



HAL
open science

L'hérédité manquante dans le syndrome de Cowden : approche par séquençage d'exome

Louise Crivelli

► **To cite this version:**

Louise Crivelli. L'hérédité manquante dans le syndrome de Cowden : approche par séquençage d'exome. Médecine humaine et pathologie. 2016. dumas-01391115

HAL Id: dumas-01391115

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01391115>

Submitted on 2 Nov 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Bordeaux
U.F.R. DES SCIENCES MEDICALES

Année 2016

N° 3116

Thèse pour l'obtention du
DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE
SPECIALISATION GENETIQUE MEDICALE

Présentée et soutenue publiquement le 11 Octobre 2016

Par Louise Crivelli

Née le 16/12/1986 à Arles (13)

L'hérédité manquante dans le syndrome de Cowden :
Approche par séquençage d'exome

Directeur de thèse

Monsieur le Docteur Michel Longy

Rapporteur

Monsieur le Professeur Pascal Pujol

Jury

Monsieur le Professeur Didier Lacombe, Président

Monsieur le Professeur Jean-Philippe Merlio

Monsieur le Professeur Benoît Arveiler

Madame le Docteur Barouk-Simonet

Monsieur le Docteur Michel Longy

Remerciements

À Monsieur le Professeur Didier Lacombe,

Vous me faites l'honneur de présider cette thèse.

Veillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.

À Monsieur le Professeur Benoît Arveiler,

Vous avez accepté d'être membre de mon jury.

Veillez recevoir mes sincères remerciements.

À Monsieur le Professeur Jean-Philippe Merlio,

Vous avez accepté d'être membre de mon jury.

Veillez croire en ma gratitude profonde.

À Madame le Docteur Emmanuelle Barouk-Simonet,

Tu as accepté d'être membre de mon jury.

Je te remercie chaleureusement pour ton encadrement, ta gentillesse...et la touche de féminité que tu apportes à ce jury qui m'est chère!

À Monsieur le Docteur Michel Longy,

Vous m'avez fait confiance en acceptant la direction de cette thèse.

Je vous remercie pour votre soutien, vos éclairages essentiels et votre temps.

Votre modestie restera un modèle pour moi.

À Monsieur le Professeur Pascal Pujol,

Vous me faites l'honneur de juger ma thèse.

Veillez croire en ma sincère reconnaissance.

Aux patients et médecins qui ont permis ce travail,
Sans vous cette thèse n'existerait pas.

**À toutes les personnes qui ont participé à ce travail de près ou de loin et se
reconnâitrons,**
Soyez assurés de ma profonde reconnaissance.

À la Fondation ARC,
Merci de son soutien financier.

À toute l'équipe de génétique du CHU de Bordeaux,
À toute l'équipe d'oncogénétique de l'Institut Bergonié,
**À tous les médecins, pharmaciens, co-internes, infirmiers, ingénieurs, conseillers en
génétique, bioinformaticiens, techniciens, secrétaires... qui m'ont aidée et formée
durant ces années d'internat,**
Je vous remercie.

À mes parents et ma sœur,

À Tata,

Merci de vos encouragements et de votre amour pendant ses loooooongues études de médecine.

À ma famille française et suisse,

C'est toujours un plaisir de vous revoir. Vous m'avez toujours très bien accueillie quand je le nécessitais (particulièrement merci aux parisiens !).

À Nicolás,

Merci de ton soutien, je te souhaite le meilleur.

À tous mes amis d'ici et d'ailleurs, Arlésiens, Montpelliérains, Dacquois, Bordelais, team 6D, team Magistère de Génétique, Chiliens, Portugais...

Merci d'être là tout simplement.

Table des matières

Table des figures.....	7
Table des tableaux.....	8
Table des annexes.....	9
Liste des Abréviations utilisées par ordre alphabétique.....	10
I. Introduction.....	11
I.1. Les PTEN Hamartoma Tumor Syndromes (PHTS).....	11
I.1.1. La maladie de Cowden.....	11
I.1.2. Les phénotypes particuliers.....	13
I.1.2.1. Le syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba.....	13
I.1.2.2. La maladie (ou syndrome) de Lhermitte-Duclos de l'adulte.....	14
I.1.2.3. Le Cowden segmentaire ou syndrome de SOLAMEN.....	14
I.1.2.4. Le syndrome d'autisme et macrocéphalie.....	14
I.1.2.5. La polypose juvénile infantile.....	14
I.1.2.6. Forme récessive de PHTS.....	14
I.1.3. Le gène PTEN (phosphatase and tensin homolog) et sa protéine.....	15
I.1.3.1. Mutations du gène <i>PTEN</i>	15
I.1.3.1.1. Mutations constitutionnelle.....	15
I.1.3.1.2. Mutations constitutionnelles et PHTS.....	15
I.1.3.1.3. Mutations somatiques des tissus tumoraux.....	16
I.1.3.2. Protéine PTEN.....	16
I.1.4. Corrélation génotype-phénotype.....	19
I.2. Hétérogénéité génétique et PHTS.....	20
I.2.1. Cas particulier de l'implication de la voie PI3K/AKT dans le Cowden segmentaire.....	20
I.2.2. Hétérogénéité génétique dans les autres présentations phénotypiques.....	20
I.2.2.1. <i>PI3KCA</i>	20
I.2.2.2. <i>AKT1</i>	21
I.2.2.3. <i>SDHB-D</i>	22
I.2.2.4. Hyperméthylation du promoteur de <i>KLLN</i>	22
I.2.2.5. <i>SEC23B</i>	22
I.3. Objectifs du travail.....	23
II. Matériels et Méthodes.....	24
II.1. Matériels.....	24
II.1.1. Série de patients (étude initiale).....	24
II.1.2. Série de tumeurs du sein (étude secondaire, insertion de séquence <i>Alu</i>).....	24
II.1.3. Série de patients (étude secondaire, exploration de <i>LDDX1</i>).....	26
II.2. Méthodes.....	27
II.2.1. Séquençage exomique	
II.2.1.1. Banque de capture (Agilent technologies) et séquençage NGS (next generation sequencing) des exomes par synthèse (Illumina).....	27
II.2.1.1.1. Constitution de la librairie de Capture.....	27
II.2.1.1.2. Préparation de la librairie d'ADN génomique.....	27
II.2.1.1.3. Séquençage sur HiSeq 2000® (Illumina).....	28

II.2.1.2. Analyses NGS informatiques primaire, secondaire et tertiaire.....	29
II.2.2. Séquençage Sanger.....	31
III. Résultats.....	32
III.1. Constitution, description de la série, et calcul des scores prédictifs de mutation.....	32
III.1.1. Description phénotypique de la série de patients.....	32
III.1.2. Calcul des scores Cleveland Clinic et PTEN Predict.....	34
III.1.3. Pré-criblage.....	35
III.2. Stratégie d'analyse tertiaire : tri des données informatiques générées par Intégragen (ERIS®).....	37
III.2.1. Résultats globaux de séquençage exomique.....	37
III.2.2. Analyse comparative de l'ensemble des exomes.....	37
III.2.2.1. Tri des variants par le logiciel ERIS®.....	37
III.2.2.1.1. Paramètres de tri choisis.....	37
III.2.2.1.2. Variants générés par ERIS®.....	38
III.2.3. Analyse des deux trios.....	38
III.2.3.1. Tri des variants dans le logiciel ERIS®.....	38
III.2.3.1.1. Paramètres de tri choisis.....	38
III.2.3.1.2. Variants générés par ERIS®.....	40
III.3. Stratégie d'analyse tertiaire : validation des variants générés par ERIS®.....	40
III.3.1. Analyse comparative de l'ensemble des exomes.....	40
III.3.1.1. Stratégie de validation des variants générés.....	40
III.3.1.2. Variants validés retrouvés dans des gènes d'intérêt connus.....	42
III.3.1.2.1. <i>PTEN</i>	42
III.3.1.2.2. <i>BRCA2</i>	50
III.3.1.3. Variants validés dans un potentiel gène candidat: <i>PLA2G4B</i>	51
III.3.2. Analyse des deux trios.....	54
III.3.2.1. Stratégie de validation des variants générés.....	54
III.3.2.2. Néomutation validée dans un potentiel gène candidat : <i>LDDX1</i>	55
IV. Discussion.....	58
V. Conclusion.....	62
Références bibliographiques.....	63
Annexes.....	69
Serment d'Hippocrate.....	83

Table des figures

Figure 1 : Domaines fonctionnels de la protéine PTEN.....	17
Figure 2 : Principaux rôles (cytoplasmique et nucléaire) de la protéine PTEN.....	18
Figure 3 : Procédure de tri des variants dans ERIS® (analyse globale).....	38
Figure 4 : Procédure de tri des variants dans ERIS® (analyse des trios).....	39
Figure 5 : Procédure de validation des variants dans Alamut®.....	41
Figure 6 : Visualisation Alamut® des fichiers .bam des patients 2001012 et 1998101 en fin d'exon 5 de <i>PTEN</i>	44
Figure 7 : Visualisation IGV® du fichier .bam du patient 2001012 au niveau de l'intron 1 de <i>MB21D1</i>	45
Figure 8 : Visualisation sous Sequencing Analysis® du 2ème point de cassure de l'insertion de séquence <i>Alu</i> dans l'exon 5 de <i>PTEN</i>	46
Figure 9 : Visualisation sous Sequencing Analysis® du 1 ^{er} point de cassure de l'insertion de séquence <i>Alu</i> dans l'exon 5 de <i>PTEN</i>	47
Figure 10 : Gel d'agarose représentant les produits de PCR de l'exon 5 de <i>PTEN</i> pour les 2 cas index et 2 témoins.....	48
Figure 11 : Visualisation sous Sequencing Analysis® de l'allèle sauvage et muté dans l'exon 5 de <i>PTEN</i>	48
Figure 12 : Représentation de l'insertion <i>Alu</i> dans l'exon 5 de <i>PTEN</i> pour 2001012 et 1998101.....	50
Figure 13 : Visualisation Alamut® des fichiers .bam des variants du gène <i>PLA2G4B</i> chez les patients 2010186, 2002213, 2010391.....	52
Figure 14 : Visualisation sous Sequencing Analysis® des variants du gène <i>PLA2G4B</i> chez les patients 2010186, 2002213, et 2010391.....	53
Figure 15 : Arbres généalogiques des cas index 2002213 et 2010186.....	54
Figure 16 : Visualisation Alamut® des fichiers .bam du patient 2012115 et de ses parents au sein de l'exon 5 de <i>LDDX1</i>	56
Figure 17 : Visualisation sous Sequencing Analysis® de l'exon 5 de <i>LDDX1</i> chez le patient 2012115 et ses parents (au niveau de la néomutation retrouvée chez le cas index).....	56

Table des Tableaux

Tableau 1 : Clinical Operational Criteria for Cowden Syndrome Based on the International Cowden Consortium (NCCN 2006).....	12
Tableau 2 : Caractéristiques clinicopathologiques des 35 tumeurs du sein sélectionnées..	25
Tableau 3 : Phénotypes des 5 patients faisant partie de l'étude « <i>LDDX1</i> ».....	26
Tableau 4 : Signes cliniques permettant le diagnostic de CS chez les 22 patients.....	33
Tableau 5 : Scores prédictifs de mutation de <i>PTEN</i> de la série de patients.....	35
Tableau 6 : Résultats de recherche de mutations ponctuelles et grands réarrangements de <i>PTEN</i> lors du pré-criblage.....	36
Tableau 7 : Représentation des fichiers .vcf des variants exoniques validés de la série retrouvés dans <i>PTEN</i>	42
Tableau 8 : Variants exoniques validés de la série retrouvés dans <i>PTEN</i>	50

Annexes

Annexe 1 : Cowden Syndrome/PHTS clinical diagnostic and testing criteria (NCCN).....	69
Annexe 2 : Signes cliniques des syndromes PHTS.....	70
Annexe 3 : Phénotypes détaillés des 22 cas index.....	71
Annexe 4 : Détails des amorces et des conditions de PCR utilisées.....	77
Annexe 5 : Score de prédiction de mutation Cleveland Clinic.....	79
Annexe 6 : Score de prédiction de mutation PTEN Predict.....	80
Annexe 7 : Liste des 15 variants validés n'impliquant qu'un seul cas index.....	81

Liste des Abréviations utilisées par ordre alphabétique

AKT1: V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 1

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BRRS: Bannayan-Riley-Ruvalcaba Syndrome

CCDS: Consensus Coding Sequences

CS: Cowden Syndrome

CRT: cyclic reversible termination

db SNP: Short Genetic Variations database

EMMA: Enhanced Mismatch Mutation Analysis

ESP: Exome sequencing project

EVS: Exome Variant Server

GENCODE: Genome annotation for ENCYclopedia Of DNA Elements

IGV: Integrative genomics viewer

KLLN: Killin, p53-regulated DNA replication inhibitor

LDD: maladie de Lhermitte-Duclos

NGS: Next generation sequencing

PHTS: PTEN Hamartoma Tumor Syndrome

PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase

PIK3CA: phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha

PIP2: phosphatidylinositol 4, 5-diphosphate

PIP3: phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate

PTEN: Phosphatase and TENsin homology deleted on chromosome ten

QMPSF: Quantitative Multiplex PCR of Short fluorescent Fragments

sam: Sequence Alignment/Map

SDHB-D: Succinate Deshydrogenase B/C/D

SEC23B: Sec23 Homolog B

SINE: Short INterspersed Elements

SOLAMEN: Segmental Overgrowth, Lipomatosis, Arteriovenous Malformation and Epidermal Nevus

TCGA: The Cancer Genome Atlas

UCSC: University of California, Santa Cruz

vcf : variant call format

I. Introduction

I.1. Les *PTEN* Hamartoma Tumor Syndromes (PHTS)

Le terme de PHTS est une dénomination, qui permet de rassembler sous une même appellation les différents syndromes en rapport avec une mutation constitutionnelle du gène *PTEN*¹, caractérisés par des présentations cliniques parfois éloignées².

Sont ainsi concernés la maladie (ou syndrome) de Cowden (CS; MIM 158350), mais également le syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba (BRRS; MIM 153480), la maladie de Lhermitte-Duclos de l'adulte (LDD), la polypose juvénile infantile (JPI; MIM 612242), le syndrome d'autisme et macrocéphalie (ASD; MIM 605309), le syndrome de Protée (PS; MIM 176920) et Protée-Like dont le syndrome SOLAMEN³⁻⁸.

I.1.1. La maladie (ou syndrome) de Cowden

La maladie de Cowden est un syndrome complexe de prédisposition héréditaire au cancer, de transmission autosomique dominante⁹. Il s'agit d'une maladie rare dont l'incidence est estimée à 1/200000¹⁰ même si cela semble inférieur à la pratique¹¹⁻¹³. La maladie est probablement sous diagnostiquée du fait d'une grande hétérogénéité phénotypique, et de la fréquence élevée en population générale de certaines manifestations cliniques^{3,14}.

Les critères diagnostiques ont été établis par l'International Cowden Consortium (ICC) en 1995, et jusqu'en 2012 étaient remis à jour régulièrement par l'US National Cancer Network NCCN¹⁵.

Depuis septembre 2013, le NCCN¹⁶ propose des critères cliniques révisés, « Revised PHTS clinical diagnostic criteria » dont découlent des critères de test génétique « CS/PHTS testing criteria », qui se fondent sur une analyse critique de la littérature (Pilarski et al.^{17,18}). Ils sont répertoriés dans l'annexe 1 (Version 2.2014). Néanmoins, cette nouvelle nomenclature étant controversée¹⁹, les critères de l'ICC restent largement utilisés par la communauté scientifique et médicale (tableau 1).

Tableau 1 : Clinical Operational Criteria for Cowden Syndrome Based on the International Cowden Consortium (NCCN 2006)

Critères Pathognomoniques
<ul style="list-style-type: none"> • Maladie de Lhermitte Duclos de l'Adulte (présence d'un gangliocytome dysplasique du cervelet) • Lésions cutanéomuqueuses : Trichilemmome facial ou Kératoses Acales ou Lésions papillomateuses (notamment papillomatose gingivale)
Critères Majeurs
<ul style="list-style-type: none"> • Cancer du Sein • Cancer épithélial de la thyroïde (non médullaire et spécialement folliculaire) • Macrocéphalie (circonférence fronto-occipitale ≥ 97eme percentile) • Cancer de l'endomètre
Critères Mineurs
<ul style="list-style-type: none"> • Lésions bénignes de la thyroïde (e.g., adénome, goitre multi nodulaire) • Retard mental modéré (QI ≤ 75) • Polypes hamartomateux intestinaux • Maladie fibrokystique du sein • Lipomes et fibromes • Fibromes utérins • Tumeurs génito-urinaires (en particulier : carcinome rénal à cellules claires) • Malformations génito-urinaires

Le diagnostic de syndrome de Cowden est clinique, établi à partir de la présence de différents critères pathognomoniques, majeurs et mineurs (selon l'ICS). Les signes cliniques les plus fréquemment rencontrés, comprennent la macrocéphalie, les signes cutanéomuqueux incluant notamment une papillomatose orale, et la survenue au cours de l'existence de lésions hyperplasiques, hamartomateuses ou tumorales touchant de multiples organes (sein, thyroïde, tractus digestif, cervelet, peau, rein). Le diagnostic de CS repose sur la présence chez les patients de ^{15,20-22}:

1/ pour les formes familiales (1 apparenté atteint sans degré défini de liaison familiale)

- Un critère pathognomonique
- Ou un critère majeur
- Ou 2 critères mineurs
- Ou BRRS

2/ pour les cas sporadiques (formes isolées)

- 1 critère pathognomonique (LDD) ou lésions cutanéomuqueuses seules si :
 - ≥ 6 papules faciales dont ≥ 3 trichilemmomes ou,
 - Papules faciales et papillomatose orale ou,
 - Papillomatose orale et kératose acrale ou,
 - ≥ 6 lésions de kératose palmo-plantaire
- Ou 2 critères majeurs dont au moins : macrocéphalie
- Ou 1 critère majeur et 3 mineurs
- Ou 4 critères mineurs

3/ pour les Cowden-Like : critères mentionnés ci-dessus moins 1 critère

Le diagnostic de CS est difficile en raison d'une expression de la maladie très variable^{23,24} d'une famille à l'autre (variabilité inter-familiale) mais également au sein d'une même famille (variabilité intra-familiale)²⁵. Sa pénétrance augmente avec l'âge et, est très élevée après 20 ans⁴. Ainsi 90% des individus avec un CS présentent au moins des atteintes cutanéomuqueuses après 20 ans^{20,21}, et 99% ont des manifestations cliniques après 30 ans. Les signes cliniques retrouvés dans les PHTS dont la maladie de Cowden sont détaillés dans l'annexe 2.

La complication majeure de la maladie est représentée par la survenue précoce de tumeurs malignes localisées au niveau du sein (67% à 85% des patientes mutées)²⁶⁻²⁸ et de la thyroïde (15% à 38% des patients mutés)²⁶⁻²⁸. Les autres localisations en fréquence décroissante, sont représentées par le rein (34 % des patients mutés), l'endomètre (28% des patientes mutées), le colon (9% des patients mutés) et la peau (mélanome chez 6% des patients mutés)²⁶. L'âge médian au premier cancer est évalué entre 32 et 39 ans²⁶⁻²⁸.

I.1.2. Les phénotypes particuliers

I.1.2.1. Le syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba

Il représente une forme juvénile du CS. Il est caractérisé par une macrocéphalie, un retard du développement, une lipomatose, des malformations vasculaires, des polypes hamartomateux intestinaux et une pigmentation génitale chez le garçon⁴.

I.1.2.2. La maladie (ou syndrome) de Lhermitte-Duclos de l'adulte

Elle est caractérisée par l'apparition d'un gangliocytome dysplasique du cervelet (hamartome). Elle est quasi-pathognomonique de CS à l'âge adulte, mais l'est beaucoup moins dans l'enfance ²⁹.

I.1.2.3. Le Cowden segmentaire ou syndrome de SOLAMEN (Segmental overgrowth, lipomatosis, arteriovenous malformation and epidermal nevus)

Apparenté au syndrome de Protée, il présente une expressivité très variable expliqué par un mosaïcisme somatique touchant le 2^{ème} allèle de *PTEN*. En plus des signes de CS, il se manifeste par des gigantismes localisés associé à des nævus épidermiques ^{7,8}.

I.1.2.4. Le syndrome d'autisme et macrocéphalie

Il a été retrouvé entre 10% et 20% de mutations germinales de *PTEN* chez des enfants présentant une macrocéphalie associée à des troubles envahissants du développement ^{30,31}.

I.1.2.5. La polypose juvénile infantile

Rare, causée par une délétion germinale des gènes *BMPR1A* et *PTEN*, elle est généralement diagnostiquée avant l'âge de 6 ans devant des saignements digestifs, une diarrhée et entéropathie exsudative sévère ³².

A noter également, que quelques cas de polypose infantile ont été rapportés associés à certaines mutations de *PTEN* ³³.

I.1.2.6. Forme récessive de PHTS

Plus récemment, un nouveau syndrome de transmission autosomique récessive appartenant aux PHTS a été décrit ³⁴ chez deux apparentés présentant une macrocéphalie sévère et un déficit intellectuel modéré dans un contexte de consanguinité. Il a été associé à la présence à l'état homozygote d'un variant délétère hypomorphe de *PTEN*.

A noter que les apparentés hétérozygotes pour ce même variant sont asymptomatiques.

I.1.3. Le gène *PTEN* (phosphatase and tensin homolog) et sa protéine

I.1.3.1. Mutations du gène *PTEN*

I.1.3.1.1. Mutations constitutionnelles

Les mutations de *PTEN*, retrouvées dans le cadre des PHTS, sont inactivatrices (entraînant une perte de fonction de la protéine : modification et/ou interruption du cadre de lecture dans 62 % des cas, trouble de l'épissage dans 12 %) et hétérozygotes à l'état constitutionnel. Elles sont retrouvées sur l'ensemble de la séquence codante mais prédominent dans l'exon 5. Elles sont rares dans les exons 1 et 9^{3,10,35}. Il est à noter que les mutations faux-sens du gène *PTEN*, prédominant au niveau de l'exon 5 qui code le domaine à activité phosphatasique, sont majoritairement responsables d'une perte de la fonction catalytique de la protéine PTEN et donc inactivatrices³⁶.

Plus récemment, quelques mutations au niveau de la région promotrice, et quelques larges délétions ont été mises en évidence dans le CS et le BRRS^{37,38}.

Un phénomène d'haplo-insuffisance est invoqué pour expliquer la survenue d'un certain nombre de manifestations de la maladie comme la macrocéphalie. Cependant, plusieurs lésions dont la plupart des tumeurs malignes, montrent une perte complète de l'expression de *PTEN* en rapport avec une inactivation somatique secondaire de l'allèle sauvage selon le modèle de Knudson³⁹⁻⁴².

I.1.3.1.2. Mutations constitutionnelles et PHTS

La prévalence des mutations constitutionnelles du gène *PTEN* est, selon les dernières études, d'environ 25% à 85% chez les patients atteints de CS (grande variabilité due à la stringence des critères cliniques et biologiques retenus selon les études), et pour les patients CS typiques estimée à 80% environ. Les autres syndromes du spectre PHTS présentent des prévalences moins élevées^{2,22,37,43,44}.

Le taux de mutations de novo est évalué entre 10% et 44%⁴⁵, et plusieurs cas de mosaïcisme somatique présentant un CS démonstratif ont été rapportés dans la littérature^{46,47,48}.

I.1.3.1.3. Mutations somatiques des tissus tumoraux

La répartition des mutations somatiques dans le gène *PTEN* suit celle observée pour les altérations germinales. Les mutations somatiques du gène *PTEN* sont majoritairement retrouvées dans les glioblastomes et les adénocarcinomes de l'endomètre^{35,49}.

Son implication a également été rapportée dans de très nombreux autres types de cancer, et en particulier le cancer du sein, pour lequel les mutations ponctuelles ne s'observent que dans 5% des tumeurs, mais dont l'inactivation par d'autres mécanismes, d'ordre génétique ou épigénétique est plus fréquente, et concerne plus de la moitié des cancers du sein de type « Basal like »⁵⁰.

