

**UNIVERSITE DE NANTES**

---

**FACULTE DE MEDECINE**

---

Année 2005

N°123

**THESE**

pour le

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE**

Qualification en : Génétique Médicale

par

**Capucine Delnatte**  
née le 05/04/1975 à Croix

---

Présentée et soutenue publiquement le 30 septembre 2005

---

**SYNDROME DE BANNAYAN-RILEY-RUVALCABA ET  
POLYPOSE JUVÉNILE INFANTILE : UN NOUVEAU  
SYNDROME DE GÈNES CONTIGUS ?**

---

Président : Monsieur le Professeur Douillard

Directeur de thèse : Madame le Docteur Stoppa-Lyonnet

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>2</b>
<b>DESCRIPTION CLINIQUE DES PATIENTS .....</b>	<b>4</b>
CAS N°1 .....	4
CAS N°2 .....	7
CAS N°3 .....	7
<b>LES SYNDROMES DE BANNAYAN-RILEY-RUVALCABA ET DE COWDEN .....</b>	<b>10</b>
DESCRIPTION CLINIQUE .....	10
1. <i>Le syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba</i> .....	10
2. <i>Le syndrome de Cowden</i> .....	12
BASES GÉNÉTIQUES DES SYNDROMES DE BANNAYAN-RILEY-RUVALCABA ET DE COWDEN .....	21
1. <i>Le gène PTEN</i> .....	21
2. <i>Mutations identifiées dans les syndromes de Bannayan-Riley-Ruvalcaba et de Cowden</i> .....	28
3. <i>Implication du gène PTEN dans le développement d'hamartomes et de cancers</i> .....	31
<b>LA POLYPOSE JUVENILE .....</b>	<b>34</b>
DESCRIPTION CLINIQUE .....	34
BASES GÉNÉTIQUES DE LA POLYPOSE JUVÉNILE .....	38
1. <i>SMAD4 : gène et protéine</i> .....	38
2. <i>BMPRIA : gène et protéine</i> .....	39
3. <i>Expression clinique de la polypose juvénile et gène impliqué</i> .....	42
4. <i>La voie TGF-<math>\beta</math></i> .....	43
<b>DESCRIPTION DES CAS DE DELETION 10q RAPPORTEES DANS LA LITTERATURE .....</b>	<b>49</b>
<b>MISE EN EVIDENCE ET CARACTERISATION D'UNE DELETION 10q CHEZ LES PATIENTS .....</b>	<b>53</b>
ETUDE INDIRECTE .....	54
1. <i>Principe de la technique</i> .....	54
2. <i>Résultats</i> .....	55
CYTOGÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE .....	55
1. <i>La FISH (fluorescent in situ hybridization)</i> .....	58
2. <i>Les puces à ADN (« CGH array »)</i> .....	60
ETUDE MOLÉCULAIRE : APPROCHE PAR PCR MULTIPLEXE/ CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE (MP/LC) .....	69
1. <i>Principe de la technique</i> .....	69
2. <i>Résultats</i> .....	72
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>78</b>
APPROCHE MÉTHODOLOGIQUE .....	78
1. <i>La MP/LC</i> .....	78
2. <i>Approche combinée cytogénétique moléculaire/ biologie moléculaire</i> .....	79
DISCUSSION MOLÉCULAIRE .....	81
1. <i>Les points de cassure</i> .....	81
2. <i>Gènes impliqués dans les délétions</i> .....	82
3. <i>Explication physiopathologique :</i> .....	85
DISCUSSION NOSOLOGIQUE .....	88
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>91</b>

## Liste des abréviations

ACTA2 : actin alpha 2, smooth muscle, aorta  
ADN : acide désoxyribonucléique  
ANKRD22 : ankirin repeat domain 22  
ATAD1 : ATPase family AAA domain containing 1  
BAC : bacterial artificial chromosome  
BAX : BCL2-associated X protein  
BCL2 : B-cell CLL/lymphome 2  
BMP : bone morphogenetic protein  
BMPR1A : transforming growth factor  $\beta$ , bone morphogenetic protein  
C10orf59 : chromosome 10 open reading frame 59  
C10orf116 : chromosome 10 open reading frame 116  
CDKIs : Cyclin Dependant Kinase Inhibitors  
CFLP1 : cofilin pseudogene 1  
CGH : comparative genomic hybridization  
DS : déviation standard  
FAM22A : family with sequence similarity 22, member A  
FAM35A : family with sequence similarity 35, member A  
FISH : fluorescent in situ hybridization  
GLUD1 : glutamate deshydrogenase  
HPLC : high performance liquid chromatography  
IP-RP-HPLC : ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography  
LDB3 : LIM domain binding 3  
LDD : syndrome de Lhermitte Duclos  
LIPF : lipase, gastric  
LOH : loss of heterozygosity  
MH1, MH2 : mad-homology domains 1, 2  
MINPP1 : multiple inositol polyphosphate histidine phosphatase 1  
MMAC1 : mutated in multiple advanced cancers 1  
MMR2 : multimerin 2  
MP-LC : PCR multiplexe/ chromatographie liquide  
mTOR : mammalian target of rapamycin  
PAC : plasmid artificial chromosome  
PC : périmètre crânien  
PCR : polymerase chaîne reaction  
PI3K/AKT : phosphatidyl inositol 3-kinase/ antiapoptotique sérine thréonine kinase  
PPASS2' 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthetase 2  
PTEN : phosphatase-tensin and located on chromosome ten  
QI : quotient intellectuel  
SMAD : ce terme est dérivé des membres fondateurs de cette famille, la protéine MAD (mothers against decapentaplegic) de la drosophile et la protéine SMA (small body size) de Caenorhabditis elegans.  
SNCG : synuclein gamma  
TEP1 : TGFbeta regulated and epithelial cell enriched phosphatase  
TGF- $\beta$  : transforming growth factor, beta  
TSC : tuberous sclerosis complex  
YAC : yeast artificial chromosome

## INTRODUCTION

Entre 1998 et 2002, trois enfants (PE, MM et LA) ont été pris en charge à l'*Hôpital Necker Enfants Malades* et un avis a été pris auprès de l'équipe de génétique médicale car ces enfants présentaient une polypose pancolique sévère à laquelle s'associaient d'autres signes cliniques. L'orientation diagnostique s'orientait vers un syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba.

Une recherche de mutation ponctuelle du gène *PTEN*, localisé en 10q23 et dont les altérations sont à l'origine de ce syndrome a été entreprise à l'*Institut Curie* en 1998, chez l'une des enfants, PE. Celle-ci s'est révélée négative. Une étude familiale indirecte (voir définition page 49) a été réalisée afin de rechercher une délétion du gène *PTEN*. Ses résultats montraient la non contribution de marqueurs, de l'un des deux parents, situés dans une partie de la région chromosomique contenant *PTEN*, suggérant une délétion *de novo* du gène. Une seconde enfant, MM, présentant un tableau clinique très semblable a été adressée en 2002, alors que l'un des gènes de la polypose juvénile, *BMPRIA*, venait d'être identifié. Une étude familiale indirecte, recherchant une délétion des gènes *PTEN* et *BMPRIA* a directement été réalisée chez cette enfant et reprise chez l'enfant PE, pour le gène *BMPRIA*. Celle-ci a été motivée par la gravité du tableau digestif, inhabituel dans le syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba et par le fait que ce gène, situé sur le chromosome dix, soit très proche de *PTEN*. Chez les deux enfants, cette nouvelle étude était compatible avec une délétion constitutionnelle, *de novo*, du gène *PTEN*. L'étude n'a pas été contributive pour le gène *BMPRIA* car les marqueurs utilisés étaient non informatifs.

L'ensemble des résultats restait toutefois compatible avec l'existence d'une grande délétion dans la région 10q23, chez les deux enfants. Les caryotypes standard étant normaux, un travail de cytogénétique moléculaire par hybridation *in situ* fluorescente (FISH) a été entrepris. Celui-ci a été réalisé par l'équipe de cytogénétique de l'*Hôpital Necker Enfants Malades* afin d'étoffer les données de l'étude indirecte. Les résultats ont confirmé une délétion au niveau de la région 10q23, emportant le gène *PTEN*. Une perte partielle de signal était quant à elle mise en évidence au niveau de la séquence recouvrant le gène *BMPRIA*, en faveur d'une délétion, au moins partielle, de

ce gène chez deux des enfants. Chez le troisième enfant, LA, l'approche par FISH a montré une perte de signal en regard des gènes *PTEN* et *BMPRIA* sous forme d'une mosaïque dans 17% des cellules au niveau sanguin périphérique. Le caryotype était normal. Chez les deux premiers enfants, une étude de la région par puce à ADN (« CGH array ») a ensuite été entreprise afin de déterminer au mieux la localisation et donc l'étendue des délétions.

En parallèle, un travail de biologie moléculaire a été réalisé, afin d'augmenter la résolution de l'analyse, pour situer les bornes des délétions de façon encore plus précise.

Bien que nous allions décrire l'ensemble de la démarche, c'est le travail de biologie moléculaire qui fait l'objet de cette thèse d'exercice. Celui-ci a débuté par l'utilisation d'une technique de PCR multiplexe/ Chromatographie liquide (MP-LC). C'est une technique semi-quantitative utilisant la chromatographie liquide haute performance (HPLC). Elle permet de quantifier le nombre de copies de régions génomiques ; l'ADN des deux parents ayant été utilisé comme témoin. Cette technique a été menée pas à pas dans les régions définies par les techniques de FISH et de puces à ADN.

Pour chaque enfant, nous avons ainsi délimité une région, dont la taille a permis, après la réalisation d'une PCR « long range », le séquençage des bornes de délétion. Celui-ci nous a donné leurs exactes positions.

Nous détaillerons dans cette thèse la démarche cytogénétique et moléculaire qui nous a permis d'arriver à ce résultat. Nous comparerons les tableaux cliniques des enfants par rapport aux données de la littérature sur les syndromes de Bannayan-Riley-Ruvalcaba, de polypose juvénile et les quelques cas rapportées de délétions du bras long du chromosome 10 visibles en cytogénétique. Enfin, nous discuterons du tableau clinique des enfants, de la coopération entre les voies de signalisation auxquelles appartiennent les gènes délétés, *BMPRIA* et *PTEN* et de l'implication de cette interaction pour expliquer la gravité du tableau clinique digestif.

## DESCRIPTION CLINIQUE DES PATIENTS

Trois enfants ont été adressés en consultation de génétique dans le cadre d'un syndrome polymalformatif.

### Cas n°1

La première enfant, PE, était née en 1995, à terme avec un poids de naissance de 3,800 kg (+1,5 DS), une taille de 52 cm (+1,5 DS) et un périmètre crânien (PC) de 37 cm (+2,5 DS). PE était la première enfant d'un couple en bonne santé, non consanguin. A la naissance, la maman était âgée de 30 ans, le papa de 35 ans. Il n'y avait pas d'antécédents familiaux particuliers. La grossesse et l'accouchement se sont déroulés sans événement marquant notable (Tableau 1).

L'enfant a présenté des rectorragies dès le premier mois de vie ainsi qu'un prolapsus d'un polype rectal. Les explorations digestives ont montré une polypose extensive depuis l'estomac jusqu'au rectum. La biopsie a montré la nature hamartomateuse de ces polypes.

L'importance de la symptomatologie a nécessité la réalisation, à l'âge de 10 mois et demi, d'une colectomie avec anastomose iléorectale associée à des polypectomies multiples au niveau de l'estomac, du duodénum et de l'intestin grêle proximal.

A l'examen clinique était associée la présence de deux lipomes au niveau abdominal (hypocondre gauche, fosse iliaque droite) apparus à l'âge de deux ans et la présence de deux angiomes veineux au niveau du dos (Photos 1). Le reste de l'examen clinique retrouvait une dysmorphie faciale (Photos 2).

A 3 ans, l'enfant mesurait 88,5 cm (-1 DS), pesait 10 kg (-2,5 DS) et son PC était de 52 cm (+3,5DS).

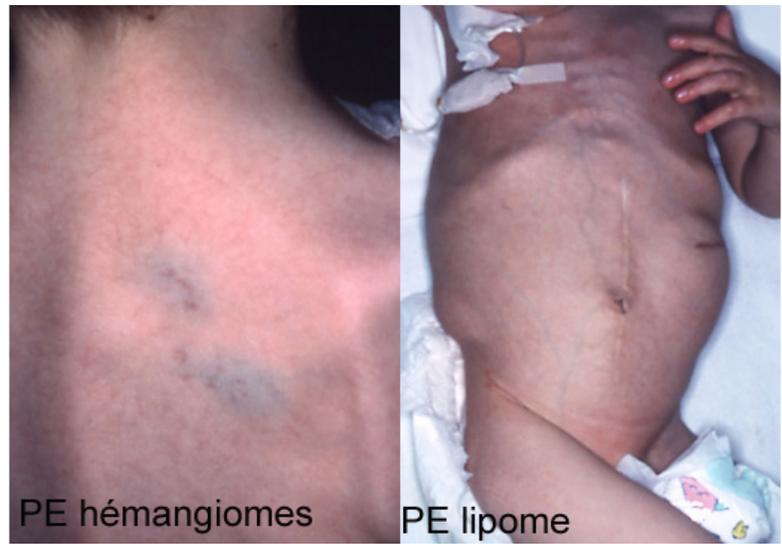
L'enfant est décédée à 3 ans ½ des complications de la polypose digestive.

	Enfant PE	Enfant MM	Enfant LA
<b>Antécédents familiaux</b>	néant	néant	néant
<b>Grossesse</b>	RAS	RAS	RAS
<b>Accouchement</b>	eutocique	eutocique	eutocique
<b>Mensurations</b>			
A la naissance			
Poids (kg)	3,800 (+1,5 DS)	3,750 (+1,5 DS)	4,400 (+3 DS)
Taille (cm)	52 (+1,5 DS)	54 (+2,5 DS)	52,5 (+1 DS)
Périmètre crânien (cm)	37 (+2,5 DS)	36.5 (+2 DS)	38 (+2,5 DS)
A 3 ans			Non décrit
Poids (kg)	10 (-2,5 DS)	13 (M)	
Taille (cm)	88,5 (-1DS)	91 (M)	
Périmètre crânien (cm)	52 (+3,5 DS)	56.5 (+6 DS)	
A 13 ans			35 (-0,5 DS)
Poids (kg)			146,5 (-0,5 DS)
Taille (cm)			56,5 (+2 DS)
Périmètre crânien (cm)			
<b>Signes cliniques</b>			
Macrocéphalie (PC ≥ 97 ème percentile)	oui	oui	oui
Lipomes	2 lipomes au niveau abdominal	Non	Non décrit
Signes cutanés	2 angiomes veineux au niveau du dos Télangiectasies	Non	Lentigines du gland 1 angiome abdominal Télangiectasies
Signes neurologiques	Hypotonie	Absents	Absents
Dysmorphie faciale	Front large Sourcils fournis Fentes palpébrales orientées vers le bas Nez petit	Grand front plat Grands yeux, hypertélorisme, épicanthus inversus Aplasia de l'ensellure nasale Oreilles bas implantées Petite bouche Petit menton	Non
Autres	Pli palmaire transverse unique à droite Pouces longs, bas implantés Phalanges distales des pieds et des mains larges Premiers orteils longs, larges Hippocratisme digital au niveau des pieds	Mains et doigts carrés	Hippocratisme digital au niveau des mains et des pieds
Polypose digestive	oui	oui	oui
Age au diagnostic	1ers mois de vie	1ers mois de vie	1ers mois de vie
Localisation	Estomac → rectum	Estomac → rectum	Estomac → rectum
Nature histologique	Endoscopie à 10 mois : Polypes hamartomateux avec foyers adénomateux	Endoscopie à 1,5 ans : Polypes hamartomateux avec foyers adénomateux et dysplasie de bas grade Endoscopie à 4 ans : Association de polypes hamartomateux à des polypes adénomateux de type villosus ou adénovillosus (intestin grêle) avec foyers de dysplasie de bas grade	Endoscopie à 1,5 ans : Polypes hamartomateux Endoscopie à 5 ans : Présence de polypes hamartomateux et adénomateux Endoscopie à 14,5 ans : Polypes hamartomateux Présence de polypes adénomateux de type villosus ou adénovillosus avec foyers de dysplasie de bas et de haut grade et un foyer d'adénocarcinome invasif. Au niveau oesophagien : muqueuse papillomateuse

Tableau 1 : Description clinique des patients PE, MM, LA

**Photos 1 et 2 : Enfants PE et MM**

**Photos 1**



**Photos 2**



## Cas n°2

MM, née en 2001, est l'unique enfant de parents non consanguins, qui n'ont pas d'antécédents médicaux particuliers. A la naissance, la maman était âgée de 26 ans, le papa de 39 ans. L'enfant est née au terme d'une grossesse normale et d'un accouchement eutocique (Tableau 1).

Ses mensurations à la naissance étaient de 3,750 kg (+1,5 DS) pour le poids, 54 cm (+2,5 DS) pour la taille et 36,5 cm (+2 DS) pour le PC. A noter que le PC du papa est de 59 cm (+1,5 DS) et que celui de la maman est de 53,5 cm (-1 DS).

Elle a présenté un prolapsus d'un polype rectal peu après la naissance et des rectorragies à 2,5 mois de vie. Des explorations digestives ont donc été réalisées. Celles-ci ont mis en évidence une polypose digestive étendue de l'estomac jusqu'au rectum.

La sévérité de la polypose a nécessité, à 17 mois, une colectomie totale avec anastomose iléorectale.

A l'âge de 2,5 ans, l'enfant a subi une oeso-gastro-duodénoscopie associée à une recto-iléoscopie. De nombreux polypes ont été retrouvés au niveau de l'estomac, du duodénum et du jéjunum. Une dizaine d'entre eux ont été retirés. Au niveau iléo-rectal, de très nombreux polypes étaient également mis en évidence. A ce niveau, une quarantaine de polypes ont pu être ôtés.

A 3 ans, la macrocéphalie s'était majorée. Le PC était mesuré à 56,5 cm (+6 DS). Le reste de l'examen clinique retrouvait une dysmorphie faciale (Photos 1).

## Cas n°3

L'enfant LA est un garçon né en 1990, de parents en bonne santé, non consanguins. A la naissance, la maman était âgée de 36 ans, le papa de 41 ans. Il est le quatrième enfant d'une fratrie de quatre. L'enfant est né au terme d'une grossesse normale et d'un accouchement eutocique (Tableau 1).

A la naissance, il pesait 4,400 kg (+3 DS), mesurait 52,5 cm (+1 DS) et son PC était de 38 cm (+2,5 DS). Depuis la naissance, l'enfant présentait une diarrhée.

A 11 mois, une cassure de la courbe staturo-pondérale était notée à laquelle s'associait une diarrhée glairo-sanglante. L'enfant a donc bénéficié d'une endoscopie digestive qui a permis de mettre en évidence une polypose diffuse gastro-intestinale étendue de l'estomac jusqu'au rectum. Sa sévérité a nécessité la réalisation d'une colectomie avec anastomose iléo-rectale à l'âge de 8 ans.

A l'âge de 13 ans, l'examen clinique retrouvait un PC à 56,5 cm (+2 DS) pour une taille de 146,5 cm (-0,5 DS) et un poids de 35kg (-0,5 DS).

A noter que le PC de la maman est à 51,5 cm (-3 DS). Le PC du papa n'est pas connu. Le reste de l'examen clinique retrouvait la présence de deux lentigines du gland et d'un angiome au niveau abdominal.

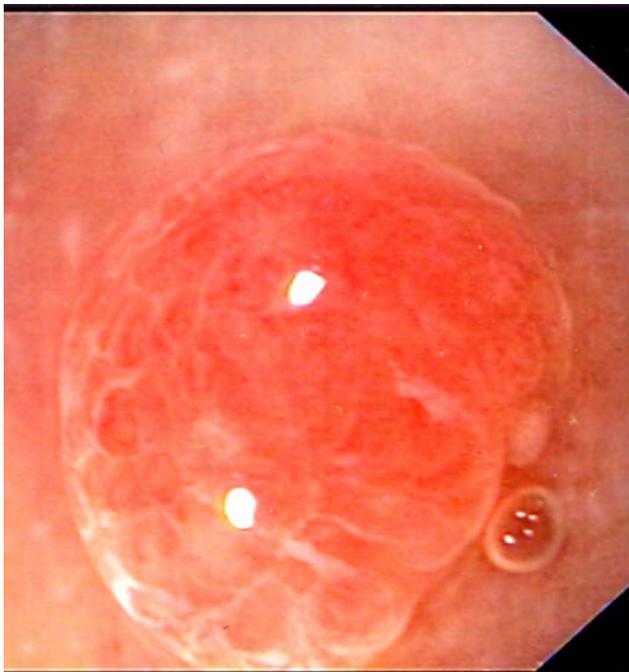
Ces trois enfants présentent comme principal signe clinique une polypose gastrointestinale sévère. Les formes les plus fréquentes de polypes colorectaux que développent les enfants diffèrent de ceux couramment rencontrés chez les adultes et sont dénommés polypes juvéniles. Alors que les polypes rencontrés chez les adultes sont fréquemment de type adénomateux ou hyperplasiques, les polypes de l'enfant sont de nature hamartomateuse (photos 3).

Les hamartomes sont définis par la prolifération excessive mais focale de cellules ou de tissu appartenant à l'organe dans lequel elle se développe. Ces structures sont matures et identiques à celles présentes dans le reste de l'organe mais elles n'ont pas l'architecture normale de celui-ci. Les polypes juvéniles sont des malformations hamartomateuses focales des composants de la muqueuse.

Ils sont composés d'une *lamina propria* augmentée d'épaisseur contenant des glandes hyperplasiques, souvent kystiques et dilatées, un stroma proéminent dans lequel siège des cellules inflammatoires. L'épithélium peut-être normal, mucosécrétant, régénératif, érodé.

La polypose juvénile, le syndrome de Cowden et de Bannayan-Riley-Ruvalcaba partagent des polypes juvéniles du tractus digestif dans leur phénotype.

**Photos 3** : Photos de gastroduodéoscopie de l'enfant LA



**Photo 3a** : Photo de gastroduodéoscopie (grossissement 1\*80) de l'enfant LA : polype gastrique de type juvénile.



**Photo 3b** : Photo de gastroduodéoscopie en rétrovision de l'enfant LA : polypes sessiles gastriques de type juvénile.

# LES SYNDROMES DE BANNAYAN-RILEY-RUVALCABA ET DE COWDEN

## Description clinique

Historiquement, ces deux syndromes, que l'on va décrire, ont été rapportés indépendamment chacun l'un de l'autre. Puis, devant l'existence de familles et de patients dans lesquelles coexistaient des signes cliniques des deux syndromes, ceux-ci ont été considérés comme alléliques ; certains auteurs allant jusqu'à dire que le syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba représente la forme pédiatrique du syndrome de Cowden.

Un même gène, *PTEN* est en cause dans ces deux pathologies.

### 1. Le syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba

Le tableau clinique des trois enfants étudiés, à savoir macrocéphalie, lentigines du gland chez l'enfant LA, et lipomes évoque un syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba. Ce syndrome a été décrit par Riley et Smith (1), Bannayan (2), Zonana et associés (3, 4), et Ruvalcaba et associés (5). Ce syndrome a été reconnu sous différents noms incluant le syndrome de Bannayan-Zonana, le syndrome de Ruvalcaba-Myhre, le syndrome de Riley-Smith. Plus récemment, au vu des signes communs présentés par ces différents syndromes, ceux-ci ont été regroupés sous le nom de syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba (6).

Le syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba est un syndrome polymalformatif rare, dont l'incidence n'est pas connue. Le plus souvent, il s'agit de formes isolées, probablement sous-diagnostiquées, de part la non spécificité des signes cliniques. Néanmoins, les cas familiaux existent, répondant à un mode de transmission autosomique dominant (7, 8). Dans une série rapportée par Marsh et associés (7), sur 43 cas, 18 sont sporadiques, 16 sont familiaux et les 9 cas restants sont des familles dans lesquelles il existe des patients atteints du syndrome de Bannayan-Riley-

Ruvalcaba et d'autres du syndrome de Cowden. De même, des signes cliniques appartenant au spectre des deux syndromes peuvent coexister chez un même patient (9, 10).

Il n'existe pas de critères diagnostiques du syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba. Nous décrivons ici les signes qui sont associés à ce syndrome (9, 11-13).

La macrocéphalie est le signe prédominant de cette entité clinique. Cette macrocéphalie, présente généralement dès la naissance, correspond à une mégalencéphalie sans dilatation ventriculaire (13). Elle ne semble pas responsable de troubles psychomoteurs.

Les autres signes caractéristiques sont les lentigines du pénis chez le garçon, les lipomes sous-cutanés et viscéraux, des tumeurs hamartomateuses incluant les polypes digestifs et des lésions vasculaires (hémangiomes).

Les lentigines du pénis sont peut-être le signe le plus distinctif et le trait qui a le plus de valeur. Ces tâches apparaissent le plus souvent chez le grand enfant et leur absence chez le nouveau né et le petit enfant ne doit pas faire remettre en cause le diagnostic (12).

Au moins la moitié des patients porteurs du syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba présentent des anomalies du système nerveux central. On peut retrouver une hypotonie (20%) (13), des crises convulsives, un retard mental modéré à sévère que l'on rencontre dans 15 à 20 % des cas (13, 14). En particulier, chez l'enfant, ce sont les retards moteurs ou de langage que l'on retrouve le plus fréquemment (dans 50% des cas). Le retard mental s'améliore, voire disparaît avec l'âge dans de nombreux cas. Les adultes sont souvent décrits avec des troubles moteurs modérés (dysarthrie, dysmétrie, défaut de fixation visuelle, faiblesse des muscles faciaux, ataxie) et un quotient intellectuel normal (11, 13).

En étudiant une série de dix patients issus de trois familles, Parisi et associés en 1991 (12), ont noté qu'un certain nombre de signes cliniques moins spécifiques peuvent également aider au diagnostic lorsqu'un enfant présente une macrocéphalie et un retard d'apprentissage mais sans lésions hamartomateuses ou sans lentigines du pénis associées. Il s'agit d'un palais ogival, une macrosomie, une hyperlaxité

ligamentaire, une orientation des fentes palpébrales vers le bas. En ce qui concerne la macrosomie, celle-ci est de début pré ou post natale. La moitié des enfants atteints du syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba ont eu un poids et une taille de naissance élevés qui se sont normalisés et sont devenus normaux à l'âge adulte.

Enfin, d'autres signes ont été décrits dans la littérature comme la présence de bosses frontales, la survenue d'épisodes d'hypoglycémie, la présence de taches café au lait (12), des anomalies oculaires (anomalies de la chambre antérieure de l'œil, nerf cornéen épaissi), des myopathies lipidiques (15, 16) et différentes anomalies squelettiques tels qu'un pectus excavatum et une scoliose. Des thyroïdites de Hashimoto ont enfin été rapportées (11).

Les polypes digestifs seraient présents dans 45% des cas. Cependant, ce chiffre est à prendre avec précaution car il n'y a pas d'étude dans laquelle un examen systématique du tractus gastrointestinal a été réalisé. En lisant les données de la littérature, les polypes digestifs semblent peu symptomatiques, ne dominant pas le tableau clinique. Leur distribution serait généralement confinée à l'iléon distal et au côlon (11). Histologiquement, ils sont indistinguables de ceux de la polypose juvénile (17). Les premiers polypes décrits étaient des hamartomes (18). Haggitt et Reid (19), en réexaminant les polypes collectés par Ruvalcaba et associés, confirment leur nature hamartomateuse, excepté pour un qui était un ganglioneurome. Des rapports plus récents retrouvent des foyers adénomateux en leur sein (20). En ce qui concerne le risque tumoral, celui-ci n'est pas clairement établi. Ceci est probablement le fait de la rareté de ce syndrome.

## **2. Le syndrome de Cowden**

Le syndrome de Cowden tire sa dénomination du nom de la première patiente décrite. Rachel Cowden était une jeune femme de 20 ans dont le phénotype particulier, associant des lésions cutanéomuqueuses, thyroïdiennes et mammaires, a été rapporté comme une entité indépendante par Lloyd et Dennis en 1963 (21). Quelques années plus tard, l'individualisation de l'affection ne faisait plus de doute ; elle était rapprochée du groupe des phacomatoses par Weary et associés (22) qui la

considèrent comme un ensemble de lésions hamartomateuses d'origine aussi bien ectodermique, endodermique, que mésodermique, et proposèrent l'appellation « syndrome des hamartomes multiples ».

Parce que le syndrome de Cowden est sous diagnostiqué, il est difficile d'évaluer de façon précise la proportion des cas isolés (apparemment sporadiques) et familiaux. Il est possible que 40 à 65% des cas soient familiaux (7, 8, 23) avec un mode de transmission autosomique dominant. Il est difficile d'évaluer cette proportion car l'expressivité intrafamiliale de la pathologie est variable, la symptomatologie peut être frustrée et les signes cliniques non spécifiques.

L'évaluation de l'incidence est également difficile. Avant l'identification du gène impliqué, l'incidence du syndrome de Cowden était estimée à 1/1 000 000 (24). Cependant, après l'identification du gène *PTEN*, une étude de population Hollandaise, retrouve une incidence  $> 1/200\ 000$  (25, 26) bien que ce taux soit encore certainement sous-estimé (Pour revue, (8)).

A l'âge de 20 ans, 90% des individus atteints du syndrome de Cowden manifestent un phénotype (8, 27). A 29 ans, 99% des individus affectés auront développé au moins des signes cutané-muqueux du syndrome. Cependant, en dessous de l'âge de 15 ans, la pénétrance est de 10% (8, 24).

Parce qu'il y avait un manque de critères diagnostiques du syndrome de Cowden avant 1995, le « Consortium International » pour le syndrome de Cowden, a établi un consensus (Tableau 2). Initialement, il avait pour but de localiser un gène de susceptibilité. Ces critères diagnostiques ont été révisés en 2000 (28, 29). Plus récemment, ceux-ci ont inclus la maladie de Lhermitte Duclos (hamartome cérébelleux), dont nous verrons plus loin la description.

