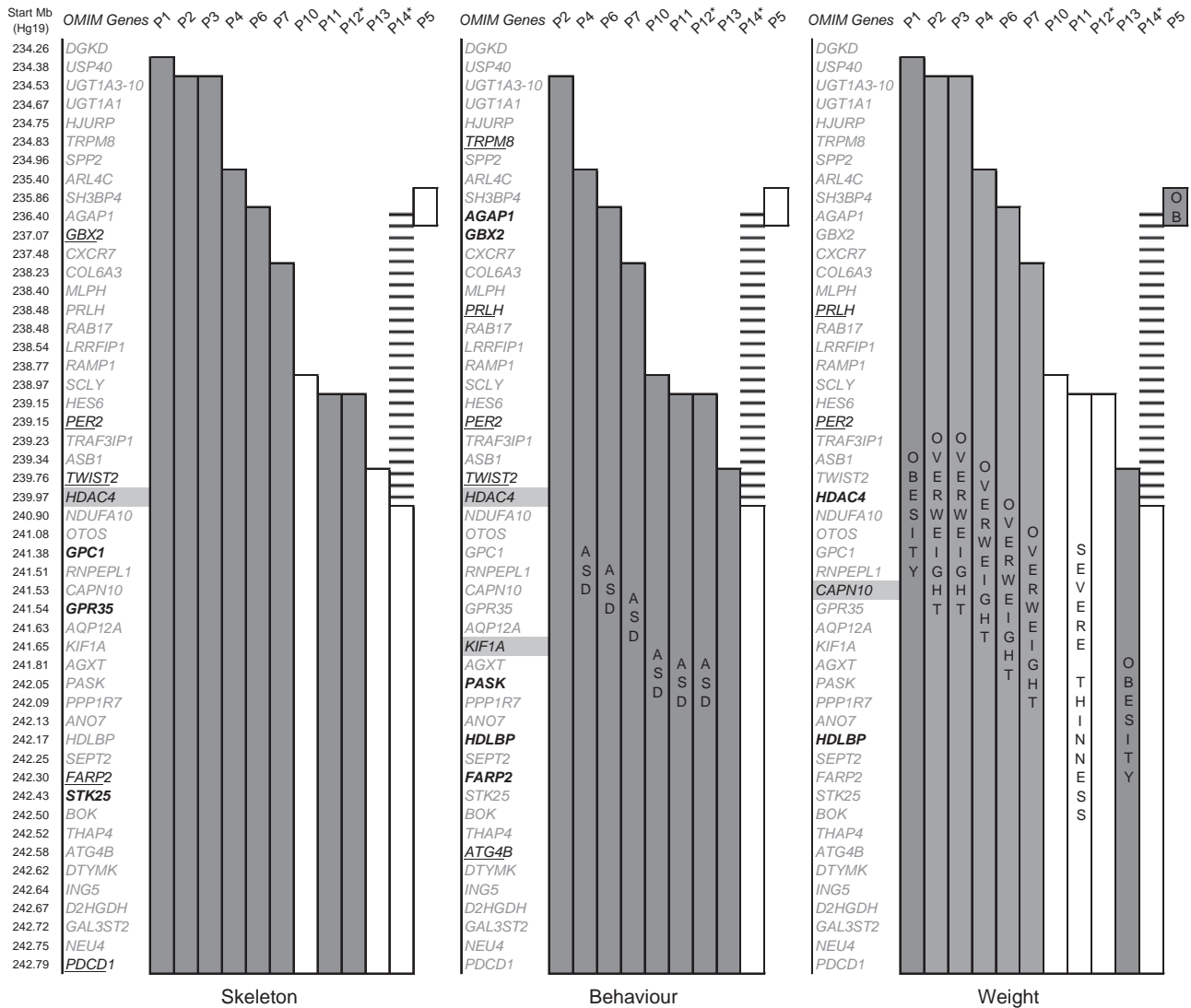


Figure 4 Representation of genotype–phenotype correlations in patients with 2q37 deletions, on three physical maps named ‘skeleton’, ‘behaviour’ and ‘weight’ when documented. Patients P8 and P9 were not included as their associated rearrangements may interfere in the phenotype (see Table 3). First column on the left: location of the genes (Hg 19). On each of the three maps the first column comprises the list of OMIM genes with candidate genes from the literature (bold), from Manteia (underlined) and both (highlighted). The columns represent the deleted genes in the patients; P5 has an interstitial deletion (last column). The columns for patients symptomatic for the concerned features are darkened. The hatched area indicates the duplicated region (P14). *Associated cytogenetic abnormality. OB, obesity.

phenotype is similar to the Felty syndrome (rheumatoid arthritis, splenomegaly and neutropenia) observed in patient P11. A mutation in the second allele of *PDCD1* could explain this severe phenotype.

Weight

Among the 66 patients reviewed by Casas *et al.*²³ >40% showed overweight or obesity, and a tendency toward obesity was found in older patients. In this study, overweight (6/14) was observed more frequently than obesity (3/14), mostly in patients with the largest deletions (>4.8 Mb). The youngest patient, P6 (4 years old), was already overweight. In the literature, three genes are associated with this phenotype: *HDAC4*,¹⁰ *CAPN10*¹² and *HDLBP*.¹² Among them, *CAPN10* is involved in susceptibility to human noninsulin-dependent diabetes mellitus (MIM 605286) and in increased body weight in mice (Manteia). Nevertheless, the ‘overweight’ map in Figure 4 shows that

these three genes were also deleted in normal-weight patients (P10–12). Interestingly, the Manteia candidate gene *PRLH* encoding prolactin-releasing peptide (PrRP) was deleted in most overweight or obese patients (P1–4, P6 and P7) but not in patients with normal weights (P10–12 and P14). Recent research has shown the involvement of PrRP and its receptor in the control of feeding behaviour in invertebrates and vertebrates, and PrRP-deficient mice show hyperphagia.^{36,37} The obese patient P5 is deleted for only two genes *SH3BP4* and *AGAP1* (*CENTG2*). A patient with *SH3BP4* deletion, inherited from a normal parent, is reported in the DECIPHER database (ID 254671), and four patients with a deletion interrupting *AGAP1* have been described: 1 in DECIPHER (ID 251750) and three by Wassink *et al.*¹⁷ but none of them were obese. Subsequently, P5 patient results may be interesting in narrowing a potential genomic region critical for obesity (*AGAP1*).

Table 4 Comparison of clinical features in this study and in the literature (when documented), including 112 patients with a distal 2q37 deletion^a

	Distal 2q37 deletions global: pure and associated		Distal 2q37 deletions pure only	
	Literature	Current study	Literature	Current study
	112 patients	13 patients	71 patients	9 patients
Average deletion length (Mb) ^b	5.13 (24 Cases)	5.67 (13 Cases)	5.73 (16 Cases)	6.39 (9 Cases)
Sex ratio	44 M/65 F	5 M/8 F	26 M/42 F	2 M/7 F
Dysmorphic features	103/107 96.3%	13/13 100%	63/67 94%	9/9 100%
Type E brachydactyly	60/78 76.9%	10/13 76.9%	38/49 77.6%	7/9 77.8%
Obesity or overweight	28/69 40.6%	7/12 58.3%	17/44 38.6%	6/8 75%
Developmental delay	106/106 100%	13/13 100%	67/67 100%	9/9 100%
Abnormal behaviour	47/54 87%	10/11 90.9%	32/38 84.2%	7/7 100%
Autistic spectrum disorders	32/49 65.3%	7/11 63.6%	25/39 64.1%	5/7 71.4%

Abbreviations: F, female; M, male.

^aFor review see Falk and Casas¹² and Casas *et al.*²³^bWhen documented.

In Table 4, the discrepancy between pure 2q37 deletions in the literature and in this study (38.6% *vs* 75%) could be explained by the lack of availability of BMI curves for previous reports, and semantic heterogeneity (overweight *vs* obesity). Indeed, the BMI-for-age has to be established to determine weight gain, and these curves were not available for most reported children.

Intellectual deficiency and seizures

Among previously reported patients for whom clinical evaluations were carried out, 100% had either a global developmental delay or hypotonia, and mild to severe mental retardation. In this series, five patients had a history of hypotonia, all patients had intellectual deficiency with mild to severe developmental delays but without major motor deficits, and P10 and P11 showed no language acquisition. Seizures have been previously described in 20–35% of patients with 2q37 deletions^{20,38} and were present here in 3 patients: P11 and P12 had generalized seizures and P6 had febrile seizures. The candidate genes for seizures identified using Manteia were *HDAC4* and *D2HGDH*. Both were deleted in P6, P11 and P12. Interestingly, Williams *et al* have described an epileptic patient (2282) with a deletion distal to *HDAC4*, including *D2HGDH*.¹⁰ *D2HGDH* is involved in D-2-hydroxyglutaric aciduria (MIM 600721), a neurometabolic disorder characterized by developmental delays, epilepsy, hypotonia and dysmorphic features.

Behavioural disorders

As shown by Falk and Casas¹², multiple reports have documented a behavioural phenotype overlapping the autistic spectrum. A diagnosis of autism or description of autistic behaviour has been reported in 24–35% of patients.^{20,23} Most of the patients in our study had heterogeneous behavioural disorders, with seven in the autistic spectrum, and patients P4 and P11 were reported as being autistic. The ‘behaviour’ map shows that all affected patients shared a deletion of the following candidate genes: *TWIST2*, *HDAC4*,¹⁰ *KIF1A*,¹⁵ *PASK*,⁵ *HDLBP*,⁵ *FARP2*,⁵ and *ATG4B*. P14 (del/dup 2q37.3) showed normal behaviour but carried deletions of the same

candidate genes, except for *HDAC4* and *TWIST2*. *HDAC4* mutations and deletions have been reported as being associated with self-injurious and aggressive behaviour.¹⁰ However, other genes could be involved, as evoked by the deletion distal to *HDAC4* in the autistic patient referred to above (2282).¹⁰ *TWIST2* has been reported to be involved in knockout mice with dystonic movements.³⁹ *AGAP1*^{13,17} is another candidate gene located in 2q37 and the four patients previously cited with *AGAP1* deletion (ID 251750 and Wassink *et al*¹⁷) had autistic disorders. Interestingly, P5 had a similar deletion but no behavioural problems. *KIF1A*, highlighted by the literature¹⁵ and Manteia, encodes a motor protein involved in the anterograde transport of synaptic-vesicle precursors along axons, and a mutation in this gene has been reported in a patient with nonsyndromic intellectual disability (MIM 601255). *KIF1A* is also associated with hypoactivity and hyporesponse to tactile stimuli in knockout mice (Manteia).

In data from Manteia, the gene *PER2* was shared by the three phenotypic groups (Figure 3). A single reference in humans has reported a heterozygous mutation in *PER2* in advanced sleep-phase syndrome. Interestingly, *PER2* is a member of the period family of genes, associated in KO mice with abnormal food intake, sleep patterns, social interaction, body weight gain and skeletal development.

