Classification moléculaire des patients ayant une polypose hamartomateuse ou hyperplasique

Kevin Sweet, MS, CGC
Joseph Willis, MD
Xiao-Ping Zhou, MD, PhD
Carol Gallione, PhD
Takeshi Sawada, MD, PhD
Pia Alhopuro, MD
Sok Kean Khoo, PhD
Attila Patocs, MD, PhD
Cossette Martin, PhD
Scott Bridgeman, BSc
John Heinz, PhD
Robert Pilarski, MS, CGC
Rainer Lehtonen, BSc
Thomas W. Prior, PhD
Thierry Frebourg, MD, PhD
Bin Tean Teh, MD, PhD
Douglas A. Marchuk, PhD
Lauri A. Aaltonen, MD, PhD
Charis Eng, MD, PhD

Contexte Des pourcentages significatifs de patients atteints de polypose hamartomateuse ou dysembryoplasique ou ayant une polypose hyperplasique/mixte demeurent sans diagnostic clinique ou moléculaire spécifique ou se présentent de façon atypique. La détermination d'un diagnostic syndromique est importante car il guide la prise en charge, en particulier, la surveillance et la chirurgie prophylactique.

Objectif Classer systématiquement les patients ayant une polypose hamartomateuse inexpliquée ou hyperplasique/mixte par une analyse moléculaire approfondie dans le contexte d'une nouvelle revue centrale des résultats histopathologiques.

Schéma, environnement et patients Étude prospective, basée sur 49 patients référés non apparentés provenant d'établissements extérieurs (n = 28) et dans un centre spécialisé anticancéreux (n = 21), menée entre le 2 mai 2002 jusqu'au 15 décembre 2004. Les analyses des lignées germinales de *PTEN*, *BMPR1A*, *STK11* (séquence, délétion), *SMAD4*, et *ENG* (séquence), un dépistage spécifique d'exon *BRAF*, *MYH* et *BHD* et une nouvelle revue de l'histologie des polypes ont été réalisés.

Principaux critères de jugement Observations moléculaires, cliniques et histopathologiques chez des patients ayant une polypose inexpliquée.

Résultats Chez les 49 patients, 11 (22 %) avaient des mutations germinales. Parmi les 14 patients ayant une polypose juvénile, deux, ayant un début précoce de la maladie, avaient des mutations de ENG, codant pour l'endogline, précédemment associée seulement à la télangiectasie hémorragique héréditaire ; 1 avaient une délétion hémizygote touchant *PTEN* et *BMPR1A* ; et 1 avait une mutation *SMAD4*. Un sujet précédemment classé comme syndrome de Peutz-Jeghers avait une délétion *PTEN*. Chez les 9 sujets ayant une polypose hamartomateuse inconnue, 4 avaient des mutations de *STK11* (1), *BMPR1A* (2), et *SMAD4* (1). Parmi les 23 patients ayant une polypose hyperplasique/mixte, 2 avaient des mutations *PTEN*. Des différences marquées des résultats histopathologiques ont été observées.

Conclusions Une classification moléculaire systématique chez 49 patients atteints de polypose hamartomateuse inexpliquée ou de polypose hyperplasique a mis en évidence un nouveau gène potentiel de susceptibilité, ENG, pour la polypose juvénile II est important de faire, compte tenu du pourcentage marqué de patients ayant des mutations des lignées germinales, des analyses plus approfondies des gènes de susceptibilité connus. Une nouvelle revue des résultats histologiques par un anatomopathologiste spécialisé en gastro-entérologie devrait être envisagée systématiquement, car la surveillance spécifique d'organe repose sur la définition du diagnostic syndromique.

JAMA 2005 ; 294 : 2465-2473. www.jama.com

Les syndromes polyposiques héréditaires, groupe hétérogène de maladies, ont été le centre d'études au cours de la dernière décennie et fournissent une vue critique de la pathogenèse moléculaire du cancer. En dépit d'études approfondies, ces syndromes importants sont encore confus et une identification objective correcte est nécessaire pour une prise en charge appropriée. Trois sous-types histopathologiques de lésions – hamartomes, adénomes et polypes hyperplasiques – contribuent à ces différentes formes, bien que le nombre et la distribution des polypes diffèrent parmi ces syndromes. Le paradigme classique est la polypose familiale adénomateuse (qui comprend > 100 à > 1 000 adénomes), dans lequel le cancer colorectal se développe par une séquence adénocarcinomateuse initiée par des mutations des lignées germinales du gène *APC*.[1]

Toutefois, il existe des preuves croissantes pour plusieurs catégories importantes de polypose et de carcinomes colorectaux qui peuvent se développer à partir d'autres voies. Ceci comprend les syndromes de polypose hamartomateuse et la voie des néoplasies dentelées, dont le spectre morphologique inclut le polype hyperplasique et l'adénome dentelé sessile. Compte tenu des risques de cancer et des problèmes de prise en charge thérapeutique de ces formes de polypose (**Tableau 1**), il est impératif que les médecins reconnaissent que cette variabilité de l'étiologie histopathologique et moléculaire peut masquer un diagnostic approprié.

