

CULTURES DE FIBROBLASTES ISSUES DE BERGES DE FENTES LABIO-PALATINE : DESCRIPTION DU PROTOCOLE ET EXTRACTION D'ADN

François C.^{1,2,3,4}, Dard R.¹, Landais E.¹, Laffon L.¹, Birembaut P.⁵, Ta Phi Than N.¹, Mangeonjean C.¹, Feucher P.¹, Gaillard D.¹, Poli-Merol M.-L.², NGuyen P.⁴, Doco-Fenzy M.^{1,4}

¹ *Génétique, Hôpital Maison Blanche, CHU Reims FRANCE*

² *Chirurgie pédiatrique American Memorial Hospital, CHU Reims France*

³ *Chirurgie plastique et reconstructrice, hopital maison Blanche, CHU Reims France*

⁴ *EA 3801, Université de Reims Champagne Ardenne*

⁵ *Histologie-Embryologie et biologie cellulaire. U903*

Auteur correspondant:

Caroline FRANCOIS, Service de chirurgie plastique et reconstructrice
Hopital Maison Blanche, 45 rue Cognacq Jay, 51092 REIMS, FRANCE
E-mail: caroline_francois@icloud.com, Mobile: + 33 (0)6 82 87 38 93

INTRODUCTION

Les fentes labiales et/ou palatines (FL/P) sont les anomalies cranio-faciales congénitales les plus fréquentes. Leurs origines étiologiques sont multiples (toxiques, génétiques ou environnementales). Fogh-Andersen en 1942 fut le premier à souligner le rôle de la génétique dans les fentes faciales. Depuis de nombreuses approches ont été utilisées pour définir ce rôle :

modèles animaux, analyse des réarrangements chromosomiques (caryotype), étude de liaison, études cliniques, séquençage de gènes candidats (1).

L'histoire de la culture cellulaire remonte à 1912 quand Carrel décrit la culture de tissu. Plus tard, en 1956, Tjio and Levan utilisèrent la culture de tissu foetal humain et le choc hypotonique pour observer 46

chromosomes dans les cellules somatiques (2). La Cytogénétique humaine est devenue une science médicale en 1959 lors de la découverte de la trisomie 21. Les travaux reposent sur la préparation des chromosomes, obtenus sur des tissus à croissance rapide comme la moelle osseuse et les tissus néoplasiques ; mais également après culture cellulaire. Ces cellules sont des lymphocytes, des fibroblastes, ou des cellules amniotiques par exemple. De nombreuses méthodes de culture cellulaire ont été décrites, toutefois la technique décrite en 1960 par Moorhead reste une référence (3). Les premières cultures de fibroblastes furent réalisées à partir de biopsies cutanées. Par la suite d'autres tissus ont été utilisés comme les aponévroses, les muscles, les reins ou les organes génitaux d'animaux (4).

La plupart des études génétiques de FL/P ont été faites à partir d'échantillons de sang. A l'inverse, très peu d'études se concentrent sur les échantillons de tissus issus de berges de fentes labio-palatines. Pourtant, cette région est un support d'étude particulièrement intéressant, pour l'étude de l'expression génique en cas de mosaïcisme germinale mais également pour des études pharmacologiques ou thérapeutiques futures.

Cependant, si cette zone est accessible, les échantillons sont uniques, petits et peuvent être uniquement obtenus lors de la première chirurgie réparatrice.

De par la nature mixte (peau, muqueuse et parfois muscle) des prélève-

ments de berges de fente faciale le choix de la culture de fibroblaste nous a paru être le plus approprié. Cette technique, standardisée pour les biopsies cutanées n'est pas bien décrite pour les fentes, même si certains auteurs s'y réfèrent dans leurs études (5,6,7,8).

L'objectif de ce travail était le développement et la description précise d'un protocole simple, efficace et reproductible pour la culture de fibroblastes à partir d'excisions de berges de fentes labiales et/ou palatines.