CONCLUSION

From these 14 new patients with a 2q37 or subtelomeric deletion, we mapped the smallest region of overlap and the genes responsible for facial dysmorphism, brachydactyly, overweight and behavioural problems. The 2q37 subtelomeric region is a gene-rich region spanning 8.8 Mb for our largest deletion (Figure 2). The 2.6 Mb region of overlap contains >25 OMIM genes. Of these, some, such as *HDAC4*, are known to be implicated in behavioural disorders, autism or intellectual disability. The molecular data from our group of patients added to observations from the literature and the DECIPHER database allowed us to focus on other candidate genes. This deletion is still under-diagnosed, but the presence of brachydactyly

type E and the characteristic facial features could direct clinicians toward this syndrome. However, a few patients with pure deletions did not display the most recognizable features (eg, P10 and P13 missed brachydactyly), or possessed a more severe phenotype (eg, P4 had severe behavioural trouble and P11 displayed Felty's syndrome). This could be explained by variations in genetic background, mutations in the second allele or epigenetic phenomena, such as imprinting, although the sex ratio of the inherited deletion is not in favour of the last hypothesis. The expression of regulatory elements in the deleted region or at distance upstream or downstream may also interfere with the phenotype of the 2q37 subtelomeric microdeletion. The associated copy number variations have been explored in the present patients and no potential modifier emerged (Table 3).⁴⁰ Furthermore, genetic, as well as functional, analysis would be useful as deletion of *HDAC4* was reported as resulting in reducing expression of *RAIL*.¹⁰ These studies may provide new insights into the pathogenic role of the haploinsufficient 2q37 genes.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the patients and their families. We thank our colleagues in the ACLF network 'mapping the subtelomeric regions/clinical and molecular phenotype'. This work was funded by the following grants: AOL 2001 and AOL 2003, PHRC 2003 CHU REIMS, DHOS/OPRC/2007/35 and 455 France. The manuscript was prepared with the editorial help from Gap Junction.

- Balikova I, Vermeesch JR, Fryns JP, Van Esch H: Bronchiectasis and immune deficiency in an adult patient with deletion 2q37 due to an unbalanced translocation t(2;10). *Eur J Med Genet* 2009; **52**: 260–261.
- Chen CP, Lin SP, Chern SR *et al*: Deletion 2q37.3->qter and duplication 15q24.3->qter characterized by array CGH in a girl with epilepsy and dysmorphic features. *Genet Couns* 2010; **21**: 263–267.
- Cusco I, del Campo M, Vilardell M *et al*: Array-CGH in patients with Kabuki-like phenotype: identification of two patients with complex rearrangements including 2q37 deletions and no other recurrent aberration. *BMC Med Genet* 2008; **9**: 27.
- Devillard F, Guinchat V, Moreno-De-Luca D *et al*: Paracentric inversion of chromosome 2 associated with cryptic duplication of 2q14 and deletion of 2q37 in a patient with autism. *Am J Med Genet A* 2010; **152A**: 2346–2354.
- Felder B, Radlwimmer B, Benner A *et al*: FARP2, HDLBP and PASK are downregulated in a patient with autism and 2q37.3 deletion syndrome. *Am J Med Genet A* 2009; **149A**: 952–959.
- Kariminejad A, Kariminejad R, Tzschach A *et al*: Craniosynostosis in a patient with 2q37.3 deletion 5q34 duplication: association of extra copy of *MSX2* with craniosynostosis. *Am J Med Genet A* 2009; **149A**: 1544–1549.
- Kitsioui-Tzeli S, Sismani C, Ioannides M *et al*: Array-CGH analysis and clinical description of 2q37.3 *de novo* subtelomeric deletion. *Eur J Med Genet* 2007; **50**: 73–78.
- Mazzone L, Vassena L, Ruta L, Mugno D, Galesi O, Fichera M: Brief report: peculiar evolution of autistic behaviors in two unrelated children with brachydactyly-mental retardation syndrome. *J Autism Dev Disord* 2012; **42**: 2202–2207.
- Vera-Carbonell A, Lopez-Exposito I, Bafalliu JA *et al*: Molecular characterization of a new patient with a non-recurrent inv dup del 2q and review of the mechanisms for this rearrangement. *Am J Med Genet A* 2010; **152A**: 2670–2680.
- Williams SR, Aldred MA, Der Kaloustian VM *et al*: Haploinsufficiency of *HDAC4* causes brachydactyly mental retardation syndrome, with brachydactyly type E, developmental delays, and behavioral problems. *Am J Hum Genet* 2010; **87**: 219–228.
- Davids MS, Crawford E, Weremowicz S *et al*: *STK25* is a candidate gene for pseudopseudohypoparathyroidism. *Genomics* 2001; **77**: 2–4.
- Falk RE, Casas KA: Chromosome 2q37 deletion: clinical and molecular aspects. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2007; **145C**: 357–371.
- Lukusa T, Vermeesch JR, Holvoet M, Fryns JP, Devriendt K: Deletion 2q37.3 and autism: molecular cytogenetic mapping of the candidate region for autistic disorder. *Genet Couns* 2004; **15**: 293–301.
- Shrimpton AE, Braddock BR, Thomson LL, Stein CK, Hoo JJ: Molecular delineation of deletions on 2q37.3 in three cases with an Albright hereditary osteodystrophy-like phenotype. *Clin Genet* 2004; **66**: 537–544.
- Smith M, Escamilla JR, Filipek P *et al*: Molecular genetic delineation of 2q37.3 deletion in autism and osteodystrophy: report of a case and of new markers for deletion screening by PCR. *Cytogenet Cell Genet* 2001; **94**: 15–22.
- Syrrou M, Keymolen K, Devriendt K *et al*: Glypican 1 gene: good candidate for brachydactyly type E. *Am J Med Genet* 2002; **108**: 310–314.
- Wassink TH, Piven J, Vieland VJ *et al*: Evaluation of the chromosome 2q37.3 gene *CENTG2* as an autism susceptibility gene. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005; **136B**: 36–44.
- Ravnán JB, Tepperberg JH, Papenhausen P *et al*: Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet* 2006; **43**: 478–489.
- Knight SJ, Lese CM, Precht KS *et al*: An optimized set of human telomere clones for studying telomere integrity and architecture. *Am J Hum Genet* 2000; **67**: 320–332.
- Aldred MA, Sanford RO, Thomas NS *et al*: Molecular analysis of 20 patients with 2q37.3 monosomy: definition of minimum deletion intervals for key phenotypes. *J Med Genet* 2004; **41**: 433–439.
- Armstrong L, Allanson JE, Weaver DD, Bevan CJ, Hobart HH: Unrelated patients with a rearrangement of chromosome 2 causing duplication of 2p23 and deletion of 2q37. *Am J Med Genet A* 2005; **134**: 299–304.
- Burd L, Martsolf JT, Kerbeshian J, Jalal SM: Partial 6p trisomy associated with infantile autism. *Clin Genet* 1988; **33**: 356–359.
- Casas KA, Mononen TK, Mikail CN *et al*: Chromosome 2q terminal deletion: report of 6 new patients and review of phenotype-breakpoint correlations in 66 individuals. *Am J Med Genet A* 2004; **130A**: 331–339.
- Chaabouni M, Le Merrer M, Raoul O *et al*: Molecular cytogenetic analysis of five 2q37 deletions: refining the brachydactyly candidate region. *Eur J Med Genet* 2006; **49**: 255–263.
- Chassaing N, De Mas P, Tauber M *et al*: Molecular characterization of a cryptic 2q37 deletion in a patient with Albright hereditary osteodystrophy-like phenotype. *Am J Med Genet A* 2004; **128A**: 410–413.
- Fernandez-Rebollo E, Perez O, Martinez-Bouzas C *et al*: Two cases of deletion 2q37 associated with segregation of an unbalanced translocation 2;21: choanal atresia leading to misdiagnosis of CHARGE syndrome. *Eur J Endocrinol* 2009; **160**: 711–717.
- Galasso C, Lo-Castro A, Lalli C, Nardone AM, Gullotta F, Curatolo P: Deletion 2q37: an identifiable clinical syndrome with mental retardation and autism. *J Child Neurol* 2008; **23**: 802–806.
- Giardino D, Finelli P, Gottardi G *et al*: Cryptic subtelomeric translocation t(2;16)(q37;q24) segregating in a family with unexplained stillbirths and a dysmorphic, slightly retarded child. *Eur J Hum Genet* 2001; **9**: 881–886.
- Grammatico P, Majore S, Marrocco G *et al*: 46,XX,der(2)t(2;10)(2pter->2q37::10p13->10pter)[127]/45,X,der(2)t(2;10)(2pter->2q37::10p13->10pter)[23]. Karyotype-phenotype correlation and genetic counselling in complex karyotypes. *Genet Couns* 1999; **10**: 351–358.
- Lukusa T, Smeets E, Vogels A, Vermeesch JR, Fryns JP: Terminal 2q37 deletion and autistic behaviour. *Genet Couns* 2005; **16**: 179–180.
- Sanchez JM, Pantano AM: A case of deletion 2q35 – qter and a peculiar phenotype. *J Med Genet* 1984; **21**: 147–149.
- Sogaard M, Tumer Z, Hjalgrim H *et al*: Subtelomeric study of 132 patients with mental retardation reveals 9 chromosomal anomalies and contributes to the delineation of submicroscopic deletions of 1pter, 2qter, 4pter, 5qter and 9qter. *BMC Med Genet* 2005; **6**: 21.
- Wiktor A, Feldman GL, Bawle EV, Czarniecki P, Conard JV, Van Dyke DL: Deletion of 2q37 and duplication of 10q24: two cases in the same family and review of the literature. *Ann Genet* 2001; **44**: 129–134.
- Fan YS, Zhang Y, Speevak M, Farrell S, Jung JH, Siu VM: Detection of submicroscopic aberrations in patients with unexplained mental retardation by fluorescence *in situ* hybridization using multiple subtelomeric probes. *Genet Med* 2001; **3**: 416–421.
- Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T: Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 1999; **11**: 141–151.
- Maletinska L, Spolcova A, Maixnerova J, Blechova M, Zelezna B: Biological properties of prolactin-releasing peptide analogs with a modified aromatic ring of a C-terminal phenylalanine amide. *Peptides* 2011; **32**: 1887–1892.
- Takayanagi Y, Onaka T: Roles of prolactin-releasing peptide and RFamide related peptides in the control of stress and food intake. *FEBS J* 2010; **277**: 4998–5005.
- Doherty ES, Solomon BD, Lacbawan F: 2q37 Deletion Syndrome; in Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K (*Hrsg*) (eds): *Gene Reviews*. Seattle/WA: University of Washington, 1993.
- Sosic D, Richardson JA, Yu K, Ornitz DM, Olson EN: Twist regulates cytokine gene expression through a negative feedback loop that represses NF-kappaB activity. *Cell* 2003; **112**: 169–180.
- Vermeesch JR, Thoelen R, Fryns JP: A familial complex chromosome translocation resulting in duplication of 6p25. *Ann Genet* 2004; **47**: 275–280.