**Critères pathognomoniques**

- Trichilemmomes multiples faciaux
- Lésions mucocutanées associant :
  - Kératose acrale
  - Papules faciales
  - Papillomatose orale

**Critères majeurs**

- Cancer du sein
- Cancer de la thyroïde (non médullaire)
- Macrocéphalie
- Maladie de Lhermitte-Duclos (LDD)
- Carcinome endométrial

**Critères mineurs**

- Lésions thyroïdiennes, adénome ou goître multinodulaire
- Retard mental ( $QI \leq 75$ )
- Polypes hamartomateux gastrointestinaux
- Maladie fibrokystique du sein
- Lipomes
- Fibromes cutanés
- Tumeurs ou malformations génito urinaires

**Diagnostic chez un individu, en l'absence de tout contexte familial :**

- Lésions mucocutanées seules si
  - Au moins 6 papules faciales dont au moins 3 sont des trichilemmomes
  - Ou papules cutanées faciales et papillomatose muqueuse orale
  - Ou papillomatose muqueuse orale et kératose acrale
  - Ou au moins 6 lésions de kératose acrale palmoplantaire
- 2 critères majeurs, dont un doit être une macrocéphalie ou un LDD
- 1 critère majeur et 3 critères mineurs
- 4 critères mineurs

**Dans un contexte familial de syndrome de Cowden, est considérée comme atteinte toute personne présentant :**

- Au moins 1 critère pathognomonique
- Au moins 1 critère majeur avec ou sans critère mineur
- 2 critères mineurs

Tableau 2 : Critères diagnostiques du syndrome de Cowden selon le « Consortium International » (d'après Longy, (30))

Les manifestations du syndrome de Cowden sont diverses et touchent plusieurs organes (27, 29-32) (Tableau 3).

L'atteinte cutanéomuqueuse est souvent au premier plan mais peut être très discrète, voire absente. Elle associe :

- Des lésions papuleuses du visage souvent regroupées au pourtour des lèvres ou le long des ailes du nez. L'étude histologique ne met souvent en évidence que des lésions tissulaires hyperplasiques non spécifiques mais l'existence de trichilemmomes (hamartomes développés au dépend du follicule pilo-sébacé) multiples du visage est considérée comme pathognomonique de l'affection (Photo 4).

- Des lésions kératosiques des extrémités représentées par des papules péri-unguéales et des puits cornés palmoplantaires (Photo 5).

- Des lésions hyperplasiques de la muqueuse buccale réalisant par leur confluence un aspect « pavé » des gencives et constituant parfois une authentique papillomatose de la langue et du palais (Photos 6).

Des lésions des tissus mous sont retrouvées, en particulier lipomes multiples, angiomes, hémangiomes ou angioliipomes (30).

La macrocéphalie est assez fréquente. Selon Eng et associés, elle est rencontrée dans 40% des cas environ (8). Mais, pour certaines équipes, elle est beaucoup plus fréquente (jusqu'à 75% des cas) et constitue un excellent signe clinique (30).

Les atteintes neurologiques sont représentées par des retards mentaux, épilepsies, méningiomes. L'un des signes neurologiques le plus évocateur est le syndrome de Lhermitte-Duclos (33). C'est un gangliocytome dysplasique du cervelet dans lequel il existe une hypertrophie des cellules ganglionnaires. Il se manifeste cliniquement, essentiellement, par des signes d'hypertension intracrânienne en particulier des céphalées et éventuellement par des signes de syndrome cérébelleux (34).

L'atteinte mammaire est présente chez près de 80% des patientes. Une hypertrophie mammaire est parfois observée chez la jeune fille. Le plus souvent, se

constitue au cours des deuxième et troisième décennies, une mastose fibro-kystique avec des lésions hyperplasiques de type adénomateux et/ou des lésions plus individualisées telles que papillomes intragalactophoriques, adénofibromes, adénofibrome juvéniles géants.

L'atteinte thyroïdienne est présente chez 75% des patients souvent sous la forme d'un goître et/ou d'adénomes. Il s'agit de goîtres multihétéronodulaires constitués de nodules dystrophiques et adénomateux.

Concernant le tractus digestif, il peut exister des polypes. Ces polypes sont en général asymptomatiques. Les taux d'incidence vont de 35% dans les séries lorsqu'ils sont incomplètement évalués à 85% quand des études à l'aide de produit de contraste ou d'endoscopies sont réalisées. Ils sont généralement répartis sur l'ensemble du tractus digestif (de l'estomac jusqu'au rectum) (35). La majorité des polypes sont de nature hamartomateuse, indistinguables de ceux de la polypose juvénile (17). Les quelques polypes non hamartomateux sont des hyperplasies, des adénomes ou sont de nature inflammatoire. Il y a peu de données dans la littérature sur les proportions des formes histologiques retrouvées au niveau de ces polypes. Au niveau de l'oesophage, on peut retrouver une acanthose glycogénique (36), définie comme une dégénérescence bénigne de la muqueuse oesophagienne. Elle est caractérisée par une accumulation de glycogène dans le cytoplasme des cellules squameuses de l'épithélium oesophagien. Elle est cliniquement asymptomatique. L'étiopathogénie de ces lésions n'est pas connue.

L'atteinte génitale est représentée par la présence de léiomyomes utérins. Des troubles du cycle menstruel et des kystes ovariens ont également été décrits chez environ 20 % des patientes atteintes du syndrome de Cowden (27).

- Lésions cutané muqueuses (90-100%)

Trichilemmomes

Kératose acrale

Papules papillomateuses ou vérucoïdes

- Anomalies thyroïdiennes (50-67%)

Goître

Adénome

Cancer (3-10%)

- Lésions mammaires

Fibroadénomes/ maladie fibrokystique (76% des femmes affectées)

Adénocarcinome (25 à 50% des femmes affectées)

- Lésions gastro intestinales (40%)

Polypes hamartomateux

- Macrocéphalie (38%)

- Anomalies génito urinaires (44% des femmes)

Léiomyome utérin (multiple, début précoce)

Tableau 3 : manifestations cliniques fréquentes du syndrome de Cowden (d'après Eng (8))



**Photo 4 :** Lésions papuleuses du visage.  
D'après <http://dermatology.cdlib.org/>

**Photo 5 :** Lésions kératosiques des extrémités.  
D'après <http://dermatology.cdlib.org/>



**Photos 6 :** Lésions hyperplasiques de la muqueuse buccale constituant parfois une authentique papillomatose de la langue (photo 6a) et du palais (photos 6b).

D'après [http://www.infocompu.com/adolfo\\_arthur/ingles/s\\_cowden1.htm](http://www.infocompu.com/adolfo_arthur/ingles/s_cowden1.htm) (photo 6a) et [http://www.uveitis.org/medical/articles/case/Cowden\\_sy.html](http://www.uveitis.org/medical/articles/case/Cowden_sy.html) (photo 6b).



**Photo 6a**



**Photo 6b**

Toute la gravité de la maladie tient à la survenue de diverses tumeurs malignes. Les deux composantes malignes les mieux documentées du syndrome de Cowden sont les cancers du sein et les cancers de la glande thyroïde (27).

Chez les femmes atteintes d'un syndrome de Cowden, le risque de cancer du sein au cours de la vie est estimé être entre 25 et 50 % (8) avec un âge de diagnostic en moyenne de 10 ans plus jeune que les femmes de la population générale, donc entre 38 et 48 ans avec des extrêmes allant de 14 à 65 ans (37). La bilatéralité est fréquente. Le type histologique n'est pas spécifique. Un des facteurs prédictifs de cancer du sein est la présence d'une mastose fibro-kystique avec hyperplasie mammaire.

Le cancer du sein masculin peut être un composant mineur de ce syndrome (23, 38). Le risque de cancer du sein chez les hommes atteints n'est pas déterminé.

Le risque au cours de la vie de développer un cancer de la thyroïde est estimé à 10%. L'âge moyen au diagnostic n'est pas précisé. Il existe une prédominance de cancers folliculaires bien que quelques cancers papillaires aient été décrits (37).

D'autres cancers sont associés au syndrome de Cowden comme le cancer de l'endomètre, dont le risque, bien qu'il ne soit pas clairement établi, est de l'ordre de 5 à 10 % (39).

En ce qui concerne le risque de cancer au niveau du tractus digestif, quelques études ont décrit des patients atteints de cancer colorectal mais ce risque n'est pas clairement estimé. (27, 40-42)

Enfin, d'autres cancers semblent associés au syndrome de Cowden comme le carcinome du col utérin et le cancer de l'ovaire. Eng et associés (29) suggèrent une association entre le syndrome de Cowden et le carcinome rénal et éventuellement le mélanome.

Les syndromes de Cowden et de Bannayan-Riley-Ruvalcaba présentent des similitudes au niveau clinique (macrocéphalie, lipomes, polypes intestinaux, hémangiomes). Cependant, même si l'on manque de données sur les signes

cliniques des enfants atteints du syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba devenus adultes, il existe des différences phénotypiques entre les deux syndromes. Et celles-ci ne sont pas toutes liées aux seules différences d'âge d'apparition des signes cliniques comme pour la macrocéphalie, plus précoce dans le syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba. En effet, si l'on reprend le risque de cancer, celui-ci est bien établi pour les cancers du sein et de la thyroïde dans le syndrome de Cowden. Ce qui n'est pas du tout le cas dans le syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba. La présence de cancers n'est pas une marque du syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba. La fréquence des signes cliniques est également très différente. Dans le syndrome de Cowden, les lipomes, hémangiomes, les thyroïdites de Hashimoto et les retards de développement sont moins fréquents. Les tâches pigmentées sur le pénis ne seraient jamais mises en évidence dans le syndrome de Cowden (43). Pourtant, au sein d'une même famille, on peut retrouver la coexistence des deux syndromes (7, 9, 44-47). Egalement, chez un même individu, des signes cliniques de chacun de ces syndromes peuvent coexister. Ceci nous amène à penser que d'autres facteurs comme des facteurs environnementaux, épigénétiques ou génétiques (gènes modificateurs) contribuent à déterminer si un patient, porteur d'une mutation dans le gène *PTEN* développera plutôt un syndrome de Cowden, de Bannayan-Riley-Ruvalcaba ou développera des signes cliniques de chacun des deux syndromes.

## **Bases génétiques des syndromes de Bannayan-Riley-Ruvalcaba et de Cowden**

### **1. Le gène *PTEN***

Les bases génétiques du syndrome de Cowden ont été décrites en 1996 (pour revue, (18)). L'implication du gène *PTEN* a été mise en évidence par une étude de liaison génétique de 12 familles choisies en fonction des critères stricts du « Consortium International ». Une région d'intérêt en 10q22-23 (24) a été mise en évidence.

En parallèle, trois autres équipes ont identifié ce gène. Deux en recherchant des gènes cibles localisés dans des régions fréquemment inactivées dans les tumeurs. Steck et associés ont identifié un gène situé en 10q23 qu'ils ont appelé

*MMAC1* (mutated in multiple advanced cancers 1) (48). Li et associés ont mis en évidence un gène qu'ils ont dénommé *PTEN* (Phosphatase-Tensin and Located on chromosome Ten) (49). Enfin, Li et associés ont identifié le gène en recherchant des protéines phosphatases. Ils l'ont appelé *TEPI* (TGFbeta regulated and epithelial cell enriched phosphatase) (50). Les trois dénominations correspondaient au même gène. Le nom de *PTEN* a été retenu.

Des mutations germinales à l'état hétérozygote de *PTEN* ont ensuite été recherchées et identifiées chez des patients atteints du syndrome de Cowden (51). Ceci a été réalisé compte tenu de la localisation de *PTEN* dans la région d'intérêt obtenue par l'étude de liaison génétique.

Les mutations sont identifiées dans 85 à 90% des cas. Elles sont inactivatrices, à l'origine d'une protéine tronquée, d'un défaut quantitatif de protéine ou d'une protéine à l'activité phosphatase diminuée ou abolie. Les mutations sont de nature variée : mutation stop, faux-sens, insertions, délétions, délétions/insertions de quelques nucléotides, mutations dans des sites d'épissage ou au niveau du promoteur (8, 10, 37, 52).

Des mutations du gène *PTEN* ont ensuite été recherchées et identifiées chez des patients atteints du syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba (43). Cette recherche a été effectuée en posant l'hypothèse que les syndromes de Cowden et de Bannayan-Riley-Ruvalcaba étaient alléliques.

Les mutations germinales de *PTEN* sont retrouvées actuellement dans 65% des cas de syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba. Ce sont des mutations de même nature. Les mutations au niveau du promoteur n'ont pas été décrites. Des cas de grandes délétions emportant tout ou partie du gène ont été identifiées (8, 10, 37, 52).

Des mêmes mutations sont retrouvées dans les syndromes de Cowden et de Bannayan-Riley-Ruvalcaba. Ceci vient confirmer que ces deux syndromes sont alléliques mais que d'autres facteurs interviennent dans le déterminisme de ces pathologies.

Il existe un certain nombre de cas de Cowden ou de Bannayan-Riley-Ruvalcaba pour lesquels aucune mutation du gène *PTEN* n'est identifiée. Il n'est pas déterminé si cela est le fait de l'existence de mutations dans *PTEN* non détectées ou si d'autres gènes sont impliqués.

Un gène, *MINPP1*, situé en 10q23, en amont de *PTEN*, codant pour une phosphatase a été exploré et aucune mutation n'a été identifiée (53). De même, *BMPRIA*, un autre gène de la région a été étudié. Des mutations, dont une de type faux-sens et l'autre dont la nature n'a pas été précisée, ont été identifiées chez deux patients atteints du syndrome de Cowden, mais, comme nous le verrons plus loin, ceci est soumis à controverse.

En ce qui concerne le syndrome de Cowden, la première étude de liaison génétique montrait qu'il n'existe pas d'hétérogénéité génétique (24). Cependant, une étude postérieure portant sur 4 familles (54) suggère la possible existence d'une hétérogénéité génétique pour deux d'entre elles. En ce qui concerne le syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba, la taille des famille est trop petite pour exclure une liaison au locus 10q23 et donc fournir des arguments en faveur de l'existence d'une hétérogénéité génétique (7).

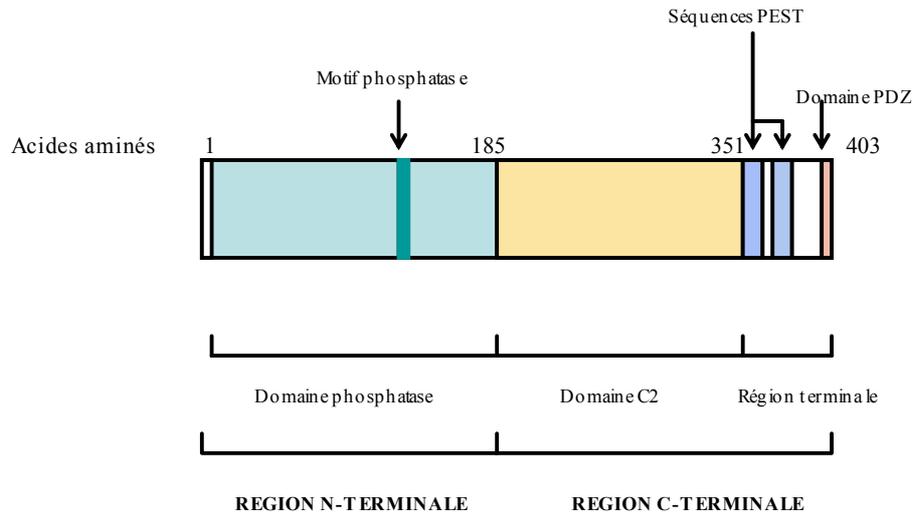
### **a. *PTEN* : gène et protéine**

Le gène *PTEN* se situe en 10q23.3 et possède 9 exons codant pour une protéine de 403 acides aminés (55, 56).

La protéine *PTEN* a deux régions majeures (Figure 3):

- Une région N terminale (acides aminés 1 à 185), correspondant au domaine phosphatase. Le motif phosphatase, proprement dit, est codé par l'exon 5 qui représente 20% de la séquence codante. Ce domaine permet à *PTEN* d'exercer son rôle de protéine phosphatase à double spécificité, déphosphorylant des résidus sérine/ thréonine et tyrosine. Elle déphosphoryle également des substrats lipidiques.
- Une région C terminale (acides aminés 186 à 403) contenant le domaine C2, domaine d'interaction avec les phospholipides des substrats membranaires. La région C terminale contient également des domaines PEST, impliqués dans la stabilité de la protéine et des domaines PDZ, qui sont des domaines d'interactions protéines-protéines. Le domaine PEST a été dénommé ainsi car il est riche en P (proline), E (acide

glutamique), S (sérine) et T (thréonine) et le domaine PDZ d'après les noms des premières protéines dans lesquelles il a été identifié (PSD-9S, Dlg et ZO-1). Il existe aussi des sites de phosphorylation qui sont critiques pour la stabilité de la protéine.

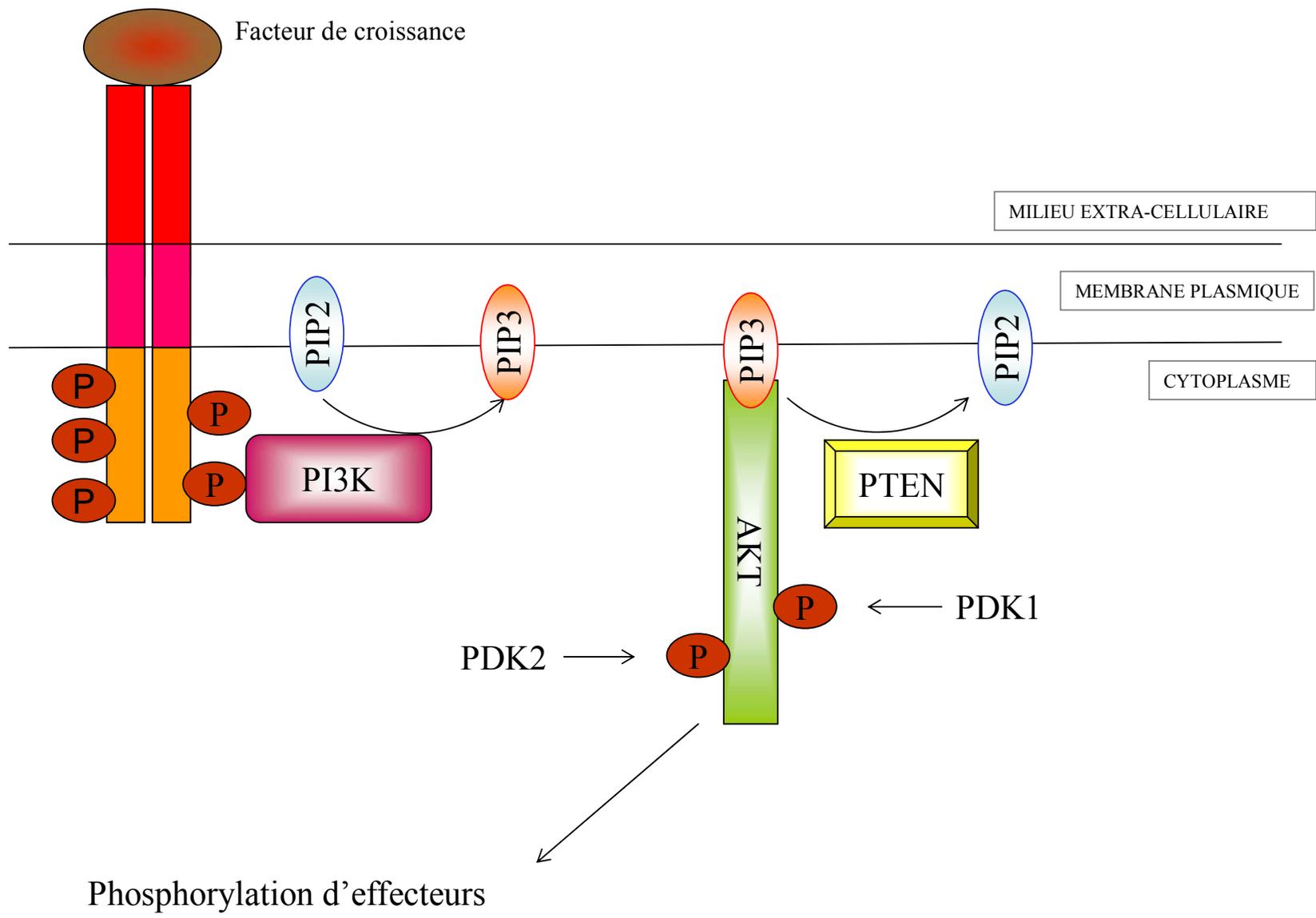


**Figure 5 :** Protéine PTEN  
D'après Simpson et Parson (55)

### **b. La voie PI3K/AKT**

*PTEN* est indispensable au cours du développement embryonnaire. En effet, les souris *PTEN*  $-/-$  ne survivent pas au delà du 9<sup>ème</sup> jour de vie embryonnaire. L'étude des embryons montre que ceux-ci sont complètement désorganisés (57, 58).

*PTEN* a deux rôles essentiels identifiés à ce jour : l'arrêt du cycle cellulaire en G1 et l'induction de l'apoptose. Elle exerce ces rôles essentiellement en régulant négativement la voie de signalisation PI3K/AKT (phosphatidyl inositol 3-kinase/ antiapoptotique sérine thréonine kinase) (8, 37, 59, 60) (Figure 4).



**Figure 4 :** Voie de signalisation PI3K/AKT

Les phosphoinositides jouent un rôle important dans les voies de transduction de signaux. Ils exercent ce rôle en activant directement des enzymes ou en dirigeant des protéines vers des compartiments cellulaires déterminés.

Le phosphatidyl inositol 3 phosphate (PIP3) est nécessaire pour l'activation de AKT/PKB, une protéine kinase à sérine/thréonine (61). Le PIP3 est issu de la phosphorylation du phosphatidyl inositol 2 phosphate (PIP2) par PI3K, activée par des facteurs de croissance. On a ainsi une accumulation de PIP3 au niveau des membranes cellulaires (62) (Figure 4). Celle-ci entraîne la mobilisation de AKT depuis le compartiment cytoplasmique jusqu'aux membranes cellulaires. AKT subit alors une modification conformationnelle qui permet sa phosphorylation par PDK1 (3-phosphoinositide-dépendant protein kinase-1), puis par PDK2.

AKT est donc activée ainsi que la voie en aval, via ses effecteurs. *PTEN* antagonise la voie PI3K/AKT en déphosphorylant le PIP3.

De nombreux effecteurs sont régulés par cette voie de signalisation tels les facteurs de transcription de la famille Forkhead, BAX-BCL2, des CDKIs (cyclin dépendant kinase inhibitors) tels que p21<sup>WAF1</sup> et p27<sup>KIP1</sup>, les kinases mTOR. Ces facteurs sont impliqués dans la prolifération, la croissance et la survie cellulaire.

D'autres protéines impliquées dans ces mêmes fonctions sont régulées par *PTEN*, via son activité protéine phosphatase, indépendante de la voie PI3K/AKT. Ce sont par exemple la cycline D1, des protéines de la voie des MAPKinas.

Enfin, *PTEN* a d'autres rôles. Il intervient dans les interactions cellulaires avec la matrice extra-cellulaire (63) en régulant négativement la protéine FAK (focal adhesion kinase) par son activité protéine phosphatase. Il inhibe également la migration cellulaire par l'intermédiaire, ou non, de la voie PI3K/AKT (64). Cette fonction se réalise par l'activité protéine phosphatase de *PTEN* et son domaine C2. Ces fonctions jouent probablement un rôle clé dans le phénotype tumoral lorsque la protéine *PTEN* manque.

Peu de chose sont connues sur la régulation fonctionnelle de *PTEN* (65). La régulation semble s'effectuer par l'intermédiaire de modifications post-traductionnelles (phosphorylation) régulant la stabilité et l'activité de la protéine ainsi que sa localisation cellulaire. Des interactions avec des protéines interviendraient également. Ces mécanismes impliquent la partie du domaine C terminal située en aval de la région C2.

La régulation de l'expression du gène *PTEN* semble également avoir un rôle important pour réguler la fonction et l'activité de la protéine PTEN mais les mécanismes impliqués ne sont pas clairs. Le gène *PTEN* a été initialement appelé *TEP1*, car l'équipe de Li avait remarqué qu'un traitement par le TGF- $\beta$ 1, un des ligands de la voie TGF- $\beta$ , sur des kératinocytes humains entraînait une diminution de l'expression de *PTEN*. Ce résultat a ensuite été confirmé par d'autres équipes *in vitro* et *in vivo* (66, 67).

Des travaux récents ont étudié le taux de protéine PTEN, dans des cellules issues de lignées de cancer du sein (cellules MCF-7) exposées à *BMP2*, un des ligands de *BMPRIA*, l'une des protéines de la voie TGF- $\beta$  (voir plus loin). Cette exposition provoque l'augmentation du taux de protéine PTEN, celle-ci étant secondaire à une diminution de la dégradation de la protéine PTEN médiée par le protéasome. D'autres travaux ont confirmé cette interaction entre la voie BMP et PTEN (68, 69).

### **c. Le pseudogène de PTEN**

Un pseudogène de *PTEN* a été identifié en 1997 (70). Il est considéré comme ayant été généré par rétrotransposition (Dahia, Oncogene, 1998), seule la partie codante ayant été rétrotransposée. Ce pseudogène est situé en 9p21 et son ADN complémentaire présente 98,6% d'homologies avec celui de *PTEN*. 19 nucléotides varient par rapport à la séquence de l'ADN complémentaire de *PTEN* étudié, soit 1287 paires de base ; la majorité étant située dans la région codante du gène. La différence la plus remarquable se situe au niveau du codon d'initiation de la transcription de *PTEN* où la séquence ATG devient AGG dans le pseudogène. Un putatif cadre ouvert de lecture prédisant une protéine de 369 acides aminés a été identifié (71).

Il semble que le pseudogène soit transcrit au moins dans certains types cellulaires. Par contre, il n'y a pour l'instant pas eu de mise en évidence de protéine traduite même si des sites potentiels de traduction ont été mis en évidence par les analyses de séquence (72).

En ce qui concerne le gène *PTEN*, celui-ci est impliqué dans l'oncogénèse ; comme nous le verrons un peu plus tard. La question du rôle pathologique éventuel

du pseudogène reste ouverte. En effet, la région contenant ce gène est délétée dans un certain nombre de cancers. De plus, une équipe travaillant sur les tumeurs astrocytaires du système nerveux central à l'aide de modèle levure a mis en évidence deux faits. Le premier est l'existence d'une corrélation entre la fréquence d'expression du pseudogène et un grade tumoral de plus en plus élevé. Le second est une corrélation entre l'augmentation de l'expression du pseudogène et l'absence de mutation délétère de *PTEN* dans les glioblastomes (73).

Depuis, il n'y a pas d'éléments nouveaux dans la littérature permettant de trancher.

De manière certaine, la présence de ce pseudogène peut conduire à de mauvaises interprétations dans la recherche de mutations fondées sur l'étude de l'ADNc.

## **2. Mutations identifiées dans les syndromes de Bannayan-Riley-Ruvalcaba et de Cowden**

Une centaine de mutations germinales différentes ont été rapportées dans des tableaux cliniques de syndrome de Cowden ou de Bannayan-Riley-Ruvalcaba. Une dizaine d'entre elles ont été identifiées plusieurs fois. Elles s'observent tout au long du gène à l'exception de l'exon 9 où elles n'ont jamais été rapportées (30). La nature des mutations est variée : mutation stop, faux sens, insertions, délétions, délétions/insertions de quelques nucléotides, mutations dans des sites d'épissage, au niveau du promoteur, grosses délétions emportant tout ou partie du gène. La majorité d'entre elles sont responsables soit d'une protéine tronquée, soit d'un défaut quantitatif de protéine, allant dans le sens que c'est l'haploinsuffisance qui explique les signes rencontrés dans les syndromes de Cowden et de Bannayan-Riley-Ruvalcaba (30). Les mutations faux-sens, rencontrées surtout dans l'exon 5, sont responsables essentiellement d'une perte partielle ou totale des activités lipidiques et protéines phosphatases de *PTEN* (37). Ces mutations sont donc inactivatrices.

### **a. Syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba**

Les mutations germinales de *PTEN* sont identifiées dans 65% des cas. Elles sont de nature variée, mutations ponctuelles, de petites tailles ou grandes délétions, et sont situées préférentiellement dans les exons 6, 7 et 8.

Il n'y a pas de mutation décrite au niveau du promoteur. Des recherches de grandes délétions intégrant tout ou partie du gène *PTEN* ont été effectuées chez 27 patients atteints du syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba. Trois grandes délétions ont été identifiées (11% des cas) (10). Celles-ci emportaient tout ou partie du gène *PTEN*. En effet, une des délétions emportait les 9 exons du gène, les autres délétions concernaient les exons 1 à 5 pour l'une et le premier exon seul pour l'autre. La borne centromérique de ces délétions n'est pas parfaitement déterminée. Il est difficile de savoir si d'autres gènes sont concernés. Les tableaux cliniques présentés par ces patients sont peu décrits. Deux des patients auraient une polypose juvénile gastrointestinale, sans précision sur leur gravité. Pour deux des patients, un diagnostic de syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba avait été posé sans précision sur son caractère sporadique ou familial. Le troisième patient avait des signes appartenant au spectre des syndromes de Cowden et de Bannayan-Riley-Ruvalcaba. Celui-ci avait un frère ou une sœur présentant un tableau clinique similaire et porteur également de la délétion.

Une première étude suggérait que les mutations germinales de *PTEN* étaient retrouvées seulement dans les cas de syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba familiaux et non dans les cas sporadiques (74). Ceci n'a pas été confirmé par d'autres études impliquant un plus grand nombre de patients. Celles-ci ont retrouvé un pourcentage de mutations identiques entre les deux groupes. (37, 44, 47, 75). Une étude a montré qu'il existait une association entre l'identification d'une mutation dans le gène *PTEN* et la présence de lipomes.

### **b. Syndrome de Cowden**

Les mutations sont identifiées dans 85 à 90% des cas. Seules des mutations ponctuelles ou de petites tailles ont été mises en évidence.