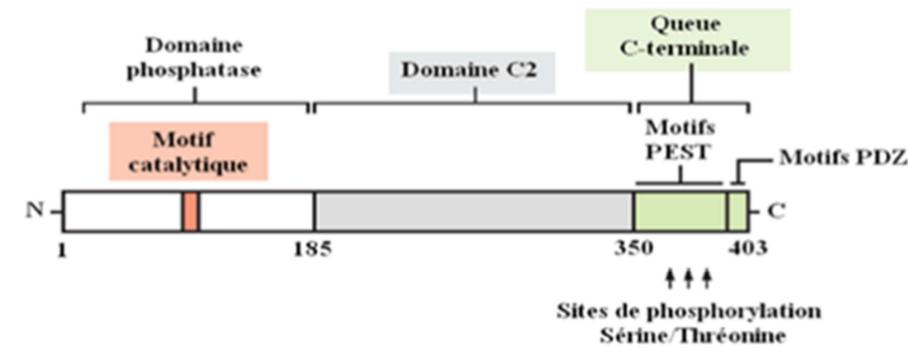
I.1.3.2. Protéine PTEN

La protéine PTEN est composée de 403 acides aminés et comprend 2 domaines distincts représentés dans la figure 1 :

- La partie amino-terminale contient le site catalytique phosphatasique de PTEN. On retrouve au niveau de l'exon 5 le motif conservé HCXXGXXRS/T qui constitue le site actif catalytique. Ce motif spécifique signe l'appartenance de la protéine au groupe des protéines phosphatases à double spécificité, déphosphorylant aussi bien les résidus sérine/thréonine que tyrosine. Ce site actif, plus large que la moyenne dans PTEN est en fait surtout impliqué dans la déphosphorylation des lipides⁵¹.
- La partie carboxy-terminale comprend un domaine liant les phospholipides (domaine C2) localisant principalement PTEN à la membrane plasmique, et un domaine (PDZ) qui interagit avec le domaine phosphatase et qui est important pour les interactions protéine-protéine impliquées dans la cascade de transduction du signal cellulaire.

Elle contient aussi des domaines PEST nécessaires à l'ubiquitinylation, à la translocation nucléaire ou à la dégradation de la protéine PTEN et des sites de phosphorylation de sérine et de thréonine critiques pour la stabilité de la protéine. Les mutations de ces résidus entraînent notamment une diminution de la demi-vie et du niveau d'expression de la protéine PTEN⁵².

Figure 1 : Domaines fonctionnels de la protéine PTEN⁴²



Fonctions de la protéine PTEN⁵³

- Au niveau cytoplasmique, le rôle de PTEN concerne la voie de transduction du signal impliquant la PI3 kinase (phosphatidylinositol 3'-kinase) qui transforme le PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-diphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate)⁵⁴. La protéine PTEN agit en déphosphorylant le substrat PIP3. PTEN de par son activité phosphatasique lipidique agit donc comme un régulateur négatif de la voie de transduction PI3K/AKT/mTOR, inhibant la transduction du signal mitogénique⁵⁵. Cette activité principale de PTEN constituerait son rôle de suppresseur de tumeur.

De plus, de par son activité phosphatasique protéique PTEN jouerait également un rôle dans l'adhésion, la migration et l'invasion cellulaires, notamment par la déphosphorylation des kinases FAK (focal adhésion kinase)⁵⁶, et la régulation de la voie de transduction ras-MAPK (mitogen-activated protein kinase), qui contrôle aussi la survie cellulaire⁵⁷.

- Au niveau nucléaire, PTEN joue de nombreux rôles dépendants ou indépendants de son activité phosphatasique. Il a été impliqué dans le maintien de la stabilité génomique durant la division cellulaire via Plk1 (polo-like kinase 1) et MCM2 (minichromosome maintenance complex component 2)^{58,59}.

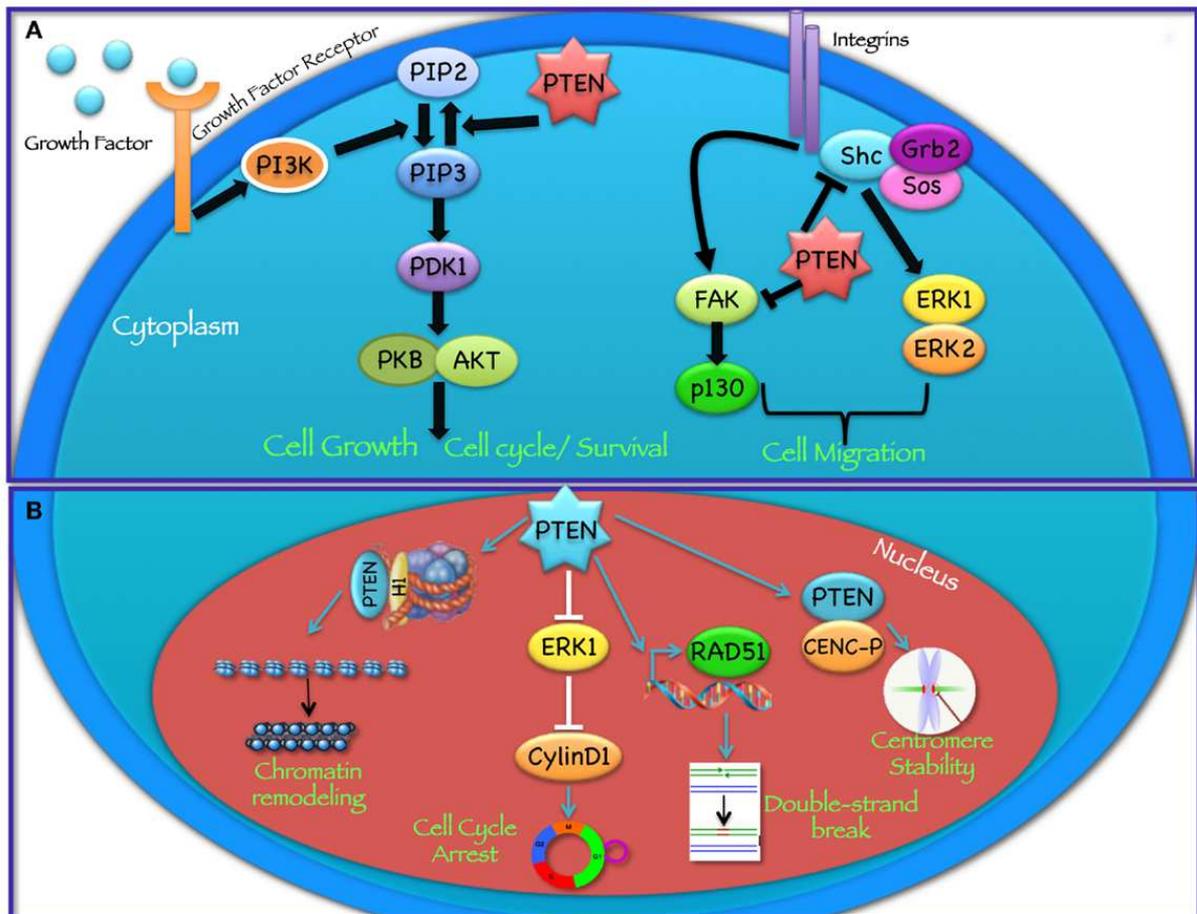
Il maintient également l'intégrité chromosomique via CENP-C (centromere-specific binding proteins) au niveau centromérique (assure la bonne ségrégation des chromatides), et via son interaction avec les histones H1 (au niveau de sa partie C-terminale) qui garantissent la stabilité des structures hétérochromatiniennes^{60,61}.

Il régule aussi la transcription de la protéine RAD51 impliquée dans la voie de réparation des cassures double brin (DSB) de l'ADN et stimulerait la réparation de ces DSB⁶⁰.

Enfin, il contrôlerait le cycle cellulaire en régulant le taux de cycline D1 intranucléaire⁶².

Les principales fonctions de PTEN sont résumées dans la figure 2.

Figure 2 : Principaux rôles (cytoplasmique et nucléaire) de la protéine PTEN⁶³



I.1.4. Corrélation génotype-phénotype

Trouver une corrélation génotype-phénotype dans le CS peut se révéler compliqué du fait de la grande variabilité phénotypique observée, soit interfamiliale, soit intrafamiliale pour une même mutation ^{24,25}.

Néanmoins, dans le phénotype particulier de « Macrocéphalie-autisme » sans autre signe de PHTS, il est décrit une majorité de mutations faux-sens de *PTEN*, alors qu'elles représentent 30% des mutations retrouvées dans les PHTS.

D'autre part des études récentes sur la souris et la levure, ont démontrés que ces patients présenteraient des mutants *PTEN* hypomorphes qui conserveraient leur activité de régulation négative de la voie PI3K/AKT expliquant l'absence de tumeurs observée. Les mutants présentant des mutations perte de fonction ou des faux-sens avec un effet dominant négatif entraîneraient quant à eux une baisse significative de l'activité phosphatasique lipidique expliquant la survenue de tumeurs multiples et précoces ⁶⁴⁻⁶⁶.

De même dans la forme récessive de PHTS décrite plus haut, l'hypothèse avancée est que le variant délétère hypomorphe mis en cause à l'état homozygote affecte seulement l'activité phosphatasique protéique, expliquant l'absence de pathologie tumorale chez les cas index et leurs apparentés hétérozygotes ³⁴.

I.2. Hétérogénéité génétique et PHTS

La grande variabilité du spectre phénotypique des PHTS a amené à suspecter l'implication de *PTEN* devant des présentations cliniques très différentes, augmentant donc le nombre de cas sans explications moléculaires. Certains d'entre eux sont probablement le reflet de l'association fortuite de pathologies retrouvées fréquemment en population générale (ex : cancer du sein et de la thyroïde), ou de la parenté avec d'autres syndromes de prédisposition héréditaire au cancer.

D'autres pourraient traduire l'existence d'une hétérogénéité génétique, impliquant des gènes autres que *PTEN*.

I.2.1. Cas particulier de l'implication de la voie PI3K/AKT dans le Cowden segmentaire

La voie PI3K/AKT est fréquemment dérégulée au cours des processus de transformation tumorale maligne ^{67,68}. Les gènes *AKT1* et *PIK3CA* (codant la sous-unité catalytique de la PI3Kinase) partenaires de *PTEN* dans cette voie, ont été impliqués sous forme de mutations activatrices en mosaïque respectivement dans le syndrome de Protée ^{3,68}, et dans un ensemble lésionnel dénommé PIK3CA-Related Segmental Overgrowth (PRSO) ou PIK3CA-Related Overgrowth Spectrum (PROS) ^{69,70}. Ces mutations en mosaïque ont également été impliquées dans des phénotypes de Cowden segmentaire dit aussi syndrome de SOLAMEN pour lequel on peut donc parler d'hétérogénéité génétique.

Plus récemment, l'exploration de ces deux gènes chez des patients au phénotype de CS a identifié des variants faux sens rares germinaux, posant la question de leur implication dans ce phénotype également ⁷¹.

I.2.2. Hétérogénéité génétique dans les autres présentations phénotypiques

I.2.2.1. *PIK3CA* (phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha)

En 1998, la voie de signalisation PI3K/AKT a été mieux comprise quand il a été démontré que *PTEN* pouvait déphosphoryler PIP3 qui est le principal produit de la PI3 kinase ⁵⁴. Le

PIP3 est alors nécessaire pour la translocation de la protéine AKT1 à la membrane plasmique, où elle est phosphorylée et activée par les kinases en amont.

PIK3CA constitue donc un gène majeur de cette voie. Il a été impliqué en génétique tumorale par la révélation d'un nombre de copie augmenté dans de nombreux cancers, par exemple de 40% dans le cancer de l'ovaire ⁷²⁻⁷⁴. Ces gains de copies mais aussi des mutations somatiques ont été liés à une augmentation de la phosphorylation d'AKT1 dans de nombreux types tumoraux, et donc à une activation de la voie de signalisation (mutations gain de fonction) ⁷⁵⁻⁷⁷.

C'est également ce mécanisme qui semble impliqué chez les patients avec un CS, sans mutation du gène *PTEN*, mais avec une mutation homogène de *PIK3CA* retrouvée. En effet, des essais fonctionnels ont montré que ces mutations entraîneraient une régulation positive de la protéine AKT1 phosphorylée, et augmenteraient les taux cellulaires de PIP3 ⁷¹.

Néanmoins, la pathogénicité de ces mutations peut être remise en question dans la mesure où les mutations activatrices de ces gènes sont considérées comme incompatibles avec la survie, ne pouvant s'observer que sous forme d'un mosaïcisme déjà responsable d'un phénotype très lourd.

I.2.2.2. *AKT1* (V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 1)

Les phosphoinositide 3-kinases ou PI3K génèrent des lipides inositol spécifiques impliqués dans la régulation de la croissance cellulaire, la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire. Dans les cellules au repos, AKT1 se situe dans le cytosol dans une conformation de faible activité mais lors de la stimulation cellulaire, elle est activée par l'entremise d'un phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate ou phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate ^{68,78}.

Des mutations somatiques du gène *AKT1* ont été retrouvées dans différents types de cancer (sein, colorectal, ovaire) ⁷⁹.

L'implication du gène *AKT1* dans le syndrome de Protée a été établie en 2011 après le séquençage d'exomes ⁶⁸, où une mutation en mosaïque a été décrite, confirmant l'hypothèse de 1987 ⁸⁰ concernant l'effet létal d'une mutation dans tous les tissus. Le lien avec le CS est beaucoup plus hypothétique, même si une mutation homogène activatrice d'*AKT1* a été rapportée chez un patient présentant un syndrome de Cowden clinique ⁷¹.

I.2.2.3. SDHB-D (Succinate Deshydrogenase B/C/D)

L'équipe de Charis Eng a rapporté des mutations germinales faux-sens des gènes *SDHB/C/D* dans des phénotypes suggestifs de CS ⁸¹⁻⁸³, alors que les mutations inactivatrices de ces 3 gènes sont responsables de paragangliomes héréditaires selon une transmission autosomique dominante pour *SDHB/C*, et soumise à empreinte parentale pour *SDHD*.

Ces résultats ont été par la suite contestés, les mutations rapportées correspondant à des polymorphismes rares, et non à d'authentiques mutations délétères ⁸⁴. Néanmoins, ces variants pourraient être considérés comme « modificateurs » particulièrement au niveau du risque et du type histologique du cancer de la thyroïde chez des patients présentant un CS avec mutation délétère de *PTEN* identifiée ^{85,86}.

I.2.2.4. Hyperméthylation du promoteur de *KLLN* (killin, p53-regulated DNA replication inhibitor)

La même équipe, a mis en évidence au niveau du promoteur du gène *KLLN* situé en 5' de *PTEN* une méthylation augmentée de manière significative chez des patients présentant un CS/CSL avec ou sans mutation de *PTEN* retrouvée ^{81,83,87}. Néanmoins, l'implication d'altérations de ce gène dans la prédisposition au cancer du sein n'est pas relevante contrairement à *PTEN* ⁸⁸. L'hyperméthylation du promoteur de *KLLN* pourrait cependant être un bon marqueur d'altérations cryptiques délétères de *PTEN* non mises en évidence à ce jour comme des mutations introniques profondes chez des patients avec un CS sans diagnostic moléculaire ⁸⁹.

I.2.2.5. SEC23B (Sec23 Homolog B, Coat Complex II Component)

Plus récemment, il a été rapporté dans une famille évocatrice de CS un variant germinale délétère (présent à l'état hétérozygote) dans le gène *SEC23B* qui coségrégait chez les individus atteints. Ce gène a déjà été mis en cause dans la survenue d'anémie dysérythropoéïtique congénitale de type II mais sur un mode de transmission autosomique récessive. Des variants délétères de ce même gène se retrouveraient également plus fréquemment dans une population atteinte de cancer de la thyroïde par rapport à la population générale ⁹⁰. Néanmoins 2 des 3 variants décrits ont des fréquences alléliques rapportées de 0.4% et 0.75% qui ne correspondent pas à l'incidence du CS, et aucune autre famille typique de CS n'a été décrite depuis.

I.3. Objectifs du travail

L'existence de patients présentant un phénotype évocateur du diagnostic de CS sans aucune mutation du gène *PTEN* mise en évidence, suggère l'existence d'une certaine hétérogénéité génétique pour cette affection. L'exploration de ces patients à la recherche du gène responsable de leur présentation phénotypique pourrait permettre d'identifier un partenaire de *PTEN* encore non caractérisé dont la fonction peut apporter un éclairage sur le rôle de *PTEN* dans la cancérogénèse et le contrôle de la stabilité du génome.

Pour explorer cette hypothèse, l'objectif de ce travail est donc de rechercher par analyse comparative d'exomes, des altérations moléculaires dans un gène commun (autre que *PTEN*) chez des patients dont la présentation clinique est fortement évocatrice du diagnostic de PHTS, mais pour lesquels aucune mutation constitutionnelle du gène *PTEN* n'a pu être identifiée en régions codantes, et non codantes pour certains.

Ces analyses ont été menées sur une série de patients dont les prélèvements ont été adressés au laboratoire de génétique de l'institut Bergonié pour étude du gène *PTEN*, et se sont faites au moyen de séquençage de nouvelle génération (NGS ; next generation sequencing) sur ADN constitutionnel avec capture exomique.

II. Matériels et Méthodes

II.1. Matériels

II.1.1. Série de patients (étude initiale)

La série de patients répertoriés comprend 22 cas index présentant un phénotype clinique évocateur de maladie de Cowden, pour lesquels aucune mutation n'a été identifiée dans les régions codantes, et non codantes (pour 18 patients) du gène *PTEN* (analyses faites dans le laboratoire).

Un consentement éclairé pour diagnostic génétique a été signé par tous ces patients ou par leur ayant-droit.

Les ADNs génomiques constitutionnels ont été extraits selon les protocoles en vigueur au laboratoire lors des dates de réception des prélèvements des patients (1991-2014).

Pour deux d'entre eux, de présentation sporadique, on disposait également de l'ADN des deux parents, permettant une analyse en trio.

La série étudiée au niveau expérimental, par NGS exomique, comprend 22 patients et 4 apparentés, correspondant à 22 familles, donc à 22 cas index.

Les phénotypes des 22 cas index sont détaillés dans l'annexe 3.

II.1.2. Série de tumeurs du sein (étude secondaire, insertion de séquence *Alu*)

La série de tumeurs du sein étudiée dans un second temps comprend 35 biopsies issues de cancers du sein avec une perte immunohistochimique de PTEN, mais sans altération génétique de *PTEN* retrouvée (mutation ponctuelle ou réarrangement de grande taille)⁹¹.

Les détails clinicopathologiques sont répertoriés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Caractéristiques clinico-pathologiques des 35 tumeurs du sein sélectionnées⁹¹

Tumeur	Age au diagnostic(an)	Phénotypes tumoraux	Score IHC PTEN	Mutation ponctuelle <i>PTEN</i>	Perte d'hétérozygotie 10q
KFAM_006	41	TN&BL	0	/	Oui
KFAM_060	42	TN&BL	30	/	Non
KFAM_082	50	Luminal A	0	/	Non
KFAM_085	64	Luminal A	0	/	Non
KFAM_092	51	TN&BL	0	/	Oui
TN_02	80	TN&BL	0	/	Oui
TN_09	62	TN&BL	0	/	Non
TN_15	66	TN&BL	0	/	Non
TN_18	58	TN&BL	10	/	Non
TN_20	47	TN&BL	0	/	NI
TN_25	39	TN&BL	0	/	Oui
TN_30	60	TN&BL	0	/	Non
TN_31	57	TN&BL	10	/	Oui
TN_33	37	TN&BL	0	/	NI
TN_48	45	TN&BL	0	/	NI
TN_52	75	TN&BL	10	/	Non
TN_55	68	TN&BL	0	/	Non
TN_59	81	TN&BL	0	/	Oui
TN_65	71	TN&BL	0	/	Oui
TN_66	73	TN&BL	20	/	ND
TN_67	84	TN&BL	30	/	Non
TN_71	63	TN&BL	20	/	Non
TN_77	57	TN&BL	0	/	ND
TN_79	51	TN&BL	0	/	Non
TN_81	50	TN&BL	0	/	ND
TN_83	66	TN&BL	10	/	Non
RELB_002	40	TN&BL	0	/	Non
RELB_024	69	Luminal A	0	/	Oui
RELB_036	40	Luminal B	0	/	Oui
RELB_049	55	TN&BL	0	/	Non
RELB_054	65	Luminal A	50	/	Oui
RELB_056	52	Luminal A	0	/	Non
RELB_057	60	Luminal A	0	/	Non
RELB_065	59	TN&BL	0	/	Non
RELB_087	42	TN&BL	0	/	Non

TN: Triple négatif, BL: Basal-like, NI: Non interprétable, ND: Non disponible

II.1.3. Série de patients (étude secondaire, exploration de *LDDX1*)

La série de patients étudiée dans un second temps comprend 5 patients ayant tous présenté une maladie de Lhermitte Duclos avant l'âge de 7 ans, et pour lesquels aucune mutation n'a été identifiée dans les régions codantes du gène *PTEN* (analyses faites dans le laboratoire).

Un consentement éclairé pour diagnostic génétique a été signé par tous ces patients ou par leur ayant-droit.

Les phénotypes de ces patients sont répertoriés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Phénotypes des 5 patients faisant partie de l'étude « *LDDX1* »

Identifiant	Présentation sporadique	Age au diagnostic de LDD	LDD Symptomatique	Signes de PHTS	Autre
G2005209	Oui	6 ans	ND	Non	
G2012492	Oui	4 ans	Non	Non	Anomalies dentaires (émail et bourgeons)
G2012327	Oui	6 ans	Oui	Non	
G2012520	Oui	6 mois	Oui	Non	
G2007168	Oui	3 ans	ND	lipomatose	Nevus psiloliparus

ND: Non documenté, LDD : maladie de Lhermitte-Duclos

II.2. Méthodes

II.2.1. Séquençage exomique

La réalisation des 26 exomes a été confiée à la société Integragen.

II.2.1.1. Banque de capture (Agilent technologies) et séquençage NGS (next generation sequencing) des exomes par synthèse (Illumina)^{92,93}

II.2.1.1.1. Constitution de la librairie de Capture⁹⁴

La banque de sondes oligonucléotidiques biotinyllées de 120-mers du kit Agilent SureSelect All Exon V5® qui permet de réaliser la capture exomique de 21 522 gènes soit 357 999 exons (50 Mb) à partir d'ADN génomique, a été utilisée.

Elle a été construite à partir des bases de données suivantes : CCDS (Consensus Coding Sequences), RefSeq (Reference Sequences), GENCODE (Genome annotation for ENCYclopedia Of DNA Elements), miRBase (microRNA database), TCGA (The Cancer Genome Atlas), UCSC Genome (University of California, Santa Cruz).

Pour chaque exon de chaque gène, une région intronique d'environ 50 bases de part et d'autre de l'exon était ajoutée.

La profondeur de capture attendue est d'1X pour 100% des cibles, et de 10X pour 94% des cibles.

II.2.1.1.2. Préparation de la librairie d'ADN génomique

La capture des séquences, l'enrichissement et l'éluion ont été effectués selon le protocole et les recommandations du fournisseur (SureSelect, Agilent) sans modification, en vue du séquençage haut débit selon la technologie Illumina.

Brièvement, 3 µg d'ADN génomique, quantifiés au Qubit® (Invitrogen) sont fragmentés par sonication, et purifiés afin d'obtenir des fragments de 150 à 200 pb (paires de bases). Il faut ensuite réparer les extrémités, modifier l'extrémité 3' des fragments (ajout d'une adénine aux extrémités 3'), puis liquer les adaptateurs oligonucléotidiques de séquençage *Paired-End* à chaque extrémité. Ces fragments sont alors de nouveau purifiés et amplifiés par 4 à 6 cycles de PCR. 500ng de ces librairies purifiées sont alors déshydratés avant d'être repris dans un tampon d'hybridation, puis hybridés à la banque de sondes oligonucléotidiques de capture

SureSelect All Exon V5® pendant 24h. Après hybridation, lavage, et élution, les séquences capturées de chaque échantillon sont de nouveau amplifiées (10 à 12 cycles de PCR) avec ajout d'un index spécifique de chaque échantillon. La fraction obtenue est alors purifiée, qualifiée, et quantifiée par PCR quantitative afin d'obtenir suffisamment d'ADN matrice pour la suite du processus en aval.

Le mélange (pool) des 16 échantillons est alors réalisé, quantifié et déposé sur l'HiSeq 2000® d'Illumina pour séquençage, par synthèse de séquences de 75 bases de chaque extrémité.

II.2.1.1.3. Séquençage sur HiSeq 2000® (Illumina)

C'est une technologie de séquençage sur puce. Chaque cycle comprend 3 étapes : Incorporation, détection et déprotection. Cette technique est fondée sur l'intégration de plusieurs méthodes :

- Les biopuces à ADN (flowcell),
- Une variante de la technique de Sanger appelé CRT (*cyclic reversible termination*),
- Un traitement informatique pour l'acquisition, le traitement et l'analyse des images.