IV. PRESENTATIONS EN CONGRES

Prix de communication

Prix du meilleur poster : Fente Palatine et cataracte congénitale : une observation familiale au Congrès de la SFCP : Nancy Juin 2011

C François-fiquet, A Lorot, O Wavreille, H Ludot, D Gaillard, E Landais, ML Poli Merol, M Doco Fenzy

Congrès nationaux

Congrès de la SFCP : Nancy Juin 2011

Communications orales

Fentes faciales et conseils génétiques.

François-Fiquet.C, Leroy C, Landais E, Poli Merol ML, Carre-Pigeon F, Doco-Fenzy M

Fente Palatine et cataracte congénitale : une observation familiale

C François-fiquet, A Lorot, O Wavreille, H Ludot, D Gaillard, E Landais, ML Poli Merol, M Doco Fenzy

Congrès internationaux

12th International Congress on Cleft Lip/Palate and related Craniofacial Anomalies (Orlando, Etats Unis, 5-10 May 2013)

Poster

Fibroblast cell cultures from excised edges of cleft lip or palate: protocol description and DNA extraction

François-Fiquet C, Landais E, Gaillard D, N Guyen P, Poli-Merol ML, Doco-Fenzy M.

Communications orales

Frequency and socio-psychological impact of teasing in school-aged patients with cleft lip/palate surgical repair

Lorot A, Guerreschi Pierre, Wolber A, Pellerin P, Martinot V, Lefevre A, Gbaguidi C, Devauchelle B, Poli-Merol ML, **François-Fiquet C**

Abstract ci-dessous.

APCA Asian Pacific Craniofacial Association (Beijing, China, Octobre 2012)

Communications orales

Fibroblast culture cells from the edges of Cleft lip-palate : protocol description and DNA extraction

François-Fiquet C, Landais E , Laffon L , Ta Phi Than N , Mangeonjean C , Feucher , Gaillard D , Poli-Merol ML, N Guyen P, Doco-Fenzy M.

Communications orales

Fente Palatine et cataracte congénitale : une observation familiale

C françois-fiquet, A Lorot, O Wavreille, H Ludot, D Gaillard, E Landais, ML Poli Merol, M Doco Fenzy

Moqueries et Vécu scolaire des patients porteurs d'une fente labio palatine : étude multicentrique

Lorot.A, Gbaguidi.C , Lefèvre.A , Devauchelle.B , Wavreille.O , Wolber.A , Guerreschi.P , Martinot.V , Pellerin.P , Poli Merol.ML, **François-Fiquet.C**

Fente palatine et tératome cervico-faciaux latéraux : à propos de deux cas

Le Saux A. Poli Merol ML. Zachar D. Josset P. Pezzettigotta S. Doco Fenzy M. Guyot E. **Francois-Fiquet C.**

Participation à travaux

Véloplastie de Furlow, à propos de 189 cas. A Wolber, **CFrancois Fiquet**, P Guerreschi, M Arnoldi, P Pellerin.

Fentes vélaires obliques dans les fentes n°5 de Tessier : à propos de cinq cas. P. Guerreschi, **C. Francois-Fiquet**, A. Wolber, P. Gangloff, E. Chauvet, Y. Anastassov, P. Pellerin.

European Human Genetics Conference : Amsterdam Mai 2011

Poster

Cleft palate and bilateral congenital cataract: a familial observation

C françois-fiquet, A Lorot , O Wavreille, H Ludot, D Gaillard, E Landais, P Jonveaux, M Béri , ML Poli Merol, M Doco Fenzy

BIBLIOGRAPHIE

ABKOWITZ JL, SABO KM, NAKAMOTO B, et al.

Diamond-blackfan anemia: in vitro response of erythroid progenitors to the ligand for c-kit.
Blood 1991 Nov 1;78(9):2198-202.

AHMED S, LIU CC, NAWSHAD A.

Mechanisms of palatal epithelial seam disintegration by transforming growth factor (TGF) beta3.

Dev Biol. 2007 Sep 15;309(2):193-207.

ALKURAYA FS, SAADI I, LUND JJ, et al.

SUMO1 haploinsufficiency leads to cleft lip and palate.

Science 2006 Sep 22;313(5794):1751.

AMARAVADI LS, NEFF AW, SLEEMAN JP, et al.

Autonomous neural axis formation by ectopic expression of the protooncogene c-ski.

Dev Biol 1997 Dec 15;192(2):392-404.

AMIN N, OHASHI Y, CHIBA J, et al.

Alterations in vascular pattern of the developing palate in normal and spontaneous cleft palate mouse embryos.

Cleft Palate Craniofac J 1994 Sep;31(5):332-44.

ANDREOU AM, PAUWS E, JONES MC, et al.

TBX22 missense mutations found in patients with X-linked cleft palate affect DNA binding, sumoylation, and transcriptional repression.

Am J Hum Genet 2007 Oct ;81(4):700-712.

ARDINGER HH, BUETOW KH, BELL GI, et al.

Association of genetic variation of the transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate.

Am J Hum Genet 1989 Sep;45(3):348-53.

ASHIQUE AM, FU K, RICHMAN JM.

Signalling via type IA and type IB bone morphogenetic protein receptors (BMPR) regulates intramembranous bone formation, chondrogenesis and feather formation in the chicken embryo.

Int J Dev Biol 2002 Mar;46(2):243-53.

ASHIQUE AM, FU K, RICHMAN JM.

Endogenous bone morphogenetic proteins regulate outgrowth and epithelial survival during avian lip fusion.

Development 2002 Oct;129(19):4647-60.

AVILA JR, JEZEWSKI PA, VIEIRA AR, et al.

PVRL1 variants contribute to non-syndromic cleft lip and palate in multiple populations.

Am J Med Genet A 2006 Dec 1;140(23):2562-70.

BACHLER M, NEUBUSER A.

Expression of members of the Fgf family and their receptors during midfacial development. *Mech Dev* 2001;100:313–316.

BARLOW AJ, FRANCIS-WEST PH.

Ectopic application of recombinant BMP-2 and BMP-4 can change patterning of developing chick facial primordia.

Development. 1997 Jan;124(2):391-8.

BARONI T, BELLUCCI C, LILLI C et al.

Human cleft lip and palate fibroblasts and normal nicotine-treated fibroblasts show altered in vitro expressions of genes related to molecular signaling pathways and extracellular matrix metabolism.

J Cell Physiol 2010;222(3):748-56.

BAXTER H, FRASER FC.

Production of congenital defects in offspring of female mice treated with cortisone.

McGill Med J 1950 Dec ; 19(4), 245–9.

BEATY TH, HETMANSKI JB, FALLIN MD, et al.

Analysis of candidate genes on chromosome 2 in oral cleft case-parent trios from three populations.

Hum Genet 2006 Nov;120(4):501–18.

BEATY TH, HETMANSKI JB, ZEIGER JS, et al.

Testing candidate genes for non-syndromic oral clefts using a case-parent trio design.

Genet Epidemiol 2002 Jan ; 22(1):1–11.

BENTZ ML, BAUER BS, ZUKER R.D.

Principles and Practice of Pediatric Plastic Surgery,

St-Louis, Quality Medical Publishing 2008, volume 1, chap 18-23, p504

BERTOLINO P, DECKERS M, LEBRIN F, et al.

Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders.

Chest 2005 Dec;128(6 Suppl):585S-590S.

BETSHOLTZ C, KARLSSON L, LINDAHL P.

Developmental roles of platelet-derived growth factors.

Bioessays 2001; 23: 494–507.

BLANTON SH, HENRY RR, YUAN Q, et al.

Folate pathway and nonsyndromic cleft lip and palate.

Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 2011 Jan;91(1):50-60.

BLAVIER L, LAZARYEV A, GROFFEN J, et al.

TGF-beta3-induced palatogenesis requires matrix metalloproteinases.

Mol Biol Cell 2001 May;12(5):1457-66.

BOSI G, EVANGELISTI R, VALENO V, et al.

Diphenylhydantoin affects glycosaminoglycans and collagen production by human fibroblasts from cleft palate patients.

J Dent Res 1998;77(8):1613-21.

- BRANCACCIO A, MINICHELLO A, GRACHTCHOUK M, et al.
Requirement of the forkhead gene Foxe1, a target of sonic hedgehog signaling, in hair follicle morphogenesis.
Hum Mol Genet 2004 Nov 1;13(21):2595-606.
- BRITANOVA O, AKOPOV S, LUKYANOV S, et al.
Novel transcription factor Satb2 interacts with matrix attachment region DNA elements in a tissue-specific manner and demonstrates cell type dependent expression in the developing mouse CNS.
Eur J Neurosci 2005;21:658-668.
- BRITANOVA O, DEPEW MJ, SCHWARK M, et al.
Satb2 haploinsufficiency phenocopies 2q32-q33 deletions, whereas loss suggests a fundamental role in the coordination of jaw development.
Am J Hum Genet 2006 Oct;79(4):668-78.
- BUENO DF, KERKIS I, COSTA AM, et al.
New source of muscle-derived stem cells with potential for alveolar bone reconstruction in cleft lip and/or palate patients.
Tissue Eng Part A 2009 Feb;15(2):427-35.
- BUENO DF, SUNAGA DY, KOBAYASHI GS et al.
Human stem cell cultures from cleft lip/palate patients show enrichment of transcripts involved in extracellular matrix modeling by comparison to controls.
Stem Cell Rev 2011;7(2):446-57.
- BUESS M, TERRACCIANO L, REUTER J, et al.
Amplification of SKI is a prognostic marker in early colorectal cancer.
Neoplasia 2004 May-Jun;6(3):207-12.
- BURDICK AB.
Genetic epidemiology and control of genetic expression in van der Woude syndrome.
J Craniofac Genet Dev Biol Suppl 1986 ;2 :99-105.
- BUSH JO, LAN Y, JIANG R.
The cleft lip and palate defects in Dancer mutant mice result from gain of function of the Tbx10 gene.
Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:7022-7027.
- CARLSON BM
Human embryology and developmental biology.
Philadelphia : Mosby Elsevier ; 2009.
- CARMICHAEL SL, SHAW GM.
Maternal corticosteroid use and risk of selected congenital anomalies.
Am J Med Genet 1999 sept 17;86 :242-4.
- CARMICHAEL SL, SHAW GM, MA C, et al.
Maternal corticosteroid use and orofacial clefts.
Am J Obstet Gynecol 2007 Dec ;197(6):585.e1-7 ; discussion 683-4 et 1-7.

CARMIGNAC V, THEVENON J, ADES L, ET AL.

In-frame mutations in exon 1 of SKI cause dominant Shprintzen-Goldberg syndrome.
Am J Hum Genet 2012 Nov 2;91(5):950-7.

CARSTENS MH, CHIN M, NG T, TOM WK.

Reconstruction of #7 facial cleft with distraction-assisted in situ osteogenesis (DISO): role of recombinant human bone morphogenetic protein-2 with Helistat-activated collagen implant.
J Craniofac Surg 2005 Nov;16(6):1023-32.

CARTER TC, MOLLOY AM, PANGILINAN F et al.

Testing reported associations of genetic risk factors for oral clefts in a large Irish study population.

Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 2010 Feb;88(2):84-93.

CELLI J, DUIJF P, HAMEL BC, ET AL.

Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome.
Cell. 1999 Oct 15;99(2):143-53.