38% d'entre elles sont situées dans l'exon 5, qui code pour le site phosphatase. Le reste des mutations est situé dans l'ensemble du gène à l'exception de l'exon 9. Des mutations dans le promoteur ont été identifiées (10). Leur caractère causal a reposé sur une étude épidémiologique (absence de ces mutations sur 372 allèles contrôles étudiés) et des arguments fonctionnels. *In vitro*, ces mutations sont associées à une diminution du taux de protéine *PTEN* et à une augmentation de celui de protéine *AKT* phosphorylée. Des délétions de grandes tailles n'ont pas été identifiées chez les patients présentant des signes de syndrome de Cowden isolés sans signes du syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba associés.

Une étude (7) a montré qu'il existait une corrélation entre l'identification d'une mutation dans le gène *PTEN* et le risque de cancer du sein.

Concernant le syndrome « Cowden-like », définissant les patients présentant des signes cliniques du syndrome de Cowden mais ne s'intégrant pas dans la définition du *Consortium*, Marsh et associés, en 1998, (76) ont recherché des mutations dans le gène *PTEN* chez les membres de 64 familles. Ils n'ont trouvé qu'une mutation (2%).

Dans ces familles, soit il existait au moins un patient atteint d'un cancer non médullaire de la thyroïde et un apparenté atteint d'un cancer du sein soit au moins un patient atteint d'un cancer non médullaire de la thyroïde ou un cancer du sein, associé à d'autres signes appartenant au spectre du syndrome de Cowden.

### **c. Familles dans lesquelles se chevauchent les deux syndromes**

Des mutations dans *PTEN* sont plus fréquemment identifiées lorsqu'il coexiste au sein d'une même famille des patients atteints de syndrome de Cowden et d'autres du syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba. En effet, dans l'étude de Marsh et associés de 1999, 11 familles dans lesquelles était retrouvé un chevauchement clinique entre le syndrome de Cowden et le Bannayan-Riley-Ruvalcaba ont été étudiées. Chez 10 d'entre elles, une mutation dans *PTEN* a été retrouvée (7). Ce chiffre de 95% continu à être vrai (8).

De façon intéressante, dans ces familles, les mutations germinales R130X (exon 5) et R335X (exon 8) représentent presque la moitié des mutations (sur une dizaine de familles) (8).

Le spectre mutationnel de *PTEN* dans les syndromes de Bannayan et de Cowden est chevauchant, démontrant que les deux syndromes sont alléliques. Les signes cliniques et les mutations germinales dans *PTEN* communs aux deux syndromes conduisent les auteurs à conclure que ceux-ci représentent l'expression variable d'une altération génétique commune. Il est suggéré que les syndromes caractérisés par la présence d'une mutation germinale de *PTEN* soient regroupés par une définition moléculaire et référés comme étant des « PHTS » : « *PTEN* Hamartoma Tumor Syndrome » (7).

#### **d. Corrélation génotype-phénotype**

Peu de corrélations génotype phénotype ont été retrouvées. Dans le syndrome de Cowden, les mutations situées dans le site ou en 5' du site phosphatase apparaissent associées à un nombre élevé d'organes atteints (5 sites : système nerveux central, thyroïde, sein, peau, tractus digestif) témoignant de la sévérité de la maladie (23). Les mutations identifiées sur le promoteur seraient associées à la présence d'une atteinte mammaire (8, 77) mais le nombre total d'organes atteints par ailleurs serait faible, inférieur à trois.

Il n'a pas été observé de corrélation génotype-phénotype dans le syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba.

### **3. Implication du gène *PTEN* dans le développement d'hamartomes et de cancers**

Le gène *PTEN* a un rôle clé dans la cancérogenèse (pour revue, (78-80)). Rappelons qu'il a été identifié car la région dans laquelle il est localisé est fréquemment emportée dans les tumeurs malignes. De plus, sur le plan biologique,

l'absence de la protéine PTEN conduit à une levée de l'inhibition de la voie PI3K/AKT.

Dans les tumeurs sporadiques, *PTEN* est l'un des gènes le plus fréquemment altéré, en particulier dans les glioblastomes et les cancers de l'endomètre (8). Dans les cancers colorectaux, il semble moins impliqué (81). Les mutations identifiées sont mono ou bialléliques. Celles-ci sont variées et dépendantes du type cellulaire. Elles sont représentées par des pertes d'allèles (mises en évidence par LOH (loss of heterozygosity)), des mutations ponctuelles, des hyperméthylations au niveau du promoteur (81, 82). Ces altérations entraînent une perte de fonction du gène. L'expression protéique est partiellement ou totalement abolie. S'y associe une augmentation du taux de protéine AKT phosphorylée et donc l'activation de gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire.

La question de savoir si l'inactivation biallélique de *PTEN* (théorie de Knudson) est indispensable à la transformation tumorale demeure ouverte. En effet, le taux de perte d'hétérozygotie de la région 10q23 est plus important que le taux de mutation sur l'autre allèle de *PTEN* (83). De nombreuses hypothèses peuvent expliquer cette discordance : limites des techniques actuelles de mise en évidence de mutations, implication d'un autre gène suppresseur de tumeur dans cette région, coopération entre perte d'un allèle de *PTEN* et un événement génétique au niveau d'un second gène, autres mécanismes d'inactivation, que ce soit au niveau de *PTEN* proprement dit, de l'ARNm ou de la protéine. L'hypothèse de l'existence d'autres mécanismes d'inactivation de *PTEN* semble d'autant plus vraisemblable qu'il existe des tumeurs dans lesquelles le taux de protéine PTEN est diminué sans qu'une mutation du gène n'ait été identifiée.

L'étude des hamartomes et des tumeurs malignes développées dans les syndromes de Cowden et de Bannayan-Riley-Ruvalcaba pourrait permettre d'avancer sur cette question. En effet, on peut se demander si l'haploinsuffisance de *PTEN* (altération monoallélique) au niveau de certains tissus ne suffit pas à la formation d'hamartome. La transformation tumorale ayant lieu lorsque le second allèle est muté.

Une étude recherchant les pertes d'hétérozygotie dans des hamartomes de patients atteints du syndrome de Cowden a été réalisée (fibroadénomes mammaires, adénomes thyroïdiens, polypes digestifs, hamartomes cutanés, du poumon et du

rein) (84). Une perte d'hétérozygotie était retrouvée dans 20% des cas. Cette faible fréquence de LOH est en faveur de cette hypothèse.

Cependant, une étude sur 18 hamartomes cérébelleux (syndrome de Lhermitte Duclos) a été réalisée (77). Seize mutations de *PTEN* ont été identifiées au niveau somatique, mais 6 seulement ont pu être étudiées au niveau germinale. Dans trois cas, les deux événements ont eu lieu. Cette étude réalisée sur un petit nombre d'échantillons ne permet pas de trancher clairement. Cependant, dans 11 des 14 échantillons qui ont pu être étudié, était retrouvée une perte complète ou une diminution de l'expression de *PTEN* associée à une augmentation du taux de protéine *AKT* phosphorylée. Ceci allant dans le sens que la perte du second allèle est nécessaire au développement d'hamartome.

Il est difficile de conclure, car les hamartomes, selon leur localisation (cutanée, cérébelleuse...), utilisent certainement différentes voies pour proliférer. Comme pour les tumeurs sporadiques, des mutations non identifiées ou l'implication d'autres mécanismes d'inactivation du gène pourraient expliquer que l'on ne trouve pas l'altération du second allèle.

Un complément de réponse pourrait nous être apportée par l'étude du gène *PTEN* dans des tumeurs malignes de patients prédisposés, afin de voir si la fréquence des altérations du second allèle est plus importante que dans les hamartomes. Ceci est malheureusement peu décrit dans la littérature.

Cependant, le cas d'une femme atteinte du syndrome de Cowden et porteuse d'une mutation germinale de *PTEN* a été rapporté (85). L'étude moléculaire de l'un de ses hamartomes cutanés retrouve cette mutation sans perte d'allèle associé. L'étude moléculaire de son cancer du sein retrouve la mutation germinale, associée à une LOH en 10q sur l'autre allèle, conduisant ainsi à une mutation biallélique de *PTEN*. Ici, nous avons un argument allant dans le sens que l'haploinsuffisance de *PTEN* suffit au développement hamartomateux et que la perte du second allèle, probablement associé à d'autres événements génétiques conduit à la transformation tumorale.

# LA POLYPOSE JUVENILE

## Description clinique

Bien que la description histologique initiale d'un polype juvénile ait été faite par Diamond (86), c'est Horilleno et associés (87) qui leur ont donné le nom de polype juvénile. Morson (88) a considéré que ces polypes juvéniles étaient des hamartomes. Le syndrome de polypose juvénile a été défini pour la première fois en 1964, par McColl et associés (89) qui ont rapporté les premiers 11 cas de patients, appartenant à 8 familles. Ces patients présentaient de multiples polypes juvéniles dans le tractus digestif.

Comme dit précédemment, les polypes juvéniles sont des malformations hamartomateuses focales des composants de la muqueuse. Ils sont composés d'une *lamina propria* augmentée d'épaisseur contenant des glandes hyperplasiques, souvent kystiques et dilatées, un stroma proéminent dans lequel siège des cellules inflammatoires. L'épithélium peut-être normal, mucosécrétant, régénératif, érodé.

Ils ont une prévalence, estimée à travers les manifestations cliniques ayant conduit à la réalisation d'une endoscopie digestive et à un diagnostic, de l'ordre de 2% dans la population pédiatrique (pour revue, (17)). La plupart de ces polypes sont isolés et de localisation colorectale, sans histoire familiale associée. Le terme de polypose juvénile est réservée aux cas pour lesquels les polypes sont multiples et /ou ont une composante familiale.

La prévalence de la polypose juvénile est estimée être entre 1/100 000 à 1/160 000 reflétant l'absence d'étude de population (90).

Dans 50 à 80% des cas, il s'agit d'une polypose isolée sans histoire familiale associée. En revanche, lorsque celle-ci existe, elle est compatible avec un mode de transmission autosomique dominant (91).

La polypose juvénile est un diagnostic d'exclusion (18). En effet, avant de poser ce diagnostic, les syndromes dans lesquels existent des polypes

hamartomateux comme les syndrome de Cowden et de Bannayan-Riley-Ruvalcaba doivent être recherchés et éliminés. Cependant, ceci peut être difficile du fait de la pénétrance incomplète du syndrome de Cowden dans l'enfance (92).

Les critères diagnostiques de la polypose juvénile par rapport aux polypes juvéniles solitaires étaient les suivant (93):

- Plus de 5 polypes de type juvénile du côlon et du rectum et/ou
- Polypes répartis à travers tout le tube digestif et/ou
- Présence de polypes au niveau du tractus digestif, quelque soit le nombre, s'il existe une histoire familiale de polypose juvénile.

Plus récemment, certains auteurs proposent de retenir un nombre minimal de 3 polypes (94).

Le nombre de polypes est en général compris entre 3 et 200 (93) et leur taille entre quelques millimètres et 5 cm (95).

Dans une étude incluant 272 cas (90), Hofting et associés, (96) décrivent les sites de localisation des polypes. Ce sont : la région colorectale dans 98% des cas, l'estomac dans 14% des cas, le jéjunum et l'iléon dans 7% des cas, le duodénum dans 2% des cas.

Sachatello et associés (97) a subdivisé la polypose juvénile en trois tableaux cliniques en fonction de la présentation et de l'évolution clinique de la maladie.

La polypose infantile, qui se révèle chez le petit enfant, est caractérisée par un tableau gravissime, sans formes familiales rapportées, associant une diarrhée sanglante et une entéropathie exsudative, responsables d'une hypoprotidémie, d'une anémie, d'un anasarque et d'un défaut de développement. Elle peut provoquer le décès des enfants avant l'âge de deux ans (pour revue, (18)). C'est ce tableau clinique qui s'apparente à celui présenté par les enfants décrits dans cette thèse.

Un tableau de diagnostic plus tardif est lui-même subdivisé en deux sous-groupes : ils se manifestent par des rectorragies, des prolapsus de polypes rectaux, des douleurs abdominales, une diarrhée (98-100). Leur diagnostic est fait

essentiellement au cours des première et deuxième décades. Les deux tableaux se différencient essentiellement par la localisation des polypes :

- La polypose juvénile colique est définie lorsque les polypes sont limités au niveau colique et rectal.
- Dans la polypose juvénile généralisée, les polypes se situent n'importe où dans le tractus digestif, de l'estomac jusqu'au rectum. De façon intéressante, dans la série de 23 patients rapportée par Coburn et associés, aucun diagnostic n'a été fait avant l'âge de 6 ans (100).

La localisation des polypes et la gravité de la symptomatologie chez des personnes atteintes au sein d'une même famille peuvent être variables. Stemper et associés (101) ont rapporté une grande famille dans laquelle certains membres étaient atteints d'une polypose juvénile généralisée et d'autres d'une polypose juvénile colique. De même, Grosky et associés (102) ont décrit une famille dans laquelle coexistaient des patients atteints de polypose juvénile colique et d'autres atteints de polypose juvénile infantile. Les différentes catégories reflètent donc probablement l'expression variable de la même pathologie (90, 101, 103). Cependant, dans la majorité des cas, les enfants atteints de polypose juvénile infantile sont des cas sporadiques (95) et apparaissent comme une entité à part entière, avec des premiers signes cliniques apparaissant avant l'âge de 9 mois voire dès la naissance. Dans la famille décrite par Grosky et associé, il est vrai qu'un enfant aurait présenté des signes digestifs et est décédé vers l'âge de 3 mois mais il n'y a pas eu de diagnostic posé. Un autre enfant a présenté des signes cliniques vers l'âge de 1 an, mais le tableau clinique semble moins grave que celui présenté par les 7 enfants rapportés par Sacchatello. De façon intéressante, sur ces 7 enfants, 3 présentaient un retard moteur associé à une macrocéphalie pour 2 d'entre eux.

Au départ, il était plutôt admis que les polypes juvéniles ne prédisposaient pas à une dégénérescence maligne gastro-intestinale du fait de leur nature hamartomateuse (88). En réalité, ce risque existe. Il semble secondaire à l'existence de foyers adénomateux au sein des polypes et/ou d'adénomes sans caractéristiques juvéniles résiduelles. Il est difficile de savoir si de tels adénomes se développent *de novo* ou s'ils sont secondaires à la conversion totale d'un polype juvénile préexistant

(93). Cependant, l'absence de petits adénomes semble plutôt en faveur de la seconde hypothèse (104).

Une revue de la littérature sur 163 patients atteints de polypose juvénile (dont 133 cas familiaux) a identifiée chez 46% (75/ 163) d'entre eux un cancer du tractus digestif. Sur ces 163 patients, 36% (58/163) avaient un cancer colorectal, 10% (16/163) un cancer de l'estomac, 1% (2/163) un cancer du pancréas et moins de 1% (1/163) un cancer duodénal (103). Dans ces 133 cas familiaux, l'âge médian au diagnostic de cancer colorectal était de 42 ans (17,4 à 68,2). L'âge médian au diagnostic de cancer du tractus digestif haut était de 57,6 ans (20,5 à 72,8). La différence entre ces deux âges moyens n'est pas significative au niveau statistique.

L'évaluation du risque est très variable selon les études. Les seules qui donnent des risques à un âge donné indiquent que le risque cumulé pourrait atteindre 17 à 22% à l'âge de 35 ans (17) et 68% à l'âge de 60 ans pour Murday et Slack (105) d'après leurs estimations faites à partir des registres de l'Hôpital Sainte-Marie.

Les anomalies congénitales associées sont peu fréquentes dans la polypose juvénile. Dans 10% des cas des anomalies sont décrites, en particulier des malformations cardiaques et une microcéphalie (56). Elles sont décrites majoritairement dans des cas sporadiques.

Avant 1998, peu de chose était connu sur les bases génétiques de la polypose juvénile.

A ce jour deux gènes ont été identifiés : les gènes *SMAD4* et *BMPRIA*. Ces deux gènes appartiennent à la même voie de signalisation cellulaire, TGF $\beta$ /BMP/SMAD (transforming growth factor  $\beta$ , bone morphogenetic protein). Le terme SMAD est dérivé des membres fondateurs de cette famille, la protéine MAD (mothers against decapentaplegic) de la Drosophile et la protéine SMA (small body size) de *Caenorhabditis elegans*.

# Bases génétiques de la polypose juvénile

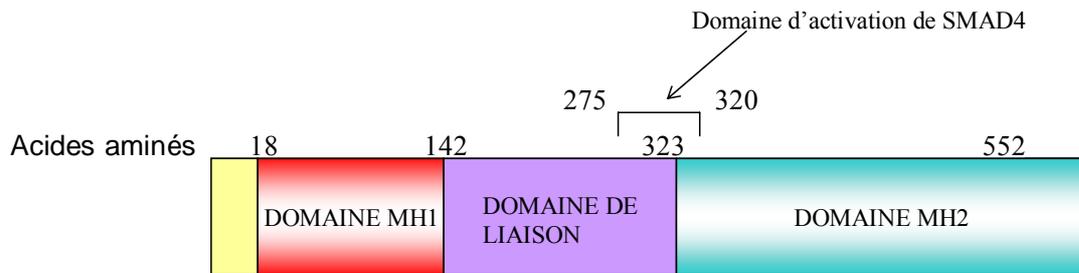
## 1. SMAD4 : gène et protéine

Le gène *SMAD4* a été identifié comme gène de susceptibilité de la polypose juvénile en 1998 par Howe et associés (106). Par une étude de liaison sur 43 familles, ils ont mis en évidence une région d'intérêt en 18q21, région contenant deux gènes suppresseurs de tumeur, *SMAD4* et *DCC*. L'identification de mutations inactivatrices permet de retenir le gène *SMAD4* comme causal.

*SMAD4*, localisé en 18q21.1, est constitué de 13 exons, dont 11 codant pour une protéine de 552 acides aminés. C'est un facteur de transcription, membre de la famille des gènes *SMAD*, codant pour des médiateurs cytoplasmiques dans la voie de signalisation TGF- $\beta$  (107) (voir ci-dessous).

La protéine SMAD4 possède trois domaines protéiques distincts (108) (Figure 5) :

- En N-terminal, un domaine MH1 (Mad Homology 1) impliqué dans la liaison à l'ADN.
- En C-terminal, un domaine MH2 (Mad Homology 2) impliqué dans l'activation transcriptionnelle et la formation de complexes avec les autres protéines *SMAD*.
- Ces deux domaines sont séparés par une région riche en proline, la région de liaison. Dans cette région, il existe un domaine SAD (SMAD activating domain) qui est une unité régulatrice impliquée dans l'activation de la transcription.



**Figure 5 : Protéines SMAD4**  
D'après Howe et associés (109)

Dans la polypose juvénile, la prévalence de mutations du gène *SMAD4* est de 22,7% (32 cas sur 141) (109). Celles-ci sont distribuées dans 8 des 11 exons codants du gène. Seules 3 mutations ont été retrouvées chez plusieurs patients non apparentés.

33 mutations différentes ont été rapportées dans des familles aux cas non apparentés. Il s'agit dans 22 cas (15 délétions, 2 insertions, et 5 mutations stop) de mutations inactivatrices. Les 10 restantes sont des mutations faux-sens, situées, pour la plupart dans le domaine MH2 de la protéine. Ce domaine est très conservé phylogénétiquement et il est fondamental pour l'activité de la protéine. Ces mutations entraînent donc vraisemblablement une perte de fonction de la protéine.

## 2. *BMPRI1A* : gène et protéine

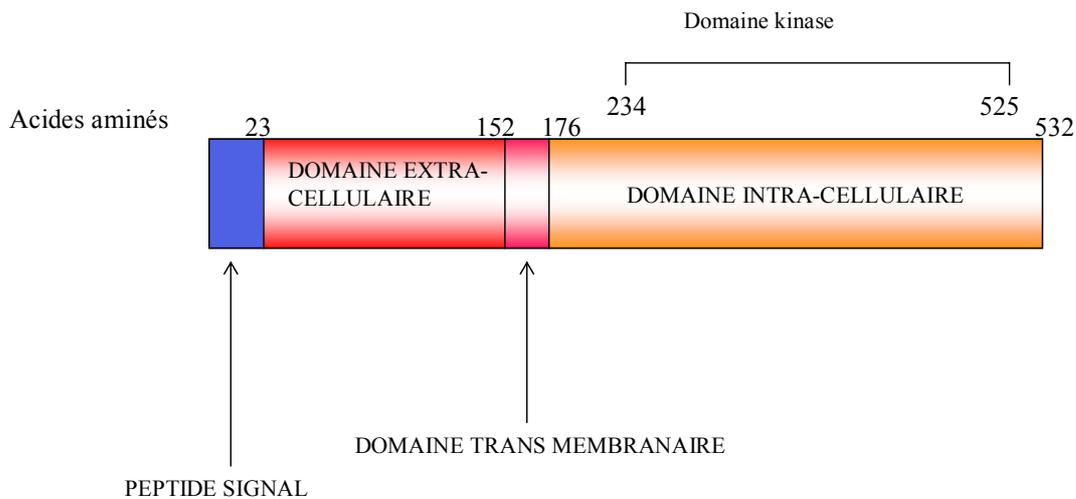
Toutes les familles étudiées par Howe et associés ne présentaient pas de liaison aux marqueurs de la région du chromosome 18 contenant *SMAD4*. En 2001, Howe et associés (110) ont identifié un second gène de susceptibilité, *BMPRI1A*. Par une étude de liaison sur 4 familles, ils ont mis en évidence un locus d'intérêt en 10q22-23. Un gène candidat *BMPRI1A* est situé dans cet intervalle. L'identification de mutations inactivatrices a permis de le retenir comme causal.

Le gène *BMPRI1A*, localisé en 10q23.2, est constitué de 11 exons (110, 111) codant pour une protéine de 532 acides aminés, récepteur de type I de ligands de la

famille TGF- $\beta$ . Notons cependant que, selon la base de données Vega, il possède, en amont de sa séquence codante, deux exons putatifs supplémentaires, non codants.

La protéine BMPR1A possède trois domaines (109) (Figure 6) :

- Un domaine extracellulaire riche en cystéine sur lequel se fixe le ligand et qui contient également un domaine PS (signal peptide). Le peptide signal est un signal de localisation, qui permet à une protéine d'être adressée spécifiquement vers un compartiment cellulaire donné.
- Un domaine transmembranaire.
- Un domaine intracellulaire comprenant une région riche en glycine et en sérine (domaine GS), siège de phosphorylation, une région à activité kinase et une région de liaison à l'ATP. Le domaine GS est impliqué dans l'activation du récepteur de type I par un récepteur de type II et le domaine kinase dans la transduction du signal.



**Figure 6** : Protéine BMPR1A  
D'après Howe et associés (109)

Dans la polypose juvénile, la prévalence des mutations retrouvées dans le gène *BMPR1A* est de 19,8% (21 cas sur une série de 106 patients non apparentés étudiés). En additionnant les cas décrits dans la littérature, 31 mutations différentes ont été

rapportées (109). Une seule mutation a été retrouvée chez 2 patients non apparentés.

21 mutations (9 mutations stop, 9 délétions, 1 insertion, 2 mutations dans des sites d'épissage) conduisent à une protéine tronquée putative et 10 mutations sont des faux-sens, localisées dans la région codant pour le domaine kinase de la protéine ou le domaine riche en cystéine. Ces régions ont un rôle fondamental pour l'activité de la protéine et conduisent donc vraisemblablement à une perte de fonction de la protéine. Aucune mutation n'a été décrite dans le domaine transmembranaire de la protéine.

Le rôle du gène *BMPRIA* comme gène de susceptibilité du syndrome de Cowden a été évoqué. Deux patients non apparentés, chez lesquels un diagnostic de syndrome de Cowden avait été porté et chez qui aucune mutation dans le gène *PTEN* n'a été identifiée, sont porteurs d'une mutation dans *BMPRIA*. Ces deux patients ont des manifestations gastro-intestinales prédominantes (56, 112). L'un de deux patients au sein de son histoire familiale présente les critères minimums répondant au diagnostic de syndrome de Cowden (1 critère majeur et 3 mineurs) (29). Cette famille pourrait être classée par certains cliniciens comme un syndrome de « Cowden-like » et non un syndrome de Cowden. La mutation identifiée est un faux-sens de l'exon 8. Concernant l'autre patient, il n'y a pas d'informations supplémentaires dans la littérature, ni sur le tableau clinique, ni sur la nature de la mutation identifiée (56).

Il n'est, pour l'instant, pas encore clairement établi que ce gène puisse être ou non impliqué dans cette maladie. Il faut être très prudent lorsque l'on fait un diagnostic de syndrome de Cowden. Concernant les patients décrits, il faudrait avant tout, réévaluer le diagnostic.

Ainsi, dans la polypose juvénile, des mutations dans les gènes *SMAD4* ou *BMPRIA* sont donc identifiées dans moins de 50% des cas. Il est probable que, pour les cas restant, les limites techniques ne permettent pas de toutes les mettre en évidence (grandes délétions, mutations dans le promoteur). Il existe aussi probablement d'autres gènes impliqués dans cette pathologie même si les données de la littérature ne nous mentionnent pas d'autres *loci* d'intérêt.

Certains gènes candidats, appartenant à la voie de signalisation TGF- $\beta$ , ont été explorés. Aucune mutation n'a été identifiée dans les gènes *SMAD1*, 2, 3, 5, 7 et *BMPR2*, *BMPRI1*, *ACVRI* (109) à ce jour.

Le rôle éventuel de *PTEN* dans la polypose colique est soumis à controverse (113). Plusieurs groupes ont identifié des mutations du gène *PTEN* chez des patients ayant des polypes digestifs (90, 114, 115). Cependant, la majorité de ces patients ont aussi développés des signes évoquant un syndrome de Cowden ou de Bannayan-Riley-Ruvalcaba (116). Plusieurs études ont recherché systématiquement des mutations dans le gène *PTEN* dans des séries de patients (43, 117) chez lesquels un diagnostic de polypose juvénile avait été porté. Ils n'en ont pas identifié. Ceci suggère que les patients porteurs d'une mutation dans *PTEN* et chez lesquels des polypes hamartomateux ont été diagnostiqués ont peut-être un syndrome de Cowden ou un « *PTEN* hamartoma tumor syndrome » plutôt qu'une polypose juvénile ; la pénétrance du syndrome de Cowden étant incomplète dans l'enfance.

### **3. Expression clinique de la polypose juvénile et gène impliqué**

La présence de mutations dans *SMAD4* prédisposerait à une polypose juvénile généralisée tandis que son absence prédisposerait plus volontiers à une polypose juvénile colique (90).

En effet, la prévalence des polypes juvéniles au niveau de l'estomac est plus importante dans les familles dans lesquelles une mutation dans *SMAD4* est identifiée que pour celles qui sont porteuses d'une mutation dans *BMPRI1* ou pour lesquelles aucune mutation n'est retrouvée. De plus, la polypose gastrique est plus sévère, nécessitant parfois le recours à la gastrectomie (118).

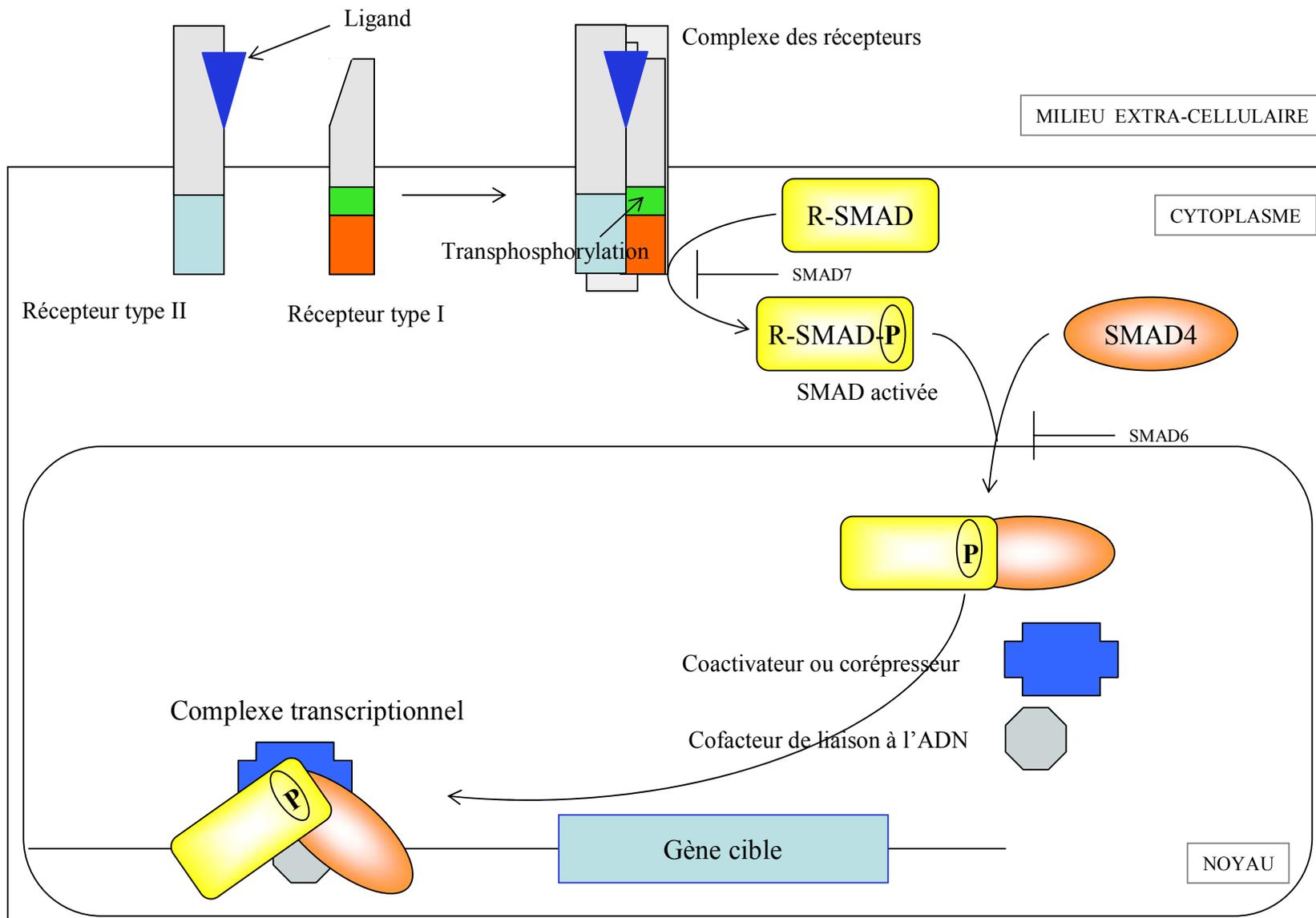
En comparant des patients pour lesquels une mutation soit dans *SMAD4* soit dans *BMPRI1* a été identifiée à des patients pour lesquels aucune mutation ne l'a été, un certain nombre de corrélations apparaissent. La présence d'une mutation est corrélée à un nombre plus important de polypes (>10) et à une fréquence plus élevée d'histoire familiale de cancers du tractus digestif. Ces patients présentent également un âge plus tardif des premiers signes cliniques et du diagnostic. Ainsi, peut-être que d'autres gènes non identifiés sont responsables d'un tableau de révélation plus précoce.