MATERIELS & METHODE

Patients

Cette étude prospective monocentrique, a inclus 48 patients opérés d'une chirurgie primaire de fente labio-palatine entre 2010 et 2012.

La population cible était constituée de patients avec fente labiale, fente labio-palatine (uni ou bilatérale), et fente palatine, requérant une chirurgie primaire réparatrice de la lèvre et/ou du palais. Les critères d'exclusion étaient les chirurgies secondaires ou le refus des parents à participer à l'étude génétique.

Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique du CHU de Reims et les patients inclus dans l'étude après information complète des parents et signature du consentement.

Prélèvement d'échantillon

Les échantillons de tissu étaient prélevés pendant l'intervention chirurgicale

pour réparation primaire de fente labio-palatine (selon Tennison, modifiée par Malek, ou Millard, Figures 1a et 1c).

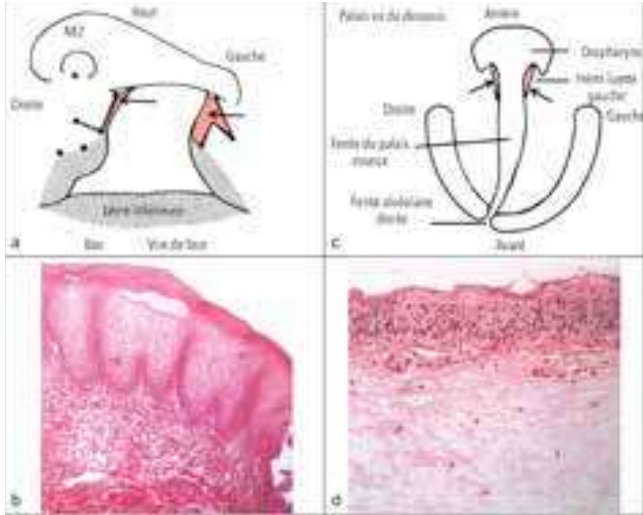


Figure 1 : Schémas opératoires et Histologie des prélèvements réséqués.

1a : Schéma opératoire de la cheiloplastie primaire. Après incision cutané-muqueuse à la lame froide, les fragments opératoires réséqués issus de la plastie de la fente labiale ont été gardés (flèches noires). Les berges externes et internes ont été identifiées.

1b : Aspect externe de fentelabiale (HESx63), versant muqueux, surface muqueuse malpighienne hyperplasique et chorion fibreux.

1c : Schéma opératoire d'une fente labio-palatine. Lors de la chirurgie primaire du voile (Veau Wardill Kilner ou Furlow), les fragments opératoires réséqués issus de l'avivement de la luette aux ciseaux ont été gardés.

1d : Œdème du chorion sur berges de fentes vélo-palatines (HESx250).

Anatomopathologie

Une analyse anatomopathologique a été réalisée sur 135 prélèvements, dont 111 berges de FL (berges externes et/ou internes) et 24 berges de FP.

Dans les FL (Fig.1b), l'épithélium malpighien est hyperplasique dans 18 % des cas mais décrit physiologiquement comme plus épais du côté buccal. L'hyperplasie des glandes sébacées dans 22 % est fréquemment retrouvée dans d'autres contextes. La présence de muscle lisse sur quelques pré-

lèvements est surprenante. Il n'existe pas de différence anatomopathologique entre les berges externes et internes, même pour la vascularisation. Des nerfs ont été observés dans le cas des formes unilatérales. Parfois hypertrophiques, ils ont rarement été retrouvés au niveau des bourgeons médians des formes bilatérales.

Dans les prélèvements palatins, en l'absence de fente, le voile (dans sa partie membraneuse) et la luette sont constitués par une double lame de muscles striés composée du muscle pharyngostaphylin et du muscle palato-staphylin. Sur les deux faces de ce plan musculaire, on trouve une couche presque continue de glandes salivaires. La muqueuse proprement dite comporte un épithélium malpighien épais du côté buccal et beaucoup plus mince du côté pharyngien. Dans les FP (Fig. 1d) le chorion était fréquemment œdématié (secondairement à l'infiltration de xylocaïne?). La présence de muscle était inconstante, les vaisseaux sanguins et lymphatiques fréquemment congestifs. Une inflammation modérée était retrouvée pour 71 % des cas.