CHANG CC, TSAI F, YANG CC.

Prenatal Diagnosis of Apert's Syndrome.

Prenat Diag 1998;18:621-5.

CHEVRIER C, BAHUAU M, PERRET C, et al.

Genetic susceptibilities in the association between maternal exposure to tobacco smoke and the risk of nonsyndromic oral cleft.

Am J Med Genet A 2008 Sep 15;146A(18):2396-406.

CHIANG C, LITINGTUNG Y, LEE E, et al.

Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function.

Nature 1996 Oct 3;383(6599):407-13.

CHIQUET BT, LIDRAL AC, STAL S, et al.

CRISPLD2: a novel NSCLP candidate gene.

Hum Mol Genet 2007;16:2241-2248.

CHIQUET BT, BLANTON SH, BURT A, et al.

Variation in WNT genes is associated with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate.

Hum Mol Genet 2008;17:2212-2218.

CHIQUET BT, HENRY R, BURT A, et al.

Nonsyndromic cleft lip and palate: CRISPLD genes and the folate gene pathway connection.

Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2011 Jan;91(1):44-9.

CHOI SJ, MARAZITA ML, HART PS, et al.

The PDGF-C regulatory region SNP rs28999109 decreases promoter transcriptional activity and is associated with CL/P.

Eur J Hum Genet 2009 Jun;17(6):774-84.

CHUNG VH, CHEN AY, JENG LB, et al.

Engineered autologous bone marrow mesenchymal stem cells: alternative to cleft alveolar bone graft surgery.

J Craniofac Surg 2012 Sep;23(5):1558-63.

CLEMENT E, MERCURI E, GODFREY C, et al.

Brain involvement in muscular dystrophies with defective dystroglycan glycosylation.

Ann Neurol 2008 Nov;64(5):573-82.

COCHARD LR.

Atlas d'embryologie humaine de Netter.

Paris : Masson ; 2003.

CONESSA C, HERVE S, GOASDOUE P, et al.

Insuffisance vélopharyngée.

EMC (Elsevier SAS, Paris), Oto-rhino-laryngoplastie, 2005, 20-618-A-10.

COULTAS L, CHAWENGSAKSOPHAK K, ROSSANT J.

Endothelial cells and VEGF in vascular development.

Nature. 2005 Dec 15, 438(7070), 937-45.

COULY, G.

Développement embryonnaire du massif facial. Développement céphalique : embryologie, croissance, pathologie.

Paris : CDP ; 1991.

COULY G.

Embryologie croissance pathologie développement céphalique.

Paris : CDP ; 1991.

COULY G, GITTON Y.

Développement céphalique Embryologie, génétique, croissance et pathologie. 2ème édition.

Paris : CDP ; 2012.

DARLAND DC, D'AMORE PA.

Blood vessel maturation: vascular development comes of age.

J Clin Invest 1999 Jan;103(2):157-8.

DARLAND DC, D'AMORE PA.

Cell-cell interactions in vascular development.

Curr Top Dev Biol 2001;52:107-49.

DARLAND DC, D'AMORE PA.

TGF beta is required for the formation of capillary-like structures in three-dimensional cocultures of 10T1/2 and endothelial cells.

Angiogenesis 2001;4(1):11-20.

DE GROUCHY J, ROUBIN M, BILLARDON C.

Chromosomal studies from cell cultures. Technical modifications.

Ann Genet 1970;13:141-143.

- DEHESDIN D.
Anatomie du pharynx.
Encycl Med Chir, Paris, OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE, Fasc 20-491-A-10, 1998.
- DING H, WU X, BOSTROM H et al.
A specific requirement for PDGF-C in palate formation and PDGFR-alpha signaling.
Nat Genet 2004; 36: 1111–1116.
- DIXON MJ.
Cleft lip and palate: synthesizing genetic and environmental influences.
Nat Rev Genet 2011 March ; 12(3): 167–178
- DOBREVA G, CHAHROUR M, DAUTZENBERG M, et al.
SATB2 is a multifunctional determinant of craniofacial patterning and osteoblast differentiation.
Cell 2006 Jun 2;125(5):971-86.
- DOYLE AJ, DOYLE JJ, BESSLING SL, et al.
Mutations in the TGF- β repressor SKI cause Shprintzen-Goldberg syndrome with aortic aneurysm.
Nature Genet 2012 Nov;44(11):1249-54.
- DUBREUIL G, CANIVENC R.
Manuel théorique et pratique d'histologie. 2ème tome
Paris : Vigot Frères éditeurs ; 1967
- DURNER M, GREENBERG DA, DELGADO-ESCUETA AV.
Is there a genetic relationship between epilepsy and birth defects?
Neurology 1992, 42(4 Suppl5), 63–7.
- EICHBERGER T, REGL G, IKRAM MS, et al.
FOXE1, a new transcriptional target of GLI2 is expressed in human epidermis and basal cell carcinoma.
Invest Dermatol 2004 May;122(5):1180-7.
- EHLERS BERTOJA A, SAMPAIO ALHO C, DE FRANÇA E, et al.
TGFA/TAQ I polymorphism in nonsyndromic cleft lip and palate patients from Rio Grande Do Sul, Brazil.
Cleft Palate Craniofac J 2008 Sep;45(5):539-44.
- ENCHA-RAZAVI F.
Embryologie humaine.
Paris : Masson ; 2004.
- ENGELMAN CD, BAURLEY JW, CHIU YF, et al.
Detecting gene-environment interactions in genome-wide association data.
Genet Epidemiol 2009;33 Suppl 1:S68-73.
- ENJOLRAS O, WASSEF M, CHAPOT R.
Color atlas of vascular tumors and malformations.
Cambridge : Cambridge university press ; 2007 :137

- ESCOBAR LF, LIECHTY EA.
Late gestational vascular disruptions inducing craniofacial anomalies: a fetal lamb model.
J Craniofac Genet Dev Biol 1998 Jul-Sep;18(3):159-63.
- FITZPATRICK DR, CARR IM, MCLAREN L, et al.
Identification of SATB2 as the cleft palate gene on 2q32–q33.
Hum Mol Genet 2003 Oct1;12(19):2491-2501.
- FOGH-ANDERSEN P.
Inheritanc of harelip and cleft palate.
Copenhagen : Nyt Nordisk Forlag. Arnold Busk ; 1942. Dissertation.
- GAMMILL LS, BRONNER-FRASER M.
Neural crest specification: migrating into genomics.
Nat Rev Neurosci 2003 Oct;4(10):795-805.
- GARCIA DE MITCHELL CA, PESSA JE, SCHAUVERIEN MV, et al.
The philtrum: anatomical observations from a new perspective.
Plast Reconstr Surg 2008 Dec;122(6):1756-60.
- GAUDERMAN WJ, THOMAS DC, MURCRAY CE, et al.
Efficient genome-wide association testing of gene-environment inter-action in case-parent trios.
Am J Epidemiol 2010 Jul 1;172(1):116-22.
- GILBERTSON DG, DUFF ME, WEST JW, et al.
Platelet-derived growth factor C (PDGF-C), a novel growth factor that binds to PDGF alpha and beta receptor.
J Biol Chem 2001 Jul 20;276(29):27406-14.
- GONZALEZ-SANCHEZ JG, JIMENEZ-BARRAGAN K.
Closure of recurrent cleft palate fistulas with plasma rich in growth factors.
Acta Otorrinolaringol Esp 2011 Nov-Dec;62(6):448-53.
- GOODNOUGH LH, BRUGMANN SA, HU D, et al.
Stage-dependent craniofacial defects resulting from Sprouty2 overexpression.
Dev Dyn 2007 Jul;236(7):1918-28.
- GREFTE S, KUIJPERS MA, KUIJPERS-JAGTMAN AM, et al.
Myogenic capacity of muscle progenitor cells from head and limb muscles.
Eur J Oral Sci 2012 Feb;120(1):38-45.
- GROSS I, BASSIT B, BENEZRA M, LICHT JD.
Mammalian Sprouty proteins inhibit cell growth and differentiation by preventing Ras activation.
J. Biol. Chem 2001 Dec 7 ;276(49): 46460-8.
- GRZMIL P, KIM Y, SHAMSADIN R, et al.
Human cyritestin genes (CYRN1 and CYRN2) are non-functional.
Biochem J 357: 551-556, 2001.

HALLIER E, JAGER R, DEUTSCHMANN S, et al.
Glutathione conjugation and cytochrome P-450 metabolism of methyl chloride in vitro.
Toxicol in vitro 1990 ;4(4-5): 513-17.

HAN J, XIAO Y, LIN J, et al.
PDGF-C controls proliferation and is down-regulated by retinoic acid in mouse embryonic palatal mesenchymal cells.
Birth Defects Res 2006; 77: 438 – 444.

HAN J, LI L, ZHANG Z, et al.
Platelet-derived growth factor C plays a role in the branchial arch malformations induced by retinoic acid.
Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 2007; 79: 221 – 230.

HE F, XIONG W, WANG Y.
Epithelial Wnt/ β -catenin signaling regulates palatal shelf fusion through regulation of Tgf β 3 expression.
Dev Biol 2011 Feb 15;350(2):511-9.

HEINONEN TY, MAKI M.
Peters' plus syndrome is a congenital disorder of glycosylation caused by a defect in the beta1,3-glucosyltransferase that modifies thrombospondin type 1 repeats.
Ann Med 2009;41(1):2-10.

HOVENS CM, STACKER SA, ANDRES AC, et al.
RYK, a receptor tyrosine kinase-related molecule with unusual kinase domain motifs.
Proc Nat Acad Sci 1992 Dec 15 ;89(24):11818-22.

HOZYASZ KK, MOSTOWSKA A, SUROWIEC Z, et al.
Genetic polymorphisms of GSTM1 and GSTT1 in mothers of children with isolated cleft lip with or without cleft palate.
Przegl Lek 2005;62(10):1019-22.

HUANG X, YOKOTA T, IWATA J, et al.
Tgf-beta-mediated FasL-Fas-Caspase pathway is crucial during palatogenesis.
J Dent Res 2011 Aug;90(8):981-7.

INGRAHAM CR, KINOSHITA A, KONDO S, et al.
Abnormal skin, limb and craniofacial morphogenesis in mice deficient for interferon regulatory factor 6 (Irf6).
Nat Genet 2006 Nov ;38(11) :1335-40.

IODANSKAIA T, NAWSHAD A.
Mechanisms of transforming growth factor β induced cell cycle arrest in palate development.
J Cell Physiol 2011 May;226(5):1415-24.

IPDTC.
Prevalence at Birth of Cleft Lip With or Without Cleft Palate: Data From the International Perinatal Database of Typical Oral Clefts (IPDTC)
Cleft Palate Craniofacial J 2011 Jan ;48(1) :66-81.

ISEKI S.

Disintegration of the medial epithelial seam: is cell death important in palatogenesis?
Dev Growth Differ 2011 Feb;53(2):259-68.

IWATA J, PARADA C, CHAI Y.

The mechanism of TGF- β signaling during palate development.
Oral Dis 2011 Nov;17(8):733-44.

JAKOBSEN LP, BORUP R, VESTERGAARD J, et al.