- *Flowcell* (ici PE Flow Cell V3-8 échantillons/flowcell)

La très haute densité de la puce de séquençage (flowcell) (plus de 100 millions de molécules par centimètres carré) permet de séquencer environ 100.000 paires de bases par seconde. L'ADN est coulé dans des cellules spécialement conçues pour assurer la fixation de chaque molécule d'ADN obtenue, après amplification en phase solide de la première molécule d'ADN fixé grâce aux adaptateurs. La formation des ponts d'amplifications permet d'avoir une haute densité de brins d'ADN ce qui facilite et augmente le débit de séquençage.

- CRT

Le principe de ce séquençage est basé sur l'incorporation réversible de nucléotides fluorescents (CRT : *cyclic reversible termination*) et la lecture optique de cette fluorescence. Comme pour la technique de Sanger il s'agit d'une terminaison de synthèse fondée sur l'utilisation d'un terminateur (mais celui-ci est réversible) contenant un groupement de protection attaché au nucléotide qui termine la synthèse d'ADN. L'élimination du groupement de protection par photoclivage utilisant la lumière ultraviolette (> 300nm) permet la

restauration du groupement fonctionnel du nucléotide incorporé, ce qui permet à l'ADN polymérase d'incorporer le prochain nucléotide et ainsi de suite. Les molécules de 175 paires de bases environ sont séquencées à chaque extrémité (ici 75 bases) puis alignées sur la séquence du génome humain de référence pour être reconstituée.

II.2.1.2. Analyses NGS informatiques primaire, secondaire et tertiaire

L'analyse bio-informatique primaire consiste en la conversion en temps réel des 112 images capturées à chaque cycle d'incorporation de nucléotide (4 fois 28 *tiles*) : pour chaque cycle, il y a 4 images capturées correspondant à chacun des 4 nucléotides potentiellement incorporés, réalisées pour chacune des 28 zones (*tile*) de la *flowcell*. Le séquençage réalisé est un séquençage paired-end à une profondeur moyenne de 60X, c'est-à-dire que chaque base est lue en moyenne 60 fois. Le séquenceur traduit ensuite ces signaux en séquences (« *basecalling* ») et un score de qualité est assigné à chaque base. Les logiciels gérant cette phase de NGS sont HiSeq Control Software 2.2.58® (HCS) et Real Time Analysis 1.18.64.0® (RTA).

L'analyse secondaire, et la première partie de l'analyse tertiaire se résument en deux grandes étapes : l'alignement des séquences sur le génome et la détection des variants. On regroupe sous le terme de « *pipeline* » la succession des différents algorithmes et programmes utilisés pour réaliser l'analyse. Ici, l'analyse des données de séquençage fournie par Integragen utilise le pipeline fourni par Illumina, CASAVA 1.8.2® qui comprend l'alignement des séquences sur le génome humain de référence hg19, et une détection des variants SNVs (*single nucleotide variation*) et Indels (Insertions-Délétions).

Les fichiers bruts de format .bcl issus de l'analyse primaire, ont été d'abord convertis en fichiers de format .fastq qui permettent de stocker les séquences nucléiques et leurs scores de qualité. Le score de qualité utilisé est le QPhred, qui correspond à une probabilité p d'erreur de mauvaise identification de la base, codée en $-10 \log_{10} p$. Ainsi, un QPhred de 30 correspond à une probabilité d'erreur de 0.1%.

Puis, à partir des données .fastq, les séquences ou *reads* ont été alignées sur le génome de référence grâce à l'algorithme ELANDv2e®, et ont été converties en fichiers de format .sam (*Sequence Alignment/Map*). Les fichiers .sam ont été ensuite compressés, indexés et convertis en fichiers .bam, qui permettent de visualiser les *reads* alignés, sous IGV® (*Integrative Genomics Viewer* Broad Institute, USA) ou Alamut® (Interactive Biosoftware, Rouen, France). Les *reads* dupliqués, ou avec une taille d'alignement trop courte, ou avec une qualité d'alignement trop faible ont été éliminés. Cette étape a été réalisée par le module

« sort » de CASAVA. Les fichiers .bam ont subis alors un nouveau réalignement car les Indels peuvent créer de faux SNVs, et également une recalibration des scores de qualité des bases par le module « CallSmallVariants » de CASAVA.

A partir de ces données, des fichiers de format .vcf (*variant call format*) ont été générés au niveau des régions cibles. Ils permettent de visualiser les différentes variations détectées, simultanément aux fichiers .bam.

Les fichiers .vcf bruts ne sont pas annotés, cela signifie que les variants rapportés sont exprimés en position génomique, allèle de référence/allèle variant, et des données de qualité comme la profondeur de lecture et le score de qualité du variant. Ici, l'annotation a été réalisée en interne par Integragen incluant :

- Une annotation des gènes par les bases de données Refseq et Ensembl.
- Une annotation des variants référencés par les bases de données dbSNP version 132, 1000Genomes version V3-20101123, HapMap version 27, et EVS (« *Exome Variant Server* ») version ESP6500SI-V2-SSA137, qui donnent des indications sur la fréquence allélique en population générale des variants.
- Une annotation des variants référencés par la base de données d'Integragen, qui détermine des fréquences exomiques (HMZ/HTZ) sur la base de 201 exomes pour les SNVs, et 130 exomes pour les Indels.
- Des caractérisations des variants : Intronique/exonique/UTR, silencieuse/faux-sens/non-sens/ au niveau des sites consensus d'épissage, de statut homozygote(HMZ) /hétérozygote(HTZ) (nb : non basé sur le ratio allélique mais sur un algorithme complexe de probabilité de statut).
- Une annotation des SNVs par l'algorithme de prédiction Polyphen.
- Des informations sur les conséquences des variants situés sur la séquence transcrite et codante : position du variant dans la séquence codante, position du variant dans la séquence protéique, description du codon sauvage/muté, descriptif de l'acide aminé sauvage/muté.

A l'issue de l'analyse CASAVA 1.8, pour chaque échantillon, un fichier Excel recensant les variants de type SNV et un fichier recensant les variants de type Indel a été généré.

II.2.2. Séquençage Sanger

Les variants suspects, détectés en NGS ont été contrôlés par séquençage conventionnel selon la méthode de Sanger^{95,96}.

L'ADN a été amplifié par PCR (polymerase chain reaction) en utilisant le kit QIAGEN Multiplex PCR® ou AmpliTaq Gold®. Les produits de PCR ont été purifiés en utilisant le kit ExoProStar™ (GE Healthcare UK). La réaction de séquence a été réalisée en utilisant le kit BigDye Terminator Cycle Sequencing® (version 3.1; Life Technologies, Paisley, UK). Les produits de séquençage ont été purifiés en utilisant le kit Agencourt CleanSEQ® (Beckman Coulter Genomics, Allemagne) , et l'analyse de la séquence a été réalisée sur le séquenceur ABI 3130xl DNA Analyzer® (Life Technologies) .

Les amorces et les conditions de PCR utilisées sont détaillées dans l'annexe 4.

III. Résultats

III.1. Constitution, description de la série, et calcul des scores prédictifs de mutation

III.1.1. Description phénotypique de la série de patients

La série de patients comprend 22 cas index. Ils sont, à l'exception de trois d'entre eux, diagnostiqués « Cowden syndrome » selon les critères définis par l'International Cowden Consortium 2006.

Pour les trois cas restants, il s'agit d'une enfant présentant un syndrome de Lhermitte-Duclos, d'une femme présentant un syndrome de SOLAMEN, deux pathologies entrant dans le spectre des PHTS, et enfin d'un homme présentant un « Cowden-like syndrome » avec des antécédents familiaux évocateurs.

A noter que seuls 10 des cas index remplissent les « Revised PHTS clinical diagnostic criteria », ce qui s'explique par des critères diagnostiques plus stringents.

Un tableau récapitule les signes cliniques par patient, et l'interprétation clinique qui en découle (tableau 4).

Tableau 4 : Signes cliniques permettant le diagnostic de CS chez les 22 cas index

Identification patients	Histoire Familiale	Signes cliniques selon ICC 2006				Critères diagnostiques Cowden ICC 2006	Critères diagnostiques PHTS NCCN 2014
		Pathogénomique (P)	Majeurs (M)	Mineurs (m)			
2006406	Non	-	Macro+Kc thyroïde	Lipome+ Digestif	2M+2m	3M(2E)+4m	
2010186	Oui	LCM	Macro+Kc sein	Thyroïde	1P+2M+1m	3M(1E)	
2009038	Non	LCM	-	Thyroïde+sein+uro	1P+3m	1M+2m	
2010029	Non	LCM	Kc thyroïde+Kc sein+Macro	Kc Rein+lipomes	1P+3M+2m	3M(1E)+4m	
2010391	Non	LCM	Macro	Digestif+thyroïde+sein+uro	1P+1M+4m	3M(2E)+1m	
2012527	Oui	LCM	Macro+Kc thyroïde	Sein+fibromes	1P+2M 2m	2M(1E)+1m	
2001018	Non	-	Kc thyroïde	Digestif+uro+thyroïde	1M+3m	1M(1E)+3m	
2001012	Oui	LDD-LCM	Macrocéphalie	Thyroïde+digestif+lipomes+fibromes	2P+1M+4m	3M(2E)+5m	
1998101	Oui	LCM	Macro	Digestif+uro+thyroïde+lipomes	1P+1M+4m	4M(2E)+4m	
1998002	Non	LCM	Macro	Digestif+thyroïde+sein+fibromes+uro	1P+1M+5m	3M(2E)+1m	
2002213	Oui	LCM	Macro	Digestif+thyroïde+lipomes	1P+1M+3m	3M(2E)+2m	
2010148	Oui	-	Macro	Digestif+Thyroïde+Sein+Uro	1M+4m	2M(2E)+1m	
1999009	Non	LDD	Macro+Kc thyroïde	Lipomes+Tyroïde	1P+2M+2m	3M(2E)+4m	
2008207	Oui	LCM	-	Digestif+ Thyroïde+Sein	1P+3m	2M(1E)+1m	
2012115	Non	-	LDD de l'enfant		NA	NA	
2003023	Non	LDD	-	Thyroïde	1P+1m	2M(1E)+1m	
2010384	Oui	LCM	Macro+Kc endometre+Kc sein	Thyroïde	1P+3M+1m	4M(2E)+1m	
2013161	Non	-	Macro+Kc thyroïde+Kc sein	Sein	3M+1m	2M(1E)+2m	
2003007	Oui	-	-	Thyroïde+Lipomes	1P+2m	1M+2m	
2011694	Oui	-	Macro	Thyroïde+Lipomes	1M+2m	1M(1E)+2m	
2008383	Oui	LCM	Kc Sein+Kc thyroïde	-	1P+2M	2M+1m	
2010018	ND	-	SOLAMEN		NA	NA	

Macro : Macrocéphalie, Digestif : polypes hamartomateux intestinaux, LDD : Syndrome de Lhermitte-Duclos, LCM : lésions cutanéomuqueuses répondant aux critères pathogénomiques, Uro : Malformation urogénitales, Kc : Cancer, Thyroïde : lésions bénignes de la thyroïde, Sein : maladie fibrokystique du sein, ND : non défini

III.1.2. Calcul des scores Cleveland Clinic et PTEN Predict

Du fait d'une grande hétérogénéité phénotypique, et de la fréquence élevée en population générale de certaines manifestations cliniques, deux équipes (Tan et Eng à Cleveland, et Pilarski à Columbus) ont créé des scores prédictifs de mutation, à forte valeur prédictive positive, correspondant à la probabilité de détecter une mutation constitutionnelle du gène *PTEN* en présence de signes cliniques évocateurs.

- **Score Cleveland Clinic (CC)** : Tan et al. ont criblé le gène *PTEN* sur 3042 patients présentant une suspicion de PHTS. Des mutations pathogènes ont été identifiées chez 290 individus (9,5%). Ils ont développé à partir de ces données un score semi-quantitatif qui permet de donner une estimation de la probabilité de trouver une mutation du gène *PTEN* en présence de signes cliniques évocateurs. Le tableau du « poids » de chaque symptôme ainsi que le calcul du score par une somme des « poids » est présenté en annexe 5⁴⁴.
- **Score PTEN Predict (PP)** : Pilarski et al. ont étudié une série de 802 patients pour une analyse du gène *PTEN*. 172 patients (21.4%) présentaient une mutation délétère. Parmi les porteurs de mutations, d'importantes différences phénotypiques par rapport aux précédentes études ont été mises en évidence et une analyse de régression logistique a permis de créer un modèle de prédiction des mutations. Le calculateur du risque de mutation en fonction de la clinique est présenté dans l'annexe 6⁹⁷.

Ces 2 scores ont été calculés à titre indicatif en parallèle de l'analyse exomique, afin de distinguer les cas index avec une probabilité importante de trouver une mutation du gène *PTEN*.

A noter que les cas index remplissant les critères NCCN ont des scores CC et PP moyens plus élevés (respectivement 79% et 78%), que ceux calculés pour l'ensemble des patients (respectivement 53% et 61%).

Le tableau 5 regroupe tous les patients de l'étude avec les probabilités respectives selon les scores CC et PP. Les patients ont été classés par ordre décroissant de la valeur du score CC (score le plus complet en termes de signes cliniques utilisés pour le calcul du score).

Tableau 5 : Scores prédictifs de mutation de PTEN de la série de patients

Numéro de Dossier	Interprétation Clinique	Score PP : Probabilité de CS	Score CC : Somme	Score CC : Probabilité de CS
2001012	Cowden	85,00%	66	99,00%
1998101	Cowden	93,30%	60	99,00%
2006406	Cowden	93,30%	47	99,00%
1998002	Cowden	97,20%	45	99,00%
2002213	Cowden	93,30%	37	97,00%
1999009	Cowden	58,20%	32	91,00%
2001018	Cowden	10,00%	30/enfant	85,00%
2010391	Cowden	85,00%	30	82,00%
2009038	Cowden	52,70%	28	77,00%
2010029	Cowden	65,90%	26	67,00%
2010384	Cowden	94,40%	23	47,00%
2013161	Cowden	26,50%	23	47,00%
2010148	Cowden	51,40%	22	41,00%
2012527	Cowden	33,20%	19	27,00%
2008207	Cowden	34,7%	18	19,00%
2011694	Cowden-like	58,20%	15	10,00%
2010186	Cowden	26,50%	15	10,00%
2003023	Cowden	15,30%	15	10,00%
2003007	Cowden	15,30%	11	4,00%
2008383	Cowden	15,30%	8	2,00%
2010018	SOLAMEN	NA	NA	NA
2012115	LDD de l'enfant	NA	NA	NA

NA : Non applicable, LDD : Syndrome de Lhermitte-Duclos

III.1.3. Pré-criblage

Avant de réaliser les exomes par séquençage de nouvelle génération chez les 22 cas index, tous les prélèvements (ADN génomiques constitutionnels) ont fait l'objet, soit initialement, soit par reprise d'analyse moléculaire, d'une recherche de mutations ponctuelles du gène *PTEN* en régions codantes (+/- 50pb en régions introniques flanquantes) et non codantes pour 18 d'entre eux, par la technique EMMA (*Enhanced Mismatch Mutation Analysis, Fluigent*)^{98,99}, et/ou par la technique NGS par synthèse (Illumina)^{92,93}. Les réarrangements de grande taille (RGT) avaient également été recherchés par QMPSF (*Quantitative Multiplex PCR of Short Fragments*)¹⁰⁰.

Les profils variants avaient été séquencés selon la méthode de Sanger (comparativement à un témoin normal pour chaque amplicon testé)^{95,96}.

Les résultats sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Résultats de recherche de mutations ponctuelles et grands réarrangements de
PTEN lors du pré-criblage

Identifiant patient	EMMA		NGS	QMPSF
	Résultats du criblage et du séquençage de confirmation			
2006406	Polymorphisme Intron 8		Idem+8 VSI introniques profonds	Normal
2010186	Polymorphisme Intron 8		-	Normal
2009038	Profil Exon 8 douteux/séquençage normal		Idem+7 VSI introniques profonds	Normal
2010029	Polymorphisme Intron 7 ¹ et 8		Idem+5 VSI introniques profonds	Normal
2010391	Profil Exon 1 douteux/séquençage normal+Polymorphisme Intron 7 ² et 8		Idem+6 VSI introniques profonds	Normal
2012527	Normal		-	Normal
2001012	Suspicion grande délétion exon 5 non confirmée en QMPSF		Idem+7 VSI introniques profonds	Normal
1998101	Profil Exon 5 douteux/séquençage normal+Polymorphisme Intron 8		Idem+2 VSI introniques profonds	Normal
1998002	Polymorphisme Intron 8		Idem+6 VSI introniques profonds	Normal
2002213	Profil Exon 1 douteux/séquençage normal		Idem+7 VSI introniques profonds	Normal
2010148	Normal		Idem+2 VSI introniques profonds	Normal
1999009	Normal		Idem+7 VSI introniques profonds	Normal
2008207	Polymorphisme Intron 8		Idem+4 VSI introniques profonds	Normal
2003023	Polymorphisme Intron 8		Idem+2 VSI introniques profonds	Normal
2010384	Profil Exon 8 douteux/séquençage normal		Pas de VSI intronique profond	Normal
2013161	Normal		-	Normal
2003007	Polymorphisme Intron 8		Pas de VSI intronique profond	Normal
2011694	Normal		Idem+6 VSI introniques profonds	Normal
2008383	Polymorphisme Intron 8		Idem+1 VSI introniques profonds	Normal
2010018	Polymorphisme Intron 8		Idem+7 VSI introniques profonds	Normal
2012115	Normal		Idem+4 VSI introniques profonds	Normal
2001018	Normal		Idem (mais regions non codantes non explorées)	Normal

Polymorphismes intron 7¹; 7² : c.802-4_802-3delTT ; c.802-3_802-2dupT. Polymorphisme 1 intron 8 : c.1026+32T>G.
VSI : Variant de Signification Inconnue

Aucune mutation délétère ou de signification inconnue n'a été retrouvée chez les 22 patients sur la séquence exonique de *PTEN*.

Onze patients présentent le polymorphisme fréquent de l'intron 8 du gène *PTEN* (c.1026+32T>G), et 2 patients présentent un autre polymorphisme intronique rare. Pour la QMPSF, tous les patients avaient des profils normaux.

III.2.Stratégie d'analyse tertiaire : tri des données informatiques générées par Intégragen (ERIS®)

III.2.1. Résultats globaux de séquençage exomique

- Pour chaque patient, environ 50 000 000 de séquences ont été générées pour les *reads* 1, et le même nombre pour les *reads* 2 (séquençage *Paired-End*). Le pourcentage d'alignement était de 96% en moyenne, le score de qualité moyen par base de 35 (Qphred), la profondeur moyenne de 70X, la couverture exomique moyenne de 98% à 1X et 95% à 10X, témoignant d'un séquençage de bonne qualité.
- Pour chaque patient, environ 2700 Indels et 37 000 SNVs ont été identifiés.

III.2.2. Analyse comparative de l'ensemble des exomes

III.2.2.1. Tri des variants par le logiciel ERIS®

III.2.2.1.1. Paramètres de tri choisis

Afin d'effectuer un premier tri des variants retrouvés pour chaque patient, le logiciel ERIS® d'Intégragen a été utilisé avec les filtres suivants (figure 3):

- Statut hétérozygote des variants (transmission dominante du CS et pas de consanguinité dans notre cohorte)
- Variants avec impact délétère clair (Indels, SNVs non sens, SNVs au niveau des sites consensus d'épissage)
- Variants avec une fréquence allélique rapportée dans les bases de données 1000Genome, EVS, HapMap) <0,1% (incidence CS estimé à 1/200000 ¹⁰)
- Variants avec une fréquence allélique rapportée dans la base d'Intégragen au statut HTZ <1 % et au statut HMZ<0,5% (élimine les « variants artefacts » dus à la technique ou à des erreurs d'alignement)
- Variants avec une profondeur de lecture minimale de 10X
- Variants présents dans des gènes pour lesquels au moins deux cas index de la série présentaient un variant

Figure 3 : Procédure de tri des variants dans ERIS® (analyse globale)

Variations : All

Type :

- 3'UTR
- 5'UTR
- Intronic
- Missense
- Nonsense
- Synonymous
- Exonic (indel)
- Splice intron
- Splice exon

External Databases :

Keep known SNPs (dbSNP132) : Yes Exclude benign Polyphen2 : No

EVS variant freq max (%) : 0.1 Integragen het freq max (%) : 1

1000G variant freq max (%) : 0.1 Integragen homo freq max (%) : 0.5

Hapmap variant freq max (%) : 0.1

Quality Control :

Min depth : 10

Exclude ambiguous genotypes :

Exclude "No Coverage" :

Status : HTZ

Sets with at least 1 variant

≥ 2

III.2.2.1.2. Variants générés par ERIS®

En appliquant ces filtres, un total de 125 variants dans 69 gènes différents a été généré pour les 22 cas index. Pour 31 gènes, les patients présentaient le même variant. Parmi ces 69 gènes, deux sont impliqués dans la prédisposition au cancer : *PTEN* et *BRCA2*.

III.2.3. Analyse des deux trios

III.2.3.1. Tri des variants dans le logiciel ERIS®

III.2.3.1.1. Paramètres de tri choisis

Afin d'effectuer un premier tri des variants dans les deux trios le logiciel ERIS® d'Integragen a été utilisé avec les filtres suivants (figure 4):

- Néomutations (i.e. tous les variants présents chez l'enfant et présents chez au moins un des deux parent sont éliminés)
- Statut hétérozygote des variants (transmission dominante du CS et pas de consanguinité dans notre cohorte)

- Variants avec une fréquence allélique rapportée dans les bases de données 1000Genome, EVS, HapMap) <0,5% (incidence CS estimé à 1/200000 ¹⁰)
- Variants avec une fréquence allélique rapportée dans la base d'Integrage au statut HTZ <1 % et au statut HMZ<0,5% (élimine les « variants artefacts » dus à la technique ou à des erreurs d'alignement)
- Variants avec une profondeur de lecture minimale de 10X

Figure 4 : Procédure de tri des variants dans ERIS® (analyse des trios)

Variations :

Type :

<input type="checkbox"/> 3'UTR	<input type="checkbox"/> Missense	<input type="checkbox"/> Exonic (indel)
<input type="checkbox"/> 5'UTR	<input type="checkbox"/> Nonsense	<input type="checkbox"/> Splice intron
<input type="checkbox"/> Intronic	<input type="checkbox"/> Synonymous	<input type="checkbox"/> Splice exon

External Databases :

Keep known SNPs (dbSNP132) : <input type="button" value="Yes"/>	Exclude benign Polyphen2 : <input type="button" value="No"/>
EVS variant freq max (%) : <input type="text" value="0.5"/>	Integrage het freq max (%) : <input type="text" value="1"/>
1000G variant freq max (%) : <input type="text" value="0.5"/>	Integrage homo freq max (%) : <input type="text" value="0.5"/>
Hapmap variant freq max (%) : <input type="text" value="0.5"/>	

Quality Control :

Min depth :

Exclude ambiguous genotypes :

Exclude "No Coverage" :

Group n°1

Status :

Group n°2

Status :

III.2.3.1.2. Variants générés par ERIS®

En appliquant ces filtres, un total de 34 variants dans 30 gènes différents pour le premier trio (cas index 2001018), et 30 variants dans 25 gènes différents pour le second trio (cas index 2012115) ont été générés.

A noter également que pour ces deux trios un gène candidat fonctionnant sur un mode de transmission autosomique récessif a été recherché grâce à d'autres paramètres de tri, mais aucun résultat n'a été obtenu pour les deux trios.