Les formes connues de polypose hamartomateuse héréditaire incluent le syndrome de Peutz- Jeghers (PJS), le syndrome de la polypose juvénile (JPS), et le syndrome de Cowden. Bien que correspondand collectivement à moins de 1 % des

Les affiliations des auteurs sont indiquées à la fin de cet article.
Correspondance : Charis Eng, MD, PhD, Genomic Medicine Institute, Cleveland Clinic Foundation, 9500 Euclid Ave, Mailstop NE-30, Cleveland,OH 44195 (engc@ccf.org).

cancers colorectaux en Amérique du Nord, [1] une identification correcte de ces syndromes cliniquement confus reste de la première importance, car chacun comporte des risques significatifs de malignité extra-intestinale et d'autres traits associés qui doivent être pris en charge (**Tableau 1**). Le syndrome de Peutz-Jeghers (*Online Mendelian Inheritance in Man*2 [MIM] 175 200) entraîne une polypose gastro-intestinale, en particulier du jéjunum supérieur (78 %), et une pigmentation mucocutanée.[3] Environ 50 % de tous les cas de PJS sont dus à une mutation de la lignée germinale au niveau du gène nucléaire de la sérine thréonine kinase *STK11*.4 Des mutations de la lignée germinale des gènes de la voie de signalisation de la superfamille du TGF b (transforming growth factor b) (**Figure**) peuvent conduire à des extrêmes de troubles héréditaires frérquents, dont les JPS (MIM 174900), et des troubles vasculaires, comme les télangiectasies hémorragiques héréditaires (HHT) (MIM 187300) et des hypertensions pulmonaires primitives (MIM 178600).[5-7] Par exemple, on sait qu'un syndrome combiné comprenant à la fois une polypose juvénile et une HHT héréditaire de type 2 (MIM 175050) est dû à des mutations des lignées germinales du gène *SMAD4*.[8] Des mutations d'un autre membre de cette voie *BMPR1A*, correspondent à 20 % à 30 % des autres cas de JPS, bien qu'apparemment sans stigmate de HHT.[9] Alors que d'autres membres de la famille du TGF- b seraient des candidats idéaux pour le JPS, aucune mutation germinale des gènes *BMPR2, ACRV1, SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5,* et *SMAD7* n'a été identifiée à ce jour, [10] ce qui laisse environ 50 % des cas inexpliqués au niveau moléculaire. Un troisième syndrome hamartomateux, le syndrome de Cowden (MIM 158350), diffère à la fois du PJS et de la JPS en ce que la polypose n'est pas le trait défini. La plupart des cas sont plutôt reconnus comme des lésions mucocutanées distinctes, bénignes et malignes de la thyroïde et du sein et des macrocéphalies. Environ 85 % des patients ayant un syndrome de Cowden qui répond à des critères diagnostiques établis ont des mutations du gène *PTEN* (**Tableau 1**).

On pense généralement que les polypes hyperplasiques n'ont pas de potentiel malin. Vus fréquemment à la coloscopie (10 % des patients de moins de 50 ans, 50 % de ceux de moins de 70 ans), ils excèdent rarement 0,5 cm et sont souvent localisés dans le côlon distal et le rectum.[11,12] Toutefois, il existe des preuves croissantes associant l'adénome dentelé sessile (SSA), une lésion liée aux polypes hyperplasiques à des néoplasies.[13-16] Les SSA tendent à être multiples et larges (> 1 cm), ont une propensité plus importante à se localiser dans le côlon proximal, et peuvent comprendre 15 % à 20 % des polypes hyperplasiques traditionnelles.[17-20] L'événement initial de la progression de polype hyperplasique vers un SSA peut être une mutation somatique activant *BRAF* (hotspot V600E).[21-23] Il est important que ce processus puisse être cliniquement exploré dans le syndrome polyposique hyperplasique (HPS), en tant que réévaluation du sous-type histologique favorisant le développement du SSA.[24-26] Il est intéressant de constater qu'il a été récemment montré dans le modèle murin d'adénome dentelé que la mutation de *SMAD4* entraîne des adénomes dentelés et des polypes mixtes, ce qui suggère le potentiel pour mettre en cause la voie du TGF b dans cette autre route vers le cancer colorectal.[27]