Expression analyses of human cleft palate tissue suggest a role for osteopontin and immune related factors in palatal development.
Exp Mol Med 2009 Feb 28;41(2):77-85.

JANSEN RG, VAN KUPPEVELT TH, DAAMEN WF, et al.

FGF-2-loaded collagen scaffolds attract cells and blood vessels in rat oral mucosa.
J Oral Pathol Med 2009 Sep;38(8):630-8.

JEZEWSKI P A, VIEIRA A R, NISHIMURA C, et al.

Complete sequencing shows a role for MSX1 in non syndromic cleft lip and palate.
J Med Genet 2003 Jun ;40(6): 399-407.

JEANS WD, FERNANDO DC, MAW AR, et al.

A longitudinal study of the growth of the nasopharynx and its contents in normal children.
Br J Radiol 1981 Feb ;54(638) :117-21.

JINNIN M, IHN H, MIMURA Y, et al.

Regulation of fibrogenic/fibrolytic genes by platelet-derived growth factor C, a novel growth factor, in human dermal fibroblasts.
J Cell Physiol 2005; 202: 510 – 517.

JIRASEK JE.

Atlas of human prenatal morphogenesis.
Amsterdam : Martinus Nijhoff ;1983.

JOOSTEN PH, TOEPOEL M, MARIMAN EC, et al.

Promoter haplotype combinations of the platelet-derived growth factor alpha-receptor gene predispose to human neural tube defects.
Nat Genet 2001 Feb;27(2):215-7.

JUGESSUR A, LIE RT, WILCOX AJ, et al.

Cleft palate, transforming growth factor alpha gene variants, and maternal exposures: Assessing gene-environment interactions in case-parent triads.
Genet Epidemiol 2003a Dec ;25(4) :367-74.

JUGESSUR A, LIE RT, WILCOX AJ, et al.

Variants of developmental genes (TGFA, TGFB3, and MSX1) and their associations with orofacial clefts: A case-parent triad analysis.
Genet Epidemiol 2003b;24:230–239.

JURILOFF DM.

Mapping studies in animal models.

In:

Wyszynski DF, ed. Cleft Lip and Palate: From Origin to Treatment.
New York: Oxford University Press; 2002:265–282.

JURILOFF DM, HARRIS MJ, MCMAHON AP, et al.

Wnt9b is the mutated gene involved in multifactorial nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in A/WySn mice, as confirmed by a genetic complementation test.
Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 2006;76:574–579.

JURILOFF DM, HARRIS MJ.

Mouse genetic models of cleft lip with or without cleft palate.
Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 2008;82:63–77.

KATSO RM, RUSSELL RB, GANESAN TS.

Functional analysis of H-Ryk, an atypical member of the receptor tyrosine kinase family.
Molec Cell Biol 1999 ;19 Sep ;19(9):6427-40.

KAUFMAN CD, MARTINEZ-RODRIGUEZ G, HACKETT PB Jr.

Ectopic expression of c-ski disrupts gastrulation and neural patterning in zebrafish.
Mech Dev 2000 Jul;95(1-2):147-62.

KIM KO, SAMPSON ER, MAYNARD RD, et al.

Ski inhibits TGF- β /phospho-Smad3 signaling and accelerates hypertrophic differentiation in chondrocytes.
J Cell Biochem 2012 Jun;113(6):2156-66.

KIM MH, KIM HJ, CHOI JY, et al.

Transforming growth factor-beta3 gene SfaN1 polymorphism in Korean nonsyndromic cleft lip and palate patients.
J Biochem Mol Biol 2003, 36, 533–7.

KOHLI SS, KOHLI VIRINDER SINGH.

A comprehensive review of the genetic basis of cleft lip and palate.
Oral Maxillofac Pathol 2012 Jan-Apr; 16(1): 64–72.

KOHAMA K, NONAKA K, HOSOKAWA R, et al

TGF-beta-3 Promotes Scarless Repair of Cleft Lip in Mouse Fetuses
J Dent Res 2002 Oct;81(10):688-94.

KONDO S, SCHUTTE BC, RICHARDSON RJ, et al.

Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes.
Nat Genet 2002 Oct ;32(2) ;285-9.

KÖSTER D, MIERZWA J, SCHUMACHER GH, et al.

Craniofacial growth influenced by blood supply. 1. Collaterals and anastomoses following unilateral ligation of the common carotid artery.
Anat Anz 1986;162(4):241-50.

KOUSKOURA T, FRANGO N, ALEXIOU M, et al.
The genetic basis of craniofacial and dental abnormalities
Schweiz Monatsschr Zahnmed 2011;121(7-8):636-46.

KRIVICKA-UZKURELE B, PILMANE M, AKOTA I.
Barx1, growth factors and apoptosis in facial tissue of children with clefts.
Stomatologija 2008;10(2):62-6.

KUTRYK MJB, KASSAM SA, STEWART DJ.
L'angiogenèse : une nouvelle technologie pour le traitement de la coronaropathie
Cardiologie conférences scientifiques 2001 juin juillet volume VI, numéro 6.

LARSEN, WJ.
Embryologie humaine.
Bruxelles : De Boeck ; 1996.

LEES MM, WINTER RM, MALCOLM S, et al.
Popliteal pterygium syndrome: A clinical study of three families and report of linkage to the
Van der Woude syndrome locus on 1q32.
J Med Genet 1999 Dec;36(12):888-92.

LEOYKLANG P, SIRIWAN P, SHOTELERSUK V.
A mutation of the p63 gene in non-syndromic cleft lip.
J Med Genet 2006 Jun;43(6):e28.

LETRA A, SILVA RA, MENEZES R, et al.
MMP gene polymorphisms as contributors for cleft lip/palate: association with MMP3 but not
MMP1.
Arch Oral Biol 2007 Oct;52(10):954-60.

LETRA A, DA SILVA RA, MENEZES R, et al.
Studies with MMP9 gene promoter polymorphism and nonsyndromic cleft lip and palate.
Am J Med Genet A 2007 Jan 1;143(1):89-91.

LETRA A, SILVA RM, MOTTA LG, et al.
Association of MMP3 and TIMP2 promoter polymorphisms with nonsyndromic oral clefts.
Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2012 Jul;94(7):540-8.

LETRA A, FAKHOURI W, FONSECA RF.
Interaction between IRF6 and TGFA genes contribute to the risk of nonsyndromic cleft
lip/palate.
PLoS One 2012;7(9):e45441.

LI J, LI P, ZHANG Y, et al.
c-Ski inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells via suppressing Smad3
signaling but stimulating p38 pathway.
Cell Signal 2013 Jan;25(1):159-67.

LIDRAL AC, ROMOTTI PA, BASART AM, et al.
Association of MSX1 and TGFB3 with nonsyndromic clefting in humans.
Am J Hum Genetics 1988 Aug ;63(2): 557-68.

- LIE RT, WILCOX AJ, TAYLOR J, et al.
Maternal smoking and oral clefts: the role of detoxification pathway genes.
Epidemiology 2008 Jul;19(4):606-15. Erratum in: *Epidemiology*. 2010 May;21(3):432.
- LIM J, WONG ESM, ONG SH, et al.
Sprouty proteins are targeted to membrane ruffles upon growth factor receptor tyrosine kinase activation: identification of a novel translocation domain.
J Biol Chem 2000 Oct 20 ;275(42):32837-45.
- LIN JY, CHEN YJ, HUANG YL, ET AL.
Association of bone morphogenetic protein 4 gene polymorphisms with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in Chinese children.
DNA Cell Biol 2008 Nov;27(11):601-5.
- LITTLE, HZ, RORICK NK, SU LI, et al
Missense mutations that cause Van der Woude syndrome and popliteal pterygium syndrome affect the DNA-binding and transcriptional activation functions of IRF6.
Hum Molec Genet 2009 Feb 1 ;18(3):535-545.
- LIU L, KORZH V, BALASUBRAMANIYAN NV, et al.
Platelet- derived growth factor A (pdgf-a) expression during zebrafish embryonic development.
Dev Genes Evol 2002; 212: 298 – 301.
- LIU W, SUN X, BRAUT A, et al.
Distinct functions for Bmp signaling in lip and palate fusion in mice.
Development. 2005 Mar;132(6):1453-61.
- LONGO LD.
Classic pages in obstetrics and gynecology. The chromosome number in man. Joe Hin Tjio and Albert Levan. *Hereditas*, vol. 42, pp. 1-6, 1956.
Am J Obstet Gynecol 1978 Mar 15;130(6):722.
- LU W, YAMAMOTO V, ORTEGA B, et al.
Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth.
Cell 2004 Oct 1 ;119(1):97-108.
- MAARSE W, BERGE SJ, PISTORIUS L, et al.
Diagnostic accuracy of transabdominal ultrasound in detecting prenatal cleft lip and palate: a systematic review.
Ultrasound Obstet Gynecol 2010 Apr;35(4):495-502.
- MANGOLD E, LUDWIG KU, NÖTHEN MM.
Breakthroughs in the genetics of orofacial clefting.
Trends Mol Med 2011 Dec ;17(12) :725-33.
- MANSILLA MA, COOPER ME, GOLDSTEIN T, et al
Contributions of PTCH gene variants to isolated cleft lip and palate.
Cleft Palate Craniofac J 2006 Jan;43(1):21-9.

MARAZITA ML.

Subclinical features in non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (CL/P): review of the evidence that subepithelial orbicularis oris muscle defects are part of an expanded phenotype for CL/P.

Orthod Craniofac Res 2007 May;10(2):82-7.

MARÇANO AC, DOUDNEY K, BRAYBROOK C, et al.

TBX22 mutations are a frequent cause of cleft palate.

J Med Genet 2004 Jan, 41(1), 68-74.

MARINUCCI L, BALLONI S, BODO M, et al.

Patterns of some extracellular matrix gene expression are similar in cells from cleft lip-palate patients and in human palatal fibroblasts exposed to diazepam in culture.

Toxicology 2009 Mar 4;257(1-2):10-6.

MARTINELLI M, SCAPOLI L, PEZZETTI F, et al.

Lack of association between common polymorphisms of epidermal growth factor receptors and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate.

Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2009 Jul;73(7):929-31.

MASSAGUE J, XI Q.

TGF- β control of stem cell differentiation genes.

FEBS Lett 2012 Jul 4;586(14):1953-8.

MEFFORD HC, CLAUIN S, SHARP AJ, et al.

Recurrent reciprocal genomic rearrangements of 17q12 are associated with renal disease, diabetes, and epilepsy.

Am J Hum Genet 2007 Nov;81(5):1057-69.

MELNICK M, JASKOLL T, SLAVKIN HC.

Corticosteroid-induced cleft lip in mice: A teratologic, topographic, and histologic investigation.

Am J Med Genet 1981 ;10(4) :333-50.

MIETTINEN PJ, CHIN JR, SHUM L, et al.

Epidermal growth factor receptor function is necessary for normal craniofacial development and palate closure.

Nat Genet 1999 May;22(1):69-73.

MILLARD RJ.

Cleft Craft, volume I and II.

Boston : Little Brown; 1977

MOORHEAD PS, NOWELL PC, MELLMANN WJ, et al.

Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood.

Exp Cell Res 1960 ;20 :613.

MORENO LM, MANSILLA MA, BULLARD SA, et al.

FOXE1 association with both isolated cleft lip with or without cleft palate, and isolated cleft palate.

Hum Molec Genet 2009 Dec 15 ;18(24): 4879-96.

- MORIOKA D, SIMIC R, VLAHOVIC A, et al.
Tessier 30 median mandibular cleft associated with lower lip hemangioma.
Plast Reconstr Surg 2003 Sep;112(3):935.
- MOSSEY PA, LITTLE J, MUNGER RG, et al.
Cleft lip and palate.
Lancet 2009 Nov 21 ;374(9703) :1773-85.
- MUENKE M, GRIPP KW, MCDONALD-MCGINN DM, et al.
A unique point mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene (FGFR3) defines a new craniosynostosis syndrome.
Am J Hum Genet 1997 Mar;60(3):555-64.
- MUNGER RG, ROMITTI PA, DAACK-HIRSCH S, et al.
Maternal alcohol use and risk of orofacial cleft birth defects.
Teratology 1996 Jul ;54(1) :27-33.
- MURAOKA N, SHUM L, FUKUMOTO S et al.
Transforming Growth Factor β 3 Promotes Mesenchymal Cell Proliferation and Angiogenesis Mediated by the Enhancement of Cyclin D1, Flk-1, and CD31 Gene Expression during CL/Fr Mouse Lip Fusion.
Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 2005 Dec ;73(12):956-65.
- MURCRAY CE, LEWINGER JP, GAUDERMAN WJ.
Gene-environment interaction in genome-wide association studies
Am J Epidemiol 2009 Jan 15 ;169(2) :219-26.
- MURRAY JC, NISHIMURA DY, BUETOW KH, et al.
Linkage of an autosomal dominant clefting syndrome (Van der Woude) to loci on chromosome 1q.
Am J Hum Genet 1990 Mar ; 46(3) :486–91.
- MURRAY JC, DAACK-HIRSCH S, BUETOW KH, et al.
Clinical and epidemiologic studies of cleft lip and palate in the Philippines.
Cleft Palate Craniofac J 1997 jan ;34(1):7-10.
- NATSUME N, KAWAI T, OGI N, et al.
Maternal risk factors in cleft lip and palate: Case control study.
Br J Oral Maxillofac Surg 2000 Feb ;38(1) :23-5.
- NEOVIUS E, LEMBERGER M, DOCHERTY SKOGH AC, et al
Alveolar bone healing accompanied by severe swelling in cleft children treated with bone morphogenetic protein-2 delivered by hydrogel.
J Plast Reconstr Aesthet Surg 2013 Jan;66(1):37-42.
- NETTER FH
Atlas d'anatomie Humaine 5ème édition
Philadelphie : Sanders Elsevier; 2011.
- NIE X, LUUKKO K, KETTUNEN P.
FGF signalling in craniofacial development and developmental disorders.
Oral Dis 2006;12:102–111.

NIEVA Cécilia.

Greffe de périoste calvarial dans l'uranoplastie des fentes labio-palatines.

Thèse exercice : Médecine, chirurgie: Amiens : 2012 ;141

NIKOPENSIUS T, KEMPA I, AMBROZAITYTE L, et al.

Variation in FGF1, FOXE1, and TIMP2 genes is associated with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate.

Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 2011 Apr;91(4):218-25.

Online Mendelian Inheritance in Man.

National Library of Medicine website: Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/> [consulté le 06/03/2013]

ORIOLO IM, VIEIRA AR, CASTILLA EE, et al.

Mutational analysis of the Sonic Hedgehog gene in 220 newborns with oral clefts in a South American (ECLAMC) population.

Am J Med Genet 2002 Feb 15;108(1):12-5.

OSOEGAWA K, VESSERE GM, UTAMI KH, et al.

Identification of novel candidate genes associated with cleft lip and palate using array comparative genomic hybridisation.

J Med Genet 2008 Feb;45(2):81-6.

PARK-WYLLIE L, MAZZOTTA P, PASTUSZAK A, et al.

Birth defects after maternal exposure to corticosteroids: Prospective cohort study and meta-analysis of epidemiological studies.

Teratology 2000 Dec;62(6):385-92.

PASSOS-BUENO MR, GASPAR DA, KAMIYA T, et al.

Transforming growth factor-alpha and nonsyndromic cleft lip with or without palate in Brazilian patients: results of a large case-control study.

Cleft Palate Craniofac J 2004 Jul;41(4):387-91.

PATYNA S, HAZNEDAR J, MORRIS D, et al.

Evaluation of the safety and pharmacokinetics of the multi-targeted receptor tyrosine kinase inhibitor sunitinib during embryo-fetal development in rats and rabbits.

Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol 2009 Jun;86(3):204-13.

PAUWS E, STANIER P.

FGF signalling and SUMO modification: new players in the aetiology of cleft lip and/or palate.

Trends Genet 2007 Dec;23(12):631-40.

PAVY B, VENDROUX J, SMARRITO S.

Fentes labiales et palatines traitement primaire.

Encycl Med Chir, Paris, Techniques chirurgicales-chirurgie plastique reconstructrice et esthétique, 1998, 45, 580.

PELIKAN RC, IWATA J, SUZUKI A, et al.

Identification of candidate downstream targets of TGF β signaling during palate development by genome-wide transcript profiling.

J Cell Biochem 2013 Apr;114(4):796-807.

PEPPER MS.

Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity.
Cytokine Growth Factor Rev 1997 Mar;8(1):21-43.
PETER H, DEUTSCHMANN S, REICHEL C, et al.
Metabolism of methyl chloride by human erythrocytes.
Arch. Toxicol 1989 ;63(5) :351-5.

PETERSEN K, BROCKS V, JENSEN FR, et al

In vitro fertilization and embryo transfer. 2. The first 44 deliveries of 55 infants.
Ugeskr Laeger 1989 May 8;151(19):1175-8.

PRADAT P, ROBERT-GNANSIA E, DI TANNA GL, et al.

First trimester exposure to corticosteroids and oral clefts.
Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 2003 Dec ;67(12) :968-70.

PRESCOTT NJ, WINTER RM, MALCOLM S.

Maternal MTHFR genotype contributes to the risk of non-syndromic cleft lip and palate.
J Med Genet 2002 May ;39(5):368-9.

PRIMAKOFF P, MYLES DG.

The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity.
Trends Genet 16: 83-87, 2000.

PROETZEL G, PAWLOWSKI SA, WILES MV, et al.

Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion.
Nat Genet 1995 Dec ;11(4) :409-14.

RAHIMOV F, JUGESSUR A, MURRAY JC.

Genetics of nonsyndromic orofacial clefts.
Cleft Palate Craniofac J 2012 Jan;49(1):73-91.

RATAGERI VH, RAJSHANKAR S.

Palatal hemangioma with cleft zero.
Indian Pediatr 2002 Jul;39(7):693-4.

RATTANASOPHA S, TONGKOBPETCH S, SRICHOMTHONG C, et al.

PDGFRa mutations in humans with isolated cleft palate.
Eur J Hum Genet 2012 Oct;20(10):1058-62.

RAY JG, MEIER C, VERMEULEN MJ, et al.

Association between folic acid food fortification and congenital orofacial clefts.
J Pediatr 2003 Dec ;143(6) :805-7.

REARDON W, WILKES D, RUTLAND P, et al.

Craniosynostosis associated with FGFR3 pro250arg mutation results in a range of clinical presentations including unsutural sporadic craniosynostosis.
J Med Genet 1997 Aug;34(8):632-6.

REDON R, ISHIKAWA S, FITCH KR, et al.

Global variation in copy number in the human genome.
Nature 2006 Nov ;23;444(7118):444-54.

REIGSTAD L J, SANDE HM, FLUGE O, et al.
Platelet-derived growth factor (PDGF)-C, a PDGF family member with a vascular endothelial growth factor-like structure.
J Biol Chem 2003 May 9;278(19):17114-20.

REIGSTAD LJ, MARTINEZ A, VARHAUG JE, et al.
Nuclear localisation of endogenous SUMO-1-modified PDGF-C in human thyroid tissue and cell lines.
Exp Cell Res 2006 Apr 1;312(6):782-95.

REITER R, BROSCHE S, LÜDEKE M, et al
Genetic and environmental risk factors for submucous cleft palate.
Eur J Oral Sci 2012 Apr;120(2):97-103.

REUTTER H, BIRNBAUM S, MENDE M, et al.
TGFB3 displays parent-of-origin effects among central Europeans with nonsyndromic cleft lip and palate.
J Hum Genet 2008;53:656–661.

RICHARDSON RJ, DIXON J, MALHOTRA S, et al.
Irf6 is a key determinant of the keratinocyte proliferation-differentiation switch.
Nat Genet 2006 Nov ;38(11) :1329-34.

RILEY BM, MANSILLA MA, MA J, et al.
Impaired FGF signaling contributes to cleft lip and palate.
Proc Natl Acad Sci U S A 2007 Mar 13;104(11):4512-7.

RILEY BM, MURRAY JC.
Sequence evaluation of FGF and FGFR gene conserved non-coding elements in non-syndromic cleft lip and palate cases.
Am J Med Genet A 2007;143A:3228–3234.

ROBBINS JR, MCGUIRE PG, WEHRLE-HALLER B, et al
Diminished matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) in ectomesenchyme-derived tissues of the Patch mutant mouse: regulation of MMP-2 by PDGF and effects on mesenchymal cell migration.
Dev Biol 1999 Aug 15;212(2):255-63.

RODRIGUEZ-PINILLA E, MARTINEZ-FRIAS ML.
Corticosteroids during pregnancy and oral clefts: A case-control study.
Teratology 1998 Jul ;58(1) :2-5.

ROESSLER E, DU YZ, MULLOR JL, et al.
Loss of function mutations in the human GLI2 gene are associated with pituitary anomalies and holoprosencephaly-like features.
Proc Natl Acad Sci U S A 2003 Nov 11;100(23):13424-9.

ROTZER D, ROTH M, LUTZ M, et al.
Type III TGF-beta receptor-independent signalling of TGF-beta2 via TbetaRII-B, an alternatively spliced TGF-beta type II receptor.
EMBO J 2001 Feb 1;20(3):480-90.