III.3.Stratégie d'analyse tertiaire : validation des variants générés par ERIS®

III.3.1. Analyse comparative de l'ensemble des exomes

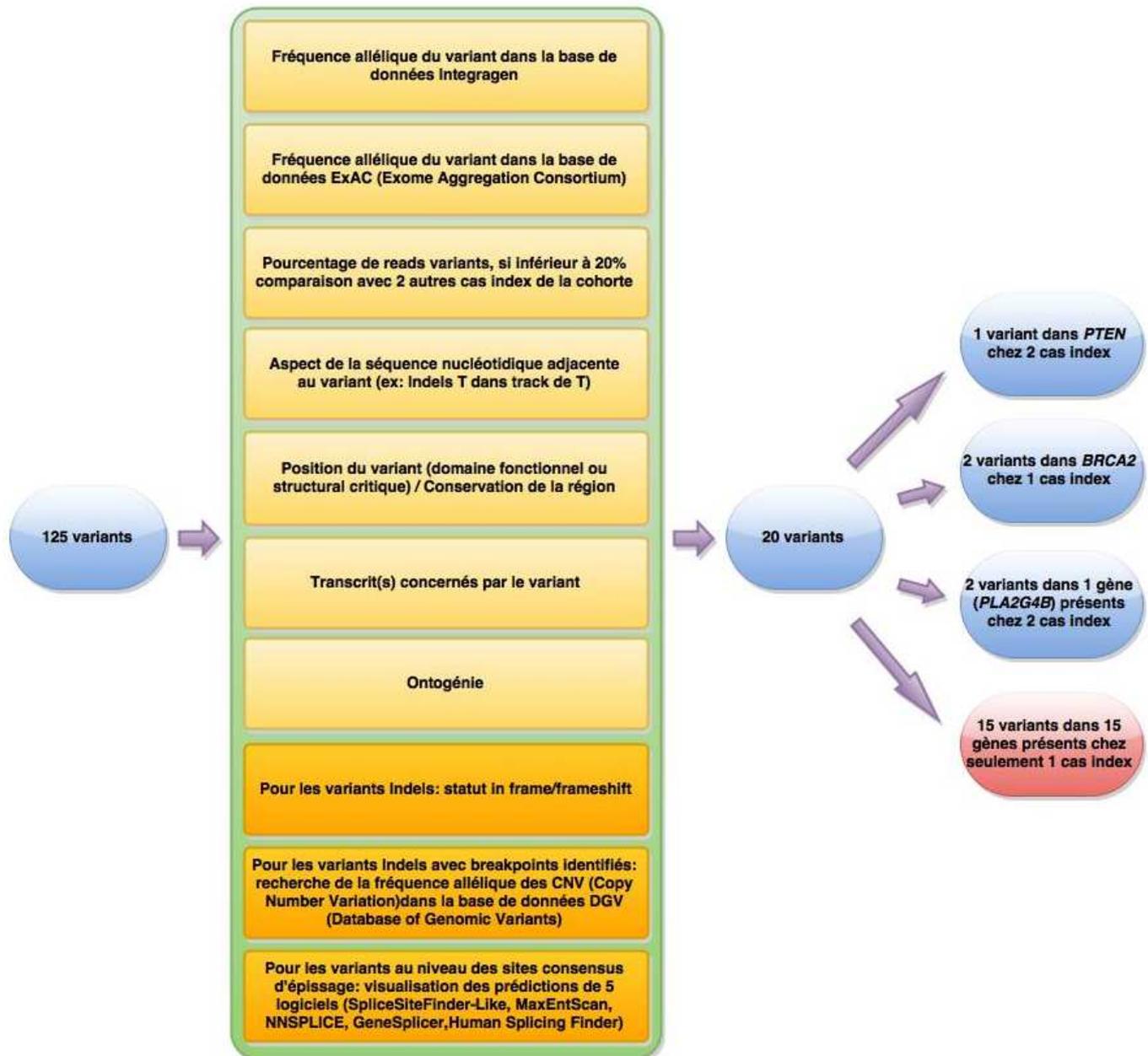
III.3.1.1. Stratégie de validation des variants générés

L'ensemble des fichiers .bam des 125 variants a été visualisé sur Alamut®, afin de confirmer leur véracité et leur potentielle implication dans les phénotypes présentés par les cas index. La validation comprenait des critères variés, certains s'appliquant à l'ensemble des variants (7 critères), et d'autres plus spécifiques seulement à certains types de variants (3 critères). Les critères de validation de variants utilisés sont résumés dans la figure 5.

Seuls 20 variants sur 125 ont été ainsi validés. Parmi eux, 15 ont été éliminés car ils ne concernaient plus qu'un seul patient, et ne satisfaisaient donc plus au critère d'implication d'au moins deux cas index par gène. Leur liste est détaillée dans l'annexe 7.

Au final, 5 variants ont été retenus chez 5 cas index différents: 1 variant dans *PTEN* chez 2 cas index, 2 variants dans *BRCA2* chez 1 cas index, et 2 variants dans un potentiel gène candidat *PLA2G4B* chez 2 cas index.

Figure 5: Procédure de validation des variants sur Alamut®



III.3.1.2. Variants validés retrouvés dans des gènes d'intérêt connus

III.3.1.2.1. PTEN

De manière inattendue, un variant exonique validé a été mis en évidence à partir des fichiers .vcf exomiques pour deux cas index. Il s'agit en réalité de deux insertions de grande taille différentes situées en fin d'exon 5, mais partageant un même point de cassure donc détectées par le *pipeline* d'analyse comme un même variant. Le tableau 7 représente ces deux insertions telles qu'elles ont été annotées par les fichiers .vcf exomiques.

Tableau 7 : Représentation des fichiers .vcf des variants exoniques validés de la série retrouvés dans PTEN

Patients	Position génomique	Génotype	Score Qphred du variant	Nombre de reads variants
2001012	g.89692937	-/TTTTTTTTGAGACGGAGTCTCGCTCTGTCGC CCCGGCGGGACTGCGGACTGCAGTGGCGCA ATCTCGGCTCACTGCAAGCTCCGCTTCCCGG GTTACGCCATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGA GTAGCTGGGAC	663	11/130 reads Soit 8.5%
1998101	g.89692937	-/GAGACGGGGTTTCACCGTTTTAGCCGGGAT GGTCTCGATCTCCTGACCTCGTGATCCGCCC GCCTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAG GCGTGAGCCACCGCGCCCGGC	383	5/121 reads Soit 4%

- **Etape n°1 : Analyse des données NGS**

Dans l'analyse, les pourcentages de *reads* variants étaient bas (8.5% des *reads* pour 2001012 et 4% des *reads* pour 1998101), mais avec un score de qualité QPhred optimal supérieur à 100 confortant leur existence. L'ensemble des bases de données (dont DGV) ne les rapportaient pas, concordant avec l'incidence du CS. Les fichiers .bam des autres cas index de la série ont été visualisés dans la région d'intérêt, mais il n'a pas été retrouvé de *reads* présentant une insertion de grande taille semblable, réduisant ainsi la probabilité de

l'existence d'un artefact dû à la technique ou à l'algorithme d'alignement. A noter qu'à la visualisation des fichiers .bam des deux variants sur le logiciel Alamut®, on pouvait visualiser un nombre non négligeable de *single mates* (dits aussi « *unpaired reads* »), c'est-à-dire de *reads* pour lesquels le « *read* compagnon » séquencé à l'autre extrémité (séquençage *Paired-End*) n'était pas aligné au niveau du gène *PTEN* (le logiciel Alamut® permet seulement une visualisation par gène des données), tel que l'on peut le voir dans la figure 6.

Tout d'abord, il a été recherché si les deux insertions rapportées pouvaient être alignées sur le génome de référence hg 19 grâce au logiciel BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool). Pour 2001012, il existait un seul alignement correspondant à 100% dans l'intron 1 du gène *MB21D1* situé sur le bras long du chromosome 6, mais également aussi de très nombreux alignements quasi-identiques de localisation très variée au niveau génomique. Pour 1998101, aucun alignement ne correspondait à 100%, mais comme pour 2001012, l'on retrouvait un nombre très important d'alignements quasi-identiques, ce qui pouvait faire évoquer déjà l'insertion d'une séquence répétée.

Ensuite, les fichiers .bam ont été chargés sur le logiciel IGV® qui permet une visualisation génomique des données, et également une récupération des séquences des *reads* non alignés, compagnons des *single mates* comme ceux présents en fin d'exon 5. L'alignement successif de ces séquences pour 1998101, a ainsi permis de compléter le génotype donné par le fichier .vcf (insertion rallongée de 125 pb) contrairement à 2001012, pour lequel il a seulement été mis en évidence un track de T rallongé de 5 T.

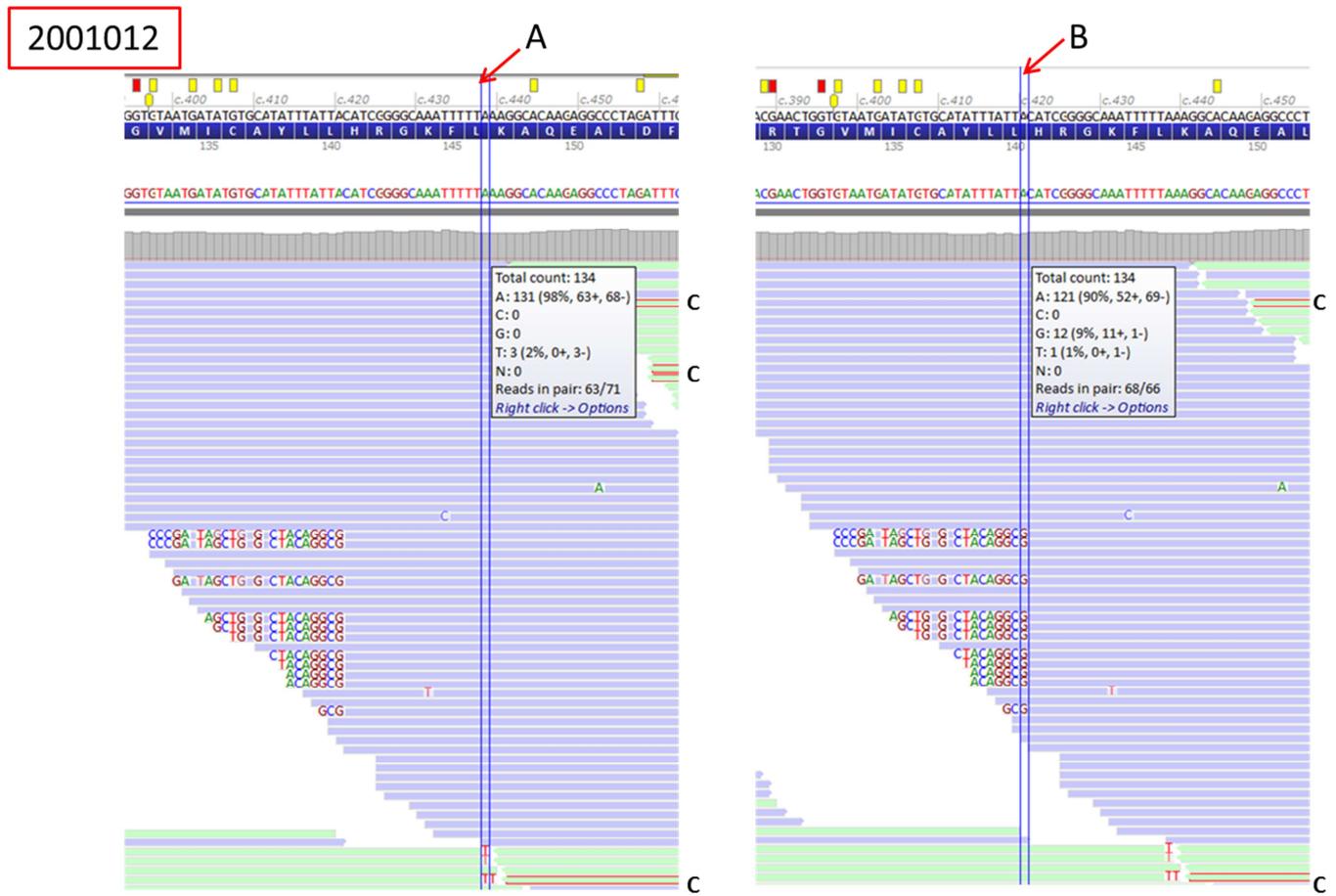
Néanmoins, pour 2001012, il a été visualisé 6 *reads* (non identifiés *single mates*) dont les compagnons se retrouvaient au niveau du chromosome 6 à la localisation décrite par BLAST®. Ils sont représentés dans la figure 7. A noter qu'il n'y avait pas de point de cassure visible dans la région de *MB21D1*, qui aurait pu faire évoquer une translocation réciproque.

Cette région visualisée sur UCSC (University of California, Santa Cruz) Genome Browser en association avec le programme RepeatMasker Element®, a permis de faire correspondre l'insertion avec une séquence répétée *Alu* (SINE : Short INterspersed Elements) de sous-classe Yb8, tronquée dans sa partie spécifique, et pouvant faire évoquer alors un mécanisme de rétrotransposition au sein de l'exon 5 de *PTEN*. La revue de la littérature^{101,102} et la base de données d'éléments répétés Repbase Gir¹⁰³ ont alors permis d'identifier l'insertion présentée par 1998101 comme une séquence *Alu* de sous-classe Ya5, confortant l'hypothèse de rétrotransposition.

Enfin, après examen de la littérature concernant le mécanisme de rétrotransposition^{102,104}, le point de cassure mis en évidence par NGS a été identifié comme le 2^{ème} point de cassure par ordre chronologique, correspondant à la limite avec la partie spécifique 5' de la séquence Alu.

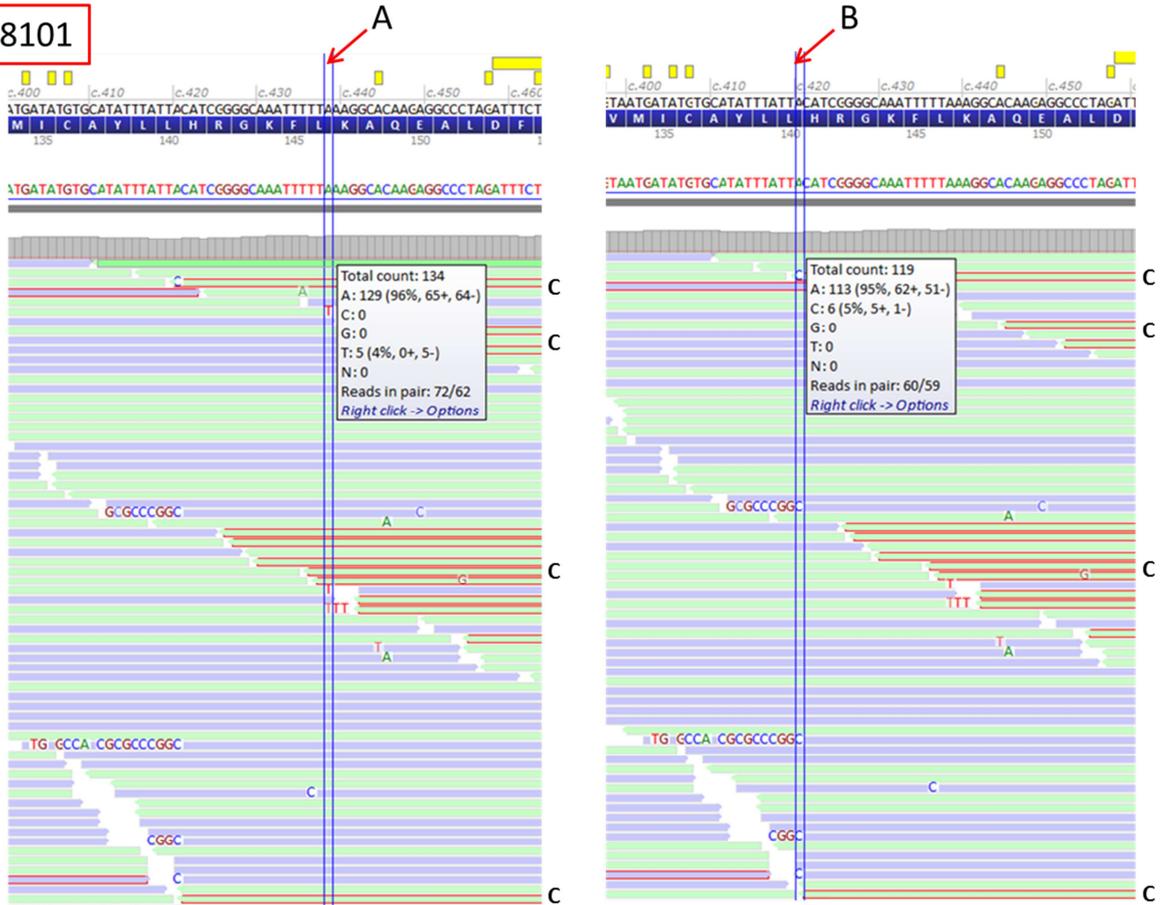
Le 1^{er} point de cassure se situant classiquement dans un motif très conservé type TTTT/AA généralement situé 15pb en aval environ, il a été possible de le situer théoriquement, puis de le confirmer sur les données NGS, car quelques *reads* non remontés par le fichier .vcf le mettaient en évidence. Il correspond à la limite avec la partie non spécifique 3' de la séquence Alu (queue polyT), comme le montre la figure 6.

Figure 6 : Visualisation Alamut® des fichiers .bam des patients 2001012 et 1998101 en fin d'exon 5 de PTEN



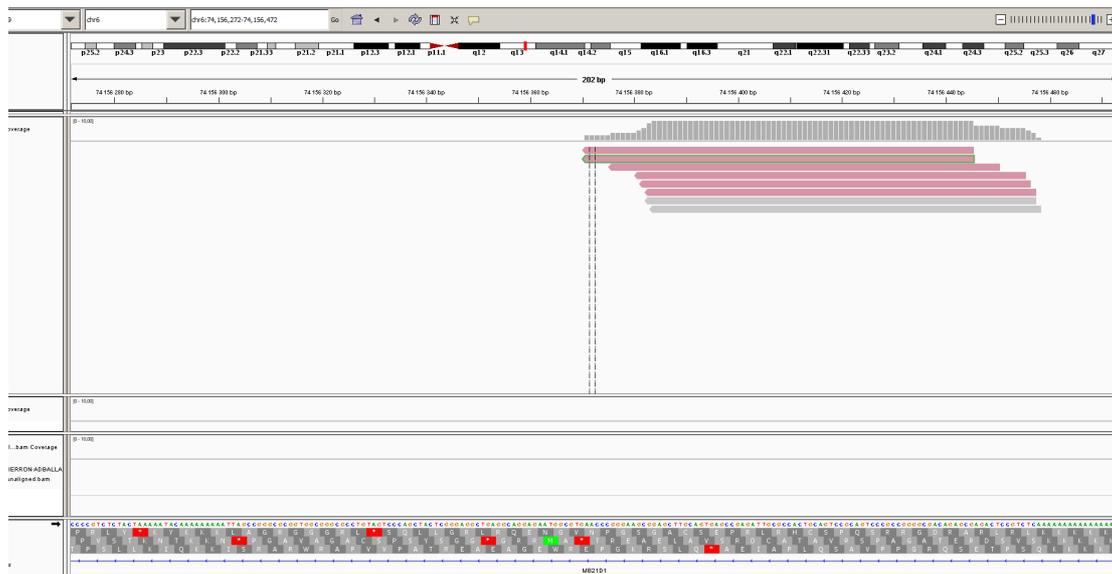
A : 1^{er} point de cassure, B : 2^{ème} point de cassure, C : *Single mates*

1998101



A : 1^{er} point de cassure, B : 2^{ème} point de cassure, C : Single mates

Figure 7 : Visualisation IGV® du fichier .bam du patient 2001012 au niveau de l'intron 1 de MB21D1



En rose: Reads dont les mates se retrouvent en fin d'exon 5 de PTEN

- **Etape n°2 : Séquençage Sanger des deux points de cassure**

Dans un 1^{er} temps des PCR spécifiques des allèles variants ont été mises au point pour les deux points de cassure de chacune des insertions.

Le séquençage Sanger du 2^{ème} point de cassure n'a pas nécessité de conditions particulières (jonction avec la partie spécifique 5' de la séquence *Alu*), et sa visualisation sous Sequencing Analysis® est reproduite dans la figure 8.

En revanche, le séquençage Sanger du 1^{er} point de cassure (jonction avec la queue polyT de la séquence *Alu*) n'a été possible qu'en optimisant les conditions de PCR (utilisation du kit Multiplex de Qiagen® et allongement du temps de dénaturation et d'élongation lors de la réaction de PCR). Il n'est visible que sur le brin Forward. Sa visualisation sous Sequencing Analysis® est reproduite dans la figure 9.

Figure 8 : Visualisation sous Sequencing Analysis® du 2^{ème} point de cassure de l'insertion de séquence *Alu* dans l'exon 5 de *PTEN*

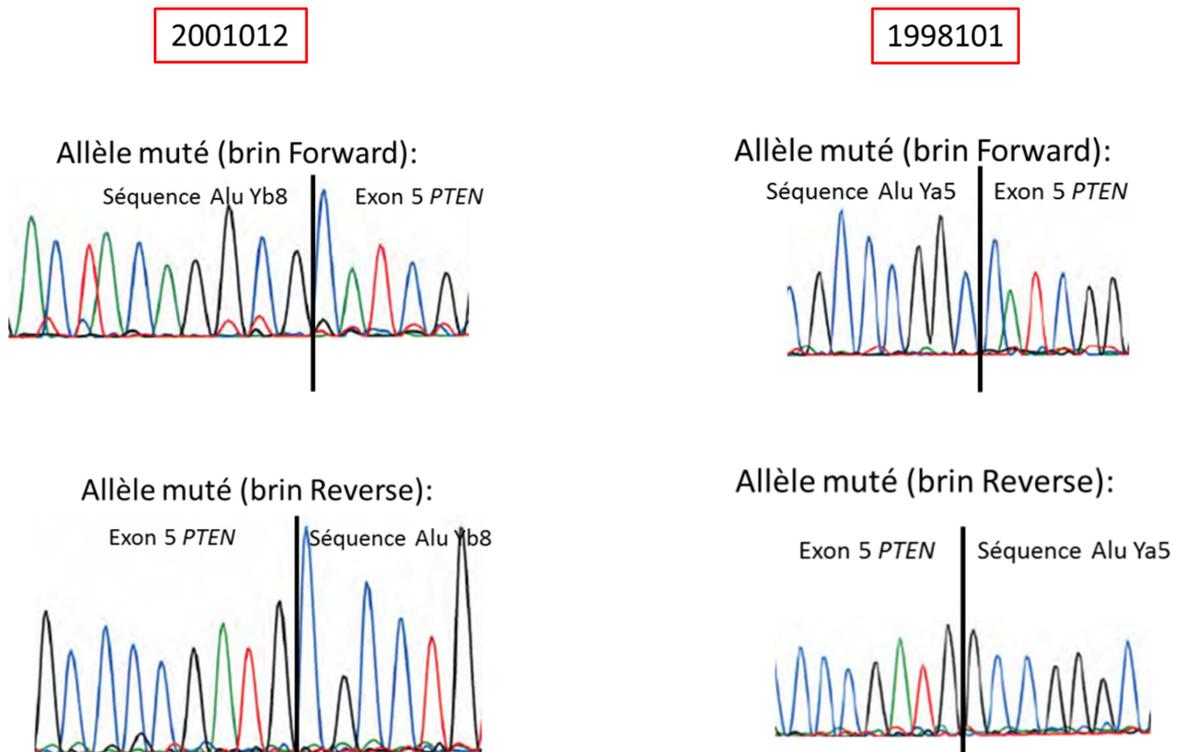
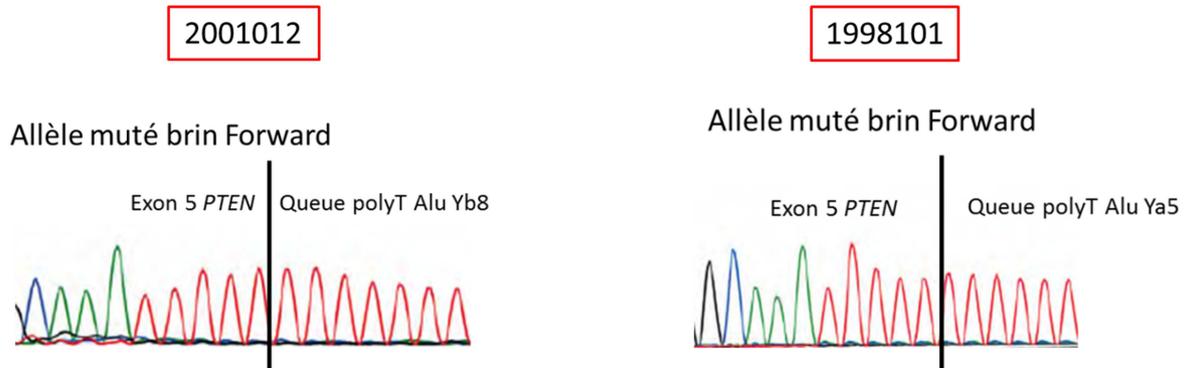


Figure 9 : Visualisation sous Sequencing Analysis® du 1^{er} point de cassure de l'insertion de séquence *Alu* dans l'exon 5 de *PTEN*



- **Etape n°3 : Séquençage Sanger des allèles mutés et sauvages**

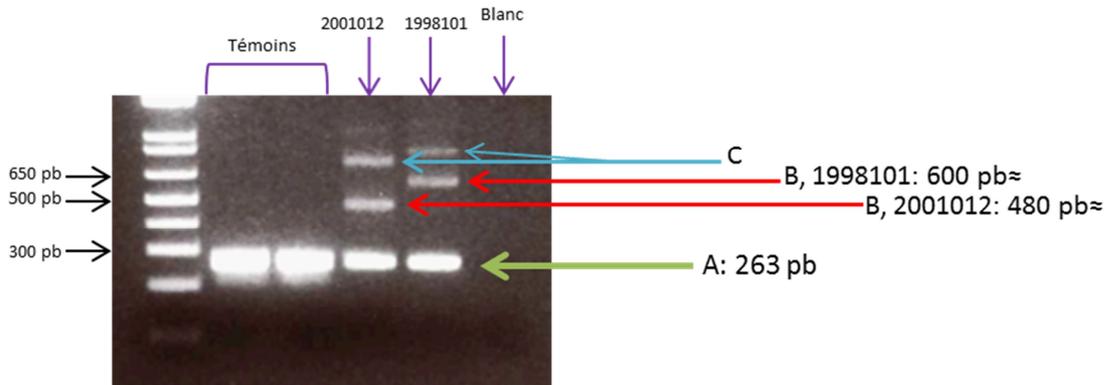
Dans un 2nd temps, une PCR de l'exon 5 de *PTEN* a été mise au point afin de mettre en évidence les allèles contenant une insertion *Alu* par rapport aux allèles sauvages.