## 4. La voie TGF- $\beta$

### a. Description

La voie TGF- $\beta$  a un rôle crucial dans le développement et l'homéostasie tissulaire. Elle régule de nombreux processus cellulaires. Elle a un rôle essentiel dans l'inhibition de la prolifération cellulaire mais elle agit également sur la différenciation, l'adhésion, la migration cellulaire, l'angiogénèse, l'immunosurveillance. La nature de ces rôles dépend du type cellulaire. Les perturbations dans cette voie de signalisation sont impliquées dans les désordres développementaux et dans une variété de maladies humaines telles des cancers, des fibroses, des maladies auto-immunes (pour revue, (108, 119-122)) et des syndromes vasculaires (maladie de Rendu-Osler, hypertension artérielle pulmonaire primitive) (56).

Les membres de la famille TGF- $\beta$  sont composés d'environ 35 cytokines répartis en deux sous-familles : la sous famille TGF- $\beta$ /Activin/Nodal et la sous famille BMP (bone morphogenetic proteins)/GDF (growth and differentiation factors)/MIS (muellerian inhibiting substance). Elles initient les réponses cellulaires en se liant et en activant des récepteurs sérine/thréonine kinases, présents à la surface cellulaire. Il en existe de deux types : le type I (dont la protéine BMPRI1A) et le type II. Le ligand se fixe au récepteur de type II, induisant la formation d'un complexe entre les deux types de récepteurs (Figure 7). Le récepteur de type II va phosphoryler le récepteur de type I au niveau de résidus Glycine Sérine (GS) en amont de son domaine kinase. Le récepteur de type I ainsi activé va, à son tour, phosphoryler certaines protéines SMAD sur des sérines, au niveau de leur domaine carboxy terminal. Il existe 8 types de protéines SMAD réparties en 3 classes fonctionnelles : les protéines SMAD régulées par le récepteur (R-SMAD), la protéine SMAD co-médiatrice (Co-SMAD), et les protéines SMAD inhibitrices (I-SMAD). Les R-SMAD (SMAD 1, 2, 3, 5 et 8) sont phosphorylées et activées par le récepteur de type I. Les protéines SMAD1, 5, 8 sont phosphorylées en réponse aux BMPs ; les SMAD 2 et 3 le sont en réponse aux TGF- $\beta$  et aux Activin. Elles sont



**Figure 7 : Voie de signalisation TGF-β**

alors relarguées des complexes formés par les récepteurs et vont créer un complexe hétérotrimérique avec la Co-SMAD (SMAD4). Ces complexes vont être transloqués dans le noyau. En conjonction avec des co-facteurs nucléaires (facteurs de transcription, coactivateurs tel que p300/CBP, corépresseurs), ils vont réguler positivement ou négativement la transcription de gènes cibles. Les protéines SMAD peuvent interagir avec de nombreux co-facteurs, conférant une spécificité de signal.

Cette voie de signalisation est contrôlée à tous les niveaux (extra, intra-cellulaire et transmembranaire) par des mécanismes de dégradation de protéines (ubiquitinylation), de compétition dans des interactions protéine-protéine, protéine-récepteur ou par l'inhibition de la translocation des protéines R-SMAD/Co-SMAD dans le noyau. Il existe des mécanismes de rétro-contrôle négatif induit par les membres de la famille TGF- $\beta$  eux-mêmes et passant par les protéines SMAD inhibitrices, SMAD 6 et 7. D'autres mécanismes de contrôle de cette voie sont sous la dépendance d'autres voies de signalisation cellulaire (pour revue (123, 124)). La transduction du signal passant par la voie TGF- $\beta$  implique donc une grande diversité de ligands, de récepteurs, de protéines SMAD, de co-facteurs et de contrôle avec chacun leur spécificité d'interaction. Ceci, associé à la durée et à l'intensité du signal engendrées dans une cellule donnée, permet une grande diversité de signaux intra-cellulaires, à partir de la même voie de signalisation.

## **b. La voie TGF- $\beta$ et cancer**

La voie TGF- $\beta$  est considérée, en même temps, comme une voie suppresseur de tumeur et une voie promotrice de la progression et de l'invasion tumorale (pour revue, (56, 125-127)).

Des mutations inactivatrices dans des gènes codant pour des récepteurs au TGF- $\beta$  ou des protéines *SMAD* ont été identifiées dans des carcinomes humains. En effet, des mutations somatiques du récepteur de type II des ligands TGF- $\beta$  ont été identifiées dans des tumeurs coliques sporadiques (128). Des mutations de *SMAD4* conduisant à une inactivation bi-allélique ont été décrites dans des cancers du pancréas et dans des cancers coliques.

Pourtant, dans de nombreux types tumoraux, il existe une augmentation de la production de TGF- $\beta$ . Et celle-ci est corrélée à la sévérité du grade tumoral, à une augmentation des capacités invasives de la tumeur et à un pronostic plus réservé pour les patients (129-131). *In vitro*, il a été montré que l'utilisation d'agents bloquant la voie TGF- $\beta$  inhibe les capacités invasives des lignées cellulaires tumorales (132). *In vivo*, le TGF- $\beta$  stimule directement la mobilité des cellules cancéreuses (133).

Deux modèles semblent se dégager pour tenter d'intégrer ces deux rôles antagonistes (126).

Le premier, prend en compte que le TGF- $\beta$  semble jouer des rôles différents dans une cellule normale, tumorale ou une cellule du stroma. Il a des fonctions supprimeuses de tumeur sur les cellules épithéliales non transformées en inhibant la prolifération et en stimulant la différenciation et l'apoptose de manière appropriée. Les effets cytostatiques du TGF- $\beta$  dominent alors les actions opposées des signaux mitotiques. Dans une cellule transformée, ce phénomène est inversé. Ceci peut-être secondaire à de nombreux mécanismes tels que l'apparition de mutation inactivatrice au niveau de gènes de la voie, entraînant une diminution de l'expression de protéines SMAD ou des récepteurs.

Dans certains cancers, cette perte de sensibilité des cellules à l'action inhibitrice sur la croissance cellulaire du TGF- $\beta$  va contribuer à la transformation tumorale. En effet, soulagées des contraintes sur la croissance exercées par le TGF- $\beta$ , les cellules cancéreuses vont augmenter leur production de TGF- $\beta$  et utiliser ces cytokines comme facteur de progression tumorale. Celle-ci se fait essentiellement par les actions qu'elles exercent sur le stroma.

Au niveau du microenvironnement tumoral, le TGF- $\beta$  agit sur différents types cellulaires (fibroblastes du stroma, cellules endothéliales, cellules immunitaires) situés à proximité de la tumeur, qui vont créer un microenvironnement tumoral propice à la croissance, à l'invasion et aux métastases.

En effet, le TGF- $\beta$  va créer une immunodépression locale et stimuler l'angiogénèse. De plus, il agit comme un important médiateur de métastases, sites spécifiques, tel que les métastases du cancer du sein au niveau de l'os. Ceci se réalise par la surexpression de certains gènes codant pour des protéines de la surface cellulaire ou des protéines sécrétées qui vont médier « le homing » au niveau de

l'os. D'autres gènes codant pour des protéines modifiant le microenvironnement en facilitant l'ostéolyse peuvent également être surexprimés.

Le second modèle considère que les deux rôles du TGF- $\beta$ , suppresseur et promoteur de tumeur sont médiés uniquement par la cellule cancéreuse. Celle-ci va subir une altération fondamentale de ses réponses au TGF- $\beta$ . Elle va devenir résistante aux effets suppresseurs du TGF- $\beta$  mais va demeurer réactive à ses effets promoteurs. Cette altération fondamentale se réalise lorsque la cellule cancéreuse subit une transition épithéliomésenchymateuse.

Au cours de cette étape, la cellule cancéreuse épithéliale perd son phénotype cellulaire épithélial (contact cellule-cellule ; immobilité) et adopte un phénotype mésenchymateux (réduction des contacts cellule-cellule ; augmentation de la mobilité). Ce modèle est attractif car le TGF- $\beta$  est connu pour avoir des effets très différents entre les cellules épithéliales et mésenchymateuses.

La voie TGF- $\beta$  semble donc agir comme une voie suppresseur de tumeur dans le cas d'une cellule non transformée et une voie promotrice de la progression et de l'invasion tumorale dans les stades avancés de la progression tumorale. Il existe certainement une conjonction entre les deux modèles pour expliquer ce rôle antagoniste du TGF- $\beta$  dans l'oncogénèse.

### **c. Voie BMP et polypes digestifs**

Depuis quelques années, la voie passant par les ligands BMP est plus étudiée, en particulier son rôle sur les cellules digestives (pour revue, (134)).

La muqueuse intestinale se renouvelle tout au long de la vie. Ce processus de renouvellement est régulé et maintenu par des cellules souches. Ces cellules forment des populations clonales localisées dans des « niches » à la base des cryptes. Leurs activités sont régulées par la sécrétion paracrine de facteurs de croissance et de cytokines, sécrétés par les cellules mésenchymateuses.

La voie BMP est l'une des voies de signalisation qui intervient dans ce contrôle.

Haramis et associés, en 2004, (135) ont étudié à partir de modèles souris, l'expression de la protéine *BMP4*. Celle-ci est exclusivement exprimée dans le mésenchyme intravillositaire ; les cellules épithéliales villositaires répondant à ce signal paracrine. L'inhibition de ce signal conduit à la formation de nombreuses cryptes ectopiques. Ces modifications reproduisent les changements histopathologiques intestinaux retrouvés chez les patients porteurs d'une polypose juvénile. La voie BMP réprime donc la formation *de novo* des cryptes et des polypes.

De récents travaux sur des souris ayant une inactivation conditionnelle de *BMRIA* dans les cellules intestinales montrent que ce rôle passe par la prévention du renouvellement des cellules souches, par l'inhibition de la voie  $\beta$ -caténine. Les souris développent des polypes contenant un nombre augmenté de cryptes au niveau colique associé un nombre de cellules souches multiplié par cinq par rapport aux souris sauvages. De façon intéressante, les effets inhibiteurs exercés sur la voie  $\beta$ -caténine apparaissent médiés par *PTEN* ; BMP régulant positivement l'activité de *PTEN*, via une inhibition de son inactivation. Les auteurs proposent que la voie BMP ait un rôle inhibiteur sur l'autorenouvellement des cellules souches intestinales en inhibant la voie Wnt/  $\beta$ -caténine et que cette interaction soit médiée, au moins en partie, par *PTEN* et la voie PI3K/AKT (68, 69, 136).

Nous avons donc décrit trois pathologies dans lesquelles existent des polypes digestifs hamartomateux ainsi que les gènes impliqués, connus à ce jour. Ces gènes appartiennent donc à des voies de signalisation cellulaire fondamentales, régulant l'homéostasie cellulaire. Et, comme nous avons commencé à l'évoquer, ces voies de signalisation n'exercent pas leur rôle de façon isolée mais sont intimement liées entre elles. Nous discuterons plus loin (chapitre discussion) de l'implication de cette interaction dans la symptomatologie présentée par les patients.

Le tableau clinique présenté par les enfants évoquait donc un syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba avec, cependant, un tableau digestif d'une particulière gravité. La démarche diagnostique, que nous détaillerons dans un chapitre suivant, a permis de mettre en évidence des délétions au niveau du bras long du chromosome 10, dans la région des gènes *PTEN* et *BMPRIA*.

Auparavant, nous rapportons les cas de délétion de cette région chromosomique déjà décrits dans la littérature.

## **DESCRIPTION DES CAS DE DELETION 10q RAPPORTEES DANS LA LITTERATURE**

Nous rappelons la position des gènes *BMPRIA* et *PTEN*. *BMPRIA* est localisé en 10q23.2, *PTEN* en 10q23.3.

Des délétions de cette région chromosomique, visibles en cytogénétique, ont été décrites.

Jacoby et associés, en 1997, (137) ont décrit chez un enfant porteur d'une polypose juvénile, une délétion  $\text{del}(10)(\text{q}22.3\text{-q}24.1)$  *de novo*. C'est à partir de cette observation que l'hypothèse selon laquelle *PTEN*, identifié en 1996, pouvait être un gène impliqué dans la polypose juvénile, avait été évoquée. En effet, *BMPRIA* n'avait alors pas été identifié.

Au niveau clinique, l'enfant présentait à la naissance un pied bot. A 10 mois de vie, il avait des mensurations en dessous de la moyenne, y compris pour le périmètre crânien, ainsi qu'une dysmorphie faciale (Tableau 4). A 1 an, l'enfant présentait des rectorragies. Les explorations digestives ont mis en évidence des polypes répartis dans tout le côlon. L'anatomopathologie a conclu à leur nature hamartomateuse. La première coloscopie retrouvait une douzaine de polypes. Il n'y a pas de précision sur le nombre exact de polypes retrouvés à la seconde coloscopie, réalisée un an plus tard. Ils étaient nombreux car au moins vingt polypes ont été cautérisés ou ôtés.

Arch et associés, en 1997, (75) ont décrit un enfant chez qui une délétion  $\text{del}(10\text{q})(23.2\text{-q}24.1)$  *de novo* a été identifiée.

A la naissance, l'enfant était macrosome (Tableau 4). A 18 mois de vie, il présentait des signes cliniques de syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba, à savoir, une macrocéphalie avec un PC à 58 cm (+8DS), deux lipomes (abdomen et pouce), deux hémangiomes (dos, épaule), une hypotonie axiale, un retard de développement

moteur et de langage. Une dysmorphie faciale était également notée (voir tableau 4), ainsi qu'une brachycéphalie. Enfin, des signes ophtalmologiques ont été mis en évidence. A 18 mois, des rectorragies sont apparues. Les examens complémentaires ont retrouvé la présence de multiples polypes hamartomateux dans le duodénum et le côlon.

La délétion du gène *PTEN* a été mise en évidence par FISH. Ce cas a été réétudié par étude familiale indirecte en 1999 par Marsh et associée ; le gène *BMPRIA* n'ayant pas encore été identifié. Ils ont utilisés des marqueurs flankants ce gène, mais ceux-ci n'étaient pas informatifs.

En 1998, Tsuchiya et associés ont décrit (138), chez un patient, une délétion del(10q)(23.2-q23.33). L'absence d'histoire familiale rend probable son caractère *de novo*. Néanmoins, cela n'a pas pu être confirmé, car un caryotype n'a pas pu être réalisé chez le père.

A l'âge de 2 ans, l'enfant présentait des rectorragies. Les explorations digestives ont retrouvé la présence de polypes depuis le duodénum jusqu'au rectum. L'examen anatomopathologique a permis de confirmer qu'il s'agissait de polypes hamartomateux. A l'âge de 5 ans, l'enfant présentait une macrocéphalie avec un PC à 53,6 cm (+2 DS), un retard mental, une dysmorphie faciale (voir tableau 4) ainsi que des signes cutanés.

Les auteurs ont réalisé une FISH en utilisant des YACs (yeast artificial chromosome). La région contenant le gène *PTEN* apparaît délétée. Les auteurs ont étudiés l'hybridation de YACs de part et d'autre du gène *PTEN* et notamment dans la région dans laquelle est située le gène *BMPRIA*, non encore identifié. *A posteriori*, il apparaît comme étant délété.

Un dernier article (139) rapporte le cas d'un enfant ayant présenté une macrocéphalie associée à une polypose intestinale profuse ayant nécessité la réalisation d'une colectomie. Au caryotype, une translocation déséquilibrée entre les chromosomes 9 et 10 a été mise en évidence, associée à une perte de matériel chromosomique en 10q23-q24. L'étude familiale indirecte réalisée était en faveur d'une délétion du gène *PTEN*. Le gène *BMPRIA* n'a pas été exploré.

	Jacoby et al, 1997 (137)	Arch et al, 1997 (75)	Tsuchiya et al, 1998 (138)
Antécédents familiaux	RAS	RAS	RAS
Grossesse	RAS	RAS	Non décrit
Accouchement	Eutocique	Césarienne à 42 semaines	Non décrit
Mensurations			
• A la naissance	Non décrit	4,904 (+4,5 DS) 58,5 (+4 DS) 42 (+6 DS)	Non décrit
• A 10 mois	8,1 (-1, 5 DS) 66,7 (-2 DS) 42,8 (-2,5 DS)	Non décrit	Non décrit
Signes cliniques			
Macrocéphalie	Non	Oui	Oui
Polypose juvénile	Oui	Oui	Oui
Signes d'appel	Rectorragies	Rectorragies	Rectorragies
Age de début	1 an	18 mois	2 ans
Localisation	côlon (pas de résultats d'endoscopie digestive haute)	duodénum et côlon	duodénum → rectum
Histologie	Hamartome	Hamartome	Hamartome
Lipomes	Non décrit	Oui	Non décrit
Signes cutanés	« Pattern » veineux proéminent au niveau thoracique et abdominal	Hémangiomes 2 tâches au niveau de la base de la colonne vertébrale et de l'aîne	Lentigines du pénis Macules hyper pigmentées cutanées (cuisse et thorax) Plage d'hypopigmentations (addomen)
Signes neurologiques	Retard de développement moteur et de langage	Retard de développement moteur et de langage Hypotonie	Retard mental
Signes de dysmorphie faciale	Hypertélorisme Apex du nez large Philtrum long Oreilles hypoplasiques Peau du cou en excès	Front proéminent Hypertélorisme Hypoplasie de la face moyenne	Bosses frontales Hypertélorisme Face moyenne du visage plate Arête du nez plate Puits pré auriculaires bilatéraux
Signes ophtalmologiques	Non décrit	Pseudocœdème papillaire bilatéral Anisométrie	Non décrit
Autres	Pieds bots Mains et pieds rebondis sur leur face dorsale Pieds courts et larges avec des doigts de pied boudinés Mains courtes et larges avec des phalanges distales courtes et la présence d'excès de peau Hypoplasie des muscles obliques abdominaux Insuffisance tricuspide	Macrosomie	Gencives fines Hyperpigmentation aux coins de la bouche Grosses phalanges distales au niveau des doigts Doigts de pied et ongles en forme de massue
Délétion	Del(10)(q22.3-q24.1)	Del(10)(q23.2-q24.1)	Del(10)(q23.2-q23.33)

Tableau 4 : Description des patients présentant une délétion visible en cytogénétique 10q23

Les tableaux cliniques des quatre enfants présentent de grandes similarités avec celui, en particulier digestif, présenté par les patients décrits dans cette thèse. Dans le second cas, étant donné la localisation de la délétion identifiée en cytogénétique, la question de l'existence d'une délétion du gène *BMPRIA*, associée à celle de *PTEN* qui a été confirmé, n'est pas évidente. Cependant, le tableau clinique est très évocateur de l'atteinte des deux gènes. De plus, la borne centromérique de délétion chez le troisième enfant, localisée en aval du gène *BMPRIA* sur la cytogénétique classique, concerne en fait ce gène lorsque des études de cytogénétique moléculaire sont réalisées. On peut donc se demander, pour le second patient décrit, si tel n'est pas également le cas.

D'autres délétions, visibles en cytogénétique et impliquant la région 10q23 (140) ont été identifiées. Les 3 enfants porteurs de ces délétions avaient en commun un retard de croissance staturo-pondéral, un léger hypertélorisme et un retard de développement psycho-moteur. Il existait des signes cliniques partagés par deux enfants sur les trois comme des anomalies oculaires (glaucome, colobome irien), des signes de dysmorphie faciale, une microcéphalie, une scoliose ou une cyphose. Pour l'un des enfants, un diagnostic de prolapsus rectal avait été posé mais il n'a pas été évoqué la réalisation d'explorations digestives complémentaires.

Un cas de délétion 10q22 a également été décrit par Cook et associés en 1999 (141). L'enfant présentait essentiellement un retard de croissance et de développement, un hypertélorisme, des oreilles ayant une orientation postérieure, une rétrognathie, et une clinodactylie du cinquième doigt.

Enfin, d'autres délétions impliquant notamment la région 10q23 ont été décrites (142, 143). Mais les éléments des descriptions cliniques ne suffisent pas à tirer des conclusions sur d'éventuelles similarités avec les cas des patients décrits dans cette thèse.

Ces délétions, caractérisées par un caryotype standard, semblent moins s'intégrer aux précédents tableaux. La position des délétions pourrait du fait de la résolution du caryotype standard (environ 5 Mb), ne pas impliquer les gènes *PTEN* et *BMPRIA*.

Enfin, comme nous l'avons vu dans le paragraphe consacré aux mutations du gène *PTEN*, identifiées dans le syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba, trois délétions de la région comprenant le gène *PTEN* ont été mises en évidence par des techniques de biologie moléculaire. Mais les éléments apportés par l'article ne permettent pas la comparaison avec les enfants présentés dans cette thèse (7).

## **MISE EN EVIDENCE ET CARACTERISATION D'UNE DELETION 10q CHEZ LES PATIENTS**

Les signes cliniques des enfants ont donc fait évoquer un syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba associé à une polypose juvénile infantile. Le premier cas rapporté a été celui de l'enfant PE. Le diagnostic de Bannayan-Riley-Ruvalcaba a tout d'abord été suspecté. Une recherche de mutation ponctuelle dans *PTEN* a donc été réalisée et s'est révélée négative. Une étude indirecte a été entreprise afin de rechercher une délétion du gène. Comme nous le verrons plus loin, l'absence chez l'enfant de marqueurs génétiques au locus *PTEN* de l'un des deux parents était en faveur d'une telle délétion.

Puis, le cas d'une seconde enfant, MM, s'est présenté. Un avis a été pris auprès des généticiens médicaux devant les ressemblances présentées entre son tableau clinique et celui de l'enfant PE. Devant ces similitudes, une étude indirecte a d'emblée été réalisée. Les résultats permettaient de suspecter une délétion du gène *PTEN*.

Enfin, un troisième enfant, LA, a été adressé au service de génétique. Une recherche préalable de mutation dans les gènes *APC* et *SMAD4* avait été réalisée par l'équipe du Docteur Olschwang à l'Hôpital Saint-Antoine, à Paris. Celle-ci était négative. Chez cet enfant, l'étude indirecte au locus *PTEN* n'a pas été faite du fait de l'indisponibilité des prélèvements parentaux.

Alors que les recherches de mutations ponctuelles et les caryotypes standard étaient normaux, c'est donc l'étude indirecte qui a permis de suspecter une délétion du gène *PTEN*, tout au moins chez les deux premiers enfants. Celle-ci a été ensuite confirmée par FISH. A noter, qu'une fois que *BMPRIA* fut identifié, l'étude

indirecte a été reprise chez ces enfants, du fait de leur tableau clinique et de la position proche de ce gène par rapport à *PTEN*. Celle-ci n'a pas été contributive.

La FISH, réalisée sur sang périphérique, a donc recherché conjointement une délétion des gènes *PTEN* et *BMPRIA*. Celle-ci a été confirmée chez les deux enfants.

Concernant LA, elle a permis de mettre en évidence, toujours sur sang périphérique, que seules 17% des cellules présentaient une délétion des deux gènes.

Une étude par puces à ADN associée à un travail de biologie moléculaire ont été ensuite réalisés afin de délimiter plus précisément et de positionner les bornes des délétions. Nous allons aborder les différentes étapes et en particulier l'étape de biologie moléculaire qui fait l'objet du travail de cette thèse d'exercice.

## **Etude indirecte**

### **1. Principe de la technique**

Le principe de l'étude indirecte consiste à étudier la transmission, d'une génération à l'autre, de marqueurs polymorphes dans une région d'intérêt ; ici, les locus des gènes *PTEN* et *BMPRIA*. Sous réserve de l'informativité de ces marqueurs, c'est-à-dire de distinguer les quatre haplotypes parentaux, l'étude permet de mettre en évidence la non contribution de l'haplotype de l'un des deux parents voire des deux parents, et part là, la mise en évidence d'une délétion *de novo*, chez l'enfant étudié.

Chez les enfants PE et MM, les locus des gènes *PTEN* et *BMPRIA* ont donc été explorés.

## 2. Résultats

L'analyse réalisée chez PE, sur sang périphérique, retrouve un seul allèle parental, d'origine maternelle, situé dans la région télomérique de *PTEN*. Ce résultat ne permet pas de conclure mais est compatible avec une délétion *de novo*, au moins partielle, du gène *PTEN*. L'étude n'est pas informative pour le gène *BMPRIA* (Figure 8).

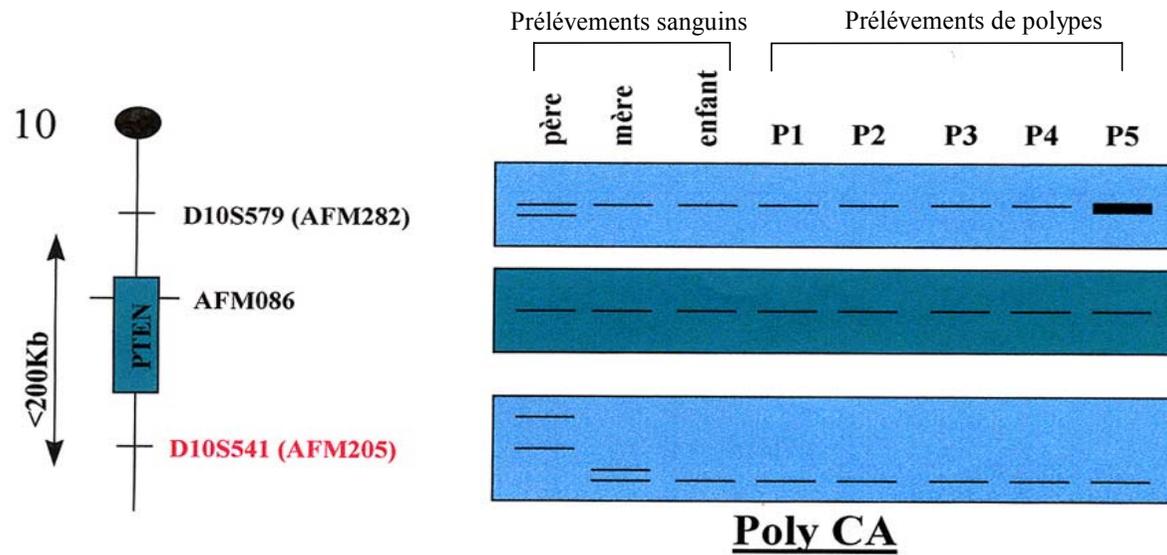
L'étude a de plus été faite sur cinq fragments de polypes. Le marqueur télomérique du gène *PTEN* est présent en un seul exemplaire parental, confirmant le résultat précédent. On a de plus l'information qu'il y a persistance de l'allèle non muté au niveau somatique et donc une absence de perte du second allèle, tout au moins dans la région qui a pu être explorée.

L'analyse réalisée chez MM, sur sang périphérique, met en évidence l'absence de marqueurs d'origine maternelle, situés dans la région entre les gènes *BMPRIA* et *PTEN*. Les marqueurs intragéniques des gènes *PTEN* et *BMPRIA* sont non informatifs. Ces résultats ne permettent pas de conclure mais sont compatibles avec une délétion *de novo*, au moins partielle, du gène *PTEN* et/ou *BMPRIA* (Figure 9).