- SAFRA MJ, OAKLEY GP Jr.
Association between cleft lip with or without cleft palate and prenatal exposure to diazepam.
Lancet 1975 Sep 13 ;2(7933) :478–80.
- SALEEM S, RAJENDRAN R, MOINAK B, et al.
Evidence for transforming growth factor-beta 3 gene polymorphism in non-syndromic cleft lip and palate patients from Indian sub-continent.
Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2012 Mar 1;17(2):e197-200.
- SARIFAKIOGLU N, ASLAN G.
Unilateral cleft lip with hemangioma.
Plast Reconstr Surg 2003 Sep 15;112(4):1174
- SATOKATA I, MAAS R.
Mx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development.
Nat Genet 1994 Apr;6(4):348-56.
- SAXEN I, SAXEN L.
Association between maternal intake of diazepam and oral clefts.
Lancet 1975 Sept 13 ;2(7933) :498.
- SCHMAHL J, RAYMOND CS, SORIANO P.
PDGF signaling specificity is mediated through multiple immediate early genes.
Nat Genet 2007; 39: 52 – 60.
- SCHRODER KR, WIEBEL FA, REICH S, et al.
Glutathione S-transferase (GST) theta polymorphism influences background SCE rate.
Arch Toxicol 1995 ;69(7) :505-7.
- SHAW GM, WASSERMAN CR, LAMMER EJ, et al.
Orofacial clefts, parental cigarette smoking, and transforming growth factor-alpha gene variants.
Am J Hum Genet 1996;58:551–561.
- SHAW GM, WASSERMAN CR, MURRAY JC, et al.
Infant TGF-alpha genotype, orofacial clefts, and maternal periconceptional multivitamin use.
Cleft Palate Craniofac J 1998;35:366–370.
- SHAW GM, LAMMER EJ.
Maternal periconceptional alcohol consumption and risk for orofacial clefts.
J Pediatr 1999;134(3) :298-303.
- SHAW GM, NELSON V, CARMICHAEL SL, et al.
Maternal periconceptional vitamins: Interactions with selected factors and congenital anomalies?
Epidemiology 2002 Nov ;13(6) :625-30.
- SHAW GM, IOVANNISCI DM, YANG W, et al.
Endothelial nitric oxide synthase (NOS3) genetic variants, maternal smoking, vitamin use, and risk of human orofacial clefts.
Am J Epidemiol 2005 Dec 15;162(12):1207-14.

SHEN X, LIU RM, YANG L, et al.

The CRISPLD2 gene is involved in cleft lip and/or cleft palate in a Chinese population.
Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2011 Oct;91(10):918-24.

SHI M, CHRISTENSEN K, WEINBERG CR, et al.

Orofacial cleft risk is increased with maternal smoking and specific detoxification-gene variants.

Am J Hum Genet 2007 Jan;80(1):76-90.

SHI M, MOSTOWSKA A, JUGESSUR A, et al.

Identification of microdeletions in candidate genes for cleft lip and/or palate.

Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 2009 Jan;85(1):42-51.

SHIANG R, LIDRAL AC, ARDINGER HH, et al.

Association of transforming growth-factor alpha gene polymorphisms with nonsyndromic cleft palate only (CPO).

Am J Hum Genet 1993 Oct;53(4):836-43.

SINGH KOHLI S, SINGH KOHLI V.

A comprehensive review of the genetic basis of cleft lip and palate.

Oral Maxillofac Pathol 2012 ;16(1) :64–72.

SLANEY SF, OLDRIDGE M, HURST JA, et al.

Differential effects of FGFR2 mutations on syndactyly and cleft palate in Apert syndrome.

Am J Hum Genet 1996 May;58(5):923–32.

SOBOTTA J

Atlas d'anatomie humaine. Tome 1 Tête, cou, membre supérieur. 3^{ème} édition.

Paris, Tec et Doc; 1994.

SONG T, LI G, JING G, et al.

SUMO1 polymorphisms are associated with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate.

Biochem Biophys Res Commun 2008 Dec 26;377(4):1265-8.

SORIANO P.

The PDGF alpha receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites.

Development 1997; 124: 2691 – 2700.

SÖZEN MA, SUZUKI K, TOLAROVA MM, et al.

Mutation of PVRL1 is associated with sporadic, non-syndromic cleft lip/palate in northern Venezuela.

Nat Genet 2001 Oct ;29(2) :141-2.

STACKER SA, HOVENS CM, VITALI A, et al.

Molecular cloning and chromosomal localisation of the human homologue of a receptor related to tyrosine kinases (RYK).

Oncogene 1993 May ;8(5):1347-56.

STALMANS I.

VEGF: A modifier of the del22q11 (DiGeorge) syndrome?
Nat Med 2003 Feb; 9(2):173-82.

STANIER P, FORBES SA, ARNASON A, et al.

The localization of a gene causing X-linked cleft palate and ankyloglossia (CPX) in an Icelandic kindred is between DXS326 and DXYS1X.
Genomics 1993 Sept ;17(3) :549–55.

STANIER P, MOORE GE.

Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts.
Hum Mol Genet 2004 Apr 1;13 Spec No 1:R73-81.

STANIER P, PAUWS E.

Development of the lip and palate: FGF signalling.
Front Oral Biol 2012;16:71-80.

STUPPIA L, CAPOGRECO M, MARZO G, et al.

Genetics of syndromic and nonsyndromic cleft lip and palate.
J Craniofac Surg 2011 Sep ;22(5) :1722-6.

SU HL, LI SSL.

Molecular features of human ubiquitin-like SUMO genes and their encoded proteins.
Gene 2002 Aug 21 ;296:65-73.

SUAZO J, SANTOS JL, JARA L, ET AL.

Association between bone morphogenetic protein 4 gene polymorphisms with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Chilean population.
DNA Cell Biol 2010 Feb;29(2):59-64.

SUAZO J, SANTOS JL, SCAPOLI L, et al.

Association between TGFB3 and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Chilean population.
Cleft Palate Craniofac J 2010b;47:513–517.

SUN D, VANDERBURG CR, ODIERNA GS, HAY ED.

TGFbeta3 promotes transformation of chicken palate medial edge epithelium to mesenchyme in vitro.
Development 1998 Jan;125(1):95-105.

SUN Y, LIU X, EATON EN, et al.

Interaction of the Ski oncoprotein with Smad3 regulates TGF-beta signaling.
Mol Cell 1999 Oct;4(4):499-509.

SULL JW, LIANG KY, HETMANSKI JB, et al.

Evidence that TGFA influences risk to cleft lip with/without cleft palate through unconventional genetic mechanisms.
Hum Genet 2009;126:385–394.

SUZUKI K, HU D, BUSTOS T, et al.

Mutations of PVRL1, encoding a cell-cell adhesion molecule/herpesvirus receptor, in cleft lip/palate-ectodermal dysplasia.

Nat Genet 2000 Aug ;25(4) :427-30.

SUZUKI S, MARAZITA ML, COOPER ME, ET AL.

Mutations in BMP4 are associated with subepithelial, microform, and overt cleft lip.

Am J Hum Genet 2009 Mar;84(3):406-11.

SUZUKI Y, JEZEWSKI PA, MACHIDA J, et al.

In a vietnamese population, MSX1 variants contribute to cleft lip and palate.

Genet Med 2004 May;6(3):117-25.

TAKAHASHI K, NAKANISHI H, MIYAHARA M, et al.

Nectin/PRR: An immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domain-containing protein.

J Cell Biol 1999 May 3 ;145(3) :539-49.

TALLQUIST MD, SORIANO P.

Cell autonomous requirement for PDGFRalpha in populations of cranial and cardiac neural crest cells.

Development 2003 Feb;130(3):507-18.

TALMANT Jean-Claude, TALAMANT Jean Christian, LUMINEAU JP.

Fentes labiales et palaines. Traitement primaire. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Techniques chirurgicales- Chirurgie plastique reconstructrice et esthétique, 45-580, 2011.

TOLAROVA M, HARRIS J.

Reduced recurrence of orofacial clefts after periconceptional supplementation with high-dose folic acid and multivitamins.

Teratology 1995 Feb ;51(2) :71-8.

TONGKOBPETCH S, SIRIWAN P, SHOTELERSUK V.

MSX1 mutations contribute to non syndromic cleft lip in Thai population.

J Hum Genet 2006;51(8):671-6.

VAN DEN BOOGAARD MJ, DORLAND M, BEEMER FA, et al.

MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans.

Nat Genet 2000 Apr;24(4):342-3.

VAN DER PUT NM, STEEGERS-THEUNISSEN RP, FROSST P, et al.

Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida.

Lancet 1995 Oct 21 ;346(8982) :1070-1.

VAN ROOIJ IA, VERMEIJ-KEERS C, KLUIJTMANS LA, et al.

Does the interaction between maternal folate intake and the methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms affect the risk of cleft lip with or without cleft palate?

Am J Epidemiol 2003 Apr 1 ;157(7) :583-91.

VAN ROOIJ IA, WEGERIF MJ, ROELOFS HM, et al.
Smoking, genetic polymorphisms in biotransformation enzymes, and nonsyndromic oral clefting: A gene-environment interaction.
Epidemiology 2001 Sept ;12(5) :502-7.

VASTARDIS H, KARIMBUX N, GUTHUA SW, et al.
A human MSX1 homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis.
Nat Genet 1996, 13, 417–21.

VASTARDIS H, KARIMBUX N, GUTHUA SW, et al.
A human MSX1 homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis.
Nat Genet 1996;13:417–21.

VENZA I, VISALLI M, PARRILLO L, et al.
MSX1 and TGF-beta3 are novel target genes functionally regulated by FOXE1.
Hum Mol Genet 2011 Mar 1;20(5):1016-25.

VEAU Victor
Bec de lièvre : formes cliniques-Chirurgie
Paris: Masson ; 1938.

VIEIRA AR, ORIOLI IM, CASTILLA EE, et al.
MSX1 and TGFB3 contribute to clefting in South America.
J Dent Res 2003 Apr ;82(4) :289-92.

VIEIRA AR, AVILA JR, DAACK-HIRSCH S, et al.
Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate.
PLoS Genet 2005 Dec ;1(6)e64.

VIEIRA AR.
Association between the transforming growth factor alpha gene and nonsyndromic oral clefts: a HuGE review.
Am J Epidemiol 2006 May 1;163(9):790-810.

VIKKULA M.
Fentes labiales et/ou palatines : quoi de neuf en génétique?
Séminaire du centre labio-palatin A.de Coninck
<http://www.saintluc.be/services/medicaux/centre-labio-palatin/pdf/clb-compte-rendu-05-03-05.pdf> [consulté le 06/03/2013]

VISSERS LE, VELTMAN JA, VAN KESSEL AG, et al.
Identification of disease genes by whole genome CGH arrays.
Hum Mol Genet 2005 Oct 15;14 Spec No. 2:R215–223.

WANG H, ZHANG T, WU T, et al.
The FGF and FGFR Gene Family and Risk of Cleft Lip With or Without Cleft Palate.
Cleft Palate Craniofac J 2013 Jan;50(1):96-103.

WATANABE A, AKITA S, TIN NT, et al.
A mutation in RYK is a genetic factor for nonsyndromic cleft lip and palate.
Cleft Palate Craniofac J 2006 May;43(3):310-6.