Les conditions de PCR ont été les mêmes que celles utilisées pour le 1^{er} point de cassure.

Les produits de PCR obtenus ont permis de calculer la taille approximative de la queue polyT pour les deux patients, et le séquençage Sanger a permis d'obtenir la séquence complète de la partie spécifique de l'insertion *Alu* pour 1998101.

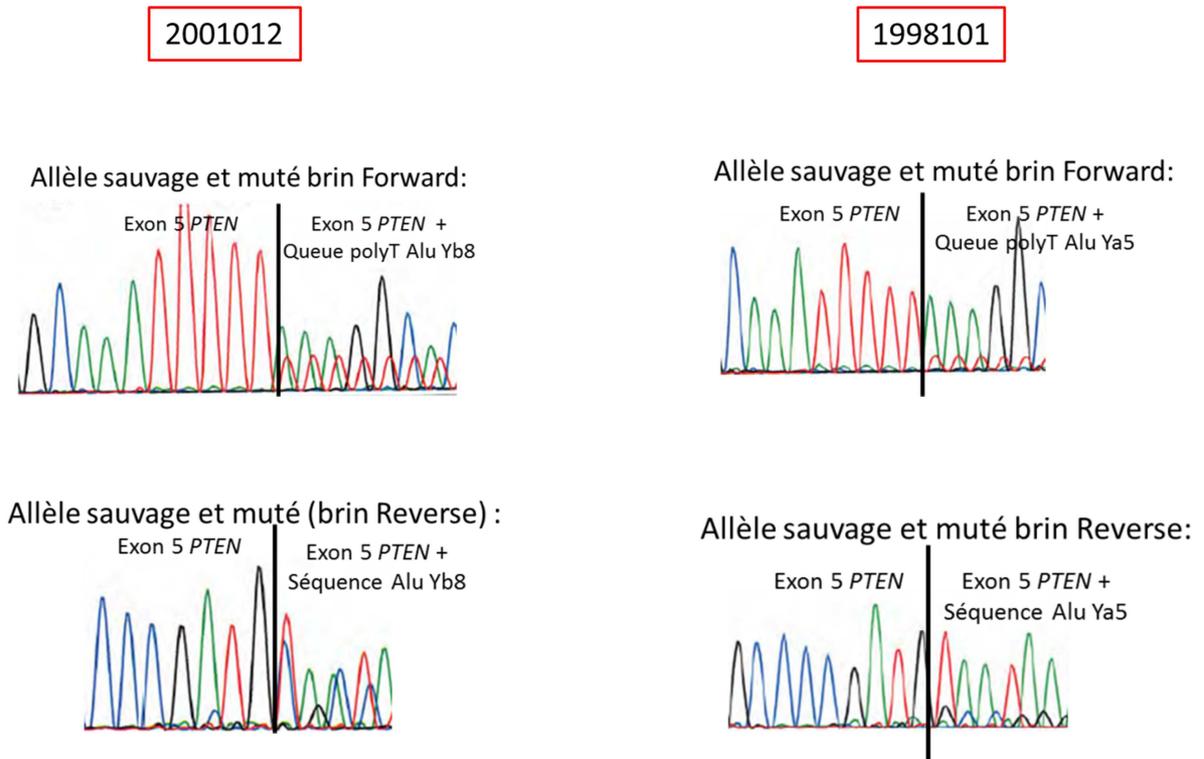
La figure 10 représente les produits de cette PCR pour les deux cas index versus deux témoins, et la figure 11 le séquençage Sanger de cette PCR dans la région des deux points de cassure.

Figure 10: Gel d'agarose représentant les produits de PCR de l'exon 5 de PTEN pour les 2 cas index et 2 témoins



A : Exon 5 sauvage, B : Exon 5 variant contenant l'insertion *Alu*, C : Bandes probablement dues à des hétéroduplex entre les produits de PCR de l'allèle sauvage et l'allèle variant (non présents chez les témoins)

Figure 11 : Visualisation sous Sequencing Analysis® de l'allèle sauvage et muté dans l'exon 5 de PTEN



- **Etape n°4 : Recherche de l'implication des insertions *Alu* de l'exon 5 de *PTEN* dans le cancer du sein**

La PCR spécifique mise au point lors de l'étape 3, a été utilisée sur 35 ADN tumoraux issus de cancers du sein distincts et avec une perte immunohistochimique de *PTEN* inexpliquée, afin de rechercher la présence d'insertions *Alu* au sein de l'exon 5 de *PTEN*, mais aucune insertion n'a pu être détectée à cette position pour l'ensemble des tumeurs étudiées.

- **Au total :**

Patient 2001012 :

Le variant c.437_438insAluYb8,421_437dupCATCGGGGCAAATTTTT, a été retrouvé chez ce patient pour qui il existait une forte probabilité de trouver une mutation sur le gène *PTEN* selon les scores prédictifs (99% score CC et 85% score PP). Il s'agit de l'insertion d'une séquence *Alu* tronquée d'environ 200 pb (partie spécifique de 135 pb et queue polyT de 65 pb environ) interrompant le cadre de lecture de l'exon 5 de *PTEN*. La séquence *Alu* est classée Yb8 par la base de données d'éléments répétés Repbase Giri¹⁰³, et de groupe 3 car tronquée¹⁰². Elle s'est insérée en antisens par rapport au sens de transcription de *PTEN*, et a probablement été retrotransposée à partir du chromosome 6.

Patient 1998101 :

Le variant c.437_438insAluYa5,421_437dupCATCGGGGCAAATTTTT, a été retrouvé chez ce patient pour qui il existait aussi une forte probabilité de trouver une mutation sur le gène *PTEN* selon les scores prédictifs (99% score CC et 93.3% score PP). Il s'agit de l'insertion d'une séquence *Alu* complète d'environ 322 pb (partie spécifique de 282 pb et queue polyT de 40 pb environ) interrompant le cadre de lecture de l'exon 5 de *PTEN*. La séquence *Alu* est classée Ya5 par la base de données d'éléments répétés Repbase Giri¹⁰³, et de groupe 1 car complète¹⁰². Elle s'est insérée en antisens par rapport au sens de transcription.

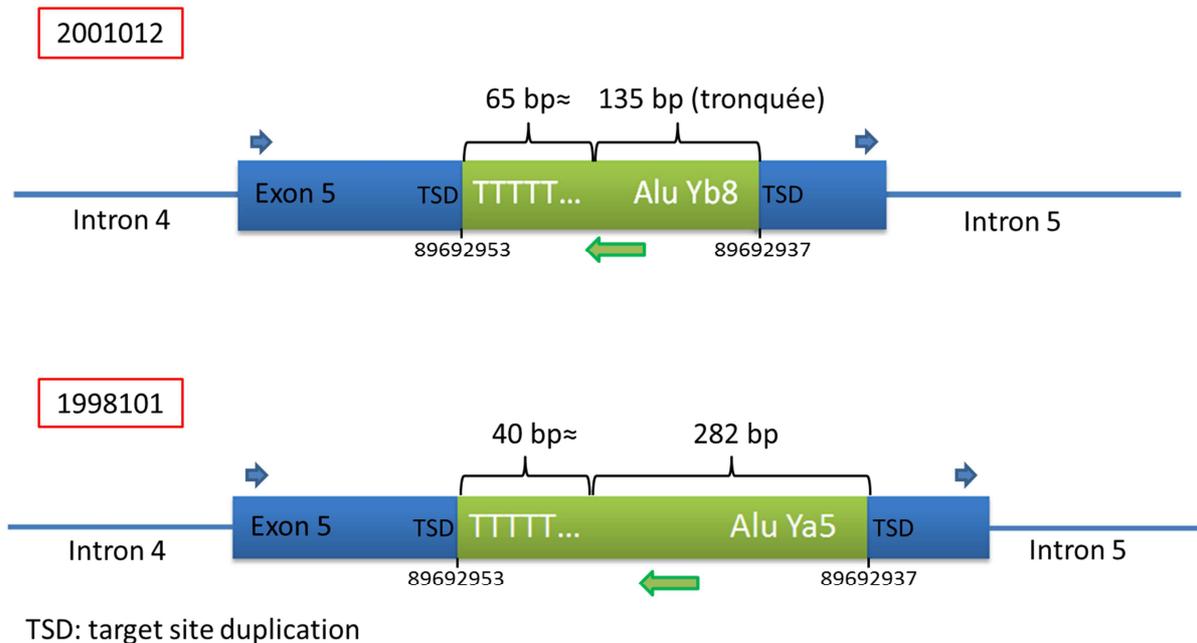
A noter qu'aucun de ces patients n'a présenté de tumeur maligne jusqu'alors (âgés respectivement de 62 et 43 ans).

Le tableau 8 et la figure 12 résument ces informations.

Tableau 8 : Variants exoniques validés de la série retrouvés dans PTEN

Patients	Séquence génomique	Formule nucléotidique	Orientation de l'insertion Alu p/r à PTEN	Nombre de reads variants totaux	Confirmation Sanger
2001012	g.89692953	c.437_438insAluYb8,421_437 dupCATCGGGGCAAATTTT	antisens	14/130 reads≈ Soit 11%	Confirmé
1998101	g.89692953	c.437_438insAluYa5,421_437 dupCATCGGGGCAAATTTT	antisens	11/121 reads≈ Soit 9%	Confirmé

Figure 12: Représentation de l'insertion Alu dans l'exon 5 de PTEN pour 2001012 et 1998101



III.3.1.2.2. BRCA2

De manière incidente, il a été retrouvé un variant délétère dans le gène *BRCA2* (détecté comme 2 variants distincts dans le fichier .vcf), localisé dans l'exon 11 et nomencluré c.5794_5800delinsT – p.His1932*, chez le cas index 2008207. A noter que les scores prédictifs étaient faibles pour ce patient (19% score CC et 34.7% score PP), qui présentait un antécédent de cancer du sein au 1^{er} degré.

III.3.1.3. Variants validés dans un potentiel gène candidat: *PLA2G4B*

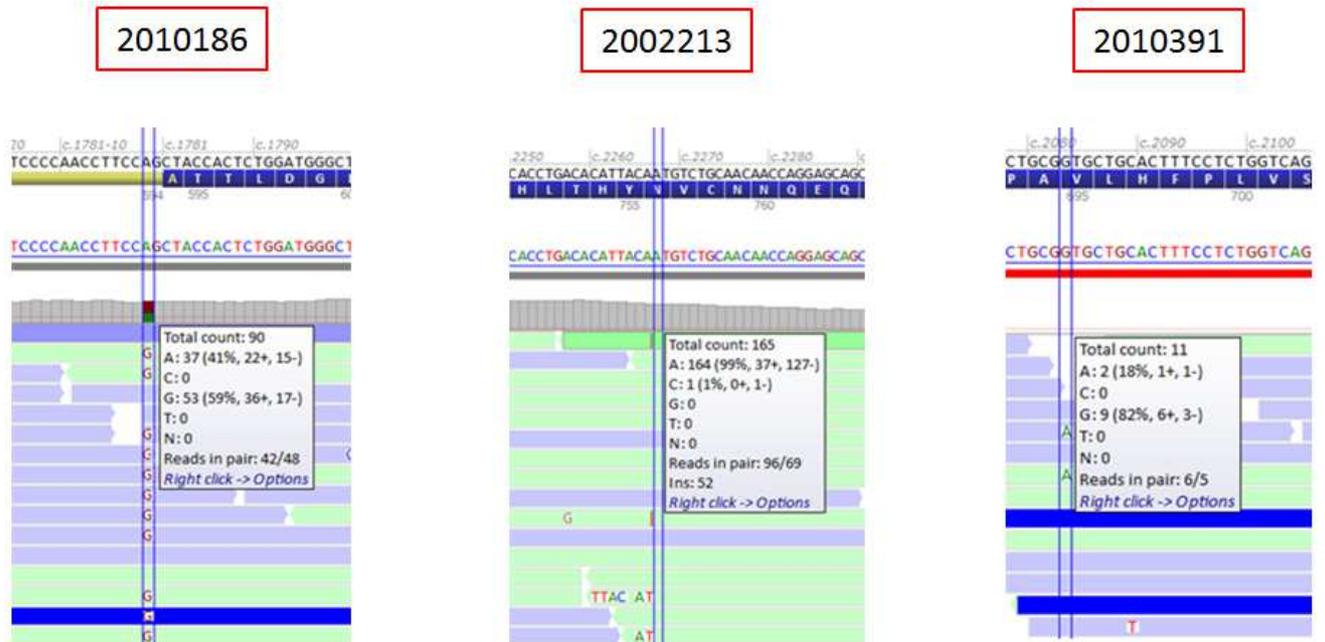
- **Etape n°1 : Analyse des données NGS**

L'analyse tertiaire des données a permis de mettre en évidence deux variants dans un potentiel gène candidat *PLA2G4B* chez deux cas index :

- Patient 2010186 : un variant dans l'intron 17, présent sur 59% des *reads*, nomenclaturé c.1781-2A>G, entraînant une suppression du site accepteur d'après les 5 logiciels de prédiction et donc un saut de l'exon 18 (qui entraînerait un décalage du cadre de lecture). Ce variant est non connu de l'ensemble des bases de données.
- Patient 2002213 : un variant frameshift dans l'exon 20 (dernier exon du gène), présent sur 34% des *reads* environ, nomenclaturé c.2267_2268insAT – p.Asn756Lysfs*36, entraînant un décalage du cadre de lecture qui se termine alors par un codon STOP 35 positions en aval (ce qui rallongerait la protéine de 10 aa (acides aminés)), et non connu de l'ensemble des bases de données.
- En réinterrogeant ERIS® pour tout type de variant dans le gène *PLA2G4B* (mais en appliquant toujours les autres filtres), il a été mis en évidence chez le patient 2010391 un autre variant faux-sens dans l'exon 19 nomenclaturé c. 2083G>A – p.Val695Met, non connu de l'ensemble des bases de données, mais présent seulement sur 2/11 reads.

La figure 13 permet de visualiser les fichiers .bam de ces 3 variants sur le logiciel Alamut®.

Figure 13 : Visualisation Alamut® des fichiers .bam des variants du gène PLA2G4B chez les patients 2010186, 2002213, 2010391



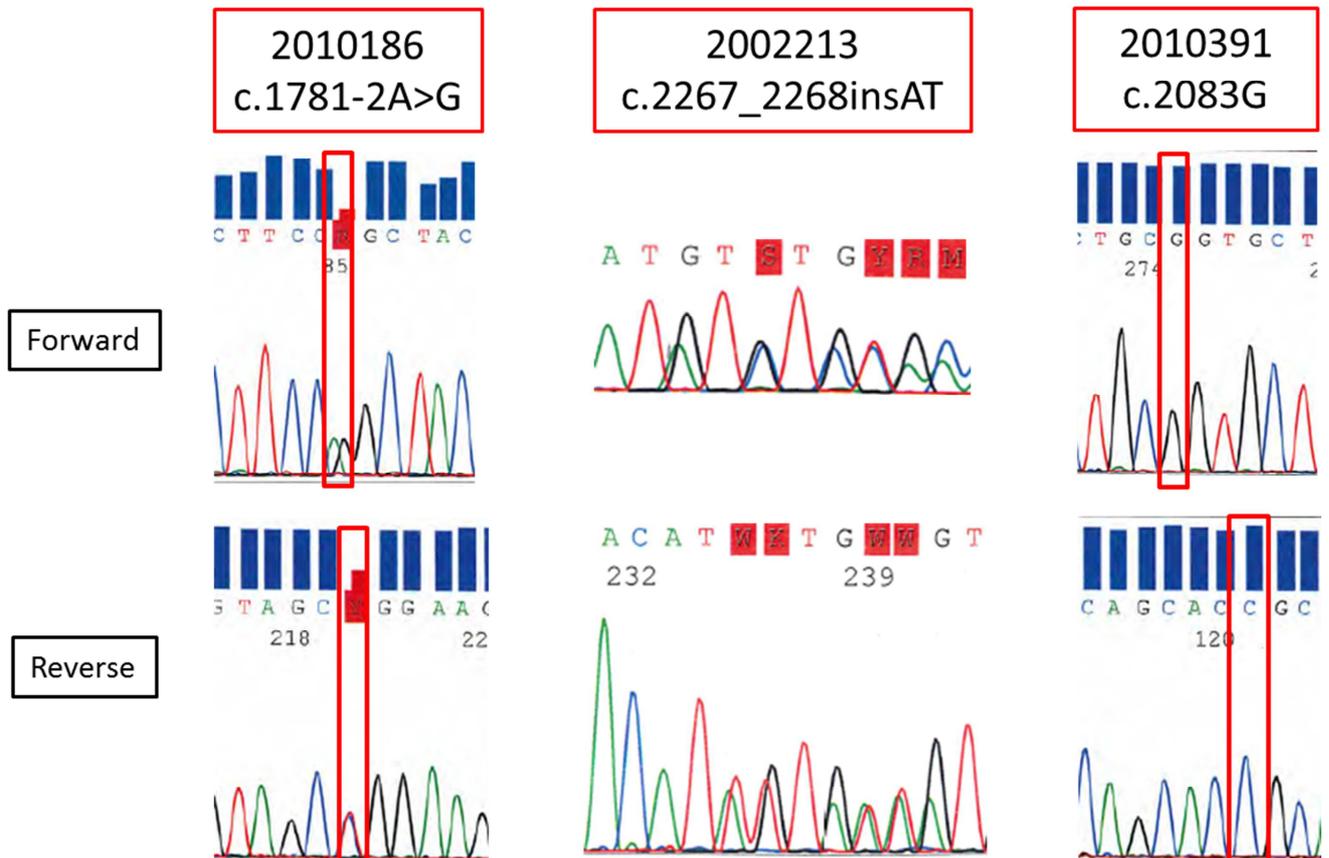
- **Etape n°2 : Confirmation des variants par séquençage Sanger**

Trois PCR spécifiques ont été mises au point pour les exons 18, 19, et 20 incluant une région intronique d'environ 20 bases de part et d'autre de l'exon.

Les variants ont été confirmés pour les patients 2010186 et 2002213, et infirmé comme l'on pouvait s'y attendre pour le patient 2010391.

La figure 14 représente leur visualisation sous Sequencing Analysis®.

Figure 14 : Visualisation sous Sequencing Analysis® des variants du gène PLA2G4B chez les patients 2010186, 2002213 et 2010391



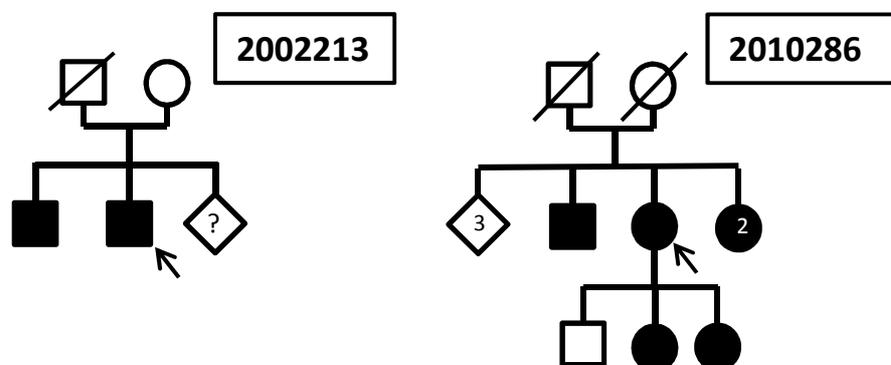
- **Etape n°3 : Etude de coségrégation familiale (variants confirmés par Sanger)**

Les patients 2002213 et 2010186 étant des cas familiaux (comme montré dans la figure 15), une étude de coségrégation familiale des variants retrouvés dans *PLA2G4B* a été initiée.

Nous avons pu récupérer l'ADN du frère du patient 2002213 également atteint (macrocéphalie, présence de signes cutanéomuqueux de CS, et polypose colique ganglioneuromateuse), mais le variant de *PLA2G4B*, c.2267_2268insAT – p.Asn756Lysfs*36 n'a pas été retrouvé chez lui.

Les ADN des apparentés atteints de la patiente 2010286 sont toujours en attente de réception.

Figure 15 : Arbres généalogiques des cas index 2002213 et 2010186



III.3.2. Analyse des deux trios

III.3.2.1. Stratégie de validation des variants générés

L'ensemble des fichiers .bam des 34 variants pour le premier trio (cas index 2001018), et des 30 variants pour le second trio (cas index 2012115) ont été visualisés sur Alamut®, afin de confirmer leur véracité, leur caractère sporadique, et leur potentielle implication dans les phénotypes présentés par les cas index. Les critères de validation de variants utilisés sont ceux résumés dans la figure 5.

La seule différence avec la stratégie utilisée précédemment (III.3.1.1), est que les .bam des parents ont été visualisés dans le même temps pour ces variants afin que leur caractère sporadique soit confirmé.

Pour 2001018, aucun des variants n'a été validé.

Pour 2012115, une néomutation dans un potentiel gène candidat *LDDX1* a été retenue. A noter que ce patient présente un phénotype particulier de maladie de Lhermitte-Duclos pédiatrique (découverte à l'âge de 7 ans), pour lequel il est très rare de retrouver une mutation de *PTEN*.

III.3.2.2. Néomutation validée dans un potentiel gène candidat : *LDDX1*

- **Etape n°1 : Analyse des données NGS**

L'analyse tertiaire des données a permis de mettre en évidence une néomutation dans un potentiel gène candidat *LDDX1* chez le cas index 2012115:

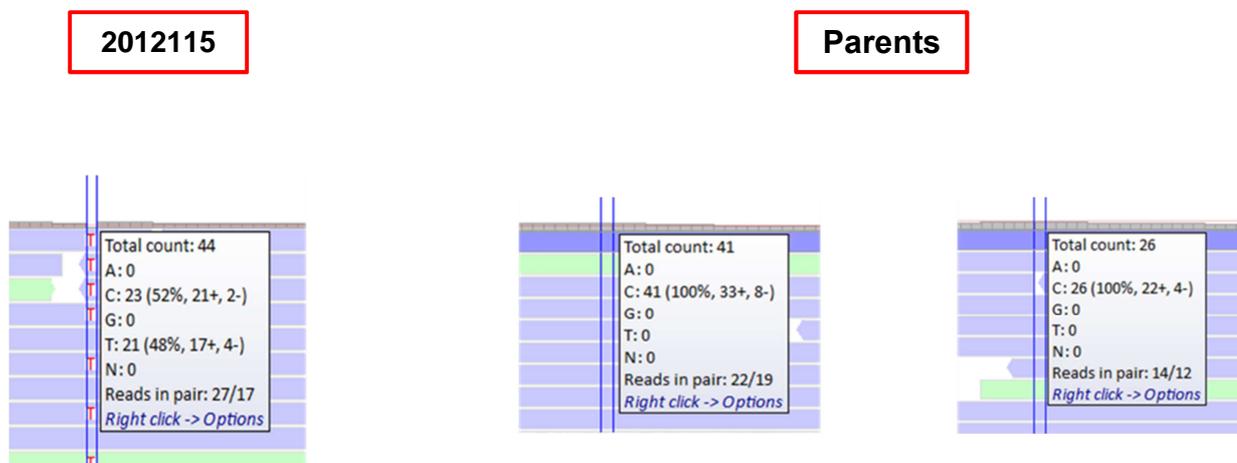
- Cas index : un variant faux-sens dans l'exon 5, présent sur 48% des *reads*, nomenclaturé c.191G>A – p.Arg64Lys, non connu de l'ensemble des bases de données, prédit délétère par deux logiciels de prédiction (SIFT® et MutationTaster®), et non délétère par trois autres logiciels (Align GVGD®, Polyphen 2® et Kd4V®).