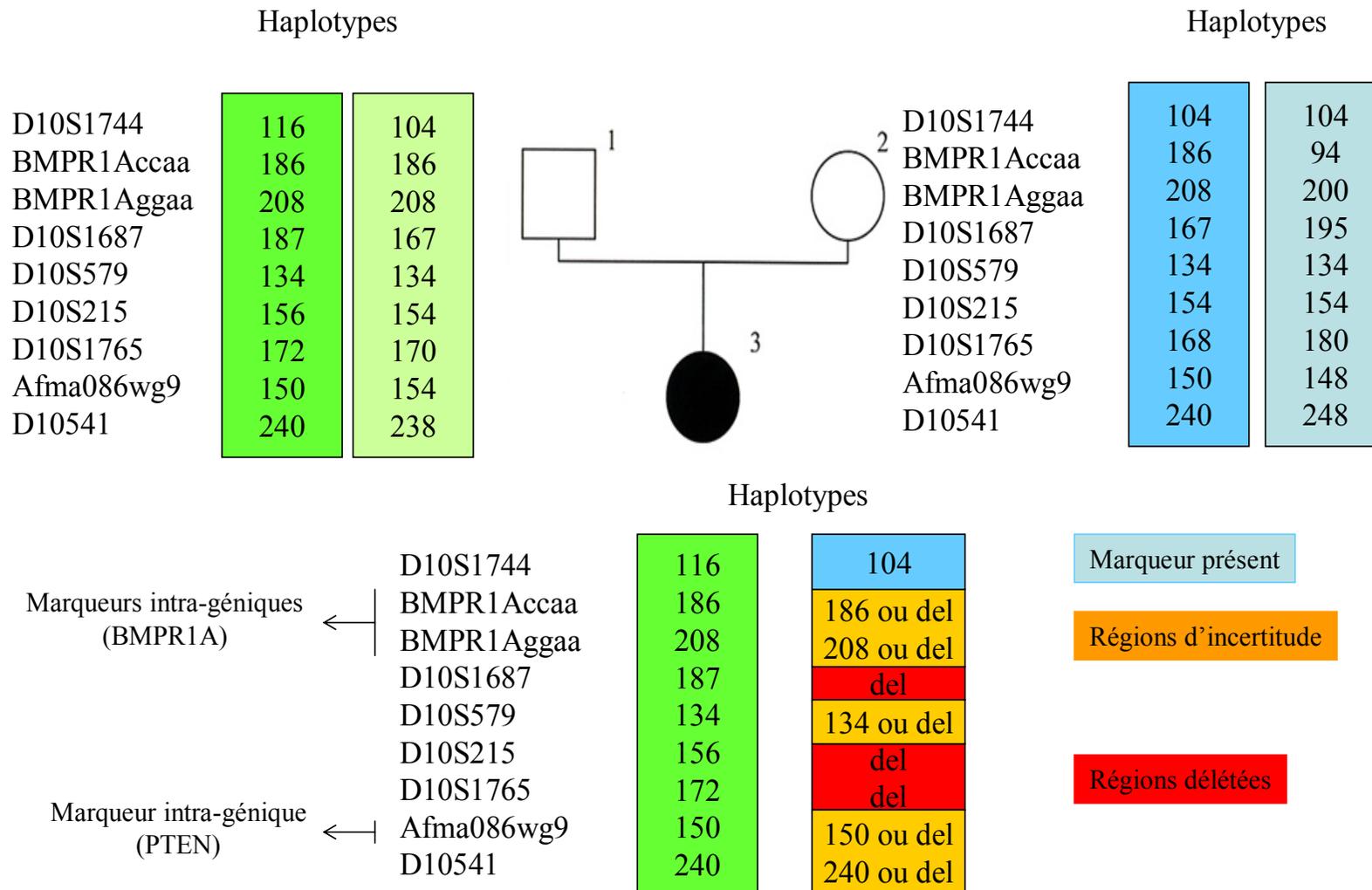
## Cytogénétique moléculaire

L'ensemble des techniques de cytogénétique moléculaire repose sur la propriété de l'ADN à pouvoir se dénaturer et se renaturer dans des conditions précises de température, de salinité et de pH. La plus connue est la FISH. Elle comporte 3 étapes :

- dénaturation de l'ADN et de la sonde (lorsqu'elle est sous forme double brin).
- hybridation de la sonde sur l'ADN cible.
- révélation de la sonde qui peut être directe ou indirecte selon le type de marquage des sondes.



**Figure 8 :** Résultats de l'étude indirecte de l'enfant PE



**Figure 9** : Résultats de l'étude indirecte de l'enfant MM

Les sondes sont des fragments d'ADN dans lesquels ont été introduites des bases nucléotidiques couplées à un composé repérable (l'ADN est marqué). Différents types de marquages sont possibles. Initialement, les sondes étaient marquées par des composés radioactifs (sondes chaudes), puis par des composés non radioactifs (sondes froides). Les sondes froides ont tout d'abord utilisées comme moyen de marquage des haptènes, comme la biotine ou la digoxygénine, qui étaient révélées par des procédés enzymatiques en raison de leur affinité pour des protéines, comme l'avidine, couplées à un fluorochrome. On parlait alors de révélation indirecte. Actuellement, on utilise des sondes marquées directement par incorporation de nucléotides couplés à une molécule fluorescente. La révélation est donc directe. Le marquage des sondes peut se faire essentiellement par 3 méthodes : « nick-translation », « random-priming » ou « polymerase chain reaction » (PCR).

Plusieurs types d'exploration sont possibles avec les techniques de cytogénétique moléculaire. Pour ce travail, nous en avons utilisés deux : la technique de FISH et la technique de puce à ADN (CGH array).

## **1. La FISH (fluorescent in situ hybridization)**

### **a. Principe de la technique**

Classiquement, la FISH correspond à l'hybridation moléculaire d'une sonde (séquence d'ADN marquée généralement par un fluorochrome) spécifique d'une région du génome sur les chromosomes en métaphase d'un patient. Les cytogénéticiens utilisent en général des BACs (bacterial artificial chromosome) comme sondes pour la FISH. Celles-ci correspondent à des régions génomiques précises. On peut ainsi préciser si ces régions sont en nombre normal ou non ou si elles sont remaniées.

La FISH a été réalisée selon les protocoles standard (144). Nous avons utilisé comme sondes les BACs RP11-411A19 contenant une partie de la séquence du gène *BMPRIA* et le BAC RP11-60C5 contenant la séquence du gène *PTEN*.

Le BAC contenant la séquence du gène *PTEN* a été marqué par « nick-translation », par un fluorochrome dont le spectre d'émission émet dans le vert (FITC) et la sonde subtélomérique du chromosome 10p (YAC 889C10) qui nous a servi de témoin, par un fluorochrome dont le spectre d'émission émet dans le rouge (Texas Red).

Le BAC contenant la séquence du gène *BMPRIA* a été marqué par un fluorochrome dont le spectre d'émission émet dans le vert (FITC). Nous n'avons pas utilisé de sonde contrôle pour cette manipulation.

Les sondes ont été déposées sur la lame, sur laquelle les métaphases du patient avaient été étalées. Après ajout d'un tampon d'hybridation, une lamelle y a été apposée. Les sondes et les chromosomes ont été codénaturés, puis on a laissé les sondes s'hybrider pendant 24 heures à 37°C. Après avoir ôté la lamelle, la lame a été rincée dans une solution de lavage stringente. Enfin, les chromosomes ont été contre colorés par du DAPI (4',6-Diamidino-2 Phenyl-Indole dihydrochloride) à 0,8mM, puis repris dans une solution d'antifade, qui permet de limiter la perte de la fluorescence dans le temps. La lecture des lames a été effectuée sur un microscope à épifluorescence à l'aide de filtres spécifiques.

Lorsque le BAC rencontre sa séquence complémentaire sur les chromosomes, il s'hybride et nous observons alors deux signaux. Lorsqu'il existe une délétion de l'ensemble de la séquence, le BAC ne s'hybride pas et nous n'observons qu'un seul signal sur l'un des deux chromosomes.

## **b. Résultats**

L'hybridation *in situ* du BAC RP11-60C5 sur les métaphases des deux patientes montre la présence d'un seul signal d'hybridation au niveau des chromosomes 10. L'hybridation *in situ* de la sonde subtélomérique du 10p montre, quant à elle, un signal sur les deux chromosomes (sonde témoin). Il existe donc une délétion du gène *PTEN* sur l'un des deux chromosomes 10, c'est-à-dire à l'état hétérozygote (Image 1).

L'hybridation *in situ* du BAC RP11-411A19 sur les métaphases des deux patientes montre un signal asymétrique sur le chromosome 10 en 10q23.2 sur l'un

des deux chromosomes suggérant une délétion hétérozygote d'une partie recouvrant le BAC, et par là de *BMPRIA*. Nous observons également une cross-hybridation sur les deux chromosomes 10, proche du centromère (Images 2).

On retrouve donc, pour les deux patientes, par la technique de FISH, une délétion complète du gène *PTEN* et une délétion, au moins partielle, du gène *BMPRIA*. Pour ces deux enfants, l'utilisation des puces à ADN nous a permis de préciser et de localiser les bornes des délétions.

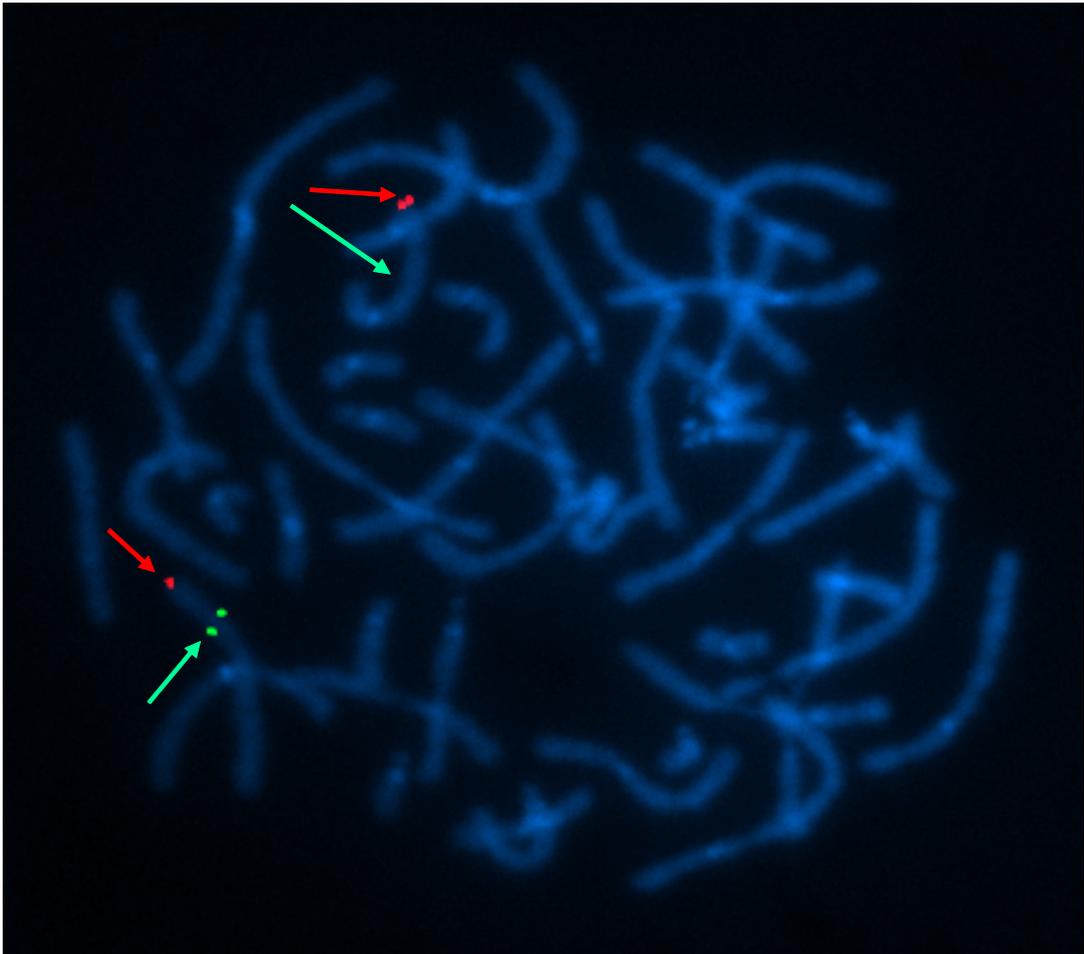
Concernant LA, la FISH met en évidence une absence de signal au niveau des *loci PTEN* et *BMPRIA*, dans 17% des cellules. Cette absence complète de signal est en faveur d'une délétion de plus grande taille que celle des deux autres patientes (Images 3).

## **2. Les puces à ADN (« CGH array »)**

Les puces à ADN permettent de quantifier le nombre de copies présentes dans des régions chromosomiques. La résolution de cette technique dépend avant tout du nombre et de la taille des fragments génomiques présents sur la puce. Celle-ci est en générale de l'ordre de 1 Mb en moyenne. C'est-à-dire que des sondes d'environ 150 à 200 kb sont réparties tous les mégabases environ, sachant que les régions d'intérêt peuvent être davantage représentées.

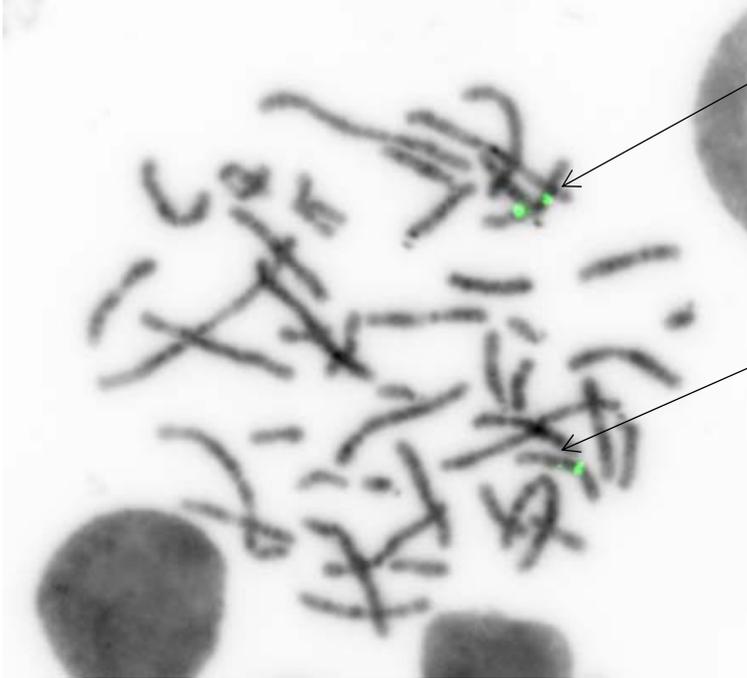
### **a. Principe de la technique**

La technique est calquée sur le principe de la CGH (145). La CGH repose sur la cohybridation compétitive de deux sondes sur des métaphases d'un témoin normal. Une sonde correspond à l'ADN génomique du patient (ADN test), marqué par un fluorochrome émettant dans le vert et l'autre sonde à l'ADN génomique d'un sujet normal (ADN de référence), marqué par un fluorochrome émettant dans le rouge. Une différence dans le nombre de copies d'ADN entre la sonde étudiée et la sonde de référence, pour un locus donné, modifie le rapport d'intensité des deux



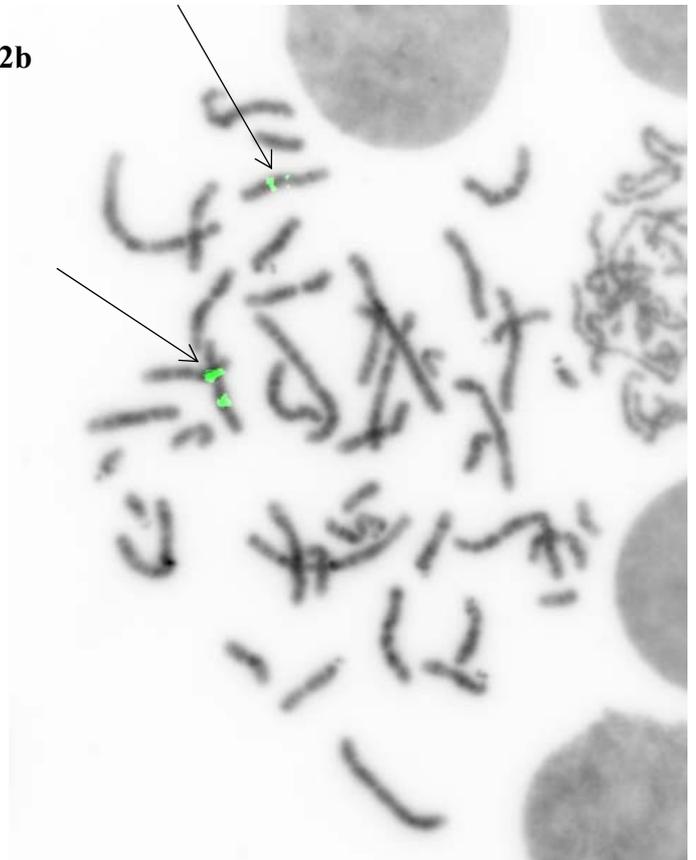
**Image 1** : Résultats des FISH du **BAC RP11-60C5 (PTEN)** et du **YAC 889C10 (tel 10p (contrôle))** pour les enfants PE et MM

**Images 2 :** Résultats de la FISH du **BAC RP11-411A19 (BMPR1A)** pour les enfants PE et MM



**Image 2a**

**Image 2b**



**Images 3 :** Résultats des FISH du **BAC 60C5 (PTEN)** et du **YAC 889C10 (tel 10p (contrôle))** pour l'enfant LA



**Image 3a**



**Image 3b :** 20% **BAC 60C5 del**

fluorochromes. Une des limites de cette technique est son niveau de résolution qui ne dépasse que rarement 5 Mb.

Dans la technique de puces à ADN, l'ADN à tester et l'ADN témoin sont cohybridés, non pas sur des préparations chromosomiques mais sur des fragments d'ADN génomique humain dont l'ensemble représente une partie, voire la totalité du génome. Ceux-ci sont déposés par un "spotter", sur une lame de verre prétraitée. Cet ADN est en général extrait de BACs, de PACs (plasmid artificial chromosome) ou de cosmides qui sont déposés en duplicat ou en triplicat de façon aléatoire.

Ce travail a été effectué en collaboration avec l'équipe de génétique de *Leuven en Belgique*, qui a mis au point la puce qui a été utilisée (146). Les clones proviennent du Sanger et sont annotés sur le site ENSEMBL. Brièvement, celle-ci est une puce pangénomique d'une résolution de 1 Mb. Les clones présents sur la puce sont de l'ADN issus de BAC ou de PACs, déposés en duplicat.

Les ADN à tester et l'ADN témoin (sondes tests et témoins) sont marqués par « random priming » par des dCTPs marqués à la Cyanine 3 ou la Cyanine 5. Des quantités égales d'ADN à tester et témoin ainsi marquées, sont mélangées avec du Cot-1 (saturant les séquences répétées des ADN tests et témoins), puis sont précipités à l'éthanol. Le précipitat est ensuite resuspendu dans un tampon d'hybridation. En parallèle, la lame est prétraitée, afin de saturer les séquences répétées des BACs et PAC, par une solution de blocage contenant du Cot-1 et du sperme de saumon, qui est précipitée à l'éthanol, puis laquelle on ajoute un tampon d'hybridation. Ensuite, les sondes et la solution de blocage sont dénaturées. Puis, les sondes sont préhybridées pendant que l'on bloque la lame avec la solution de blocage. Les sondes sont ensuite déposées sur la lame, sur laquelle une lamelle est apposée. Puis, celle-ci est placée dans une chambre humide à 37°C, pendant 2 à 3 nuits. Après avoir ôté la lamelle, la lame est lavée dans plusieurs solutions stringentes puis scannée. Les résultats peuvent alors être normalisés et interprétés.

Le rapport de fluorescence est calculé pour chaque fragment d'ADN déposé. L'interprétation est rapide et automatisable. Un logiciel calcule le rapport de fluorescence rouge/vert.

Il y a une phase de normalisation pendant laquelle le logiciel utilisé prend en compte l'existence du bruit de fond et va le soustraire du *ratio* d'intensité entre la fluorescence émise par l'ADN témoin et celui du patient.

La majorité du génome étant en nombre normal de copie, les *ratios* d'intensité des patients par rapport au contrôle sont égaux pour la majorité des spots de la puce, le *ratio* entre les deux doit donc être proche de 1. Pour des problèmes de représentation graphique, la plupart des auteurs utilisent le log 2 de ce *ratio*, qui est donc égal à 0. La moyenne des déviations standard (DS) des différents spots peut donc être calculée. Il est considéré que les clones relevants sont ceux qui sont au-dessus ou au-dessous de la valeur représentée par 4 déviations standard. Si le *ratio* est supérieur à + 4 DS, il y a un gain pour les clones concernés. Si le *ratio* est inférieur à - 4 DS, il y a une perte pour les clones concernés.

Le logiciel intègre les différentes données, la valeur moyenne des ratios d'intensité de chaque duplicat, leur localisation et le BAC auquel elle correspond. Cela permet d'avoir une carte génomique avec les différentes régions de gain et de perte génomique de l'ADN testé.

## b. Résultats

Nous représentons les BACs nous ayant permis d'approcher la localisation des points de cassure.

Nom des BACs présents sur la puce	Position Ensembl (version 34 du NCBI) (en nucléotide, sur le chromosome 10)	Signal observé pour l'enfant PE	Signal observé pour l'enfant MM
RP11-396M20	88054883-88222662	présent	présent
RP11-165M8	89206513-89271554	déléte	déléte
RP11-380G5	89271555-89473090	déléte	déléte
RP11-765C10	89471091-89514108	déléte	déléte
RP11-304I5	90229545-90273000	déléte	présent
RP11-399O19	90271016-90458328	déléte	présent
RP11-80H5	90989861-91138256	présent	présent

La technique de FISH a été reprise secondairement à l'intérieur des régions d'intérêt afin de préciser la borne télomérique. Les BACs qui ont été utilisés sont :

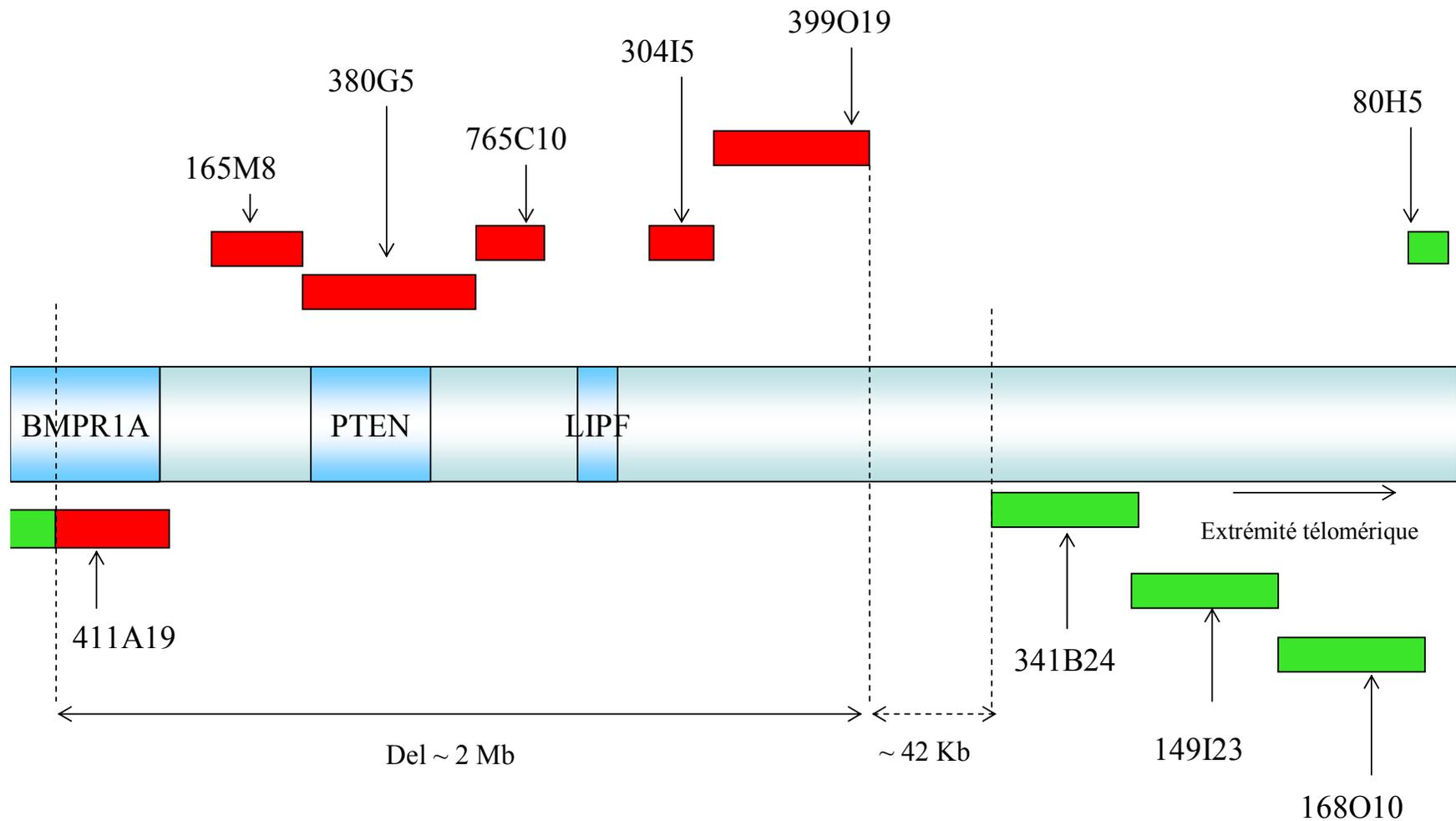
Nom des BACs utilisés	Position Ensembl	Enfant PE	Enfant MM
RP11-813O3	89512109-89676026	Non étudié	déléte
RP11-416C17	89738486-89889120	Non étudié	déléte
RP11-186O14	90069719-90231544	Non étudié	présent
RP11-341B24	90499641-90647791	présent	Non étudié
RP11-149I23	90645792-90815195	présent	Non étudié
RP11-168O10	90813196-90938087	présent	Non étudié

Il existe donc une délétion estimée de 2 Mb pour l'enfant PE entre le RP11-411A19 et le BAC RP11-341B24 et de 1,2 Mb pour l'enfant MM entre le RP11-411A19 et le BAC RP11-186O14 (Figures 10 et 11).

Au niveau centromérique, on considère puisque le signal apparaît hybridé de façon asymétrique pour le BAC RP11-411A19, que le point de cassure se situe dans cette région pour les deux enfants.

Au niveau télomérique : pour l'enfant PE, il reste une région de 42 kb à explorer. Le point de cassure se situe dans la région entre le BAC RP11-399O19 et le BAC RP11-341B24. Pour l'enfant MM, il reste une région de 180 kb à explorer. Le point de cassure se situe dans la région entre le BAC RP11-416C17 et le BAC RP11-186O14.

Bien évidemment, il faut prendre en compte le niveau de résolution de la FISH, qui peut difficilement détecter des signaux pour des séquences inférieures à 20 kb. Les points de cassure peuvent être dans les intervalles déterminés par les BACs *stricto sensu* mais également dans les séquences des BACs, localisés de telle façon que les variations des signaux d'hybridation ne soient pas détectables.

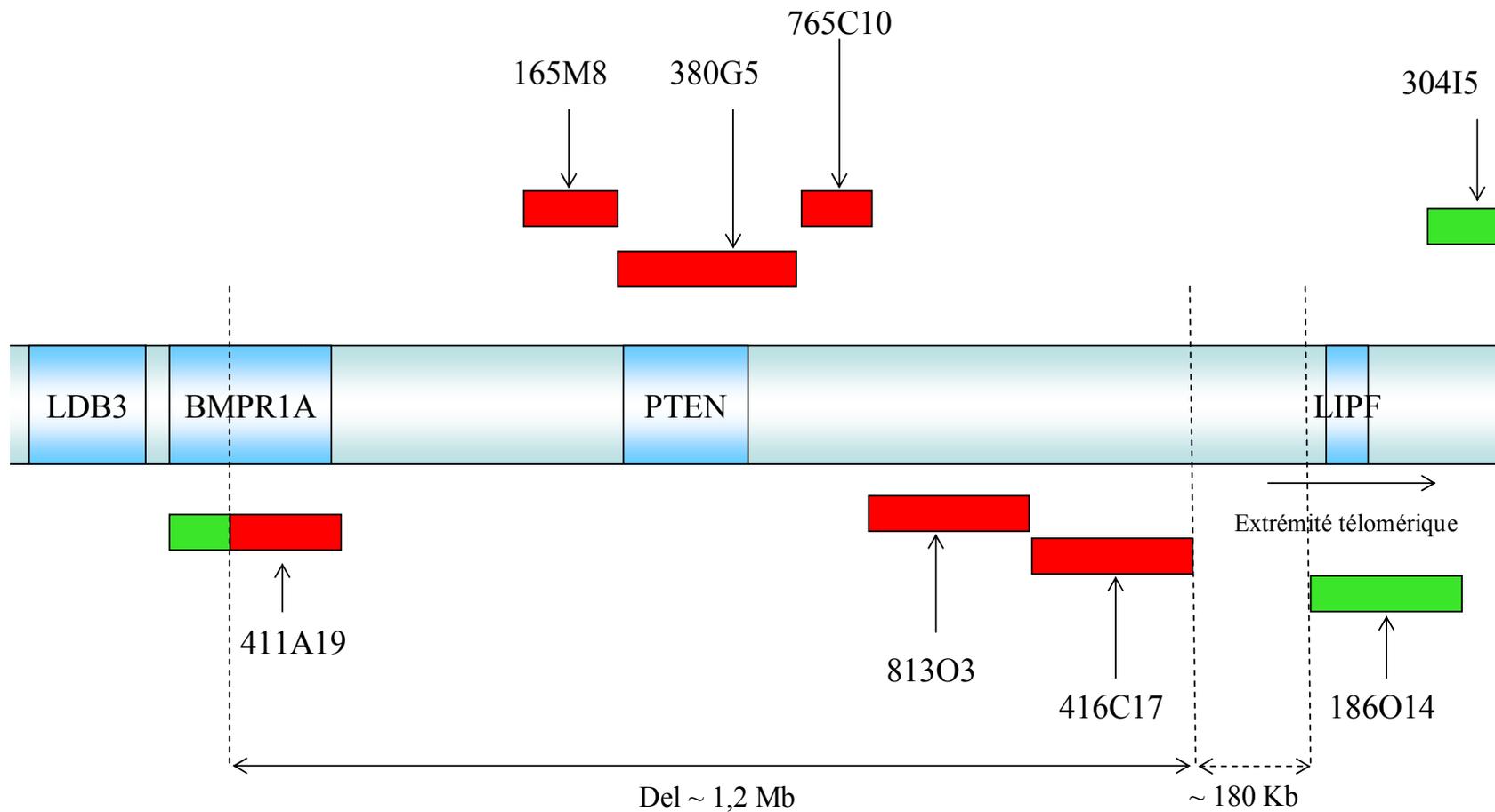


**Figure 10 :**

Représentation schématique des résultats après les techniques de FISH et de puces à ADN pour l'enfant PE.

Au-dessus de la région d'intérêt, sont indiqués les BAC spottés sur la puce; en-dessous, ceux utilisés en FISH.

En rouge sont représentés les BAC interprétés comme étant délétés soit en FISH, soit par puces à ADN; En vert, ceux qui apparaissent conservés; En bicolore, ceux qui apparaissent partiellement délétés.



**Figure 11 :**

Représentation schématique des résultats après les techniques de FISH et de puces à ADN pour l'enfant MM.

Au-dessus de la région d'intérêt, sont indiqués les BAC spottés sur la puce; en-dessous, ceux utilisés en FISH.

En rouge sont représentés les BAC interprétés comme étant délétes soit en FISH, soit par puces à ADN; En vert, ceux qui apparaissent conservés; En bicolore, ceux qui apparaissent partiellement délétes.