- WILKIE AO, SLANEY SF, OLDRIDGE M, et al.
Apert syndrome results from localized mutations of FGFR2 and is allelic with Crouzon syndrome.
Nat Genet 1995 Feb;9(2):165-72.
- WU C, ENDO M, YANG BH, et al.
Intra-amniotic transient transduction of the periderm with a viral vector encoding TGF β 3 prevents cleft palate in Tgf β 3(-/-) mouse embryos.
Mol Ther 2013 Jan;21(1):8-17.
- WU D, WANG M, WANG X, et al.
Maternal transmission effect of a PDGF-C SNP on nonsyndromic cleft lip with or without palate from a Chinese population.
PLoS One 2012;7(9):e46477.
- WURDAK H, ITTNER LM, LANG KS, et al.
Inactivation of TGF beta signaling in neural crest stem cells leads to multiple defects reminiscent of DiGeorge syndrome.
Genes Dev 2005 Mar 1;19(5):530-5.
- WYSZYNSKI DF, WU T.
Use of US birth certificate data to estimate the risk of maternal cigarette smoking for oral clefting.
Cleft Palate CraniofacJ 2002 Mar ;39(2) :188-92.
- XIE J, ASZTERBAUM M, ZHANG X, et al.
A role of PDGFRalpha in basal cell carcinoma proliferation.
Proc Natl Acad Sci U S A 2001 Jul 31;98(16):9255-9.
- XU X, BRINGAS P JR, SORIANO P, et al.
PDGFR-alpha signaling is critical for tooth cusp and palate morphogenesis.
Dev Dyn 2005 Jan;232(1):75-84.
- YAGI H, FURUTANI Y, HAMADA H, et al.
Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome.
Lancet 2003 Oct 25;362(9393):1366-73.
- YANG J, ZHANG X, LI Y, et al.
Downregulation of Smad transcriptional corepressors SnoN and Ski in the fibrotic kidney: an amplification mechanism for TGF-beta1 signaling.
J Am Soc Nephrol 2003 Dec;14(12):3167-77.
- YAO Z, CHEN D, WANG A, et al
Folic acid rescue of ATRA-induced cleft palate by restoring the TGF- β signal and inhibiting apoptosis.
J Oral Pathol Med 2011 May;40(5):433-9.
- YOKOYAMA E, DEL CASTILLO V, RAMOS S, et al
Omphalocele, bladder exstrophy, imperforate anus, spine defects complex, and bilateral cleft lip and palate in one product of a triplet pregnancy obtained by in vitro fertilization: a case report.
Am J Med Genet A 2007 Aug 15;143A(16):1933-5.

- YOSHIOKA M, TANIMOTO K, TANNE Y, et al.
Bone regeneration in artificial jaw cleft by use of carbonated hydroxyapatite particles and mesenchymal stem cells derived from iliac bone.
Int J Dent 2012;2012:352510.
- ZEIGER JS, BEATY TH, LIANG KY.
Oral clefts, maternal smoking, and TGFA: a meta-analysis of gene-environment interaction.
Cleft Palate Craniofac J 2005;42:58–63.
- ZHANG KQ.
Artery supply of the lip and palate in normal and cleft patients.
Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi 1994 Jan;29(1):30-3, 63.
- ZHU J, HAO L, LI S, et al.
MTHFR, TGFB3, and TGFA polymorphisms and their association with the risk of non-syndromic cleft lip and cleft palate in China.
Am J Med Genet A 2010 Feb;152A(2):291-8.
- ZHU X, OZTURK F, LIU C, et al.
Transforming growth factor- β activates c-Myc to promote palatal growth.
J Cell Biochem 2012 Oct;113(10):3069-85.
- ZHU X, OZTURK F, PANDEY S et al
Implications of TGF β on Transcriptome and Cellular Biofunctions of Palatal Mesenchyme.
Front Physiol 2012;3:85.
- ZIGIOTTI GL, SIRAGO P.
Anatomo-clinical features of the musculature and vascularization of the normal lip and congenital cleft.
Minerva Stomatol 1984 May-Jun;33(3):447-53.
- ZOUVELOU V, LUDER HU, MITSIADIS TA, et al.
Deletion of BMP7 affects the development of bones, teeth, and other ectodermal appendages of the orofacial complex.
J Exp Zool B Mol Dev Evol 2009 Jun 15 ;312B(4) :361-74.
- ZOUVELOU V, PASSA O, SEGKLIA K, et al.
Generation and functional characterization of mice with a conditional BMP7 allele.
Int J Dev Biol 2009; 53(4):597-603.

FRANCOIS-FIQUET, Caroline (EA 3801 Pr P.Nguyen, Reims)

Les fentes labio-palatines (FLP) sont la malformation cranio-faciale congénitale la plus fréquente. D'origine multifactorielle, elles sont la conséquence d'un défaut de fusion des bourgeons faciaux.

Objectif et Méthodologie

L'objectif de ce travail a été d'étudier la place des gènes de l'angiogenèse dans le cadre de la piste étiologique des FL/P. La méthodologie de ce travail comportait 3 étapes :

- Une analyse systématique et exhaustive des gènes impliqués dans les FL/P comprenant les gènes identifiés mais aussi les gènes potentiellement impliqués.
- Une analyse rétrospective des explorations génétiques des FL/P opérées au CHU de Reims entre 2003 et 2009.
- La mise en place d'une analyse prospective (2009-2012, AOL) :
 - Génomique constitutionnelle par CGH Array
 - *In situ* au niveau des berges des fentes issues de déchets opératoires des chirurgies primaires des FL/P comprenant :
 - Le développement d'un protocole de culture cellulaire de fibroblastes
 - Une analyse anatomopathologique

Et surtout le développement d'un modèle d'étude *in vivo* chez l'enfant d'analyse d'expression des gènes de l'angiogenèse.

Résultats L'analyse systématique des gènes impliqués dans les FL/P a mis en évidence 95 gènes dont plus d'une dizaine sont connus comme liés aux mécanismes d'angiogenèse (facteurs de croissance et protéases). Ces derniers sont en interaction entre eux mais aussi avec 18 autres gènes impliqués eux aussi dans les FL/P. Ainsi au total 1/3 des gènes d'intérêt sont soit des gènes de l'angiogenèse soit en lien avec eux.

L'étude rétrospective nous a permis de mettre en exergue certaines formes cliniques originales qui ont été étudiées et publiées sous un angle « étiologique ».

L'étude prospective nous a permis, après obtention des consentements, d'inclure 72 patients (30 FLP, 24FL, 18FP) opérés au CHU de Reims entre 2009 et 2012 d'une chirurgie primaire.

Nous présentons :

- nos résultats anatomopathologiques, et génétiques (CGH Array)
- notre protocole de culture cellulaire
- nos réflexions, notre cheminement aboutissant à la création du modèle d'étude d'analyse d'expression des gènes de l'angiogenèse

Discussion La littérature a bien mis en avant une implication des phénomènes angiogéniques dans la constitution des FL/P par le biais des facteurs de croissance (*TGFβ*, *PDGF C et Ra*, *FGF*, *TGFA*, *FGFR1*, *FGFR2* ; *VEGF*) et des protéases (*MMP/TIMP2*). L'ensemble de nos manipulations *in situ* nous permet aujourd'hui de disposer du matériel nécessaire pour l'étude de l'expression des facteurs impliqués dans l'angiogenèse sur les berges des fentes. Parallèlement, l'étude génomique constitutionnelle en CGH Array a permis de retrouver des variations non connues comme polymorphiques chez 62% de nos patients. Des études familiales vont compléter notre travail. Elles permettront de savoir si ces CNV sont héritées ou *De Novo* et ainsi de préciser leur caractère bénin ou pathologique. L'identification chez un de nos patients d'une amplification, même de petite taille, du gène *SKI* (gène lié à la voie des *TGFβ*) nous encourage dans la poursuite de nos recherches d'anomalies constitutionnelles des gènes de l'angiogenèse dans les FL/P.

La CGH array est une technique qui nous a paru particulièrement utile et fiable en terme de « scanning » et de dépistage. En conclusion, en pratique clinique, la découverte des anomalies préalablement certainement sous estimées par les cliniciens doit nous mener à une nouvelle réflexion sur le conseil génétique et sur l'utilité dans l'avenir d'un dépistage plus systématique.

Cleft lip-palate : Genetic-etiological approach and role of gene expression in angiogenesis. Development of an *in vivo* study model in children.

Cleft lip and palate (CLP) are the most common congenital craniofacial malformation. They have a multifactorial etiology and are the consequence of incomplete fusion of the facial buds.

Objective and Methodology The objective of this work was to study the role of the genes of angiogenesis in the framework of studying the etiology of CL/P. Our methodological approach included 3 steps:

- Systematic and thorough analysis of the genes involved in CL/P including identified genes but also genes that could be potentially involved.
- A retrospective analysis of the operated clefts at the University Hospital of Reims between 2003 and 2009.
- Implementation of a prospective analysis (2009-2012, AOL):
 - Constitutional genomic study by CGH Array
 - *In situ* with tissue specimens extracted from surgically excised cleft edges including:
 - The development of a protocol for fibroblast cell cultures
 - Histopathological analysis
 - And above all the development of an *in vivo* study model in children for analyzing the expression of genes of angiogenesis.

Results The systemic analysis of genes involved in cleft lip palate unveiled 95 genes including about ten that are known to be related to angiogenesis mechanisms (growth factor and proteases). These genes interact between themselves but also with 18 other genes also involved in CL/P. In all, 1/3 of relevant genes are either angiogenesis-related genes or in direct relation with them.

The retrospective study permitted to underline the some original clinical forms that were studied and published under an « etiological » angle.

The prospective study included 72 patients (30 CLP, 24CL, 18CP), for whom we obtained informed signed consents, operated at the University Hospital of Reims between 2009 and 2012 for primary cleft surgery.

We present:

- Our histopathological and genetic results (CGH Array)
- Our cell culture protocol (submitted for publication)
- Our approaches and thought process behind the design of a study model for analyzing expression profiling of angiogenic genes

Discussion The literature has highlighted the role of angiogenesis in the formation of cleft lip/palate via growth factors (*TGFβ*, *PDGF C* and *Ra*, *FGF*, *TGFA*, *FGFR1*, *FGFR2*, *VEGF*) and proteases (*MMP/TIMP2*). All our manipulations *in situ* have yielded the necessary material, i.e. edges of resected clefts, to study the expression of factors involved in cleft angiogenesis.

In parallel, the constitutional genomic study in CGH Array enabled to uncover abnormalities in 62% of our patients. Family studies will complete our work. They will help to refine if these CNV are inherited or *de novo* and thus indicate their benign or pathological nature. In one of our patients, the identification of the *SKI* gene (related to the *TGFβ* pathway) encourages us to continue our research of genetic abnormalities of angiogenic genes involved in cleft lip/palate. CGH array appeared to be a very useful and reliable method in terms of scanning and screening.

In conclusion, in clinical practice, the discovery of abnormalities which were probably underestimated by clinicians before, leads us to rethink the issue of genetic counseling and the relevance of a more systematic screening for these abnormalities in the future.

MOTS CLES : Fente labiale. Fente palatine. Etiologie. Génétique. Angiogenèse. CGH Array. Chirurgie plastique. Chirurgie cranio-faciale. Chirurgie pédiatrique. Procédure de chirurgie maxillo-faciale.

JURY	Président	Pr Philippe N'Guyen	Directeur	Pr Martine Doco Fenzy
	Rapporteur	Pr Laurence Olivier-Faivre	Rapporteur	Pr Philippe Pellerin
	Membre du jury	Pr Bruno Bachy	Membre du jury	Pr Marie-Laurence Poli-Merol

carolinefiquet@me.com

Tél : 06 82 87 38 93