Les résultats de l'ensemble de ces logiciels étant à prendre avec précaution, car les alignements utilisés pour leurs prédictions n'ont pas été corrigés pour *LDDX1*, gène peu étudié à l'heure actuelle.

- Parents du cas index: ce variant n'est pas présent chez aucun des deux parents, c'est donc une néomutation.
- En réinterrogeant ERIS® pour tout type de variant dans le gène *LDDX1* (mais en appliquant toujours les autres filtres), dans notre série de patients et 8 témoins issus d'un autre projet d'exome, il n'a pas été mis en évidence un autre variant d'intérêt dans ce gène.

La figure 16 permet de visualiser les fichiers .bam du cas index et de ses parents dans la région d'intérêt sur le logiciel Alamut®.

Figure 16 : Visualisation Alamut® des fichiers .bam du patient 2012115 et de ses parents au sein de l'exon 5 de LDDX1



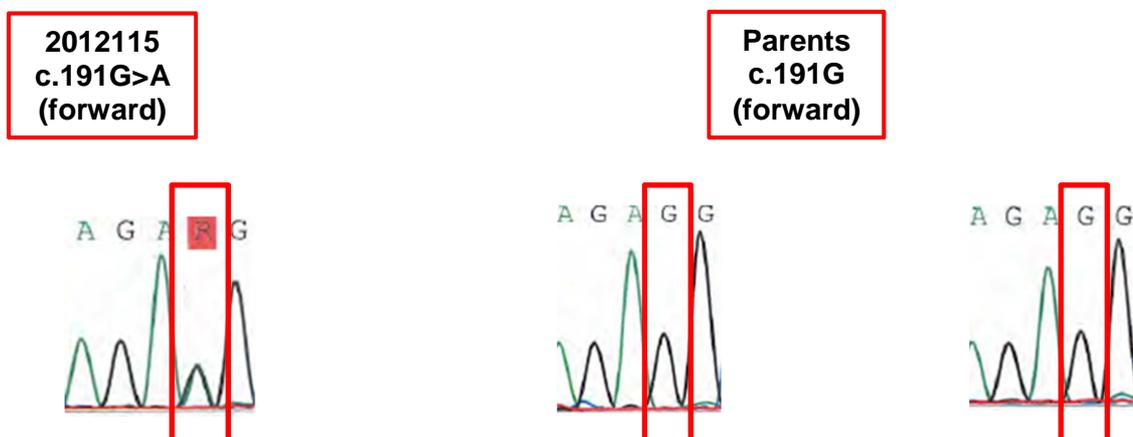
- **Etape n°2 : Confirmation des variants par séquençage Sanger**

Une PCR spécifique a été mise au point pour l'exon 5 de *LDDX1* incluant une région intronique d'environ 20 bases de part et d'autre de l'exon.

Les variants ont été confirmés pour le patient 2012115, et infirmé comme l'on pouvait s'y attendre pour ses deux parents.

La figure 17 représente leur visualisation sous Sequencing Analysis®.

Figure 17 : Visualisation sous Sequencing Analysis® de l'exon 5 de LDDX1 chez le patient 2012115 et ses parents (au niveau de la néomutation retrouvée chez le cas index)



- **Etape n°3 : Etude du gène *LDDX1* sur une série de LDD pédiatrique**

18 PCR spécifiques (en plus de celle désignée pour l'exon 5) ont été mises au point pour tous les exons de *LDDX1* incluant une région intronique d'environ 20 bases de part et d'autre de l'exon.

Grâce à ces PCR, il a été recherché une mutation constitutionnelle de *LDDX1* chez 5 patients ayant tous présentés une LDD pédiatrique, et pour lesquelles aucune mutation de *PTEN* en parties codantes (mutation ponctuelle ou grand réarrangement) n'avait été retrouvée.

Aucune variant délétère dans *LDDX1* n'a pu être mis en évidence chez ces 5 patients.

IV. Discussion

Les patients avec un syndrome du spectre PHTS présentent des risques tumoraux augmentés au cours de leur vie. Pour le CS, le seul pour lequel ce risque est documenté, le risque est augmenté pour les cancers du sein, de l'endomètre, de la thyroïde, du rein, du colon et de la peau ²⁶⁻²⁸. Des traitements efficaces sont disponibles pour ces différents cancers à partir du moment où ceux-ci sont détectés précocement. Ce constat permet de comprendre l'importance du dépistage génétique et de la recherche d'une mutation marquant le diagnostic moléculaire chez les cas index, pour évaluer l'intérêt d'un dépistage, d'une prévention des cancers et d'un suivi personnalisé pour tous les apparentés qu'ils soient symptomatiques ou non. Dans le CS, il existe environ 15 à 20 % des cas, familiaux ou sporadiques, pour lesquels aucune mutation constitutionnelle du gène *PTEN* ou d'autres gènes d'intérêt, n'a pu être mise en évidence. Cette génétique non élucidée, rend le diagnostic uniquement clinique, et complique donc le dépistage et le suivi de ces patients et de leurs apparentés, devant l'impossibilité d'un diagnostic moléculaire.

L'hypothèse d'une hétérogénéité génétique pour les syndromes du spectre PHTS reste d'actualité et même si leur génétique est dominée par une mutation constitutionnelle du gène *PTEN*, l'implication d'autres gènes de la même voie de signalisation a été proposée ⁷¹. La technique diagnostique doit alors être sensible pour tous ces gènes et les indications adaptées. En effet, en dehors du syndrome de SOLAMEN, les autres phénotypes décrits au sein des PHTS semblent distincts de ceux présentés par les porteurs de mutations d'*AKT* et *PIK3CA* ¹⁰⁵. En dehors de cette voie de signalisation, d'autres gènes ont été impliqués, comme *SDHB*, *SDHD*, et plus récemment *SEC23B*, mais ces résultats n'ont jusqu'à alors pas été confirmés, voir même ont été contestés ⁸⁴.

Les tests prédictifs de mutations des scores CC et PP ont été créés pour évaluer la probabilité de détecter une mutation du gène *PTEN* selon l'atteinte clinique des patients atteints de CS, sur le même modèle que le score BRCA Pro ¹⁰⁶ pour les patients avec un cancer du sein et leurs apparentés.

Dans notre série, les deux scores de prédiction sont généralement concordants, et pour la moitié environ des patients ils donnent une probabilité importante de trouver une mutation du gène *PTEN*. Or, les deux patients pour lesquels il a été retrouvé un variant délétère dans *PTEN* non détecté auparavant, sont ceux présentant les scores les plus élevés de la série. Ces résultats tendraient donc à valider ces scores, même si les études sur lesquelles ils reposent comportaient des biais (le score PTEN Predict a été réalisé dans une cohorte où seulement 34% des patients entrant dans les critères diagnostiques de l'International

Cowden consortium ont été détecté mutés pour *PTEN* (contre 80 % dans les autres études) tandis que le score CC se trouvait dans une cohorte avec seulement 9,5% de mutations de *PTEN*).

Ces deux variants se retrouvaient respectivement sur 11% et 9% des *reads* (sur plus de 100 *reads*) dans notre analyse. On pourrait alors évoquer un mosaïcisme, or ces deux patients présentent une atteinte familiale, donc l'hypothèse d'une néomutation semble peu probable, et théoriquement le ratio allélique devrait être plus élevé. Cela peut s'expliquer notamment, par le séquençage préférentiel de l'allèle sauvage, du fait de la présence d'une queue polyT d'au moins 40 pb au niveau de l'allèle variant, mais aussi de part « l'alignement biaisé sur la référence », ce qui signifie que les *reads* présentant un nombre de *mismatch* trop important par rapport à la référence, ont été éliminés lors de l'analyse secondaire du fait d'un score de qualité du *read* trop bas (plus l'Indel est grande plus le score de qualité du *read* est bas). On s'attend à ce que la modification des critères de filtre lors de l'analyse secondaire, s'accompagne d'un ratio allélique plus élevé en faveur de l'allèle variant.

On peut également se demander pourquoi jusqu'alors il avait été impossible de mettre en évidence ces deux variants. Pour 2001012, le profil EMMA avait mis en évidence une diminution de l'intensité de l'exon 5, mais la QMPSF réalisée par la suite était revenue normale, ce qui s'explique par un drop-out de l'allèle muté, l'absence de délétion au niveau de l'exon 5 de *PTEN* et l'absence de sonde à cheval sur les points de cassure. Pour 1998101 également, le profil EMMA s'était révélé douteux pour l'exon 5, mais le séquençage Sanger de cet exon avec des réactifs standards et dans des conditions de routine n'avait amplifié que l'allèle sauvage. D'ailleurs même avec le séquençage Sanger dans des conditions optimisées, il existe une amplification préférentielle de l'allèle sauvage avec une plus faible intensité des pics mutés. De plus, ces deux patients avaient bénéficié en 2013 d'une analyse complète du locus de *PTEN* en NGS par synthèse (Illumina), sans qu'il y ait eu de détection des deux variants que ce soit par l'analyse informatique tertiaire (fichier .vcf) ou la visualisation des fichiers .bam. Cela peut s'expliquer par les raisons citées au paragraphe précédent, mais surtout par un pipeline d'analyse différent, élaboré pour détecter des mutations ponctuelles et de petites Indels (10-20 pb) et qui éliminait de façon systématique les single mates (qui font baisser les scores de qualité de l'analyse), soulignant l'importance du traitement bioinformatique des données de NGS à l'heure actuelle ¹⁰⁷. Néanmoins, on peut noter rétrospectivement qu'il était visible une baisse de la couverture au niveau de l'insertion, non visualisée chez des témoins de la même analyse.

Ensuite, on peut souligner l'importance de cette découverte d'un point de vue mutationnel, puisque ce phénomène au niveau constitutionnel n'a jusqu'alors pas été décrit dans *PTEN*, même si il est de plus en plus incriminé dans bon nombre de pathologies génétiques

humaines^{108,109}. Autre fait intéressant, l'insertion de ces deux séquences *Alu* distinctes se fait exactement aux mêmes points de cassure indiquant la présence d'un *hotspot* favorisant la survenue de rétrotransposition, nous incitant dorénavant à rechercher systématiquement ces insertions dans l'exon 5 par PCR spécifique ou pipeline NGS adapté. L'origine différente des deux rétrotransposons indique également qu'il ne s'agit pas d'un variant avec effet fondateur, comme cela a pu être observé pour le gène *BRCA2*¹¹⁰. On peut noter par ailleurs, que la troncation des séquences *Alu* lors de leur rétrotransposition est un phénomène observé fréquemment et qui peut faciliter leur insertion.

Au niveau tumoral, ce phénomène avait déjà été décrit mais cette fois-ci avec l'insertion d'une séquence LINE-1 (L1Hs) dans l'exon 6¹¹¹. La recherche de la présence d'insertions semblables au niveau de l'exon 5 sur une série de tumeurs du sein présentant une extinction de *PTEN* sans cause moléculaire identifiée s'est révélée infructueuse. Cependant, cela soulève la question de l'absence d'effet cancérigène des insertions *Alu* dans l'exon 5. En effet, aucun des deux patients décrits n'a présenté de tumeur maligne à 62 et 43 ans respectivement, ce qui est rarement observé dans le CS. Cela pourrait s'expliquer par l'expression d'un transcrite alternatif de l'exon 5, conséquence de l'insertion de la séquence *Alu*¹¹².

Concernant les deux patients présentant un variant dans le gène *PLA2G4B*, ils présentent des scores phénotypiques hétérogènes. *PLA2G4B* code pour la phospholipase A_2 du Groupe IVB (cPLA₂ β), groupe IV qui comprend 6 phospholipases cytosoliques. A l'exception de cPLA₂ α qui catalyse l'hydrolyse des phospholipides en acide arachidonique, l'on connaît peu la fonction *in vivo* des autres phospholipases du Groupe IV¹¹³. Au niveau tumoral, cPLA₂ α a été impliquée dans la régulation de l'angiogenèse, et son inhibition pourrait constituer une nouvelle thérapie antiangiogénique dans le cancer du poumon et le glioblastome^{114,115}, malheureusement rien n'a été décrit pour cPLA₂ β . Les deux variants retrouvés dans notre série se trouvent au niveau de domaines catalytiques, et n'ont pas été décrits dans la base de données tumorale COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer). Néanmoins, il est décrit dans COSMIC des mutations du gène *PLA2G4B* majoritairement faux-sens associées à une surexpression, présentes surtout dans les tumeurs de l'endomètre, du colon, de la peau, et de l'estomac.

Ces deux patients présentant une atteinte familiale, une étude de coségrégation familiale a été initiée, mais le premier résultat obtenu dans une des deux familles est peu concluant, puisque le phénotype de CS ne coségrège pas avec la présence du variant identifié dans *PLA2G4B*.

La néomutation de *LDDX1* retrouvée chez un cas index présentant une LDD pédiatrique, est quant à elle très intéressante. Tout d'abord de par la présentation phénotypique du patient,

puisque les LDD pédiatriques restent très rarement expliqués par des mutations de *PTEN*, contrairement aux formes adultes ²⁹. Ensuite, car le gène *LDDX1* serait également impliqué dans la régulation de la voie PI3K/AKT comme *PTEN*. En effet, il a été décrit une activation de cette voie chez des drosophiles mutantes qui présentaient une grande délétion in-frame de *LDDX1*. A noter que la néomutation retrouvée dans notre série n'a pas été décrite dans la base de données tumorale COSMIC, qui récence majoritairement des faux-sens notamment dans l'endomètre.

Dans un premier temps suite à ce résultat nous avons recherché dans une série de cas de LDD pédiatriques des variants constitutionnels potentiellement délétères de *LDDX1*, mais nous n'en avons pas retrouvé. Cependant les LDD pédiatriques sont très rare, et le diagnostic souvent uniquement radiologique reste difficile.

Il serait donc intéressant de pouvoir étudier ce gène au niveau somatique dans une série de gangliocytomes dysplasiques du cervelet de survenue pédiatrique, ce type de tumeur ayant été peu étudié sur le plan moléculaire.

Enfin, concernant le variant retrouvé de manière incidente dans *BRCA2*, il nous incite à envisager pour les patients présentant les scores prédictifs les plus faibles, d'autres syndromes de prédisposition héréditaire au cancer, même si les phénotypes semblent atypiques.

V. Conclusion

Pour conclure, ces résultats nous encouragent pour les patients présentant les phénotypes les plus caractéristiques et pour lesquels aucune mutation de *PTEN* n'a été retrouvée en région codante, à persévérer dans l'étude de ce gène et de ces régions régulatrices, par exemple en réalisant des études fonctionnelles qui évalueraient l'impact des variants introniques rares profonds, ou encore par le séquençage et l'étude de régions régulatrices à distance. Ils nous poussent aussi à toujours réévaluer nos connaissances en fonction des nouvelles techniques disponibles. On pourrait imaginer que la réalisation de génomes complets qui évitent les biais de capture, pourrait permettre de mettre en évidence un nouveau mécanisme mutationnel dans *PTEN*, à l'origine des CS présentés par le reste de la série. Ceux-ci impliquent également de prendre en considération des variants détectés en NGS à de faibles ratios alléliques, et ce même pour la détection de mutations présentes à l'état homogène comme reporté ici.

Concernant les patients présentant les phénotypes les moins caractéristiques, cette étude nous amène à reconsidérer l'hypothèse d'une association fortuite de signes parfois fréquemment retrouvés en population générale, ou de l'association à un autre syndrome avec parenté phénotypique. En effet, la reconnaissance d'une grande variabilité phénotypique au sein des PHTS s'est accompagnée d'une augmentation importante des indications moléculaires.

Quant à nos résultats concernant *LDDX1*, ils nous invitent à continuer d'explorer l'hypothèse d'une hétérogénéité génétique dans le CS pour des formes particulières, même si ceux-ci doivent auparavant être validés.

L'hétérogénéité génétique dans le syndrome de Cowden typique reste encore à prouver.

Références Bibliographiques

1. Blumenthal, G. M. & Dennis, P. A. PTEN hamartoma tumor syndromes. *Eur. J. Hum. Genet.* **16**, 1289–1300 (2008).
2. Marsh, D. J., Kum, J. B. & Lunetta, K. L. PTEN mutation spectrum and genotype-phenotype correlations in Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome suggest a single entity with Cowden syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 1461–1472 (1999).
3. Eng, C. PTEN: One Gene, Many Syndromes. *Hum. Mutat.* **22**, 183–198 (2003).
4. Lachlan, K. L., Lucassen, A. M., Bunyan, D. & Temple, I. K. Cowden syndrome and Bannayan Riley Ruvalcaba syndrome represent one condition with variable expression and age-related penetrance: results of a clinical study of PTEN mutation carriers. *J. Med. Genet.* **44**, 579–585 (2007).
5. Arch, E. M., Goodman, B. K. & Van Wesep, R. A. Deletion of *PTEN* in a patient with Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome suggests allelism with Cowden disease. *Am. J. Med. Genet.* **71**, 489–493 (1997).
6. Riegert-Johnson, D. L. *et al.* Research Cancer and Lhermitte-Duclos disease are common in Cowden syndrome patients. (2010).
7. Zhou, X. P. Germline and germline mosaic *PTEN* mutations associated with a Proteus-like syndrome of hemihypertrophy, lower limb asymmetry, arteriovenous malformations and lipomatosis. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 765–768 (2000).
8. Caux, F. *et al.* Segmental overgrowth, lipomatosis, arteriovenous malformation and epidermal nevus (SOLAMEN) syndrome is related to mosaic *PTEN* nullizygoty. *Eur. J. Hum. Genet.* **15**, 767–773 (2007).
9. Starink, T. The Cowden syndrome: a clinical and genetic study in 21 patients. *Clin. Genet.* **29**, 222–233 (1986).
10. Nelen, M. R., Kremer, H. & Konings, I. B. Novel *PTEN* mutations in patients with Cowden disease: absence of clear genotype–phenotype correlations. *Eur. J. Hum. Genet.* **7**, 267–273 (1999).
11. Haibach, H., Burns, T. & Carlson, H. Multiple hamartoma syndrome (Cowden's disease) associated with renal cell carcinoma and primary neuroendocrine carcinoma of the skin (Merkel cell carcinoma). *Am. J. Clin. Pathol.* **97**, 705–712 (1992).
12. Schrager, C., Schneider, D. & Gruener, A. Clinical and pathological features of breast disease in Cowden's syndrome: an underrecognized syndrome with an increased risk of breast cancer. *Hum. Pathol.* **29**, 47–53 (1998).
13. Zbuk, K. M. & Eng, C. Cancer phenomics: RET and PTEN as illustrative models. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 35–45 (2007).
14. Gustafson, S., Zbuk, K. M., Scacheri, C. & Eng, C. Cowden Syndrome. *Semin. Oncol.* **34**, 428–434 (2007).
15. Eng, C. PTEN hamartoma tumor syndrome (PHTS). (2014).
16. National Comprehensive Cancer Network. *The NCCN genetic/familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian*. (from <http://www.nccn.org>, 2014).
17. Lachlan, K. L. Cowden Syndrome and the PTEN Hamartoma Tumor Syndrome: How to Define Rare Genetic Syndromes. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **105**, 1595–1597 (2013).
18. Pilarski, R. *et al.* Cowden Syndrome and the PTEN Hamartoma Tumor Syndrome: Systematic Review and Revised Diagnostic Criteria. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **105**, 1607–1616 (2013).
19. Tan, M.-H. & Eng, C. RE: Cowden Syndrome and PTEN Hamartoma Tumor Syndrome: Systematic Review and Revised Diagnostic Criteria. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **106**, dju130–dju130 (2014).
20. Nelen, M. R., Padberg, G. W. & Peeters, E. A. J. Localization of the gene for Cowden disease to chromosome 10q22-23. *Nat. Genet.* **13**, 114–116 (1996).
21. Eng, C. Will the real Cowden syndrome please stand up: revised diagnostic criteria. *J. Med. Genet.* **37**, 828–830 (2000).

22. 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.* **41**, 323–326 (2004).
23. Kurose, K., Araki, T. & Matsunaka, T. Variant Manifestation of Cowden Disease in Japan: Hamartomatous Polyposis of the Digestive Tract with Mutation of the PTEN Gene. *Am. J. Hum. Genet.* **64**, 308–310 (1999).
24. Farooq, A., Walker, L. J., Bowling, J. & Audisio, R. A. Cowden syndrome. *Cancer Treat. Rev.* **36**, 577–583 (2010).
25. Merks, J. H. M. *et al.* PTEN hamartoma tumour syndrome: variability of an entity. *J. Med. Genet.* **40**, e111–e111 (2003).
26. Tan, M.-H. *et al.* Lifetime Cancer Risks in Individuals with Germline PTEN Mutations. *Clin. Cancer Res.* **18**, 400–407 (2012).
27. Bubien, V. *et al.* High cumulative risks of cancer in patients with PTEN hamartoma tumour syndrome. *J. Med. Genet.* **50**, 255–263 (2013).
28. Nieuwenhuis, M. H. *et al.* Cancer risk and genotype–phenotype correlations in PTEN hamartoma tumor syndrome. *Fam. Cancer* **13**, 57–63 (2014).
29. Zhou, X.-P. *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.* **73**, 1191–1198 (2003).
30. Butler, M. G. Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline PTEN tumour suppressor gene mutations. *J. Med. Genet.* **42**, 318–321 (2005).
31. Varga, E. A., Pastore, M., Prior, T., Herman, G. E. & McBride, K. L. The prevalence of PTEN mutations in a clinical pediatric cohort with autism spectrum disorders, developmental delay, and macrocephaly. *Genet. Med.* **11**, 111–117 (2009).
32. Delnatte, C. *et al.* Contiguous gene deletion within chromosome arm 10q is associated with juvenile polyposis of infancy, reflecting cooperation between the BMPR1A and PTEN tumor-suppressor genes. *Am. J. Hum. Genet.* **78**, 1066–1074 (2006).
33. Olschwang, S. PTEN germ-line mutations in juvenile polyposis coli.pdf. *Nat. Genet.* **18**, 12–14 (1998).
34. Schwerd, T. *et al.* A recessive form of extreme macrocephaly and mild intellectual disability complements the spectrum of PTEN hamartoma tumour syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* (2015).
35. Bonneau, D. & Longy, M. Mutations of the Human PTEN Gene. *Hum. Mutat.* **16**, 109–122 (2000).
36. Furnari, F. B., Lin, H., Huang, H.-J. S. & Cavenee, W. K. Growth suppression of glioma cells by PTEN requires a functional phosphatase catalytic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 12479–12484 (1997).
37. Zhou, X.-P. *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.* **73**, 404–411 (2003).
38. Teresi, R. E., Zbuk, K. M., Pezsolesi, M. G., Waite, K. A. & Eng, C. Cowden Syndrome–Affected Patients with PTEN Promoter Mutations Demonstrate Abnormal Protein Translation. *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 756–767 (2007).
39. Salmena, L., Carracedo, A. & Pandolfi, P. P. Tenets of PTEN Tumor Suppression. *Cell* **133**, 403–414 (2008).
40. Marsh, D. J. *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* **21**, 61–69 (1998).
41. Lynch, E. D. & Ostermeyer, E. A. Inherited Mutations in PTEN That Are Associated with Breast Cancer.pdf. *Am. J. Hum. Genet.* **61**, 1254–1260 (1997).
42. Bubien, V. *Etude des événements génétiques somatiques dans les lésions bénignes et malignes de la maladie de Cowden.* (2010).