# Etude moléculaire : approche par PCR multiplexe/ Chromatographie liquide (MP/LC)

## 1. Principe de la technique

La PCR multiplexe/ Chromatographie liquide (MP/LC) est une technique semi-quantitative, basée sur l'amplification de segments d'ADN par PCR multiplexe, que l'on va ensuite séparer par chromatographie liquide haute performance de paires d'ions en phase inverse (IP-RP-HPLC) en condition fluorescente (147).

La sensibilité apportée par la détection en fluorescence permet de travailler en condition semi-quantitative et en conséquence le signal obtenu des amplicons est corrélé au nombre de copies du fragment d'ADN amplifié.

### PCR multiplexes

L'ADN est extrait du sang périphérique des parents et de l'enfant. Les échantillons d'ADN sont portés à la même concentration (50ng/μL).

Les PCR multiplexes (biplexes, triplexes) sont réalisées avec des amorces non marquées choisies à l'aide du logiciel *Primer 3*. Afin de s'affranchir des rendements inter-échantillons des PCR, un exon du gène *RBI* est ajouté à chaque multiplexe à titre de contrôle interne. L'enzyme utilisée est une Taq Gold (*AmpliTaq Gold DNA Polymerase* ; Applied Biosystems). Les fragments sont amplifiés dans un thermocycleur GeneAmp 9700 PCR system (Applied Biosystems), programmé à 25 cycles afin de rester dans la phase exponentielle d'amplification.

### **IP-RP-HPLC (chromatographie liquide haute performance de paires d'ions en phase inverse)**

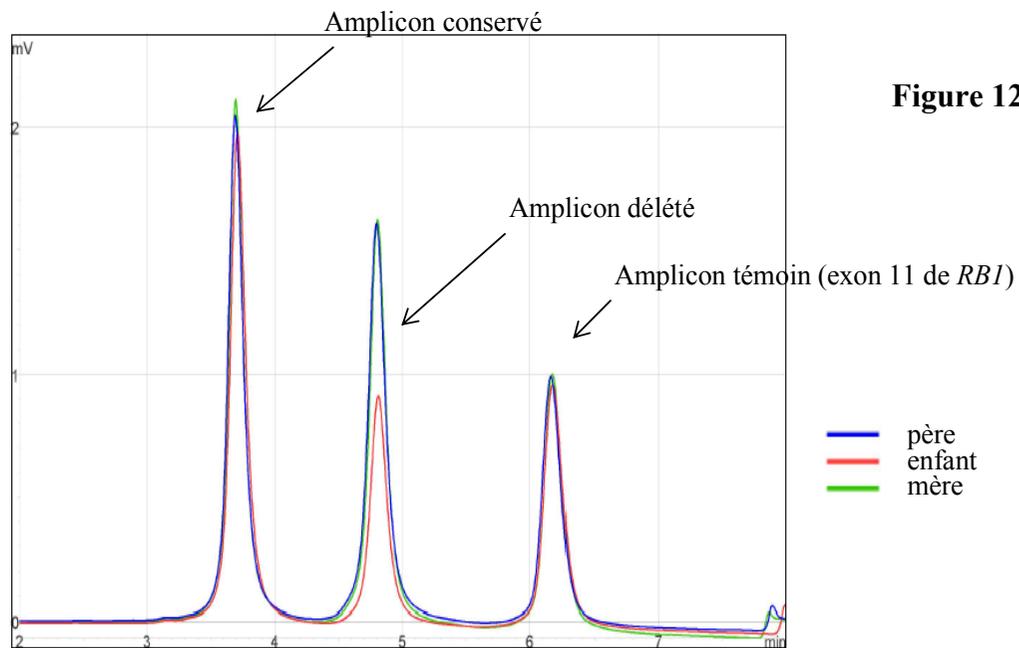
Les produits PCR sont ensuite séparés par IP-RP-HPLC sur un Wave 3500 HT (Transgenomic).

Le principe est fondé sur la séparation physique, en conditions non dénaturantes, de différents fragments d'ADN en phase mobile par rétention différentielle sur phase solide. La phase solide est une colonne de chromatographie composée d'une matrice de polystyrène-divinylbenzène alkylé (DNA-sep, Transgenomic). La phase mobile, qui entraîne les fragments d'ADN sur la colonne, est composée de triéthylammonium (TEAA) à 0,1 M. L'ADN, chargé négativement interagit avec les charges positives du TEAA qui lui interagit par ses trois groupements triéthyl avec la surface hydrophobe de la phase solide. Cette interaction est modifiée par un gradient croissant de tampon à 25% d'acétonitrile qui rompt la liaison ADN-colonne.

L'élution en conditions non dénaturantes (50°C) permet la séparation des fragments d'ADN double brin en fonction de leur taille, indépendamment de leur composition en bases. En effet, la rétention est essentiellement déterminée par la charge des polynucléotides qui détermine le nombre de paires d'ions formé. Les fragments les plus petits s'éluent donc avant les plus grands.

Après la séparation chromatographique, les produits élués non marqués sont mélangés à une solution contenant du SYBR Green I (Molecular Bioprobes), produit intercalant de l'ADN. Ce composant fluoresce lorsqu'il est lié à des complexes d'acides nucléiques, ce qui permet donc la détection des produits de PCR élués avec une grande sensibilité.

Les données sont ensuite analysées avec le logiciel Wave Navigator (Transgenomic). La hauteur et l'aire des pics sont mesurées. L'ajustement des chromatogrammes est réalisé grâce au pic témoin (exon de *RBI*), puis, les résultats des parents et de l'enfant sont comparés. Lorsque la région correspondant à un amplicon est délétée sur l'un des deux allèles, la hauteur de pic de l'enfant correspondra à la moitié de la hauteur de pic des parents (Figure 12).



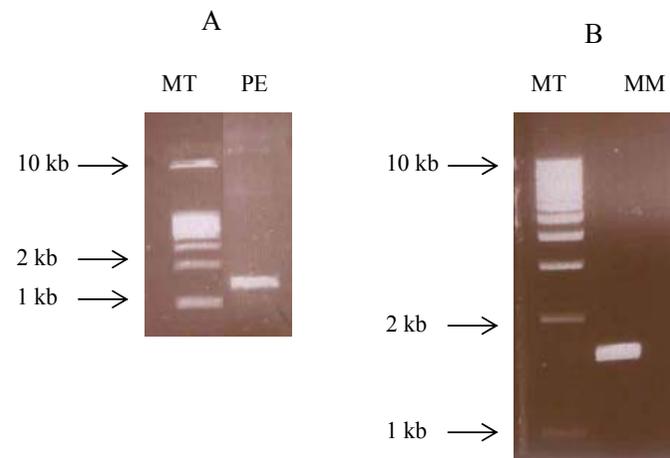
**Figure 12 :** Représentation des résultats obtenus en MP/LC

**Figure 15 :** Résultats des PCR *long range*

A : Gel enfant PE

B : Gel enfant MM

(MT : marqueur de taille)



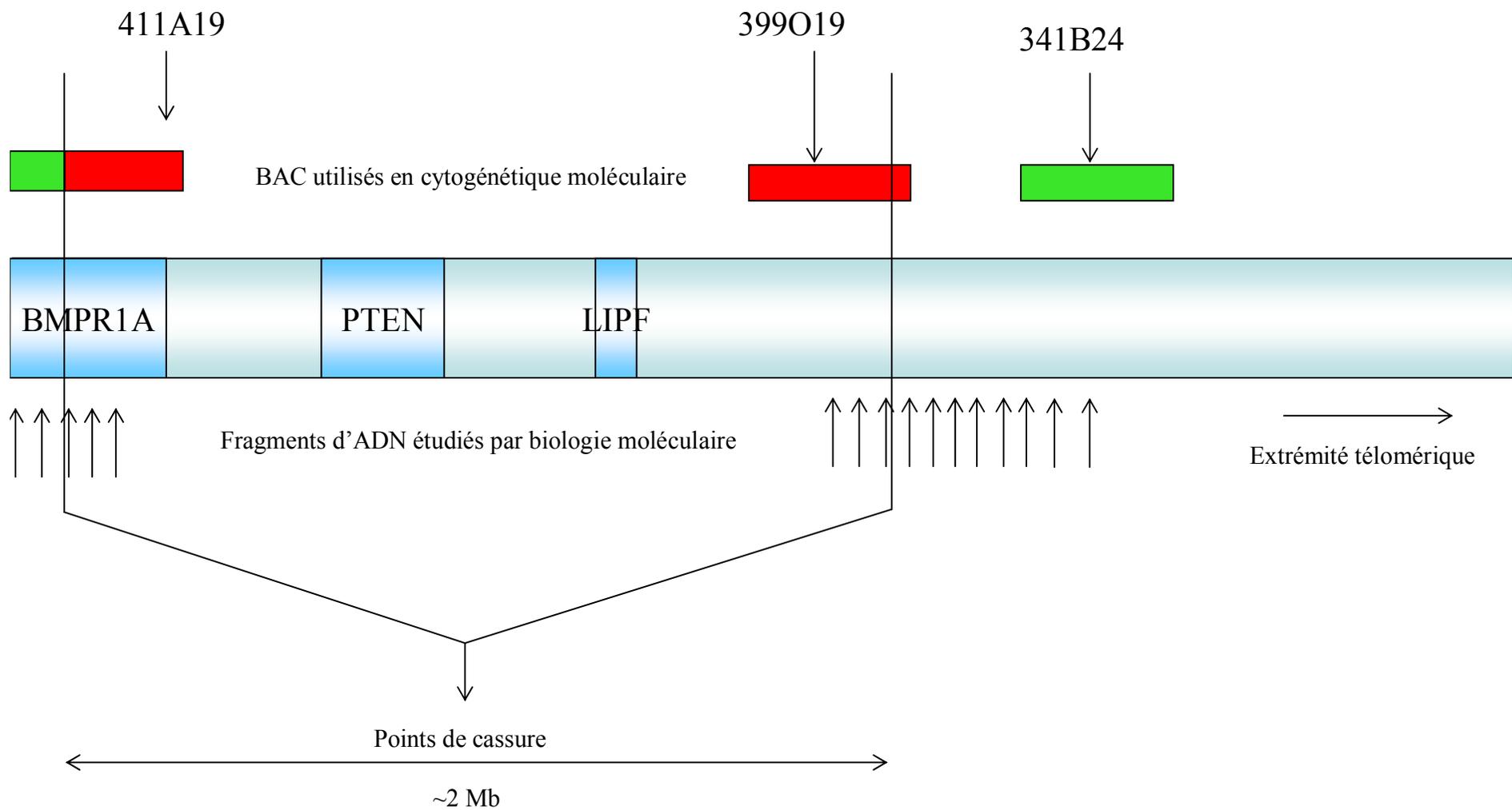
L'approche MP/LC a permis de préciser, pour chaque enfant, la localisation des bornes et donc, la taille de chaque délétion. Pour cela, cent couples d'amorces ont été nécessaires pour les deux patients. Les régions d'intérêt ont été explorées petits bouts par petits bouts ; les amplicons représentant autant de petites fenêtres qui nous ont, pas à pas, permis de définir, pour chaque patient, un intervalle minimal contenant les points de cassure (Figures 13 et 14). Le fragment correspondant a ensuite été amplifié en PCR « long range ». Puis, le produit obtenu a été séquencé dans les deux sens.

## 2. Résultats

La technique de MP/LC a localisé les points de cassure dans un intervalle d'environ 6 kb pour l'enfant PE et de 5 kb pour l'enfant MM. Brièvement, aiguillés par les résultats de la FISH, nous avons commencé par rechercher les points de cassure centromériques dans le gène *BMPRIA*. Nous avons donc d'emblée étudié l'exon putatif 2 et l'exon 3. L'exon 2 était conservé chez l'enfant PE, délété chez l'enfant MM. L'exon 3 était quant à lui délété chez les deux enfants. Pour l'enfant PE, nous avons donc progressé, depuis l'exon 3, vers l'extrémité centromérique du gène pour finalement mettre en évidence une borne de délétion dans l'intron 2. Pour l'enfant MM, nous avons progressé en étudiant l'intron 1 du gène *BMPRIA*. Puis, nous avons utilisé la séquence du BAC RP11-420K10 et celle du gène *LDB3* dans lequel nous avons identifié la borne de délétion centromérique de MM.

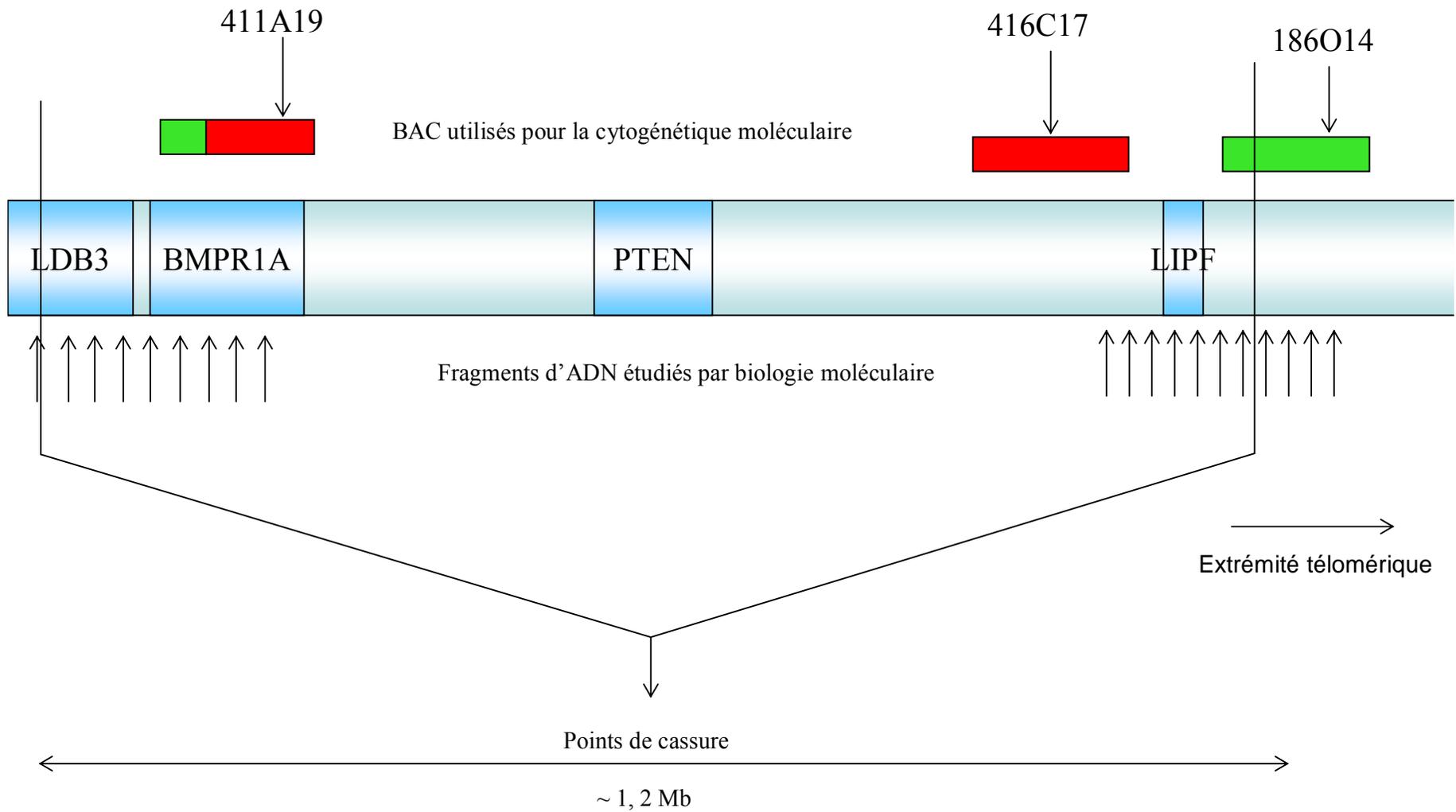
En ce qui concerne l'extrémité télomérique, nous avons étudié plusieurs gènes de la région délimitée par la cytogénétique. Les résultats issus de ces études nous ont conduit à choisir des couples d'amorces et à étudier les séquences du BAC RP11-399O19 pour l'enfant PE et du BAC RP11-186O14 pour l'enfant MM. En allant de proche en proche, nous avons réussi à identifier des bornes télomériques chez les deux enfants.

Pour l'enfant PE, le point de cassure centromérique se situe dans l'intron 2, putatif, du gène *BMPRIA* et le point de cassure télomérique, dans le BAC RP 11-399O19.



**Figure 13 :**

Représentation schématique de la position des BAC, utilisés en cytogénétique moléculaire, qui ont permis de choisir la position des amorces utilisées pour la MP/LC. Représentation schématique de la position des fragments d'ADN étudiés en MP/LC, pour l'enfant PE (50 amplicons ont été étudiés). Indication des positions des points de cassure identifiés par MP/LC.



**Figure 14 :**

Représentation schématique de la position des BAC, utilisés en cytogénétique moléculaire, qui ont permis de choisir la position des amorces utilisées pour la MP/LC. Représentation schématique de la position des fragments d'ADN étudiés en MP/LC, pour l'enfant MM (50 amplicons ont été étudiés). Indication des positions des points de cassure identifiés par MP/LC

Pour l'enfant MM, le point de cassure centromérique, dans le gène *LDB3* se trouve en amont du gène *BMPRIA* et le point de cassure télomérique dans le BAC RP 11-186O14.

Après l'étape de MP/LC, la PCR « long range » réalisée a fourni pour les enfants PE et MM respectivement des fragments d'environ 1,4 kb et 1,7 kb (Figure 15).

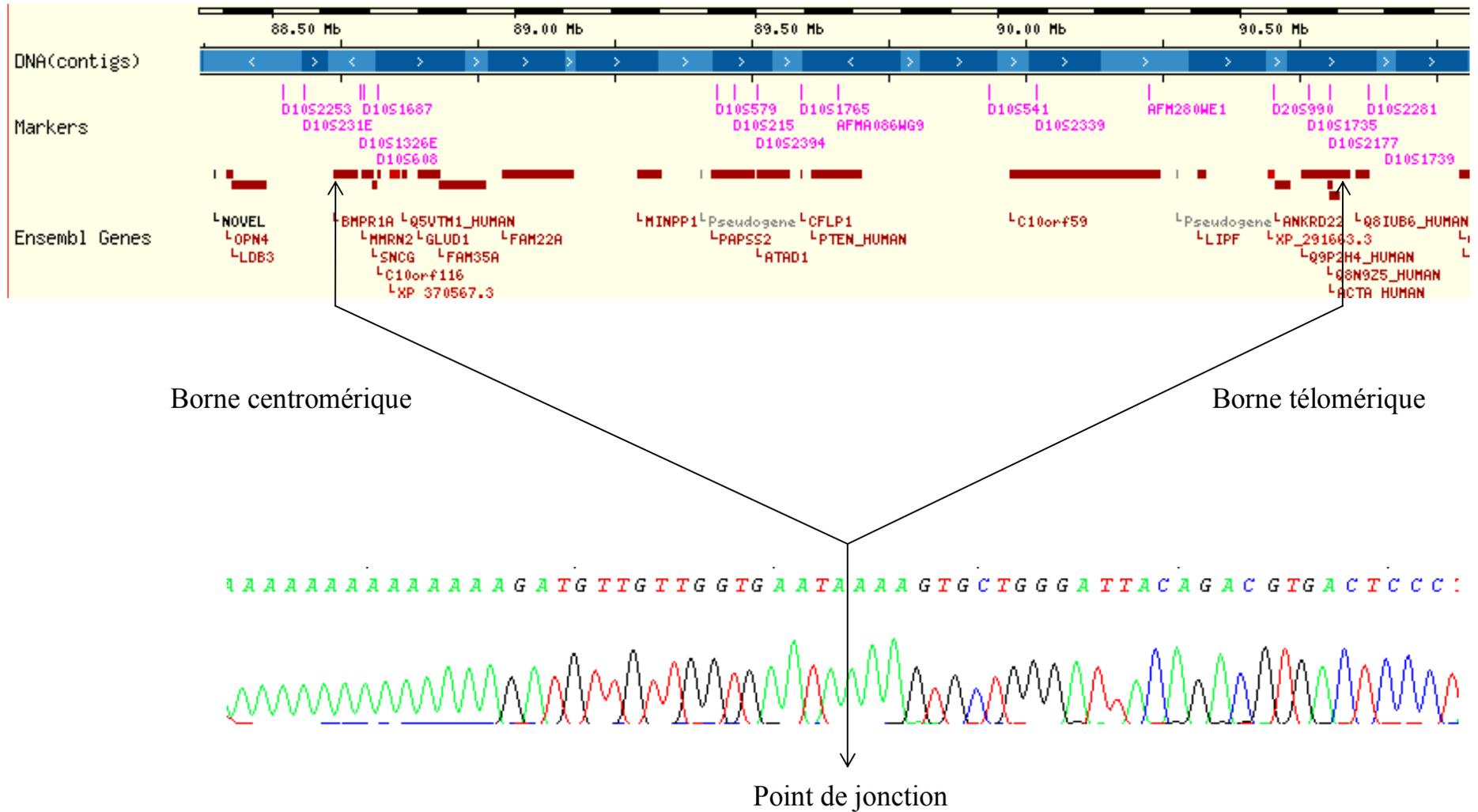
Ces produits ont ensuite été séquencés dans les deux sens. Ceci nous a permis d'identifier au nucléotide près les points de cassure. Pour l'enfant PE, le point de cassure centromérique se situe dans l'intron 2 putatif, à 2,5 kb en amont du début de la séquence codante du gène *BMPRIA* et au niveau télomérique dans le BAC RP 11-399O19. Il se localise plus exactement à la fin du deuxième tiers du BAC, à 5 kb environ en aval du gène *ACTA2* (Figure 16).

Pour l'enfant MM, le point de cassure centromérique se situe dans l'intron 1 du gène *LDB3*, gène se trouvant en amont du gène *BMPRIA* et au niveau télomérique, dans le BAC RP 11-186O14. Il se situe plus exactement dans le premier tiers du BAC, à 19 kb environ en aval du gène *LIPF* (Figure 17).

En prenant en compte les localisations des points de cassure identifiés, nous avons donc exploré, en MP/LC, au niveau centromérique, une région d'environ 36 kb pour l'enfant PE et de 166 kb pour l'enfant MM. Pour l'extrémité télomérique, les régions étudiées s'étendaient sur 118 kb pour l'enfant PE et 220 kb pour l'enfant MM.

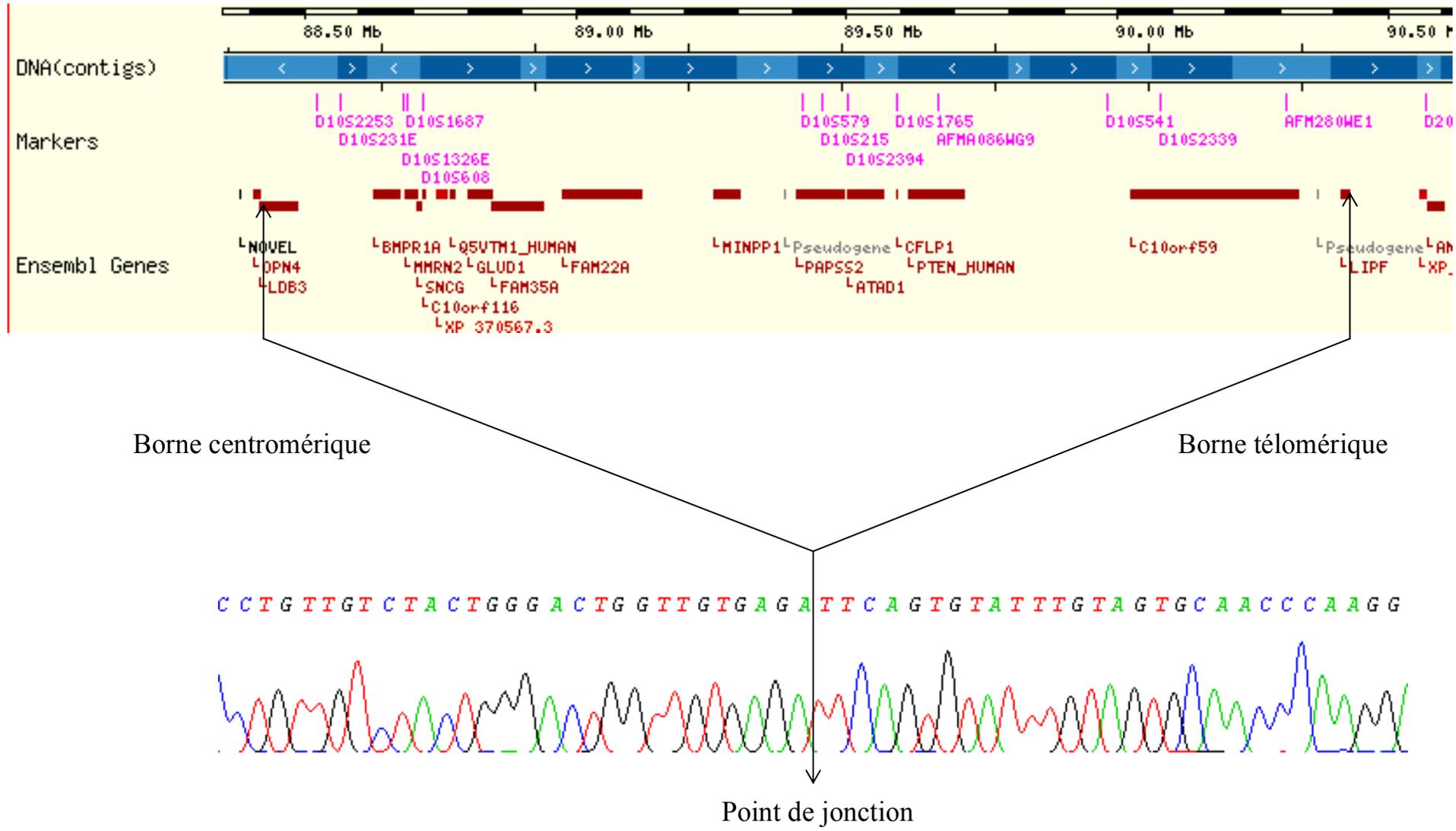
Cette méthode a permis l'identification précise de la localisation des points de cassure et donc de l'étendue des zones délétées (Figures 19 et 20). Elle est de 2 Mb chez les deux enfants. Plusieurs gènes, gènes prédits ou transcrits sont localisés dans cette délétion. Ce sont, de l'extrémité centromérique à télomérique, pour l'enfant PE, *BMPRIA*, *MMRN2*, *SNCG*, *C10orf116*, *Q5VTM1*, *GLUD1*, *FAM35A*, *FAM22A*, *MINPP1*, *PAPSS2*, *ATAD1*, *CFLP1*, *PTEN*, *C10orf59*, *LIPF*, *ANKRD22*, *Q9P2H4*, *ACTA2* et *Q8N9Z5*. Pour l'enfant MM, nous retrouvons *LDB3*, *BMPRIA*, *MMRN2*, *SNCG*, *C10orf116*, *Q5VTM1*, *FAM35A*, *FAM22A*, *MINPP1*, *PAPSS2*, *ATAD1*, *CFLP1*, *PTEN*, *C10orf59* et *LIPF*.

# Enfant PE



**Figure 16 :** Représentation de la position des délétions et des gènes impliqués (selon ENSEMBL, version 35 du NCBI). Présentation des points de cassure.

Enfant MM



**Figure 17 :** Représentation de la position des délétions et des gènes impliqués (selon ENSEMBL, version 35 du NCBI). Présentation des points de cassure.

# DISCUSSION

## Approche méthodologique

### 1. La MP/LC

La MP/LC utilise la robustesse de la IP-RP-HPLC pour la séparation et la quantification. Celle-ci est combinée à la sensibilité importante de la détection fluorescente de l'ADN (supérieure d'un facteur 100 à la détection UV), qui permet de travailler en phase exponentielle d'amplification. En conséquence, il n'y a pas de saturation des signaux. Ceux-ci sont proportionnels au nombre de copies de fragments génomiques amplifiés. Notons que l'addition du SYBR Green I après la séparation chromatographique ne peut altérer ni la cinétique des PCR, ni la séparation des fragments, ni la résolution.

Cette méthode est simple à mettre en oeuvre et fiable. Nous n'avons eu aucun résultat erroné pour les différentes régions génomiques étudiées, ce qui a permis une interprétation rapide des résultats. Cependant, afin de garantir leur interprétation optimale, un minimum de mise au point a parfois été nécessaire pour la réalisation des PCR multiplexes.

Le détecteur fluorescent acheté, le coût de fonctionnement de la technique est faible car les amorces sont standard, non marquées, non purifiées.

L'approche qui a été choisie est une approche « globale » qui a été de définir une dizaine de couples d'amorces réparties régulièrement dans les régions d'intérêt. Une fois ces régions restreintes, nous redéfinissons une dizaine de couples d'amorces dans les nouveaux intervalles. Cette stratégie nous a certainement permis de gagner du temps. En effet, comme nous l'avons déjà dit, certaines PCR multiplexes nécessitent un minimum de mise au point pour que les résultats soient clairement interprétables. Le fait d'en choisir toute une batterie permet de vérifier la cohérence des résultats obtenus.

L'autre approche, plus « séquentielle », aurait été de couper la région d'intérêt, à chaque fois en deux, et d'étudier un fragment d'ADN dans chacune de ces régions.

Mais, il faut pouvoir interpréter les résultats de la façon la plus exacte possible sous peine d'étudier ensuite « la mauvaise région ». Cette méthode permet certainement d'utiliser moins de couples d'amorces mais demande plus de temps. En effet, comme dit précédemment, les résultats peuvent parfois être difficiles à interpréter, nécessitant alors une ou plusieurs vérifications.

Cette technique nous a donc permis de mettre en évidence les bornes dans lesquelles nous avons secondairement identifié les points de cassure.

## **2. Approche combinée cytogénétique moléculaire/ biologie moléculaire**

Les résultats obtenus montrent une concordance globale entre ceux obtenus en cytogénétique moléculaire et en biologie moléculaire.