Transport

Au bloc opératoire, en salle, les échantillons étaient placés dans des flacons stériles préalablement remplis de milieu HAM/DMEM F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/F-12, HiMedia Laboratories, Inde) avec substitut de sérum de veau fœtal (Ultrosor G, Pall Life Science, USA), et antibiotiques (Pénicilline, Streptomycine et Gentamycine, Invitrogen, Fischer Bioblock, USA), puis acheminés immédiatement au laboratoire de génétique.

Culture cellulaire

Toutes les étapes ont été réalisées en environnement stérile. Nous avons fait le choix d'une dissociation mécanique. Au laboratoire, les échantillons étaient découpés au scalpel en fragments de quelques millimètres, puis placés dans une solution de dissociation à 37°C composée de Collagénase de type II de *Clostridium histolyticum* à 1,25 g/L (Sigma Aldrich), de désoxyribonucléase I de pancréas de bœuf à 250 mg/L (Sigma Aldrich), dans le milieu de culture à 10% de sérum de veau fœtal (SVF). Cette solution était filtrée et transférée dans des tubes de 100 mL (congelés si besoin). La durée de la dissociation dépendait de la taille de l'échantillon (entre 1 et 4 heures avec agitation douce toutes les 30 minutes). Une fois dissociées, les cellules étaient lavées avec le milieu HAM/DMEM F12 supplémenté en SVF pour inhiber l'action de la collagénase. Les échantillons étaient centrifugés à 1000 rpm, 10 min. Après décantation, le culot étaitensemencé dans 6 mL de milieu de culture (HAM/DMEM F12) dans des boîtes de 25 cm³ (GREINER type, Dominique Dutscher, France).

Le milieu de culture était constitué de :

- DMEM/F12 Glutamax 1x, GIBCO (Fischer Bioblock Scientific, USA) supplémenté avec 4% de substrat de SVF ULTROSER G et reconstitué dans 20 mL de solution saline injectable.
- 20 mL de Pénicilline-Streptomycine à 0,5% (Invitrogen, Fischer Bioblock, 10000 unités par mL de Pénicilline et 10000 mg/mL de Streptomycine)

- 20 mL de Gentamycine à 0,1%, (Fischer Bioblock).

Les boîtes étaient placées dans un incubateur à 37°C régulé en atmosphère humide 3 gaz (CO₂ 5%, O₂ 5% N₂ 90%).

Le milieu était remplacé à J5 en vidant lentement les boîtes pour éliminer les cellules mortes non adhérentes, en suspension et en ajoutant 8 mL de milieu de culture frais.

Les boîtes étaient observées au microscope inversé (x40) à partir du 8^{ème} jour afin d'apprécier la croissance des îlots cellulaires. Si le nombre et la taille de ces îlots atteignait 80% de confluence, la culture était amplifiée. Sinon, les boîtes étaient replacées dans l'incubateur et observées tous les jours jusqu'à obtenir une pousse satisfaisante des cellules. Le milieu de culture était ensuite changé tous les 2 jours à partir du 9^{ème} jour (Fig. 2).

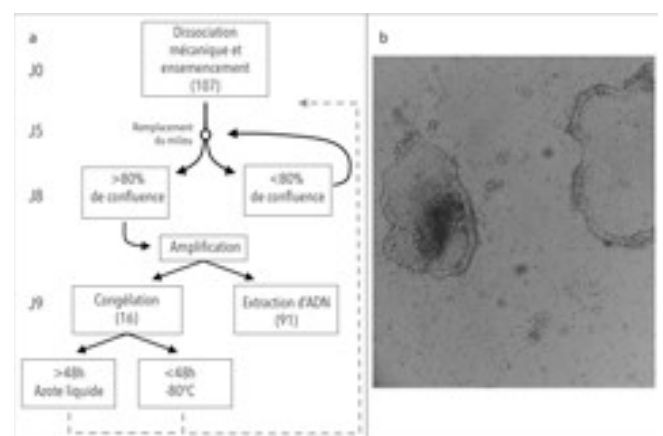


Figure 2 : Culture cellulaire.