43. Marsh, D. J., Coulon, V. & Lunetta, K. L. Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in Cowden disease and Bannayan–Zonana syndrome, two hamartoma syndromes with germline PTEN mutation. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 507–515 (1998).
44. Tan, M.-H. *et al.* A Clinical Scoring System for Selection of Patients for PTEN Mutation Testing Is Proposed on the Basis of a Prospective Study of 3042 Proband. *Am. J. Hum. Genet.* **88**, 42–56 (2011).
45. Mester, J. & Eng, C. Cowden syndrome: Recognizing and managing a not-so-rare hereditary cancer syndrome: Cowden Syndrome. *J. Surg. Oncol.* **111**, 125–130 (2015).
46. Gammon, A., Jaspersen, K., Pilarski, R., Prior, T. & Kuwada, S. *PTEN* mosaicism with features of Cowden syndrome: *PTEN* mosaicism with features of CS. *Clin. Genet.* **84**, 593–595 (2013).
47. Gourdon, S. *Exploration génomique exhaustive du gène PTEN par séquençage de nouvelle génération dans des familles atteintes de maladie de Cowden sans mutation identifiée en phase codante.*
48. Pritchard, C. C. *et al.* A mosaic PTEN mutation causing Cowden syndrome identified by deep sequencing. *Genet. Med.* **15**, 1004–1007 (2013).
49. Hollander, M. C., Blumenthal, G. M. & Dennis, P. A. PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 289–301 (2011).
50. Marty, B. *et al.* Frequent PTEN genomic alterations and activated phosphatidylinositol 3-kinase pathway in basal-like breast cancer cells. *Breast Cancer Res* **10**, R101 (2008).
51. Lee, J.-O. *et al.* Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* **99**, 323–334 (1999).
52. Waite, K. A. & Eng, C. Protean PTEN: form and function. *Am. J. Hum. Genet.* **70**, 829–844 (2002).
53. Song, M. S., Salmena, L. & Pandolfi, P. P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2012). doi:10.1038/nrm3330
54. Furnari, F. B., Huang, H. S. & Cavenee, W. K. The phosphoinositid phosphatase activity of PTEN mediates a serum-sensitive G1 growth arrest in glioma cells. *Cancer Res.* **58**, 5002–5008 (1998).
55. Myers, M. P. & Tonks, N. K. PTEN: sometimes taking it off can be better than putting it on. *Am. J. Hum. Genet.* **61**, 1234 (1997).
56. Leslie, N. R., Maccario, H., Spinelli, L. & Davidson, L. The significance of PTEN's protein phosphatase activity. *Adv. Enzyme Regul.* **49**, 190–196 (2009).
57. Weng, L.-P., Smith, W. M., Brown, J. L. & Eng, C. PTEN inhibits insulin-stimulated MEK/MAPK activation and cell growth by blocking IRS-1 phosphorylation and IRS-1/Grb-2/Sos complex formation in a breast cancer model. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 605–616 (2001).
58. Zhang, Z. *et al.* PTEN regulates Plk1 and controls chromosomal stability during cell division. *Cell Cycle* 00–00 (2016). doi:10.1080/15384101.2016.1203493
59. Feng, J. *et al.* PTEN Controls the DNA Replication Process through MCM2 in Response to Replicative Stress. *Cell Rep.* **13**, 1295–1303 (2015).
60. Shen, W. H. *et al.* Essential Role for Nuclear PTEN in Maintaining Chromosomal Integrity. *Cell* **128**, 157–170 (2007).
61. Chen, Z. H. *et al.* PTEN Interacts with Histone H1 and Controls Chromatin Condensation. *Cell Rep.* **8**, 2003–2014 (2014).
62. Planchon, S. M., Waite, K. A. & Eng, C. The nuclear affairs of PTEN. *J. Cell Sci.* **121**, 249–253 (2008).
63. Milella, M. *et al.* PTEN: Multiple Functions in Human Malignant Tumors. *Front. Oncol.* **5**, (2015).
64. Spinelli, L., Black, F. M., Berg, J. N., Eickholt, B. J. & Leslie, N. R. Functionally distinct groups of inherited PTEN mutations in autism and tumour syndromes. *J. Med. Genet.* **52**, 128–134 (2015).
65. Wang, H. *et al.* Allele-specific tumor spectrum in Pten knockin mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 5142–5147 (2010).

66. Leslie, N. R. & Longy, M. Inherited PTEN mutations and the prediction of phenotype. *Semin. Cell Dev. Biol.* **52**, 30–38 (2016).
67. Weng, L. & Brown, J. PTEN induces apoptosis and cell cycle arrest through phosphoinositol-3-kinase/Akt-dependent and -independent pathways. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 237–242 (2001).
68. Lindhurst, M. J. *et al.* A Mosaic Activating Mutation in *AKT1* Associated with the Proteus Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **365**, 611–619 (2011).
69. Kurek, K. C. *et al.* Somatic Mosaic Activating Mutations in *PIK3CA* Cause CLOVES Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **90**, 1108–1115 (2012).
70. Keppler-Noreuil, K. M. *et al.* Clinical delineation and natural history of the *PIK3CA* -related overgrowth spectrum. *Am. J. Med. Genet. A.* **164**, 1713–1733 (2014).
71. Orloff, M. S. *et al.* Germline *PIK3CA* and *AKT1* Mutations in Cowden and Cowden-like Syndromes. *Am. J. Hum. Genet.* **92**, 76–80 (2013).
72. Knuutila, S. & Zhu, Y. DNA Copy Number Amplifications in Human Neoplasms: Review of Comparative Genomic Hybridization Studies. *Am. J. Pathol.* **152**, 1107–1123 (1998).
73. Lee, J. W. *et al.* *PIK3CA* gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. *Oncogene* **24**, 1477–1480 (2005).
74. Shayesteh, L. *et al.* *PIK3CA* is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat. Genet.* **21**, 99–102 (1999).
75. Liu, Z. *et al.* Highly Prevalent Genetic Alterations in Receptor Tyrosine Kinases and Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in Anaplastic and Follicular Thyroid Cancers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 3106–3116 (2008).
76. Samuels, Y. High Frequency of Mutations of the *PIK3CA* Gene in Human Cancers. *Science* **304**, 554–554 (2004).
77. Gymnopoulos, M. & Elsliger, M. Rare cancer-specific mutations in *PIK3CA* show gain of function.pdf. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 5569–5574 (2007).
78. Franke, T. F., Kaplan, D. R., Cantley, L. C. & Toker, A. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3, 4-bisphosphate. *Science* **275**, 665–668 (1997).
79. Carpten, J. D. *et al.* A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of *AKT1* in cancer. *Nature* **448**, 439–444 (2007).
80. Happle, R. Lethal genes surviving by mosaicism: a possible explanation for sporadic birth defects involving the skin. *J. Am. Acad. Dermatol.* **16**, 899–906 (1987).
81. Mahdi, H. *et al.* Germline *PTEN*, *SDHB-D*, and *KLLN* alterations in endometrial cancer patients with cowden and cowden-like syndromes: An international, multicenter, prospective study: Cowden Syndrome-Related Endometrial Cancer. *Cancer n/a-n/a* (2014). doi:10.1002/cncr.29106
82. Ni, Y. *et al.* Germline Mutations and Variants in the Succinate Dehydrogenase Genes in Cowden and Cowden-like Syndromes. *Am. J. Hum. Genet.* **83**, 261–268 (2008).
83. Ngeow, J. *et al.* Incidence and Clinical Characteristics of Thyroid Cancer in Prospective Series of Individuals with Cowden and Cowden-Like Syndrome Characterized by Germline *PTEN*, *SDH*, or *KLLN* Alterations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, E2063–E2071 (2011).
84. Bayley, J.-P. Succinate dehydrogenase gene variants and their role in cowden syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **88**, 674 (2011).
85. Yu, W., He, X., Ni, Y., Ngeow, J. & Eng, C. Cowden syndrome-associated germline *SDHD* variants alter *PTEN* nuclear translocation through SRC-induced *PTEN* oxidation. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 142–153 (2015).
86. Ni, Y. *et al.* Germline *SDHx* variants modify breast and thyroid cancer risks in Cowden and Cowden-like syndrome via FAD/NAD-dependant destabilization of p53. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 300–310 (2012).
87. Bennett, K. L. Germline Epigenetic Regulation of *KILLIN* in Cowden and Cowden-like Syndrome. *JAMA* **304**, 2724 (2010).

88. kConFab *et al.* Analysis of KLLN as a high-penetrance breast cancer predisposition gene. *Breast Cancer Res. Treat.* **134**, 543–547 (2012).
89. Nizialek, E. A., Mester, J. L., Dhiman, V. K., Smiraglia, D. J. & Eng, C. KLLN epigenotype–phenotype associations in Cowden syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* (2015). doi:10.1038/ejhg.2015.8
90. Yehia, L. *et al.* Germline Heterozygous Variants in SEC23B Are Associated with Cowden Syndrome and Enriched in Apparently Sporadic Thyroid Cancer. *Am. J. Hum. Genet.* **97**, 661–676 (2015).
91. Jones, N. *et al.* Comprehensive analysis of PTEN status in breast carcinomas: PTEN status in breast cancer. *Int. J. Cancer* **133**, 323–334 (2013).
92. Priya, R. & Rajasimha, H. Exome sequencing: capture and sequencing of all human coding regions for disease gene discovery. *Methods Mol. Biol.* **884**, 335–351 (2012).
93. Bainbridge, M. N. *et al.* Targeted enrichment beyond the consensus coding DNA sequence exome reveals exons with higher variant densities. *Genome Biol* **12**, R68 (2011).
94. Gnirke, A. *et al.* Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. *Nat. Biotechnol.* **27**, 182–189 (2009).
95. Sanger, F. & Coulson, A. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **94**, 441–448 (1975).
96. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 5463–5467 (1977).
97. Pilarski, R., Stephens, J. A., Noss, R., Fisher, J. L. & Prior, T. W. Predicting PTEN mutations: an evaluation of Cowden syndrome and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome clinical features. *J. Med. Genet.* **48**, 505–512 (2011).
98. Weber, J., Looten, R., Houdayer, C., Stoppa-Lyonnet, D. & Viovy, J.-L. Improving sensitivity of electrophoretic heteroduplex analysis using nucleosides as additives: Application to the breast cancer predisposition gene BRCA2. *ELECTROPHORESIS* **27**, 1444–1452 (2006).
99. Houdayer, C. & Moncoutier, V. Enhanced mismatch mutation analysis: simultaneous detection of point mutations and large scale rearrangements by capillary electrophoresis, application to BRCA1 and BRCA2. *Methods Mol. Biol.* **653**, 147–180 (2010).
100. Casilli, F. *et al.* Rapid detection of novel BRCA1 rearrangements in high-risk breast-ovarian cancer families using multiplex PCR of short fluorescent fragments. *Hum. Mutat.* **20**, 218–226 (2002).
101. Batzer, M. A. *et al.* Standardized nomenclature for Alu repeats. *J. Mol. Evol.* **42**, 3–6 (1996).
102. Chen, J.-M., Férec, C. & Cooper, D. N. Mechanism of Alu integration into the human genome. *Genomic Med.* **1**, 9–17 (2007).
103. Jurka, J. Repbase Update: a database and an electronic journal of repetitive elements. *Trends Genet.* **16**, 418–420 (2000).
104. Jurka, J. Sequence patterns indicate an enzymatic involvement in integration of mammalian retroposons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 1872–1877 (1997).
105. Mirzaa, G. *et al.* PIK3CA-associated developmental disorders exhibit distinct classes of mutations with variable expression and tissue distribution. *JCI Insight* **1**, (2016).
106. O'Neill, S. M., Peters, J. A., Vogel, V. G., Feingold, E. & Rubinstein, W. S. Referral to cancer genetic counseling: Are there stages of readiness? *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* **142C**, 221–231 (2006).
107. Samuels, D. C. *et al.* Finding the lost treasures in exome sequencing data. *Trends Genet.* **29**, 593–599 (2013).
108. Chen, J.-M., Férec, C. & Cooper, D. N. LINE-1 Endonuclease-Dependent Retrotranspositional Events Causing Human Genetic Disease: Mutation Detection Bias and Multiple Mechanisms of Target Gene Disruption. *J. Biomed. Biotechnol.* **2006**, 1–9 (2006).

109. Wimmer, K., Callens, T., Wernstedt, A. & Messiaen, L. The NF1 Gene Contains Hotspots for L1 Endonuclease-Dependent De Novo Insertion. *PLoS Genet.* **7**, e1002371 (2011).
110. De Brakeleer, S., De Grève, J., Lissens, W. & Teugels, E. Systematic Detection of Pathogenic Alu Element Insertions in NGS-Based Diagnostic Screens: The *BRCA1 / BRCA2* Example. *Hum. Mutat.* **34**, 785–791 (2013).
111. Helman, E. *et al.* Somatic retrotransposition in human cancer revealed by whole-genome and exome sequencing. *Genome Res.* **24**, 1053–1063 (2014).
112. Cordaux, R. & Batzer, M. A. The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 691–703 (2009).
113. Leslie, C. C. Cytosolic phospholipase A2: Physiological function and role in disease. *J. Lipid Res.* jlr-R057588 (2015).
114. Tosato, G., Segarra, M. & Salvucci, O. Cytosolic Phospholipase A2 and Cancer: A Role in Tumor Angiogenesis. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **102**, 1377–1379 (2010).
115. Linkous, A. G., Yazlovitskaya, E. M. & Hallahan, D. E. Cytosolic Phospholipase A2 and Lysophospholipids in Tumor Angiogenesis. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **102**, 1398–1412 (2010).

Annexe 1 : Cowden Syndrome/PHTS clinical diagnostic and testing criteria

REVISED PTEN HAMARTOMA TUMOR SYNDROME CLINICAL DIAGNOSTIC CRITERIA^a**MAJOR CRITERIA:**

- Breast cancer
- Endometrial cancer (epithelial)
- Thyroid cancer (follicular)
- Gastrointestinal hamartomas (including ganglioneuromas, but excluding hyperplastic polyps; ≥3)
- Lhermitte-Duclos disease (adult)
- Macrocephaly (≥97 percentile: 58 cm for females, 60 cm for males)
- Macular pigmentation of the glans penis
- Multiple mucocutaneous lesions (any of the following):
 - Multiple trichilemmomas (≥3, at least one biopsy proven)
 - Acral keratoses (≥3 palmoplantar keratotic pits and/or acral hyperkeratotic papules)
 - Mucocutaneous neuromas (≥3)
 - Oral papillomas (particularly on tongue and gingiva), multiple (≥3) OR biopsy proven OR dermatologist diagnosed

MINOR CRITERIA:

- Autism spectrum disorder
- Colon cancer
- Esophageal glycogenic acanthoses (≥3)
- Lipomas (≥3)
- Mental retardation (ie, IQ ≤75)
- Renal cell carcinoma
- Testicular lipomatosis
- Thyroid cancer (papillary or follicular variant of papillary)
- Thyroid structural lesions (eg, adenoma, multinodular goiter)
- Vascular anomalies (including multiple intracranial developmental venous anomalies)

Operational diagnosis in an individual (either of the following):

1. Three or more major criteria, but one must include macrocephaly, Lhermitte-Duclos disease, or gastrointestinal hamartomas; or
2. Two major and three minor criteria.

Operational diagnosis in a family where one individual meets revised PTEN hamartoma tumor syndrome clinical diagnostic criteria or has a PTEN mutation:

1. Any two major criteria with or without minor criteria; or
2. One major and two minor criteria; or
3. Three minor criteria.

^aPilarski R, Burt R, Kohlman W, Pho L, Shannon KM, Swisher E. Cowden syndrome and the PTEN Hamartoma Tumor Syndrome: Systematic review and revised diagnostic criteria. J Natl Cancer Inst 2013;105:1607-1616.

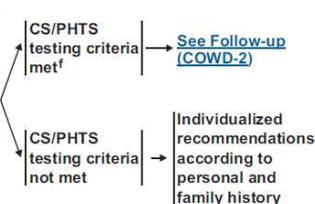
Note: All recommendations are category 2A unless otherwise indicated.

Clinical Trials: NCCN believes that the best management of any cancer patient is in a clinical trial. Participation in clinical trials is especially encouraged.

COWDEN SYNDROME/PTEN HAMARTOMA TUMOR SYNDROME TESTING CRITERIA^{a,b}

- Individual from a family with a known *PTEN* mutation
- Individual meeting clinical diagnostic criteria^c for CS/PHTS
- Individual with a personal history of:
 - Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome (BRRS) or
 - Adult Lhermitte-Duclos disease (cerebellar tumors) or
 - Autism spectrum disorder and macrocephaly or
 - Two or more biopsy-proven trichilemmomas or
 - Two or more major criteria (one must be macrocephaly) or
 - Three major criteria, without macrocephaly or
 - One major and ≥3 minor criteria^d or
 - ≥4 minor criteria

- At-risk individual^e with a relative with a clinical diagnosis of CS/PHTS or BRRS for whom testing has not been performed
- The at-risk individual must have the following:
 - ◊ Any one major criterion or
 - ◊ Two minor criteria

**Major criteria:**

- Breast cancer
- Endometrial cancer
- Follicular thyroid cancer
- Multiple GI hamartomas or ganglioneuromas
- Macrocephaly (megalcephaly) (ie, ≥97%, 58 cm in adult women, 60 cm in adult men)^g
- Macular pigmentation of glans penis
- Mucocutaneous lesions^h
 - One biopsy-proven trichilemmoma
 - Multiple palmoplantar keratoses
 - Multifocal or extensive oral mucosal papillomatosis
 - Multiple cutaneous facial papules (often verrucous)

Minor criteria:ⁱ

- Autism spectrum disorder
- Colon cancer
- ≥3 esophageal glycogenic acanthoses
- Lipomas
- Mental retardation (ie, IQ ≤75)
- Papillary or follicular variant of papillary thyroid cancer
- Thyroid structural lesions (eg, adenoma, nodule(s), goiter)
- Renal cell carcinoma
- Single GI hamartoma or ganglioneuroma
- Testicular lipomatosis
- Vascular anomalies (including multiple intracranial developmental venous anomalies)

^aThese are testing criteria, clinical diagnostic criteria on [COWD-3](#).

^bIf two criteria involve the same structure/organ/tissue, both may be included as criteria.

^cPilarski R, Burt R, Kohlmann W, Pho L, Shannon KM, Swisher E. Cowden syndrome and the PTEN Hamartoma Tumor Syndrome: Systematic review and revised diagnostic criteria. J Natl Cancer Inst 2013;105:1607-1616.

^dIf an individual has two or more major criteria, such as breast cancer and non-mediullary thyroid cancer, but does not have macrocephaly, one of the major criteria may be included as one of the three minor criteria to meet testing criteria.

^eAn at-risk individual can be defined as a first-degree relative of an affected individual and/or proband. If a first-degree relative is unavailable or unwilling to be tested, more distant relatives should be offered testing.

Note: All recommendations are category 2A unless otherwise indicated.

Clinical Trials: NCCN believes that the best management of any cancer patient is in a clinical trial. Participation in clinical trials is especially encouraged.

^fPatients who have received an allogeneic bone marrow transplant should not have molecular genetic testing via blood or buccal samples due to unreliable test results from contamination by donor DNA. If available, DNA should be extracted from a fibroblast culture. If this source of DNA is not possible, buccal samples can be considered, subject to the risk of donor DNA contamination.

^gRoche AF, Mukherjee D, Guo SM, Moore WM. Head circumference reference data: Birth to 18 years. Pediatrics 1987;79:706-712.

^hThe literature available on mucocutaneous lesions is not adequate to accurately specify the number or extent of mucocutaneous lesions required to be a major criterion for CS/PHTS. Clinical judgement should be used.

ⁱInsufficient evidence exists in the literature to include fibrocystic disease of the breast, fibromas, and uterine fibroids as diagnostic criteria.

Annexe 2 : Signes cliniques des syndromes PHTS

Le syndrome de Cowden			
Lésions cutanéomuqueuses <ul style="list-style-type: none"> • 90% patients (surestimés) • 2ème décennie • Augmentent en nombre et sévérité avec les années • Aucun risque de transformation maligne 	Trichilemmomes	Hamartomes bénins du follicule pileux	Critère Pathognomonique
	Papules faciales	Périorificielles, couleur chair, saillantes	Lésion tissulaires hyperplasiques non spécifiques
	Papillomatose orale	lèvres, gencives langue	80% des cas
	Kératose acrale	petites lésions palmo-plantaires verruqueuses	Critère pathognomonique
Lésions digestives <ul style="list-style-type: none"> • 70 à 85% des patients • Dès l'enfance • Asymptomatiques++ 	Acanthosis glycoligénique	hyperkératose œsophagienne	Spécifique du Cowden
	Polypose hamartomateuse	estomac, duodénum, colon	Critère mineur
Lésions thyroïdiennes <ul style="list-style-type: none"> • 70 à 75% des patients • 60% bénignes • Précoces (enfance) 	Goitre multihétéronodulaire	adénomes thyroïdiens multifocaux ou des hamartomes	Critère mineur
	Thyroïdite de Hashimoto	Avec ou sans retentissement fonctionnel	
Lésions mammaires <ul style="list-style-type: none"> • 50 à 70% des patientes • Débute à la puberté • Caractère évolutif • Multiplicité et bilatéralité 	Mastopathie fibrokystique, hyperplasies atypiques, gynécomastie des hommes	fibroadénomes, adénomes tubuleux,	Critère mineur
	Macrocéphalie	Périmètre crânien > 97ème percentile Dès la naissance et progressive	Signe quasi constant Critère majeur
Les autres signes	Lipomes	Sous cutanés ou profonds, précoces	Critère mineur
	Anomalies vasculaires	Angiomes plans lymphangiomes angiomes caverneux ou MAV	50% des patients
	Anomalies gynécologiques	Kystes ovariens, fibromes, léiomyomes utérins	55% des patientes
	Anomalies de l'appareil urinaire	Polypes urétéraux, kystes rénaux...	
	Cancer du sein	Jeune âge (40 ans), bilatéralité	70% des femmes atteintes Critère majeur
Risque tumoral	Cancer de la thyroïde	Précoce, transformations malignes	30% des patients Critère majeur
	Autres	Cancer de l'endomètre, Cancer du rein	Critère majeur de la maladie
	Le syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba		
Association de : Macrocéphalie, retard du développement, lipomatose, malformations vasculaires, polypes hamartomateux intestinaux et pigmentation génitale chez le garçon.			
La maladie de Lhermitte Duclos			
Gangliocytome dysplasique du cervelet. Clinique variable. Critère pathognomonique du syndrome de Cowden (adultes)			
Les syndromes de Protée, Protée-like dont SOLAMEN			
Gigantisme asymétrique plus ou moins proportionné et progressif, lipomatose, MAV, naevi épidermiques...			