Les amorces ont été choisies en fonction de la position des BACs et des gènes sur le génome, apportées par les bases de données bioinformatiques, disponibles sur internet. Cependant, il est parfois difficile d'avoir un aperçu très précis de la localisation des gènes et des BACs dans les régions d'intérêt. En effet, le positionnement des BACs varie en fonction de l'évolution des connaissances, notamment de l'avancée du séquençage des BACs et du génome. De plus, leur séquence est donnée soit dans le sens 3' → 5' ou dans le sens 5' → 3'. Enfin, selon les bases de données bioinformatiques, les informations données peuvent être différentes. La position d'un gène peut-être apportée par rapport à sa séquence génomique, ou codante. Lorsque l'on choisit des amorces dans une région, ces différences comptent. Il est, en conséquence, important de bien interpréter les informations à disposition et ne pas hésiter à se référer directement aux séquences génomiques des BACs et des gènes d'intérêt, à les comparer et à les « blaster » sur la séquence du génome, afin de pouvoir positionner au mieux les séquences qui nous intéressent.

Lors de notre travail, nous avons pour l'essentiel travaillé à partir de la base de données ENSEMBL (version 34 et 35 du NCBI).

Concernant l'étude de l'extrémité centromérique de *BMPRIA* pour l'enfant MM, il y a eu une phase de réévaluation. En effet, sur la base de données

ENSEMBL, il existait un chevauchement de 5 kb entre le gène *BMPRIA* et le BAC RP11-420K10 dont la séquence nous a servi à choisir des amorces pour l'étude en MP/LC. Hors en prenant en compte les deux exons non codants putatifs, il s'avère que celles du gène *BMPRIA* et du BAC 11-420K10 se chevauchent presque entièrement ; la base ENSEMBL nous donnant la position de la séquence transcrite et non de la séquence génomique dans son intégralité. Les amorces utilisées étaient donc dès le départ bien plus en amont que nous ne le pensions.

Les résultats ont montré qu'il existait une concordance parfaite entre les résultats obtenus par cytogénétique et par biologie moléculaire en ce qui concerne l'extrémité télomérique des deux enfants. Nous avons vu précédemment que, sur la puce à ADN de l'enfant PE, un signal en faveur d'une délétion du BAC RP11-399O19 était retrouvé, et que, pour l'enfant MM, en FISH, un signal d'hybridation du BAC RP11-186O14 existait. Ces résultats ne sont pas contradictoires. En effet, le point de cassure de l'enfant PE se situe à la fin de la séquence du BAC et peut donc expliquer que le signal obtenu sur la puce soit en faveur d'une délétion. Quant au point de cassure de l'enfant MM, celui-ci se situe tout au début de la séquence du BAC RP11-186O14 ; ce qui peut expliquer que ce BAC s'hybride en FISH.

Par contre en ce qui concerne l'extrémité centromérique, nous avons observé un signal d'hybridation asymétrique du BAC RP11-411A19 pour les deux enfants. Hors, en biologie moléculaire, le point de cassure retrouvé chez l'enfant MM se situe en amont de la séquence du BAC RP11-411A19, au niveau du gène *LDB3*. Il existait donc, pour la borne de ce patient une discordance entre les résultats obtenus par FISH et par biologie moléculaire. En essayant de l'expliquer, nous avons « blasté » l'ensemble du BAC par fragment de 25 kb sur l'ensemble du génome. Nous avons remarqué qu'il existe une région de 25 kb présentant une homologie de plus de 96% avec une région située à environ 13 Mb de l'extrémité centromérique du gène *BMPRIA*. Cette région n'est pas délétée chez les deux enfants. De plus, le point de cassure de l'enfant PE se situe à 6,6 kb du début du BAC, expliquant difficilement qu'il puisse exister une hybridation de ce BAC au niveau du fragment non délété. Nous avons donc probablement observé en FISH, non une asymétrie de signal secondaire à une délétion partielle du gène *BMPRIA*, mais à la cross-hybridation du fragment de 25 kb dans une région non délétée chez les deux

patients ; la cross-hybridation ne se révélant qu'à la faveur de la délétion du gène *BMPRIA*, et donc de la perte du signal spécifique d'hybridation. Nous n'avons pas observé ce signal chez LA. La différence de qualité d'hybridation des lames explique probablement l'absence de signal.

Dans tous les cas, nous mettons donc en évidence, grâce à la collaboration de la cytogénétique et de la biologie moléculaire, chez deux des enfants, une délétion de 2 Mb en 10q23 emportant un certain nombre de gènes dont *PTEN* et *BMPRIA*.

## **Discussion moléculaire**

### **1. Les points de cassure**

Les fragments délétés ont une taille de 2 Mb pour les deux patientes ; la localisation exacte des deux points de cassure étant différente entre les deux enfants.

Afin d'expliquer la mécanique moléculaire impliquée dans ces délétions, nous avons recherché des régions impliquées dans les réarrangements moléculaires (séquences répétées) à l'aide des logiciels CLUSTALW et BLAST. L'analyse des régions délétées et de leurs régions flanquantes par CLUSTALW a permis d'identifier des séquences répétées mais leur localisation ne permet pas de rendre compte, par un modèle simple, du réarrangement observé. Aucune boîte de recombinaison n'a été observée (148-150).

En ce qui concerne le patient LA, celui-ci est donc porteur d'une délétion des gènes *PTEN* et *BMPRIA* à l'état de mosaïque dans 17% des cellules du sang périphérique. Il n'a donc pas été possible de caractériser les bornes exactes de cette délétion par les techniques de biologie moléculaire. Etant donné la sévérité du tableau digestif, on peut se demander si cette mosaïque n'est pas plus importante ou si elle n'est pas absente au niveau des cellules digestives. Une étude par FISH est en cours.

## 2. Gènes impliqués dans les délétions

Ces délétions impliquent de nombreux gènes, des gènes prédits, des séquences géniques définies par leur transcrit. De l'extrémité centromérique à télomérique, ce sont, pour l'enfant PE, *BMPRIA*, *MMRN2*, *SNCG*, *C10orf116*, *Q5VTMI*, *GLUD1*, *FAM35A*, *FAM22A*, *MINPP1*, *PAPSS2*, *ATAD1*, *CFLP1*, *PTEN*, *C10orf59*, *LIPF*, *ANKRD22*, *Q9P2H4*, *ACTA2* et *Q8N9Z5*. Pour l'enfant MM, il existe également une délétion du gène *LDB3*. Mais, *ANKRD22*, *Q9P2H4*, *ACTA2* et *Q8N9Z5* ne sont pas concernés.

Certains de ces gènes sont caractérisés. Mis à part *BMPRIA* et *PTEN*, nous les avons répertoriés dans le tableau 5.

Certains, non rapportés dans le tableau 5, sont putatifs. Ils ont été identifiés par des approches systématiques, cherchant à identifier les séquences codantes (banques d'ADNc). Ce sont les séquences codantes *ATAD1* (ATPase family AAA domain containing1), *CFLP1* (cofilin pseudogene 1), *ANKRD22* (ankirin repeat domain 22), *Q8N9Z5* (151, 152). Leurs fonctions ne sont pas connues. Enfin, certaines séquences géniques putatives, définies par leur transcrit potentiel, sont localisées dans notre région d'intérêt. Elles ont été identifiées par leurs homologies avec des séquences protéiques connues ou parce que la séquence génomique possède des cadres ouverts de lecture. Leurs fonctions ne sont pas connues. Ce sont les séquences *C10orf116* (chromosome 10 open reading frame 116), *Q5VTMI*, *FAM35A* (family with sequence similarity 35, member A), *FAM22A* (family with sequence similarity 22, member A), *C10orf59* (chromosome 10 open reading frame 59) et *Q9P2H4*.

Les gènes répertoriés dans ce chapitre, si l'on exclut *BMPRIA* et *PTEN*, au vue des connaissances actuelles et de leurs implications connues en pathologie humaine semblent peu intervenir dans le phénotype présenté par nos patients.

Cependant, comme on l'a indiqué dans le tableau 5, des mutations constitutionnelles, en particulier des mutations faux-sens, situées dans des domaines conservés, à l'état hétérozygote, dans le gène *LDB3*, sont mises en évidence dans des cas de myocardiopathie dilatée et de myopathie myofibrillaire. Même si le début de ces pathologies se situe vers 50 ans, un article rapporte un cas de

myocardiopathie dilatée chez un enfant de quelques mois porteurs d'une mutation dans ce gène (153). Cet article semble toutefois soumis à controverse (154) car les caractéristiques cliniques et échocardiographiques des myocardiopathies sont insuffisamment décrites.

L'enfant MM a bénéficié d'une échographie cardiaque. Celle-ci était normale. L'absence de pathologie cardiaque, bien qu'on ne puisse éliminer une apparition plus tardive, n'est pas inattendue, puisque aucune mutation tronquante inactivatrice n'a été rapportée dans ces tableaux.

Même si l'on ne peut exclure complètement la participation de certains de ces gènes au phénotype des patients, il est évident que deux d'entre eux jouent un rôle fondamental : les gènes *BMPRIA* et *PTEN*.

Gènes	Protéines codées, fonction et implication éventuelle en pathologie humaine
<i>LDB3</i> ( <i>LIM domain binding 3</i> ) ou <i>ZASP</i> ou <i>CYPHER</i>	Appartient à une famille de protéines contenant un domaine PDZ et un ou trois domaines LIM (155). Protéine du cytosquelette entrant dans la composition des lignes Z des muscles squelettique et cardiaque. Maintiendrait sa structure pendant la contraction musculaire. Serait impliquée dans une forme autosomique dominante de cardiomyopathie dilatée (156) et de myopathie fibrillaire (157).
<i>MMR2</i> ( <i>multimerin 2</i> )	Appartient à la famille des protéines EMILINs. Protéines de la matrice extra-cellulaire (158). Fortement exprimées pendant le développement, notamment au niveau cardio-vasculaire et dans les cellules mésenchymateuses. Fonction inconnue à ce jour. Non impliquée en pathologie humaine à ce jour.
<i>SNCG</i> ( <i>synuclein gamma</i> )	Protéine appartenant à la famille des synucléines. Protéines impliquées dans des maladies neurologiques. Rôle exact dans ces pathologies inconnu (159). Aussi connue sous le nom BCSG1 (gène spécifique de cancer du sein) car surexprimé dans les cancers du sein, mais également dans les cancers de l’ovaire en progression. Rôle potentiel de protéine chaperonne. Stimulerait le signal passant par les récepteurs $\alpha$ aux oestrogènes. Stimulerait la tumorigénèse mammaire en réponse aux oestrogènes (160).
<i>GLUD1</i> ( <i>glutamate deshydrogenase</i> )	Enzyme mitochondriale catalysant la déamination oxydative du 1-glutamate en 2-oxoglutarate (161). Impliquée dans le syndrome hyperinsulinisme-hyperammoniémie se transmettant selon un mode autosomique dominant, secondaire à l’activité excessive de l’enzyme par défaut du contrôle de son activité (162).
<i>MINPP1</i> ( <i>multiple inositol polyphosphate phosphatase</i> )	Protéine phosphatase. Hydrolyse le pentakisphosphate et l’hexakisphosphate (163, 164). Rôle dans la signalisation intracellulaire inconnu à ce jour. Rôle potentiel de ce gène dans des cancers folliculaires de la thyroïde (165).
<i>PPASS2</i> ( <i>3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthetase 2</i> )	Protéine impliquée dans la sulfatation des protéines en particulier celles de la matrice extracellulaire. Impliquée dans un syndrome de dysplasie spondyloépimétaphysaire de transmission autosomique récessive (166).
<i>LIPF</i> ou <i>HGL</i> ( <i>human gastric lipase</i> )	Lipase gastrique. Enzyme lipolytique, sécrétée par les cellules du fundus gastrique (167, 168). Rôle dans la digestion des triglycérides alimentaires au niveau gastrique et duodénale, en synergie avec la lipase pancréatique (169). Une augmentation de son taux semble compenser les déficits en lipase gastrique dans les pancréatites chroniques. Non impliquée en pathologie à ce jour.
<i>ACTA2</i> ( <i>actin alpha 2 smooth muscle aorta</i> )	Appartient à la famille des protéines d’actine, composants majeurs des microfilaments, intervenant dans le maintien de la forme et le mouvement des cellules. Isoforme d’actine exprimée dans le tissu musculaire vasculaire et les fibroblastes (170). Interviendrait dans la différenciation des cellules musculaires lisses (171) et dans l’activité contractile des myofibroblastes (172) .

Tableau 5 : gènes présents dans l’intervalle de délétion. Protéines pour lesquelles ils codent, fonction et implications éventuelles de ces protéines en pathologie humaine.

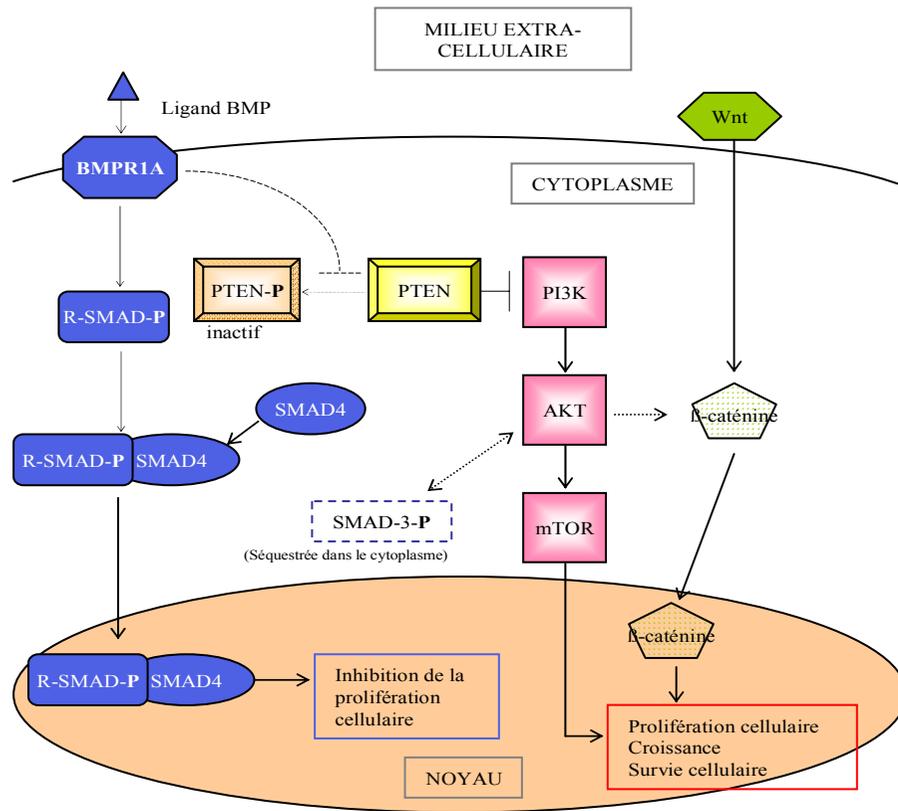
### 3. Explication physiopathologique :

La présence de la délétion des gènes *PTEN* et *BMPRIA* est corrélée à un tableau digestif d'une particulière gravité.

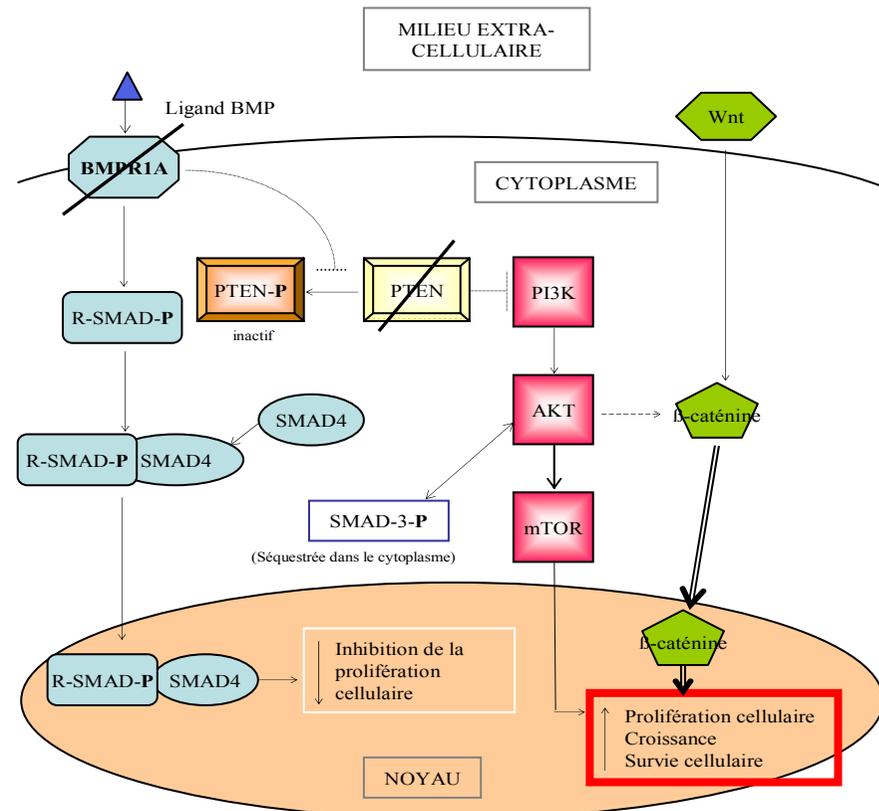
Comme on l'a déjà vu, la voie BMP, et en particulier le gène *BMPRIA*, est impliquée dans la genèse des polypes juvéniles. En effet, des souris invalidées, spécifiquement au niveau digestif, pour le gène *BMPRIA* développent des polypes ayant les caractéristiques de polypes juvéniles (68). On peut également aisément penser que *PTEN* ait un rôle à jouer dans cette genèse. En effet, même si les polypes ne dominent pas la symptomatologie clinique du syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba, ils sont fréquemment décrits.

Une délétion des gènes *BMPRIA* et *PTEN* va entraîner une diminution de l'activité de la voie TGF- $\beta$ /BMP, voie connue pour inhiber la prolifération cellulaire, et une augmentation de l'activité de la voie PI3K/AKT, voie impliquée dans la survie, la croissance et la prolifération cellulaire. Il est probable qu'il y ait une véritable coopération entre les deux voies (Figures 18), majorant l'effet de la perte de chacune, conduisant à ce tableau clinique gravissime sans commune mesure avec celui présenté dans chacune de ces pathologies. En effet, comme on l'a déjà évoqué, il existe des arguments biologiques en faveur de l'interaction de la voie TGF- $\beta$ /BMP sur la voie PI3K/AKT. L'exposition de lignées de cancer du sein MCF-7, à BMP2, provoque l'augmentation du taux de protéine PTEN, consécutive à une diminution de sa dégradation médiée par le protéasome (173). De plus, il a été montré que la voie BMP, dans les cellules souches intestinales, régulait négativement la  $\beta$ -caténine ; ceci passant par la régulation positive de l'activité de PTEN (68, 69, 136). Hors, la  $\beta$ -caténine a un rôle dans la prolifération cellulaire (174). De plus, des mutations gains de fonction de la  $\beta$ -caténine ou des mutations perte de fonction de ses régulateurs négatifs, tel *APC*, sont retrouvées dans le syndrome de polypose adénomateuse familiale (*APC*) et les cancers colorectaux sporadiques (175).

Inversement, il a été montré que la voie PI3K/AKT avait un effet régulateur sur la voie TGF- $\beta$ , activée par le ligand TGF- $\beta$ 1. Dans les cellules 293T (cellules



**Figure 18a :** situation d'équilibre dans une cellule souche intestinale  
 En rouge : activation de la prolifération cellulaire  
 En bleu : inhibition de la prolifération cellulaire



**Figure 18b :** interaction entre les voies BMP et PI3K/AKT.  
 Modèle proposé au niveau des cellules souches intestinales.  
 La délétion des gènes *BMPRI1* et *PTEN* conduit à la majoration de l'activité de la voie PI3K/AKT, activatrice de la prolifération cellulaire et à une diminution de l'activité de la voie BMP, inhibitrice de la prolifération cellulaire.

embryonnaires humaines de rein), l'apoptose médiée par la voie TGF- $\beta$  serait dépendante du taux d'AKT, qui se lierait à la protéine SMAD3 phosphorylée, l'empêchant ainsi de se transloquer au niveau du noyau et d'exercer son action transcriptionnelle (176). Néanmoins, il n'a pas été mis en évidence de régulation directe de la voie PI3K/AKT sur la voie BMP.

Même si les interactions entre ces voies de signalisation ne sont pas encore bien connues, il est évident que les différentes voies, telles que TGF- $\beta$ /BMP et PI3K/AKT, ne sont pas indépendantes l'une de l'autre. Elles sont très intriquées et régulent des phénomènes complexes. Leurs interactions et leurs rôles sont variables en fonction du temps, du type cellulaire et de l'environnement permettant le maintien de l'homéostasie cellulaire.

En ce qui concerne la physiopathologie des hamartomes, celle-ci est encore mal connue. L'hypothèse avancée dans la polypose juvénile, est que les mutations inactivatrices des composants de la voie BMP affectent la perception des signaux qu'envoient les cellules mésenchymateuses aux cellules épithéliales (135, 177). Un article récent montre que BMP4 est sécrétée par les cellules mésenchymateuses et que BMPRI1A est exprimée de façon importante dans les cellules souches intestinales (68). Nous faisons l'hypothèse que l'inactivation du gène *BMPRI1A* dans les cellules souches intestinales entraîne une altération de leur réponse aux signaux inhibiteurs sur la croissance cellulaire envoyés par les cellules mésenchymateuses avoisinantes ; ceci étant responsable du phénotype hamartomateux.

Récemment, Inoki et associés (178) proposent un modèle pouvant expliquer le lien entre certains syndromes hamartomateux (la sclérose tubéreuse de Bourneville, le syndrome de Peutz-Jeghers, les syndromes de Bannayan-Riley-Ruvalcaba et de Cowden). Ce lien passerait par les protéines mTOR, fondamentales dans la régulation de la croissance cellulaire, car elles activent indirectement la traduction de protéines telles que le protooncogène c-myc, la cycline D1, impliquée dans la régulation du cycle cellulaire. Les mutations constitutionnelles inactivatrices des gènes impliqués dans ces syndromes conduiraient à l'activation des protéines mTOR et donc à la régulation positive de la croissance cellulaire.

Il serait intéressant pour étayer la compréhension de la physiopathologie de la formation de polypes hamartomateux puis de leur éventuelle transformation en

adénocarcinome invasif, de rechercher la présence d'un second événement somatique au niveau des gènes *PTEN* et *BMPRIA* sur les deux types de tumeurs, et voir s'il existe une perte d'allèle dès le stade hamartome ou si celui-ci n'a lieu qu'au stade adénocarcinome. Nous avons un début de réponse pour le cas de l'enfant PE pour laquelle, dans les cinq fragments de polypes hamartomateux digestifs étudiés, il n'y a pas de perte d'allèle retrouvé. Mais cela ne concerne qu'un marqueur télomérique au gène *PTEN*. Concernant l'enfant MM, une étude par FISH sur un fragment de polype hamartomateux a été réalisée, montrant l'absence de perte du second allèle de *PTEN*. Dans ces deux cas, au stade polype hamartomateux chez ces patientes, les résultats sont en faveur d'un seul événement délétionnel, tout au moins au niveau du gène *PTEN*. Cependant, nous ne pouvons éliminer un autre mécanisme d'inactivation du second allèle (mutation ponctuelle, hyperméthylation du promoteur). De plus, en ce qui concerne l'approche par biologie moléculaire, pour laquelle la technique de microdissection n'a pas pu être utilisée, nous ne pouvons éliminer l'absence de cellules normales contaminantes dans nos prélèvements. Les résultats obtenus n'ont pas pu être comparés à ceux de polypes transformés, car de tels prélèvements ne sont pas disponibles. On s'attendrait, dans ces polypes, à retrouver une perte du second allèle de *PTEN*, voir de *BMPRIA*.

## Discussion nosologique

Les enfants décrits dans cette thèse présentaient un tableau de polypose juvénile infantile associée à des signes cliniques du syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba, en particulier une macrocéphalie. Comme on l'a vu, la polypose juvénile infantile se caractérise par sa sévérité, son extension à travers tout le tractus digestif (de l'estomac jusqu'au rectum) et son diagnostic avant l'âge de 1 an. Le pronostic est sombre. Cette polypose peut entraîner le décès des enfants avant l'âge de 2 ans.

Comme nous l'avons déjà vu, seuls quelques cas d'enfants atteints de polypose juvénile infantile ont été décrits dans la littérature. Ainsi, dans une revue de la littérature datant de 1975 (97), Sachatello a rapporté 7 cas d'enfants, parmi lesquels deux présentaient une macrocéphalie. Par ailleurs, trois autres cas d'enfants atteints d'une polypose juvénile infantile ont été décrits en 1997 par Jacoby (137) et Arch

(75) et en 1998 par Tsuchiya (138). Parmi ces trois cas, les deux derniers présentaient une macrocéphalie. En cytogénétique classique, une délétion 10q23 était retrouvée chez les trois enfants. Chez le dernier, si l'on reprend l'article dans lequel une FISH de la région contenant *PTEN* et *BMPRIA* a été réalisée, il existait, en analysant les résultats *a posteriori*, une délétion des deux gènes. Enfin, un dernier article (139) rapporte le cas d'un enfant ayant présenté une macrocéphalie ainsi qu'une polypose intestinale profuse ayant nécessité la réalisation d'une colectomie. Au caryotype, une translocation déséquilibrée entre les chromosomes 9 et 10 a été mise en évidence, associée à une perte de matériel chromosomique en 10q23-q24. L'étude familiale indirecte réalisée était en faveur d'une délétion du gène *PTEN*. Le gène *BMPRIA* n'a pas été exploré.

Nous faisons l'hypothèse que la polypose juvénile infantile est secondaire à la délétion des deux gènes *BMPRIA* et *PTEN*. Comme nous venons de le voir, des signes cliniques évocateurs du syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba, en particulier la macrocéphalie, ne sont pas toujours associés. Ceci n'est pas inattendu. En effet, comme nous l'avons évoqué, un ou des facteurs modificateurs interviennent probablement dans le déterminisme de ce syndrome. On pourrait imaginer que les enfants qui n'en sont pas porteurs, développeraient, plus tard, un syndrome de Cowden. Cette hypothèse est malheureusement difficile à confirmer du fait de la gravité du tableau digestif, conduisant dans la grande majorité des cas au décès des enfants en bas âge.

Le tableau clinique présenté par ces enfants correspond, en fait, à une entité différente d'un syndrome de gènes contigus. C'est une nouvelle pathologie connue sous le nom de polypose juvénile infantile. En effet, nous sommes en présence, non pas de la stricte association entre deux pathologies, la polypose juvénile et le syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba, mais devant une pathologie digestive dont la sévérité dépasse celle attendue par l'association de ces deux syndromes. Cette sévérité est secondaire à la coopération des deux voies de signalisation auxquels appartiennent les deux gènes délétés, *BMPRIA* et *PTEN*. Il serait intéressant de confirmer notre hypothèse en étudiant d'autres enfants atteints d'un phénotype similaire. Dans tous les cas, la mise en évidence de ces délétions par les techniques

de cytogénétique et de biologie moléculaire est un bel exemple de complémentarité entre les deux techniques.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Riley H, Jr., Smith W. Macrocephaly, pseudopapilledema and multiple hemangiomas; A previously undescribed hereditary familial syndrome. *Pediatrics* 1960;26(2):293-300.
2. Bannayan GA. Lipomatosis, angiomas, and macrencephalia. A previously undescribed congenital syndrome. *Arch Pathol* 1971;92(1):1-5.
3. Zonana J, Rimoin DL, Davis DC. Macrocephaly with multiple lipomas and hemangiomas. *J Pediatr* 1976;89(4):600-3.
4. Zonana JD, D.; Rimoin, D.L. multiple lipomas, hemangiomas and macrocephaly: an autosomal dominant hamartomatous syndrome. *Am J Hum Genet* 1975;27:97A.
5. Ruvalcaba RH, Myhre S, Smith DW. Sotos syndrome with intestinal polyposis and pigmentary changes of the genitalia. *Clin Genet* 1980;18(6):413-6.
6. Cohen MM, Jr. Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome: renaming three formerly recognized syndromes as one etiologic entity. *Am J Med Genet* 1990;35(2):291-2.
7. Marsh DJ, Kum JB, Lunetta KL, Bennett MJ, Gorlin RJ, Ahmed SF, et al. PTEN mutation spectrum and genotype-phenotype correlations in Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome suggest a single entity with Cowden syndrome. *Hum Mol Genet* 1999;8(8):1461-72.
8. Eng C. PTEN: one gene, many syndromes. *Hum Mutat* 2003;22(3):183-98.
9. Fargnoli MC, Orlow SJ, Semel-Concepcion J, Bologna JL. Clinicopathologic findings in the Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome. *Arch Dermatol* 1996;132(10):1214-8.
10. Zhou XP, Waite KA, Pilarski R, Hampel H, Fernandez MJ, Bos C, et al. Germline PTEN promoter mutations and deletions in Cowden/Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome result in aberrant PTEN protein and dysregulation of the phosphoinositol-3-kinase/Akt pathway. *Am J Hum Genet* 2003;73(2):404-11.
11. Gorlin RJ, Cohen MM, Jr., Condon LM, Burke BA. Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome. *Am J Med Genet* 1992;44(3):307-14.
12. Parisi MA, Dinulos MB, Leppig KA, Sybert VP, Eng C, Hudgins L. The spectrum and evolution of phenotypic findings in PTEN mutation positive cases of Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome. *J Med Genet* 2001;38(1):52-8.
13. Miles JH, Zonana J, McFarlane J, Aleck KA, Bawle E. Macrocephaly with hamartomas: Bannayan-Zonana syndrome. *Am J Med Genet* 1984;19(2):225-34.
14. Moretti-Ferreira D, Koiffmann CP, Souza DH, Diamant AJ, Wajntal A. Macrocephaly, multiple lipomas, and hemangiomas (Bannayan-Zonana syndrome): genetic heterogeneity or autosomal dominant locus with at least two different allelic forms? *Am J Med Genet* 1989;34(4):548-51.
15. DiLiberti JH, D'Agostino AN, Ruvalcaba RH, Schimschock JR. A new lipid storage myopathy observed in individuals with the Ruvalcaba-Myhre-Smith syndrome. *Am J Med Genet* 1984;18(1):163-7.
16. DiLiberti JH, Weleber RG, Budden S. Ruvalcaba-Myhre-Smith syndrome: a case with probable autosomal-dominant inheritance and additional manifestations. *Am J Med Genet* 1983;15(3):491-5.
17. Schreibman IR, Baker M, Amos C, McGarrity TJ. The hamartomatous polyposis syndromes: a clinical and molecular review. *Am J Gastroenterol* 2005;100(2):476-90.