2a : Etapes de culture.

2b : Îlots cellulaires en culture observés en inversion de phase.

L'amplification des cultures était réalisée en séparant les cellules des îlots de croissance où les mitoses se produisent

uniquement en périphérie. Une fois détachées les cellules étaient remises en culture comme décrit précédemment. Le but était d'obtenir une densité cellulaire homogène sur toute la surface de la boîte et d'augmenter ainsi la division cellulaire. Le détachement des cellules était réalisé avec une solution de PBS, trypsine-EDTA à 0,5%. Le jour suivant le traitement par trypsine la confluence cellulaire était évaluée par observation au microscope inversé. Le milieu était remplacé par 8 mL de HAM/DMEM+ULTROSER G. Le lendemain, la confluence cellulaire atteignait souvent 70 à 80% preuve d'une activité mitotique intense.

Certains échantillons étaient congelés à cette étape pour étudier la faisabilité d'une culture cellulaire après décongélation (comme décrit dans le protocole ci-après). D'autres échantillons étaient utilisés pour l'extraction d'ADN.

Etape de congélation, décongélation et culture cellulaire

Dans le but de réaliser une cryopréservation, après traitement des boîtes par la trypsine, les cellules dans le milieu de croissance étaient centrifugées et le surnageant avec les cellules mortes en suspension était éliminé. Nous ajoutons un agent cryoprotecteur, le « Recovery Cell Culture Freezing Medium » (InVitrogen F GIBCO, Fischer Bioblock) contenant du DMSO, du DMEM, et du SVF. Après suspension au vortex, le milieu était placé 24h à 4°C. Puis, les échantillons étaient transférés dans des cryotubes de 1,8 mL (NUNC by Dutscher) et placés à -80°C pour au

moins 48h. Puis dans l'azote liquide pour la conservation à long-terme.

La décongélation était réalisée rapidement à 37°C au bain marie juste après avoir retiré le tube de l'azote liquide. Après décongélation, le milieu de culture avec du SVF était ajouté goutte à goutte et centrifugé. Les cellules étaient ensuite remises en suspension, transférées dans des boîtes et placées dans l'incubateur à 37°C. Le milieu de culture était remplacé le lendemain. La suite du protocole était strictement similaire au protocole de culture cellulaire initiale.

Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN des cultures cellulaires était réalisée sur colonnes QIAGEN (QIAamp DNA Mini Kit, Pays-Bas) en centrifugation suivant les recommandations du fournisseur.

Contrôle

Pour chaque extraction nous avons étudié le volume, la concentration en µg/mL (NanoDrop 1000 Spectrophotometer) et la quantité d'ADN obtenue. Le contrôle de la qualité d'ADN était évalué par électrophorèse en gel d'agarose 1% avant et après traitement par RNase.

RESULTATS

Après recueil des consentements éclairés, 48 patients furent inclus consécutivement. 108 échantillons ont été prélevés (23 berges de fente palatine et 85 berges de fentes labiales). Sur les 108 échantillons, 107 ont été utilisés pour la culture cellulaire (1 échantillon n'ayant pas été placé

correctement dans le flacon de recueil en salle d'opération à été exclu). 91 des 107 échantillons ont suivi le protocole de culture directe sans congélation (protocole 1) et les 16 autres échantillons ont suivi le protocole de culture après congélation (protocole 2). La durée moyenne de la culture secondaire après décongélation était de 8j (5 à 17 jours).