Annexe 3 : Phénotypes détaillés des 22 cas index

Identifiant	2002213	2011694	2010029	2010018
Age au dg clinique	2002	2011	2010	2010
Date dernières nouvelles cliniques	2007	2011	2012	2011
Interprétation	Cowden	Cowden	Cowden	SOLAMEN
Histoire Familiale	oui	oui	non	non
Lésions cutanéomuqueuses	x			x
Papules faciales périorificielles			x	
Trichilemmomes				
Papillomatose orale			x	x
Kératose Acrale			x	0
Lésions verruqueuses des membres			x	
Keratosis palmoplantaire				
Autres lésions				
Taches pigmentées du pénis				
Naevus épidermique				
Lésions Digestives	x			?
Acanthosis glycogénique de l'œsophage				
Polypes gastriques/intestinaux				
Polypes coliques	x			
Lésions Thyroïdiennes	x	x	x	?
Lésions bénignes	x	x	x	
Lésions	GMHN	adénomes vésiculaires	goitre	
Cancer de la thyroïde			x	
Type histologique			papillaire a priori	
Lésions Mammaires			x	?
Hypertrophie mammaire virginale				
Mastopathie bénigne complexe				
Cancer du sein			x	
Macrocéphalie	x	x	x	
PC et âge de la mesure	+5,3DS (64cm)	64 cm	58,5 cm	57 cm
Atteintes Neurologiques				x
Syndrome de Lhermitte-Duclos				
Autres				NORB 1997
Lipomatose et anomalies vasculaires	x	x	x	x
Lipomes sous cutanés	x	x		x
Age				naissance
Topographie	région dorsale droite			jambe gauche abdomen dos
Angiolipome			x	x
Age				thorax
topographie et nombre			intraosseux temporal droit	
Lymphangiomes cutanés				x
topographie et nombre				multiples dorsales
MAV profondes				
Anomalies vasculaires intracrâniennes				
Hypertrophie asymétrique d'un membre				x
Autres				Lymphangiome médiastinal bénin et des surrénales
Atteintes urogénitales et digestives				x
Kystes ovariens				x
Fibromes utérins				
Autres Maladies tumorales malignes			x	
Cancer du rein			x	
cancer de l'endomètre				
mélanome malin				
cancer colorectal				
AUTRES			Hyperostose diffuse des os de la face	Arthralgies multiples

Identifiant	2008207	2010391	2010384	2003023
Age au dg clinique	avant 57 ans (2008)	2010 (déjà connue)	2010	2002
Date dernières nouvelles cliniques	2010	2010	2010	2003
Interprétation	Cowden	Cowden	Cowden	LDD
Histoire Familiale	oui (goitre parents et sœur, Kc sein mère)	non	Sœur (kc sein thyroïde), mère (kc sein) fille (macrocéphalie)	non
Lésions cutanéomuqueuses	x	x	x	x
Papules faciales péri-orificielles	x			
Trichilemmomes			+/-	
Papillomatose orale		x	X	
Kératose Acrale	x	x	x	x
Lésions verruqueuses des membres	x			x
Keratosis palmoplantaire			x	x
Autres lésions				
Taches pigmentées du pénis				
Naevus épidermique				
Autres		lésions dentaires		
Lésions Digestives	x	x		
Acanthosis glycogénique de l'œsophage				
Polypes gastriques/intestinaux				
Polypes coliques	x			
Lésions Thyroïdiennes	x	x	x	x
Lésions bénignes	x	x	x	x
Lésions		nodules multiples	nodules bénins	nodules multiples
date (âge)				
Cancer de la thyroïde				
Lésions Mammaires	x	x	x	
Hypertrophie mammaire virginale	x			
Mastopathie bénigne complexe				
Cancer du sein			x	
Date (âge)			75 ans	
Lésion				
Macrocéphalie		x	x	
PC et âge de la mesure	57 cm	61 cm	60 cm	
Atteintes Neurologiques	x			x
Syndrome de Lhermitte-Duclos				x
Autres	Méningiome frontal gauche			
Lipomatose et anomalies vasculaires				
Lipomes sous cutanés				
Topographie				
Angiolipome				
Lymphangiomes cutanés				
MAV profondes				
Anomalies vasculaires intracrâniennes				
Hypertrophie asymétrique d'un membre				
Atteintes urogénitales et digestives		x		
Kystes ovariens		x		
Fibromes utérins		x		
Autres		Nodules rénaux		
Autres Maladies tumorales malignes				
Cancer du rein				
cancer de l'endomètre			x	
mélanome malin				
cancer colorectal				
AUTRES		Sarcoïdose cutanéopulmonaire		

Identifiant	1998101	2008383	2006406	2010148
Age au dg clinique	1999 (déjà connue)	2008	2006	54ans (2010)
Date dernières nouvelles cliniques	2003	2010	2012	2012
Interprétation	Cowden	Cowden	Cowden	Cowden
Histoire Familiale	+/-	filles (méningiome + oligodendrocytome) père (Kc rein)	non	frères x2 (Kc et polypes coliques) mère (kc sein et estomac)
Lésions cutanéomuqueuses	x	x	x	0
Papules faciales périorificielles	x	x		
Trichilemmomes	x prétragien			
Papillomatose orale	x	x	x	
Kératose Acrale	x			
Lésions verruqueuses des membres	x			
Keratosis palmoplantaire	x			
Autres lésions	x			
Taches pigmentées du pénis	x			
Naevus épidermique				
Autres	palais ogival, chute des dents			
Lésions Digestives	x		x	x
Acanthosis glycogénique de l'œsophage	x		x	
Polypes gastriques/intestinaux	x		0	
Polypes coliques	x		ganglioneuromatose	x
Lésions Thyroïdiennes	x	x	x	x
Lésions bénignes	x		x	x
Lésions	adénomes thyroïdiens		GMHN	GMHN
date (âge)	1998			20 ans
Cancer de la thyroïde		x	x	
Type histologique			ADK papillaire	
Date (âge)		58 ans	avt 28 ans	
Lésions Mammaires		x		x
Hypertrophie mammaire virginale				
Mastopathie bénigne complexe				x
Cancer du sein		x		
Date (âge)		56 ans		
Lésion				
Macrocéphalie	x		x	x
PC et âge de la mesure	PC 63cm en 1998	limite sup normale...	60 cm	62 cm
Atteintes Neurologiques				
Syndrome de Lhermitte-Duclos				
Lipomatose et anomalies vasculaires	x		x	
Lipomes sous cutanés	x		x	
Age				
Topographie	kyste sébacé du dos			
Angiolipome				
Lymphangiomes cutanés				
MAV profondes				
Anomalies vasculaires intracrâniennes	x			
Hypertrophie asymétrique d'un membre				
Atteintes urogénitales et digestives	x			x
Kystes ovariens				x
Fibromes utérins				x
Autres	Kyste foie et rein			
Autres Maladies tumorales malignes				
Cancer du rein				
cancer de l'endomètre				
mélanome malin				
cancer colorectal				
AUTRES			lithiase vésiculaire	

Identifiant	2010186	2012527	2003007	2001018
Age au dg clinique	2010	46 ans (2012)	2003	3 ans (2001)
Date dernières nouvelles cliniques	2010	2013	2003	2014
Interprétation	Cowden	Cowden	Cowden	Cowden
Histoire Familiale	Fille (Kc thyroïde) sœur (kc sein) polypes (frere et sœur)	Frère (mélanome) Mère (Kc thyroïde) tante mat(Kc sein+leiomyome sigmoïde)	Fille (seinB diificlutés apprentissage)	non
Lésions cutanéomuqueuses	x	x	x	
Papules faciales périorificielles				
Trichilemmomes				
Papillomatose orale		x	x	
Kératose Acrale	x	x		
Lésions véruqueuses des membres				
Keratosis palmoplantaire	x	x		
Autres lésions				
Taches pigmentées du pénis				
Naevus épidermique				
Autres			kystes cuir chevelu	
Lésions Digestives				x
Acanthosis glycogénique de l'œsophage				
Polypes gastriques/intestinaux				hamartomes du grêle
Polypes coliques				
Lésions Thyroïdiennes	x	x	x	x
Lésions bénignes	x		x	
Lésions date (âge)	Thyroïdite atrophiante 49 ans		GMHN	
Cancer de la thyroïde		x		x
Type histologique		ADK papillaire		ADK papillaire
Date (âge)		33 ans		10 ans
Lésions Mammaires	x	x		
Hypertrophie mammaire virginale				
Mastopathie bénigne complexe		x		
Cancer du sein	x			
Date (âge)	39 ans			
Lésion	Carcinome canalaire infiltrant			
Macrocéphalie	x	x		
PC et âge de la mesure	58 cm	58 cm		56 cm à 15a
Atteintes Neurologiques				
Syndrome de Lhermitte-Duclos				
Autres				
Lipomatose et anomalies vasculaires			x	x
Lipomes sous cutanés			x	
Age				
Topographie				
Angiolipome				
Age				
topographie et nombre				
Lymphangiomes cutanés				x
topographie et nombre				lymphangiome kystique
MAV profondes				
topographie et nombre				
Anomalies vasculaires intracrâniennes				
Hypertrophie asymétrique d'un membre				
Atteintes urogénitales et digestives		x		x
Kystes ovariens				
Fibromes utérins		x		
Autres				Hamartomes rénaux
Autres Maladies tumorales malignes		x	x	x
Cancer du rein				
cancer de l'endomètre				
mélanome malin				
cancer colorectal				
Autres		Carcinome adénoïde kystique de la langue	Tumeur médullaire	Cancer de l'ovaire type Sertoli-Leydig
AUTRES				Hamartomes pulmonaires

Identifiant	1999009	2001012	2009038
Age au dg clinique	30 ans	1995 (déjà connue)	2009
Date dernières nouvelles cliniques	2002	2012	2009
Interprétation	LDD	Cowden	Cowden
Histoire Familiale	Kc colon père	Oui	Non
Lésions cutanéomuqueuses	x	x	x
Papules faciales périorificielles		x	X
Trichilemmomes			X
Papillomatose orale		x	X
Kératose Acrale	x	x	X
Lésions verruqueuses des membres	x	x	
Keratosis palmoplantaire		x	X
Autres lésions			
Taches pigmentées du pénis			
Naevus épidermique			
Autres		lésions dentaires	
Lésions Digestives		x	
Acanthosis glycogénique de l'œsophage		x	
Polypes gastriques/intestinaux		x	
Polypes coliques		hamartomateux et adénomateux	
Lésions Thyroïdiennes		x	x
Lésions bénignes		x	
Lésions		Goitre multinodulaire	GMHN
date (âge)		14 ans	
Cancer de la thyroïde			
Type histologique			
Date (âge)			
Lésions Mammaires		x	x
Hypertrophie mammaire virginale			
Mastopathie bénigne complexe		x	x
Cancer du sein		0	
Date (âge)			
Lésion			
Macrocéphalie	x	x	
PC et âge de la mesure	62 cm	60cm	57 cm
Atteintes Neurologiques	x	x	0
Syndrome de Lhermitte-Duclos	x	x	0
Autres			
Lipomatose et anomalies vasculaires	x		
Lipomes sous cutanés	x		
Age			
Topographie			
Angiolipome		x	
Age			
topographie et nombre		cutanés++ et rectal	
Lymphangiomes cutanés			
topographie et nombre			
MAV profondes		x	x
topographie et nombre		fesse gauche	pelvienne
Anomalies vasculaires intracrâniennes		x	x
Hypertrophie asymétrique d'un membre			
Atteintes urogénitales et digestives		x	x
Kystes ovariens			x
Fibromes utérins		x	x
Autres		Hamartomes hépatiques, Kyste rein	
Autres Maladies tumorales malignes			
Cancer du rein			
cancer de l'endomètre			
mélanome malin			
cancer colorectal			
AUTRES			

Identifiant	2013161	1998002	2012115
Age au dg clinique	46 ans (2011)	46 ans (1994)	2012 (7 ans)
Date dernières nouvelles cliniques	2013	2015	2012
Interprétation	Cowden	Cowden	LDD
Histoire Familiale	Non	Mère : mésothelium	Non
Lésions cutanéomuqueuses		x	0
Papules faciales périorificielles		x	
Trichilemmomes		x	
Papillomatose orale		x	
Kératose Acrale		x	
Lésions véréuqueuses des membres			
Keratosis palmoplantaire			
Autres lésions			
Taches pigmentées du pénis			
Naevus épidermique			
Autres			Granulomes annulaires cutanés multiples
Lésions Digestives		x	
Acanthosis glycogénique de l'œsophage			
Polypes gastriques/intestinaux		x	
Polypes coliques		x	
Lésions Thyroïdiennes	x	x	
Lésions bénignes		x	
Lésions		GMHN	
date (âge)			
Cancer de la thyroïde	x		
Type histologique	ADK papillaire		
Date (âge)	33 ans		
Lésions Mammaires	x	x	
Hypertrophie mammaire virginale			
Mastopathie bénigne complexe	x	x	
Cancer du sein			
Date (âge)			
Lésion			
Macrocéphalie	x	x	x
PC et âge de la mesure si enfant	60 cm		57 cm à 7 ans
Atteintes Neurologiques		x	x
Syndrome de Lhermitte-Duclos			x
Autres		méningiome cérébelleux	
Lipomatose et anomalies vasculaires			
Lipomes sous cutanés			
Angiolipome			
Lymphangiomes cutanés			
topographie et nombre			
MAV profondes			
topographie et nombre			
Anomalies vasculaires intracrâniennes			
Hypertrophie asymétrique d'un membre			
Atteintes urogénitales et digestives		x	
Kystes ovariens		x	
Fibromes utérins		x	
Autres Maladies tumorales malignes	x		
Cancer du rein			
cancer de l'endomètre			
mélanome malin			
cancer colorectal			
Autres	Oligodendrocytome cérébelleux à 28 ans	Méningiome cérébelleux 1992	
AUTRES	Sd de Saddam	nodules paratrachéaux, Hamartome kystique mésoenchymateux pulmonaire	

Annexe 4 : Détails des amorces et des conditions de PCR utilisées

Annexe 4a. Liste des amorces et conditions de PCR pour l'amplification de l'exon 5 de *PTEN*, et des séquences *Alu*

Exon	Nom	Séquence 5'-3'	Orientation	Taille (wt/mut)	PCR	Enzyme
5	5f	ACCCACCACAGCTAGAACTT	fwd	263/>450 pb	1	HotStarTaq DNA Polymerase (QIAGEN)
	5r	AAATTCTCAGATCCAGGAAGAGG	rev			
Amorces spécifiques des séquences <i>Alu</i>						
1^{er} point de cassure						
5	5af	CCACAGTTGCACAATATCCTTTT	fwd	*/>300 pb	1	HotStarTaq DNA Polymerase (QIAGEN)
	<i>Alu_5r</i>	GAGAATGGCGTGAACCCG	rev			
2^{ème} point de cassure						
5	<i>AluYa5_5f</i>	GGGATGGTCTCGATCTCCTG	fwd	*/211 pb	2	AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Life)
	<i>AluYb8_5f</i>	CGCAATCTGGCTCACTG	fwd	*/209 pb		
	5r	AAATTCTCAGATCCAGGAAGAGG	rev			

wt = allèle sauvage, mut = allèle muté, PCR = programme de PCR, fwd = amorce forward, rev = amorce reverse
* l'allèle sauvage ne s'amplifie pas sous ces conditions

Annexe 4b. Liste des amorces et conditions de PCR pour l'amplification des exons 18, 19 et 20 de *PLA2G4B*

Exon	Nom	Séquence 5'-3'	Orientation	Taille (wt)	PCR	Enzyme
18	18f	GTGTTGGTTCAGCAGGAGAG	fwd	348 pb	3	AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Life)
	18r	ACTCCAAAGCCCCTCTCTTC	rev			
19	19f	CCTGTCAGGTGTGGAGAGTT	fwd	438 pb	3	AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Life)
	19r	TGTGGGGAAGACAGGTTTGG	rev			
20	20f	AGCCCCGAAGAGCAGCTC	fwd	635 pb	2	AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Life)
	20r	TCCTTACCCCACTGCAAACCT	rev			

wt = allèle sauvage, PCR = programme de PCR, fwd = amorce forward, rev = amorce reverse

Annexe 4d. Liste des programmes de PCR utilisés

PCR	Dénat.	Cycle 1	Final élong.	Store
1	95° 10'	(95° 30'' - 64° 45'' - 72° 1') x 40	72° 20'	15°
2	95° 10'	(95° 30'' - 62° 30'' - 72° 45') x 40	72° 20'	15°
3	95° 10'	(95° 30'' - 60° 30'' - 72° 45') x 40	72° 20'	15°

PCR = programme de PCR

Annexe 5 : Score de Prédiction de mutation CC ⁴⁴

Table 4. CC Adult Score Derivation

	Population Risk	Relative Risk (Referral/Community)	Relative Risk (Mutants/Community)	Weight
Neurological				
Macrocephaly, presence	2	10.7	30.1	6
Extreme (male, OFC ≥ 63 cm)	0.2	130	160	10
Extreme (female, OFC ≥ 60 cm)	0.2	20	170	10
Lhermitte Duclos disease	0.01	80	860	10
Autism or developmental delay	5	0.2	1.2	1
Breast and Gynecological				
Invasive breast cancer				
<30	0.06	23.3	23.3	4
30-39	0.43	20.2	19.8	4
40-49 ^a	1.45	17.3	12.6	2
≥50	10.93	3	1.8	1
Fibrocystic breast disease	10	4.5	4.2	1
Endometrial cancer				
20-29	0.01	50	140	10
30-39	0.06	20	46.7	6
40-49	0.19	13.7	36.8	6
≥50	2.43	3.7	2.9	1
Fibroids	13	3.2	2.9	1
Gastrointestinal				
Polyposis syndrome (five or more, any type)	1	3.7	34.3	6
Intestinal hamatoma or ganglioneuroma, any number	0.01			10
Glycogenic acanthosis	0.01	100	1520	10
Skin				
Trichilemmomas, biopsy proven	0.01	60	570	10
Oral papillomas	0.46	17.4	33	6
Penile freckling	1	18.8	29.4	6
Acral keratoses	10	0.6	2.7	1
Arteriovenous malformations	0.25	3.6	45.6	6
Skin lipomas	20	1.3	2.1	1
Endocrine				
Thyroid cancer				
<20	0.01	90	480	10
20-29 ^a	0.06	46.7	48.3	4
30-39 ^a	0.13	44.6	51.5 ^b	4
40-49 ^a	0.17	43.5	44.7	4
≥50 ^a	0.57	17.7	6.7	1
Thyroid goiter, nodules, adenomas, or Hashimoto's thyroiditis (one or more features)	5	7.1	14.4	4
Genitourinary				
Renal cell carcinoma	1.49	3.2	4.5	1

^a For these specific features, referral bias was clinically recognized and accounted for by a standard downward modification of weight by a risk tier; this bias may also be recognized in a high RR (study population/community, relative to the RR in patients with *P TEN* mutations/community). Individual features for which high referral bias was evident, but where weight was already 1, were not further adjusted downward.

^b For this borderline RR just above the threshold of 50, given the relatively consistent RRs in adjacent groups for all populations, this weight was adjusted to 4 for consistency between the adjacent age groups.

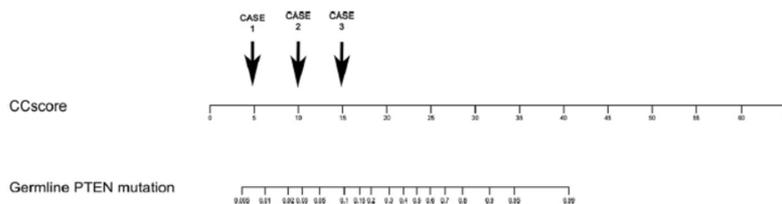


Figure 2. CC Score Nomogram for Obtaining a Corresponding Individual Point Pretest Probability of Germline *P TEN* Mutation
 The CC score is first derived by a sum of the weights of positive features that is provided in Table 4. To illustrate, three hypothetical cases are presented, each corresponding to a CC score of 5 points, 10 points, and 15 points, respectively. Case 1 may present with breast cancer at age 55 (1 point), with background of thyroid cancer at age 44 (4 points), with a final score of 5 and corresponding point probability < 1%. Case 2 may present with breast cancer at age 38 (4 points) and concurrent macrocephaly (6 points), with a final score of 10 and corresponding point probability of 3%. Case 3 may present with a single hamartomatous gastrointestinal polyp (10 points) found on endoscopy, Hashimoto's thyroiditis (4 points), and lipomas (1 point), for a final score of 15 and corresponding point probability of 10%.

Annexe 6 : Score de prédiction de mutation PTEN Predict ⁹⁷

 <p>PTEN-Predict: Mutation Risk Calculator</p>	<p><i>PTEN Predict is the property of the Clinical Cancer Genetics Program, Department of Internal Medicine, James Comprehensive Cancer Center, The Ohio State University.</i></p> <p><i>For questions, contact Robert Pilarski, MS, CGC 614-293-7774 robert.pilarski@osumc.edu</i></p>
<p>Females <18 Variables</p>	<p>Indicator (Yes/No)</p>
<p>Benign Skin Lesions</p>	<p>No</p>
<p>Macrocephaly</p>	<p>No</p>
<p>Probability of Mutation</p>	<p>1,7%</p>
<p>Females >18 Variables</p>	<p>Indicator (Yes/No)</p>
<p>Benign GI Lesions</p>	<p>No</p>
<p>Benign Thyroid Lesions</p>	<p>No</p>
<p>Macrocephaly</p>	<p>No</p>
<p>Papillomatous Papules</p>	<p>No</p>
<p>Trichilemmoma</p>	<p>No</p>
<p>Endometrial Cancer</p>	<p>No</p>
<p>Probability of Mutation</p>	<p>0,9%</p>
<p>Males <18 with macrocephaly Variables</p>	<p>Indicator (Yes/No)</p>
<p>Lipomas</p>	<p>No</p>
<p>Papillomatous Papules</p>	<p>No</p>
<p>Penile Freckling</p>	<p>No</p>
<p>Probability of Mutation</p>	<p>8,6%</p>
<p>Males > 18 with macrocephaly Variables</p>	<p>Indicator (Yes/No)</p>
<p>Benign GI Lesions</p>	<p>No</p>
<p>Benign Thyroid Lesions</p>	<p>No</p>
<p>Probability of Mutation</p>	<p>19,5%</p>

Annexe 7 : Liste des 15 variants validés n'impliquant qu'un seul cas index

Patients	Gène	Position génomique	Génotype	Type de variants
2002213	TMCO4	g.20072127	AG	non sens
1998101	FLG2	g.152324335	-/TGAGTGTGTCCTGTATGTGTGTGTGAGA CCCCTGAGTGCACTTCACTGTCACT GGACTCACTGTGGCTAGATCTCTGT CTTCCAGTTGTCTGGACCCTCTCTGTGT GGACTGTCCATGACCAGAGTGG	grande insertion
2010018	USH2A	g.215844313	CT	impact épissage
2006406	HELQ	g.84376685	CG	impact épissage
1998002	NUP155	g.3733602	AT/-	frameshift
2001018	DMGDH	g.78359437	AG	impact épissage
2003007	CROT	g.86978418	CT	non sens
2010391	SSPO	g.149487384	C/-	frameshift
2003007	MMRN2	g.88705235	CT	impact épissage
2010029	SCYL1	g.65305291	GTCT/-	frameshift
2008383	ANO2	g.5941688	AG	non sens
2010391	HYDIN	g.70986510	-/GA	frameshift
2010391	ZNF594	g.508738	AA/-	frameshift
2003023	HAUS8	g.17169493	AC	non sens
2003023	ZNF419	g.58003582	AG	impact épissage

Serment d'Hippocrate

En présence des Maîtres de cette école, et de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai gratuitement mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira ni à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Reconnaissant envers mes Maîtres, je tiendrai leurs enfants et ceux de mes confrères pour des frères et, s'ils devaient apprendre la Médecine ou recourir à mes soins, je les instruirai et les soignerai sans salaire ni engagement.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes. Si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

L'hérédité manquante dans le syndrome de Cowden : Approche par séquençage d'exome

Résumé: Le syndrome de Cowden (CS) est une maladie de transmission autosomique dominante associée à des mutations germinales du gène suppresseur de tumeur *PTEN*. Son expression phénotypique est très variable, et l'existence de patients avec un phénotype démonstratif sans mutation de *PTEN* retrouvée suggère l'existence d'une hétérogénéité génétique. Pour explorer cette hypothèse, nous avons recherché par séquençage d'exome (WES), des altérations moléculaires dans un gène candidat commun dans une série de 22 patients évocateurs de CS, sans mutation de *PTEN* détectable par des méthodes conventionnelles. Pour deux d'entre eux de présentation sporadique, les ADN parentaux étaient disponibles permettant une stratégie de trio. De façon surprenante, pour deux patients, le WES a identifié dans l'exon 5 de *PTEN* deux insertions *Alu* distinctes aux mêmes points de cassure, jamais décrites. Celles-ci n'ont pas été retrouvées dans une série de 35 cancers du sein avec perte d'expression de *PTEN* sans mutation de celui-ci identifiée. Nous avons également mis en évidence deux gènes candidats, *PLA2G4B* et *LDDX1*, qui pourraient amener un nouvel éclairage sur la carcinogenèse et les voies de signalisation, mais d'autres travaux sont nécessaires pour confirmer leur implication. Cette étude révèle dans *PTEN* la présence d'un hotspot de rétrotransposition *Alu*, responsable de CS, et suggère que des mutations de *PTEN* non détectées pourraient contribuer à l'hérédité manquante du CS. Ainsi, l'hétérogénéité génétique dans le CS reste à ce jour à prouver.

The missing heritability in Cowden Syndrome: Approach by exome sequencing

Abstract: Cowden syndrome (CS) is an inherited autosomal dominant disorder associated with germline mutations of the tumour suppressor gene *PTEN*. Its phenotypical expression is highly variable and the existence of patients with a demonstrative disease phenotype without a *PTEN* mutation may be related to genetic heterogeneity. To explore this hypothesis, and in order to compare potentially deleterious variants that could enable us to identify a new candidate gene, we performed Whole Exome Sequencing (WES) in a series of 22 CS patients without a *PTEN* mutation detectable using conventional methods. Two of them with a sporadic presentation had parental DNA available allowing a trio strategy. Interestingly, in two patients WES revealed the presence of two distinct, undescribed *Alu* insertions with the same breakpoints in *PTEN* exon 5. These insertions were not found in a series of 35 breast carcinomas that showed a loss of *PTEN* expression without a detectable alteration of this gene. We also identified two novels candidate genes, *PLA2G4B* and *LDDX1* that can reveal important perspectives concerning functional pathways and carcinogenesis, but further investigations are needed to confirm their implication. This study reveals the presence of a *PTEN Alu* insertion hotspot involved in CS, and furthermore suggests that undetected *PTEN* mutations could contribute to the CS missing heritability. Genetic heterogeneity in CS remains to be proved.

Discipline: Génétique Médicale

Mots-clés : *PTEN*, Syndrome de Cowden, Séquence *Alu*, Séquençage d'exome, Hétérogénéité génétique

UFR DES SCIENCES MEDICALES, 146 rue Léo Saignat CS 61292, 33076 Bordeaux
CEDEX