18. Merg A, Howe JR. Genetic conditions associated with intestinal juvenile polyps. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2004;129(1):44-55.
19. Haggitt RC, Reid BJ. Hereditary gastrointestinal polyposis syndromes. *Am J Surg Pathol* 1986;10(12):871-87.
20. Coyle WJ, Ryan MT, Nowicki MJ. Adenomatous changes in the hamartomatous polyps of Ruvalcaba-Myhre-Smith syndrome. *J Clin Gastroenterol* 1998;26(1):85-7.
21. Lloyd KM, 2nd, Dennis M. Cowden's disease. A possible new symptom complex with multiple system involvement. *Ann Intern Med* 1963;58:136-42.
22. Weary PE, Gorlin RJ, Gentry WC, Jr., Comer JE, Greer KE. Multiple hamartoma syndrome (Cowden's disease). *Arch Dermatol* 1972;106(5):682-90.
23. Marsh DJ, Coulon V, Lunetta KL, Rocca-Serra P, Dahia PL, Zheng Z, et al. Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in Cowden disease and Bannayan-Zonana syndrome, two hamartoma syndromes with germline PTEN mutation. *Hum Mol Genet* 1998;7(3):507-15.
24. Nelen MR, Padberg GW, Peeters EA, Lin AY, van den Helm B, Frants RR, et al. Localization of the gene for Cowden disease to chromosome 10q22-23. *Nat Genet* 1996;13(1):114-6.
25. Nelen MR, van Staveren WC, Peeters EA, Hassel MB, Gorlin RJ, Hamm H, et al. Germline mutations in the PTEN/MMAC1 gene in patients with Cowden disease. *Hum Mol Genet* 1997;6(8):1383-7.
26. Nelen MR, Kremer H, Konings IB, Schoute F, van Essen AJ, Koch R, et al. Novel PTEN mutations in patients with Cowden disease: absence of clear genotype-phenotype correlations. *Eur J Hum Genet* 1999;7(3):267-73.
27. Starink TM, van der Veen JP, Arwert F, de Waal LP, de Lange GG, Gille JJ, et al. The Cowden syndrome: a clinical and genetic study in 21 patients. *Clin Genet* 1986;29(3):222-33.
28. NCCN. NCCN practice guidelines: genetics/familial high risk cancer. *Oncology* 1999;13:161-86.
29. Eng C. Will the real Cowden syndrome please stand up: revised diagnostic criteria. *J Med Genet* 2000;37(11):828-30.
30. Longy M. [Cowden disease and the PTEN gene: a successfully clinical and biological combined approach]. *Bull Cancer* 2001;88(12):1153-8.
31. Longy M, Lacombe D. Cowden disease. Report of a family and review. *Ann Genet* 1996;39(1):35-42.
32. Hanssen AM, Fryns JP. Cowden syndrome. *J Med Genet* 1995;32(2):117-9.
33. Padberg GW, Schot JD, Vielvoye GJ, Bots GT, de Beer FC. Lhermitte-Duclos disease and Cowden disease: a single phakomatosis. *Ann Neurol* 1991;29(5):517-23.
34. Milbouw G, Born JD, Martin D, Collignon J, Hans P, Reznik M, et al. Clinical and radiological aspects of dysplastic gangliocytoma (Lhermitte-Duclos disease): a report of two cases with review of the literature. *Neurosurgery* 1988;22(1 Pt 1):124-8.
35. Marra G, Armelao F, Vecchio FM, Percesepe A, Anti M. Cowden's disease with extensive gastrointestinal polyposis. *J Clin Gastroenterol* 1994;18(1):42-7.
36. Eng C. Constipation, polyps, or cancer? Let PTEN predict your future. *Am J Med Genet A* 2003;122(4):315-22.
37. Waite KA, Eng C. Protean PTEN: form and function. *Am J Hum Genet* 2002;70(4):829-44.
38. Fackenthal JD, Marsh DJ, Richardson AL, Cummings SA, Eng C, Robinson BG, et al. Male breast cancer in Cowden syndrome patients with germline PTEN mutations. *J Med Genet* 2001;38(3):159-64.

39. Pilarski R, Eng C. Will the real Cowden syndrome please stand up (again)? Expanding mutational and clinical spectra of the PTEN hamartoma tumour syndrome. *J Med Genet* 2004;41(5):323-6.
40. Burnett JW, Goldner R, Calton GJ. Cowden disease. Report of two additional cases. *Br J Dermatol* 1975;93(3):329-36.
41. Gorenssek M, Matko I, Skralovnik A, Rode M, Satler J, Jutersek A. Disseminated hereditary gastrointestinal polyposis with orocutaneous hamartomatosis (Cowden's disease). *Endoscopy* 1984;16(2):59-63.
42. Hover AR, Cawthern T, McDanial W. Cowden disease. A hereditary polyposis syndrome diagnosable by mucocutaneous inspection. *J Clin Gastroenterol* 1986;8(5):576-9.
43. Marsh DJ, Dahia PL, Zheng Z, Liaw D, Parsons R, Gorlin RJ, et al. Germline mutations in PTEN are present in Bannayan-Zonana syndrome. *Nat Genet* 1997;16(4):333-4.
44. Longy M, Coulon V, Duboue B, David A, Larregue M, Eng C, et al. Mutations of PTEN in patients with Bannayan-Riley-Ruvalcaba phenotype. *J Med Genet* 1998;35(11):886-9.
45. Celebi JT, Tsou HC, Chen FF, Zhang H, Ping XL, Lebowitz MG, et al. Phenotypic findings of Cowden syndrome and Bannayan-Zonana syndrome in a family associated with a single germline mutation in PTEN. *J Med Genet* 1999;36(5):360-4.
46. Wanner M, Celebi JT, Peacocke M. Identification of a PTEN mutation in a family with Cowden syndrome and Bannayan-Zonana syndrome. *J Am Acad Dermatol* 2001;44(2):183-7.
47. Zori RT, Marsh DJ, Graham GE, Marliss EB, Eng C. Germline PTEN mutation in a family with Cowden syndrome and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome. *Am J Med Genet* 1998;80(4):399-402.
48. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 1997;15(4):356-62.
49. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997;275(5308):1943-7.
50. Li DM, Sun H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res* 1997;57(11):2124-9.
51. Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PL, Wang SI, Zheng Z, et al. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet* 1997;16(1):64-7.
52. Bonneau D, Longy M. Mutations of the human PTEN gene. *Hum Mutat* 2000;16(2):109-22.
53. Dahia PM, Gimm O, Chi H, Marsh DJ, Reynolds PR, Eng C. Absence of germline mutations in MINPP1, a phosphatase encoding gene centromeric of PTEN, in patients with Cowden and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome without germline PTEN mutations. *J Med Genet* 2000;37(9):715-7.
54. Tsou HC, Teng DH, Ping XL, Brancolini V, Davis T, Hu R, et al. The role of MMAC1 mutations in early-onset breast cancer: causative in association with Cowden syndrome and excluded in BRCA1-negative cases. *Am J Hum Genet* 1997;61(5):1036-43.
55. Simpson L, Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res* 2001;264(1):29-41.

56. Waite KA, Eng C. From developmental disorder to heritable cancer: it's all in the BMP/TGF-beta family. *Nat Rev Genet* 2003;4(10):763-73.
57. Di Cristofano A, Pesce B, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet* 1998;19(4):348-55.
58. Podsypanina K, Ellenson LH, Nemes A, Gu J, Tamura M, Yamada KM, et al. Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(4):1563-8.
59. Stiles B, Groszer M, Wang S, Jiao J, Wu H. PTENless means more. *Dev Biol* 2004;273(2):175-84.
60. Leslie NR, Downes CP. PTEN: The down side of PI 3-kinase signalling. *Cell Signal* 2002;14(4):285-95.
61. Vazquez F, Ramaswamy S, Nakamura N, Sellers WR. Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol Cell Biol* 2000;20(14):5010-8.
62. Kapeller R, Cantley LC. Phosphatidylinositol 3-kinase. *Bioessays* 1994;16(8):565-76.
63. Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 1998;280(5369):1614-7.
64. Raftopoulos M, Etienne-Manneville S, Self A, Nicholls S, Hall A. Regulation of cell migration by the C2 domain of the tumor suppressor PTEN. *Science* 2004;303(5661):1179-81.
65. Maehama T, Okahara F, Kanaho Y. The tumour suppressor PTEN: involvement of a tumour suppressor candidate protein in PTEN turnover. *Biochem Soc Trans* 2004;32(Pt 2):343-7.
66. Ebert MP, Fei G, Schandl L, Mawrin C, Dietzmann K, Herrera P, et al. Reduced PTEN expression in the pancreas overexpressing transforming growth factor-beta 1. *Br J Cancer* 2002;86(2):257-62.
67. Lei X, Bandyopadhyay A, Le T, Sun L. Autocrine TGFbeta supports growth and survival of human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Oncogene* 2002;21(49):7514-23.
68. He XC, Zhang J, Tong WG, Tawfik O, Ross J, Scoville DH, et al. BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat Genet* 2004;36(10):1117-21.
69. Tian Q, He XC, Hood L, Li L. Bridging the BMP and Wnt pathways by PI3 kinase/Akt and 14-3-3zeta. *Cell Cycle* 2005;4(2):215-6.
70. Teng DH, Hu R, Lin H, Davis T, Iliev D, Frye C, et al. MMAC1/PTEN mutations in primary tumor specimens and tumor cell lines. *Cancer Res* 1997;57(23):5221-5.
71. Dahia PL, FitzGerald MG, Zhang X, Marsh DJ, Zheng Z, Pietsch T, et al. A highly conserved processed PTEN pseudogene is located on chromosome band 9p21. *Oncogene* 1998;16(18):2403-6.
72. Fujii GH, Morimoto AM, Berson AE, Bolen JB. Transcriptional analysis of the PTEN/MMAC1 pseudogene, psiPTEN. *Oncogene* 1999;18(9):1765-9.
73. Zhang CL, Tada M, Kobayashi H, Nozaki M, Moriuchi T, Abe H. Detection of PTEN nonsense mutation and psiPTEN expression in central nervous system high-grade astrocytic tumors by a yeast-based stop codon assay. *Oncogene* 2000;19(38):4346-53.
74. Carethers JM, Furnari FB, Zigman AF, Lavine JE, Jones MC, Graham GE, et al. Absence of PTEN/MMAC1 germ-line mutations in sporadic Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome. *Cancer Res* 1998;58(13):2724-6.

75. Arch EM, Goodman BK, Van Wesep RA, Liaw D, Clarke K, Parsons R, et al. Deletion of PTEN in a patient with Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome suggests allelism with Cowden disease. *Am J Med Genet* 1997;71(4):489-93.
76. Marsh DJ, Dahia PL, Caron S, Kum JB, Frayling IM, Tomlinson IP, et al. Germline PTEN mutations in Cowden syndrome-like families. *J Med Genet* 1998;35(11):881-5.
77. Zhou XP, Marsh DJ, Morrison CD, Chaudhury AR, Maxwell M, Reifenger G, et al. Germline inactivation of PTEN and dysregulation of the phosphoinositol-3-kinase/Akt pathway cause human Lhermitte-Duclos disease in adults. *Am J Hum Genet* 2003;73(5):1191-8.
78. Di Cristofano A, Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* 2000;100(4):387-90.
79. Sulis ML, Parsons R. PTEN: from pathology to biology. *Trends Cell Biol* 2003;13(9):478-83.
80. Goberdhan DC, Wilson C. PTEN: tumour suppressor, multifunctional growth regulator and more. *Hum Mol Genet* 2003;12 Spec No 2:R239-48.
81. Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, Carethers JM, Dowell JM, Wasserman L, et al. Frequent inactivation of PTEN by promoter hypermethylation in microsatellite instability-high sporadic colorectal cancers. *Cancer Res* 2004;64(9):3014-21.
82. Khan S, Kumagai T, Vora J, Bose N, Sehgal I, Koeffler PH, et al. PTEN promoter is methylated in a proportion of invasive breast cancers. *Int J Cancer* 2004;112(3):407-10.
83. Sansal I, Sellers WR. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol* 2004;22(14):2954-63.
84. Marsh DJ, Dahia PL, Coulon V, Zheng Z, Dorion-Bonnet F, Call KM, et al. Allelic imbalance, including deletion of PTEN/MMAC1, at the Cowden disease locus on 10q22-23, in hamartomas from patients with Cowden syndrome and germline PTEN mutation. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;21(1):61-9.
85. Reifenger G, Rauch L, Beckmann MW, Megahed M, Ruzicka T, Reifenger G. Cowden's disease: clinical and molecular genetic findings in a patient with a novel PTEN germline mutation. *Br J Dermatol* 2003;148(5):1040-6.
86. Diamond. Adenoma of the rectum in children: report of a case in a thirty month old girl. *Am J Dis Child* 1939;57:360-367.
87. Horrilleno E. Polyps of the rectum and colon in children. *Cancer* 1957;10:1210-1220.
88. Morson BC. Precancerous lesions of the colon and rectum. Classification and controversial issues. *Jama* 1962;179:316-21.
89. McColl I, Buskey HJ, Veale AM, Morson BC. Juvenile Polyposis Coli. *Proc R Soc Med* 1964;57:896-7.
90. Sayed MG, Ahmed AF, Ringold JR, Anderson ME, Bair JL, Mitros FA, et al. Germline SMAD4 or BMPR1A mutations and phenotype of juvenile polyposis. *Ann Surg Oncol* 2002;9(9):901-6.
91. Bronner MP. Gastrointestinal polyposis syndromes. *Am J Med Genet A* 2003;122(4):335-41.
92. Huang SC, Chen CR, Lavine JE, Taylor SF, Newbury RO, Pham TT, et al. Genetic heterogeneity in familial juvenile polyposis. *Cancer Res* 2000;60(24):6882-5.
93. Jass JR, Williams CB, Bussey HJ, Morson BC. Juvenile polyposis--a precancerous condition. *Histopathology* 1988;13(6):619-30.

94. Giardiello FM, Hamilton SR, Kern SE, Offerhaus GJ, Green PA, Celano P, et al. Colorectal neoplasia in juvenile polyposis or juvenile polyps. *Arch Dis Child* 1991;66(8):971-5.
95. Sachatello CR, Hahn IS, Carrington CB. Juvenile gastrointestinal polyposis in a female infant: report of a case and review of the literature of a recently recognized syndrome. *Surgery* 1974;75(1):107-14.
96. Hofting I, Pott G, Stolte M. [The syndrome of juvenile polyposis]. *Leber Magen Darm* 1993;23(3):107-8, 111-2.
97. Sachatello CR, Griffen WO, Jr. Hereditary polypoid diseases of the gastrointestinal tract: a working classification. *Am J Surg* 1975;129(2):198-203.
98. Roth SI, Helwig EB. Juvenile polyps of the colon and rectum. *Cancer* 1963;16:468-79.
99. Reed K, Vose PC. Diffuse juvenile polyposis of the colon: a premalignant condition? *Dis Colon Rectum* 1981;24(3):205-10.
100. Coburn MC, Pricolo VE, DeLuca FG, Bland KI. Malignant potential in intestinal juvenile polyposis syndromes. *Ann Surg Oncol* 1995;2(5):386-91.
101. Stemper TJ, Kent TH, Summers RW. Juvenile polyposis and gastrointestinal carcinoma. A study of a kindred. *Ann Intern Med* 1975;83(5):639-46.
102. Grotsky HW, Rickert RR, Smith WD, Newsome JF. Familial juvenile polyposis coli. A clinical and pathologic study of a large kindred. *Gastroenterology* 1982;82(3):494-501.
103. Howe JR, Mitros FA, Summers RW. The risk of gastrointestinal carcinoma in familial juvenile polyposis. *Ann Surg Oncol* 1998;5(8):751-6.
104. Goodman ZD, Yardley JH, Milligan FD. Pathogenesis of colonic polyps in multiple juvenile polyposis: report of a case associated with gastric polyps and carcinoma of the rectum. *Cancer* 1979;43(5):1906-13.
105. Murday V, Slack J. Inherited disorders associated with colorectal cancer. *Cancer Surv* 1989;8(1):139-57.
106. Howe JR, Roth S, Ringold JC, Summers RW, Jarvinen HJ, Sistonen P, et al. Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science* 1998;280(5366):1086-8.
107. Wrana JL, Attisano L. MAD-related proteins in TGF-beta signalling. *Trends Genet* 1996;12(12):493-6.
108. Chacko BM, Qin BY, Tiwari A, Shi G, Lam S, Hayward LJ, et al. Structural basis of heteromeric smad protein assembly in TGF-beta signaling. *Mol Cell* 2004;15(5):813-23.
109. Howe JR, Sayed MG, Ahmed AF, Ringold J, Larsen-Haidle J, Merg A, et al. The prevalence of MADH4 and BMPR1A mutations in juvenile polyposis and absence of BMPR2, BMPR1B, and ACVR1 mutations. *J Med Genet* 2004;41(7):484-91.
110. Howe JR, Bair JL, Sayed MG, Anderson ME, Mitros FA, Petersen GM, et al. Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis. *Nat Genet* 2001;28(2):184-7.
111. ten Dijke P, Ichijo H, Franzen P, Schulz P, Saras J, Toyoshima H, et al. Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene* 1993;8(10):2879-87.
112. Zhou XP, Woodford-Richens K, Lehtonen R, Kurose K, Aldred M, Hampel H, et al. Germline mutations in BMPR1A/ALK3 cause a subset of cases of juvenile polyposis syndrome and of Cowden and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndromes. *Am J Hum Genet* 2001;69(4):704-11.

113. Eng C, Ji H. Molecular classification of the inherited hamartoma polyposis syndromes: clearing the muddied waters. *Am J Hum Genet* 1998;62(5):1020-2.
114. Olschwang S, Serova-Sinilnikova OM, Lenoir GM, Thomas G. PTEN germ-line mutations in juvenile polyposis coli. *Nat Genet* 1998;18(1):12-4.
115. Lynch ED, Ostermeyer EA, Lee MK, Arena JF, Ji H, Dann J, et al. Inherited mutations in PTEN that are associated with breast cancer, cowden disease, and juvenile polyposis. *Am J Hum Genet* 1997;61(6):1254-60.
116. Eng C, Peacocke M. PTEN and inherited hamartoma-cancer syndromes. *Nat Genet* 1998;19(3):223.
117. Woodford-Richens K, Bevan S, Churchman M, Dowling B, Jones D, Norbury CG, et al. Analysis of genetic and phenotypic heterogeneity in juvenile polyposis. *Gut* 2000;46(5):656-60.
118. Friedl W, Uhlhaas S, Schulmann K, Stolte M, Loff S, Back W, et al. Juvenile polyposis: massive gastric polyposis is more common in MADH4 mutation carriers than in BMPR1A mutation carriers. *Hum Genet* 2002;111(1):108-11.
119. Massague J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1(3):169-78.
120. ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci* 2004;29(5):265-73.
121. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;113(6):685-700.
122. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 2003;425(6958):577-84.
123. Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: Transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005.
124. Balemans W, Van Hul W. Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev Biol* 2002;250(2):231-50.
125. Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3(11):807-21.
126. Elliott RL, Blobe GC. Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *J Clin Oncol* 2005;23(9):2078-93.
127. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 2001;29(2):117-29.
128. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995;268(5215):1336-8.
129. Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 2000;342(18):1350-8.
130. Picon A, Gold LI, Wang J, Cohen A, Friedman E. A subset of metastatic human colon cancers expresses elevated levels of transforming growth factor beta1. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7(6):497-504.
131. Wikstrom P, Stattin P, Franck-Lissbrant I, Damber JE, Bergh A. Transforming growth factor beta1 is associated with angiogenesis, metastasis, and poor clinical outcome in prostate cancer. *Prostate* 1998;37(1):19-29.
132. Oft M, Heider KH, Beug H. TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr Biol* 1998;8(23):1243-52.
133. Dumont N, Bakin AV, Arteaga CL. Autocrine transforming growth factor-beta signaling mediates Smad-independent motility in human cancer cells. *J Biol Chem* 2003;278(5):3275-85.

134. Leedham SJ, Brittan M, McDonald SA, Wright NA. Intestinal stem cells. *J Cell Mol Med* 2005;9(1):11-24.
135. Haramis AP, Begthel H, van den Born M, van Es J, Jonkheer S, Offerhaus GJ, et al. De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science* 2004;303(5664):1684-6.
136. Tian Q, Feetham MC, Tao WA, He XC, Li L, Aebersold R, et al. Proteomic analysis identifies that 14-3-3zeta interacts with beta-catenin and facilitates its activation by Akt. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(43):15370-5.
137. Jacoby RF, Schlack S, Sekhon G, Laxova R. Del(10)(q22.3q24.1) associated with juvenile polyposis. *Am J Med Genet* 1997;70(4):361-4.
138. Tsuchiya KD, Wiesner G, Cassidy SB, Limwongse C, Boyle JT, Schwartz S. Deletion 10q23.2-q23.33 in a patient with gastrointestinal juvenile polyposis and other features of a Cowden-like syndrome. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;21(2):113-8.
139. Zigman AF, Lavine JE, Jones MC, Boland CR, Carethers JM. Localization of the Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome gene to chromosome 10q23. *Gastroenterology* 1997;113(5):1433-7.
140. Farrell SA, Szymonowicz W, Chow G, Summers AM. Interstitial deletion of chromosome 10q23: a new case and review. *J Med Genet* 1993;30(3):248-50.
141. Cook L, Weaver DD, Hartsfield JK, Jr., Vance GH. De novo 10q22 interstitial deletion. *J Med Genet* 1999;36(1):71-2.
142. Higgins J. Two nonoverlapping deletions of 10q with similar phenotypes (del(10) (pter-q26.1:) and del(10) (pter-q23.2::q24.1-qter)). *Am J Hum Genet* 1984;36:95S.
143. Morey M. A 10q23 deletion syndrome. *Am J Hum Genet* 1985;37:A107.
144. Romana SP, Le Coniat M, Berger R. t(12;21): a new recurrent translocation in acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 1994;9(3):186-91.
145. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992;258(5083):818-21.
146. Vermeesch JR, Melotte C, Froyen G, Van Vooren S, Dutta B, Maas N, et al. Molecular karyotyping: array CGH quality criteria for constitutional genetic diagnosis. *J Histochem Cytochem* 2005;53(3):413-22.
147. Dehainault C, Lauge A, Caux-Moncoutier V, Pages-Berhouet S, Doz F, Desjardins L, et al. Multiplex PCR/liquid chromatography assay for detection of gene rearrangements: application to RB1 gene. *Nucleic Acids Res* 2004;32(18):e139.
148. Stoppa-Lyonnet D, Carter PE, Meo T, Tosi M. Clusters of intragenic Alu repeats predispose the human C1 inhibitor locus to deleterious rearrangements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(4):1551-5.
149. Stankiewicz P, Lupski JR. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet* 2002;18(2):74-82.
150. Shaw CJ, Lupski JR. Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Hum Mol Genet* 2004;13 Spec No 1:R57-64.
151. Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, Collins FS, et al. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(26):16899-903.
152. Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, Otsuki T, Sugiyama T, Irie R, et al. Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat Genet* 2004;36(1):40-5.

153. Vatta M, Mohapatra B, Jimenez S, Sanchez X, Faulkner G, Perles Z, et al. Mutations in Cypher/ZASP in patients with dilated cardiomyopathy and left ventricular non-compaction. *J Am Coll Cardiol* 2003;42(11):2014-27.
154. Finsterer J, Stollberger C. Do cypher gene mutations cause left ventricular noncompaction with subclinical myopathy? *J Am Coll Cardiol* 2004;44(5):1139; author reply 1139-40.
155. Zhou Q, Chu PH, Huang C, Cheng CF, Martone ME, Knoll G, et al. Ablation of Cypher, a PDZ-LIM domain Z-line protein, causes a severe form of congenital myopathy. *J Cell Biol* 2001;155(4):605-12.
156. Arimura T, Hayashi T, Terada H, Lee SY, Zhou Q, Takahashi M, et al. A Cypher/ZASP mutation associated with dilated cardiomyopathy alters the binding affinity to protein kinase C. *J Biol Chem* 2004;279(8):6746-52.
157. Selcen D, Engel AG. Mutations in ZASP define a novel form of muscular dystrophy in humans. *Ann Neurol* 2005;57(2):269-76.
158. Braghetta P, Ferrari A, De Gemmis P, Zanetti M, Volpin D, Bonaldo P, et al. Overlapping, complementary and site-specific expression pattern of genes of the EMILIN/Multimerin family. *Matrix Biol* 2004;22(7):549-56.
159. von Bohlen Und Halbach O. Synucleins and their relationship to Parkinson's disease. *Cell Tissue Res* 2004;318(1):163-74.
160. Jiang Y, Liu YE, Goldberg ID, Shi YE. Gamma synuclein, a novel heat-shock protein-associated chaperone, stimulates ligand-dependent estrogen receptor alpha signaling and mammary tumorigenesis. *Cancer Res* 2004;64(13):4539-46.
161. Smith TJ, Peterson PE, Schmidt T, Fang J, Stanley CA. Structures of bovine glutamate dehydrogenase complexes elucidate the mechanism of purine regulation. *J Mol Biol* 2001;307(2):707-20.
162. Stanley CA, Lieu YK, Hsu BY, Burlina AB, Greenberg CR, Hopwood NJ, et al. Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene. *N Engl J Med* 1998;338(19):1352-7.
163. Chi H, Tiller GE, Dasouki MJ, Romano PR, Wang J, O'Keefe R J, et al. Multiple inositol polyphosphate phosphatase: evolution as a distinct group within the histidine phosphatase family and chromosomal localization of the human and mouse genes to chromosomes 10q23 and 19. *Genomics* 1999;56(3):324-36.
164. Chi H, Yang X, Kingsley PD, O'Keefe RJ, Puzas JE, Rosier RN, et al. Targeted deletion of *Minpp1* provides new insight into the activity of multiple inositol polyphosphate phosphatase in vivo. *Mol Cell Biol* 2000;20(17):6496-507.
165. Gimm O, Chi H, Dahia PL, Perren A, Hinze R, Komminoth P, et al. Somatic mutation and germline variants of *MINPP1*, a phosphatase gene located in proximity to *PTEN* on 10q23.3, in follicular thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(4):1801-5.
166. ul Haque MF, King LM, Krakow D, Cantor RM, Rusiniak ME, Swank RT, et al. Mutations in orthologous genes in human spondyloepimetaphyseal dysplasia and the brachymorphic mouse. *Nat Genet* 1998;20(2):157-62.
167. Lohse P, Chahrokh-Zadeh S, Seidel D. The acid lipase gene family: three enzymes, one highly conserved gene structure. *J Lipid Res* 1997;38(5):880-91.
168. Miled N, Canaan S, Dupuis L, Roussel A, Riviere M, Carriere F, et al. Digestive lipases: from three-dimensional structure to physiology. *Biochimie* 2000;82(11):973-86.
169. Carriere F, Grandval P, Renou C, Palomba A, Prieri F, Giallo J, et al. Quantitative study of digestive enzyme secretion and gastrointestinal lipolysis in chronic pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;3(1):28-38.

170. Comer KA, Dennis PA, Armstrong L, Catino JJ, Kastan MB, Kumar CC. Human smooth muscle alpha-actin gene is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein. *Oncogene* 1998;16(10):1299-308.
171. Kumar MS, Hendrix JA, Johnson AD, Owens GK. Smooth muscle alpha-actin gene requires two E-boxes for proper expression in vivo and is a target of class I basic helix-loop-helix proteins. *Circ Res* 2003;92(8):840-7.
172. Chaponnier C, Gabbiani G. Pathological situations characterized by altered actin isoform expression. *J Pathol* 2004;204(4):386-95.
173. Waite KA, Eng C. BMP2 exposure results in decreased PTEN protein degradation and increased PTEN levels. *Hum Mol Genet* 2003;12(6):679-84.
174. Gregorieff A, Clevers H. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev* 2005;19(8):877-90.
175. van Es JH, Giles RH, Clevers HC. The many faces of the tumor suppressor gene APC. *Exp Cell Res* 2001;264(1):126-34.
176. Conery AR, Cao Y, Thompson EA, Townsend CM, Jr., Ko TC, Luo K. Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis. *Nat Cell Biol* 2004;6(4):366-72.
177. Kinzler KW, Vogelstein B. Landscaping the cancer terrain. *Science* 1998;280(5366):1036-7.
178. Inoki K, Corradetti MN, Guan KL. Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. *Nat Genet* 2005;37(1):19-24.

NOM : Delnatte

PRENOM : Capucine

**Titre de thèse** : Syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba et polypose juvénile infantile : un nouveau syndrome de gènes contigus ?

---

## RESUME

Nous décrivons trois enfants présentant une délétion constitutionnelle, *de novo*, de deux gènes suppresseurs de tumeur, *BMPRIA* et *PTEN*, dont l'un à l'état de mosaïque. Nous exposons les démarches clinique et biologique nous ayant permis de mettre en évidence ces délétions. Nous discutons du fait que ces enfants, au niveau clinique, ne présentent pas un syndrome de gènes contigus au sens strict du terme. En effet, nous ne sommes pas devant l'association d'une polypose juvénile et d'un syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba, respectivement secondaire à une délétion des gènes *BMPRIA* et *PTEN*, mais devant une nouvelle pathologie connue sous le nom de polypose juvénile infantile. Nous faisons l'hypothèse que la sévérité du phénotype digestif est secondaire à la coopération entre les deux voies de signalisation auxquelles appartiennent les deux gènes délétés.

---

## MOTS-CLES

Syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba  
Polypose juvénile  
Syndrome de Cowden  
Gène *BMPRIA*  
Gène *PTEN*