Il y eut 5 échecs de culture suivant le premier protocole et 1 échec suivant le 2nd protocole (après culture primaire, congélation, décongélation et tentative de remise en culture). Il n'y a pas de différence significative au regard de la fréquence d'échecs entre les 2 types d'échantillons : palais ou lèvre (Fisher test p 0.5825).

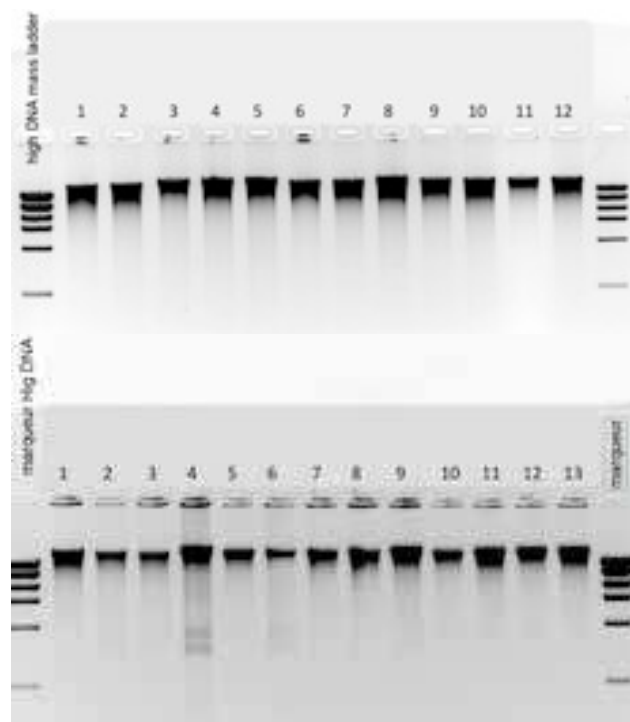
La durée moyenne de culture cellulaire était de 18 jours +/- décongélation (Tableau I). Il n'y a pas de différence significative dans la durée de culture entre les bords externes et internes des fentes labiales (Student t-test p=0,52).

Nature du prélèvement	Nombre de prélèvements	Durée moyenne de culture (j)	Nombre d'extractions d'ADN	Quantité d'ADN (µg)	Concentration d'ADN (µg/µL)	Volume (µL)
Total FL/P	108	18 (7-54)	102	42 (1,9-191)	133 (9,6-273,6)	313 (100-1000)
FP	23	17 (8-39)	23	48 (3,5-96)	154,5 (23,5-273,6)	308,5 (150-500)
FL	85	18 (7-54)	79	41 (1,9-191)	127,7 (9,6-205,4)	314,2 (100-1000)
Dont bord externe de FL	42	19 (7-54)	40	45 (1,9-191)	126,5 (9,6-205,4)	334,21 (100-1000)
Dont bord interne de FL	43	17 (7-45)	39	37 (12-74)	127,8 (52,2-248,2)	292,9 (100-450)

Tableau I : Résultats de la culture cellulaire

Nous avons réalisé 102 extractions d'ADN (Tableau I). La quantité moyenne d'ADN obtenue après extraction était

42,31 mg par échantillon, avec un volume moyen de 312,98 µL et une concentration moyenne de 133,17 µg/µL. La qualité de l'ADN était satisfaisante après traitement par RNase (Figures 4 et 5).



Figures 4 et 5 : Contrôle de la qualité des ADN par migration sur gel d'agarose, avant (4) et après (5), traitement par RNase.

DISCUSSION

Nous nous sommes inspirés des protocoles de culture de fibroblastes de peau pour développer notre protocole. La petite taille de nos pièce d'exérèse chirurgicale s'est révélé ne pas être un facteur limitant. Ainsi ces tissus rares et précieux représentent une source d'ADN de bonne qualité, accessible, et réutilisable en quantité suffisante. Ces cultures peuvent être réutilisées à la demande puisque les cellules peuvent être remises en culture.

Echec de culture

Nous avons recensé 5 échecs de culture

sur culture native (sans congélation initiale). 3 ont eu lieu sur une même semaine dont deux prélèvements issus d'un même malade. Ces échecs peuvent être liés à la manutention des cultures. Toutefois d'autres prélèvements réalisés au même moment et traité de la même manière ont correctement évolué. La taille initiale de l'échantillon est un facteur de réussite de la technique.

Nos cultures ont été réalisées par différents techniciens et techniciennes avec le même taux de réussite ce qui souligne la reproductibilité de cette technique.

Un échec de culture s'est produit après l'étape de congélation/décongélation. Le risque est connu et nécessiterait d'être étudié sur une plus grande série.

Quantité et qualité d'ADN

La qualité et la quantité de l'ADN issues de nos extractions est satisfaisante pour réaliser différentes techniques de cytogénétique comme la CGH-array.

Perspectives

Les fentes labio-palatines résultent d'un défaut de fusion des bourgeons primitifs de la face (frontonasal, maxillaire et mandibulaires). L'anomalie observée à la naissance révèle la localisation et la sévérité des défauts de fusion. Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués individuellement ou en association durant la pathogenèse de la fente, comme la migration cellulaire, la prolifération, la différenciation ou encore l'apoptose.

De nombreux éléments ont été identifiés comme essentiels à la fusion : interaction épithélio-mésenchymateuse et molécules de signalisation (FGFs, BMPs, TGFs, MSX, DLX, PAX, TBX)². L'étude de l'expression des gènes aux sites de fusion semble une voie de recherche intéressante. Grâce à la validation de ce protocole nous sommes désormais capables de poursuivre vers des études comparatives en 2 berges, ou entre fentes labiales et palatines depuis les cultures de fibroblastes issus des berges de fentes. Les cultures pourront permettre de tester différentes molécules ou protéines impliquées dans le développement des fentes sur les cellules cibles comme cela est déjà le cas en cosmétologie.

CONCLUSION

La culture de fibroblastes issue des berges des fentes labio-palatines est une méthode intéressante pour obtenir de l'ADN et des cellules de bonne qualité en grande quantité au regard de la zone malformée. Malgré les risques connus de dérives génétiques des cultures, cette approche reste intéressante car les prélèvements accessibles sont très petits et uniques. Notre étude montre que cette technique est simple, fiable et reproductible. Cela en fait un outil très utile pour des études plus approfondies sur les modèles animaux et fœtaux.

Conflits d'intérêt

L'auteur ne déclare aucun conflit d'intérêt.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé avec le soutien de l'AOL 2011-2012 fentes labio-palatine du CHU REIMS.

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

BIBLIOGRAPHIE

1. BOSI G ET AL. Diphenylhydantoin affects glycosaminoglycans and collagen production by human fibroblasts from cleft palate patients. *J Dent Res*, 1998 ;77(8) :1613-21.
2. MARINUCCI L ET AL. Patterns of some extracellular matrix gene expression are similar in cleft lip-palate patients and in human palatal fibroblasts exposed to diazepam in culture. *Toxicology*, 2009 ;257(1-2) :10-6.
3. LONGO LD. Classic pages in obstetrics and gynecology. The chromosome number in man. Joe Hin Tjio and Albert Levan. *Hereditas*, vol. 42, 1956 . *Am J Obstet Gynecol*. 1978 Mar 15 ;130(6) :722.
4. MOORHEAD PS ET AL. Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res*, 1960 ;20 :613.
5. DE GROUCHY J ET AL. Cytogenetic, biochemical and morphological studies of a continuous cell line (Cy-LMC-1). *Ann Genet*, 1970 ;13 :141-143.
6. FOGH-ANDERSEN ET AL. Inheritance of harelip and cleft palate. *Nyt Nordisk Forlag. Arnold Busk. Copenhagen*, 1942.
7. BARONI 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.
8. BUENO DF 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.