Bien q'une analyse de l'ADN rende souvent possible de différencier des syndromes polypeux à niveau génétique, un pourcentage significatif de patients reste sans diagnostic moléculaire ou un tableau clinique typique (**Tableau 1**). Nous avons donc cherché à classer de façon moléculaire 49 patients ayant des polypes hamartomateux ou des polypes hyperplasique/mixtes dans le contexte d'une nouvelle revue de tous les résultats histopathologiques. Dix-sept patients (34 %) répondaient aux critères cliniques de diagnostic de syndrome polypeux hamartomateux connu et avaient des séquences négatives pour leurs gènes respectifs avant leur inclusion dans l'étude. Pour la cohorte totale, un séquençage approfondi des lignées germinales et une analyse de délétion de *PTEN, BMPR1A*, et *STK11*, ainsi qu'une analyse séquentielle de *SMAD4* et de *ENG*, ce dernier étant une cause connue de HHT de type 1, ont été effectués. Un dépistage spécifique d'exon a été réalisé pour *BRAF*, *MYH* et *BHD*. De plus, ceci est la première étude à évaluer le statut des mutations germinales de gènes connus de polypes dans une cohorte de patients ayant

Tableau 1. Incidence et risques de cancer pour les syndromes de polypes connus.

Syndrome	MIM No.*	Gène(s)	Patients répondant aux critères cliniques avec mutation, %	Incidence de la population	Risques de cancer
Polypose familiale adénomateuse	175000	*APC*	90	1/5000	Tumeurs colorectales, duodénales, papillaires thyroïdiennes, pancréatiques, hépatoblastomes, tumeurs SNC
Polypose adénomateuse MYH	608456	*MYH*	Unknown	1/5000	Tumeurs colorectales, autres ?
Syndrome polyposique hyperplasique		NA	NA	1/100 000	Tumeurs colorectales, autres ?
Syndrome héréditaire mixte polyposique	601228	*CRAC1*	NA	NA	Tumeurs colorectales, autres ?
Syndrome de télangiectasie hémorragique juvénile polyposique	175050	*SMAD4*	20-40	1/100 000	Tumeurs colorectales, gastriques, duodénales, pancréatiques
Syndrome polyposique juvénile	174900	*BMPR1A*	20-40	1/100 000	Tumeurs colorectales, gastriques, duodénales, pancréatiques
Syndrome de Cowden	158350	*PTEN*	80-85	1/200 000	Tumeurs sein, thyroïde, utérines mélanomes, tumeurs rénales
Syndrome de Peutz-Jeghers	175200	*STK11*	50	1/30 000-1/100 000	Tumeurs colorectales, intestins grêles,gastriques, sein, pancréatiques, tumeurs génitales
Syndrome de Birt-Hogg Dube	135150	*BHD*	50-70	1/200 000	Tumeurs rénales, autres ?

Abréviations : SNC, système nerveux central ; MIM, hérédité mendélienne chez l'homme; NA, non applicable.
*De *Online Mendelian Inheritance in Man*.[2]

une polypose hyperplasiqe/mixte pour déterminer quelles sont, s'il y en a, les maladies héréditaires.

MÉTHODES

Patients

Il s'agissait d'une étude prospective, de patients référés au nombre de 49, sans parenté, recrutés entre le 2 mai 2002 jusqu'au 15 décembre 2004, et dans des consultations génétiques d'établissements extérieurs (n = 28) et dans un centre spécialisé anticancer (n = 21). Tous les patients ont donné leur consentement éclairé dans un protocole revu et approuvé par les comités respectifs d'éthique et de protection des personnes. Pour être inclus dans l'étude, les patients devaient avoir un minimum de 5 polypes gastro-intestinaux au cours de coloscopies consécutives, dont au moins un était soit un polype hamartomateux ou hyperplasique. Les patients étaient classés en trois groupes sur la base d'un diagnostic anatomopathologique à partir d'une revue pathologique clinique dans leurs hôpitaux respectifs ou après avoir été référés. Seuls les patients du groupe 1 (n = 17) avaient eu une analyse antérieure des gènes connus de polypose hamartomateuse.

Le groupe 1 (**Tableau 2**) comprenait 17 patients ayant un diagnostic clinique soit de JPS (n = 14) ou de PJS (n = 3) sur la base de critères cliniques établis.[28,29] Chaque individu devait aussi avoir une évaluation négative des mutations de *SMAD4*, *BMPR1A*, ou *STK11*. L'âge moyen au moment du diagnostic de JPS était de 9 ans; le nombre moyen de polypes juvéniles était de 17.

L'âge moyen au moment du diagnostic de PJS était de 33 ans; le nombre moyen de polypes PJS était de 7.

Le groupe 2 (**Tableau 3**) comprenait 9 patients ayant une polypose hamartomateuse non définie, due soit à des différences des rapports pathologiques ou à l'absence de traits cliniques caractéristiques pour établir un diagnostic. L'âge moyen au moment du diagnostic de premier polype était de 36 ans.

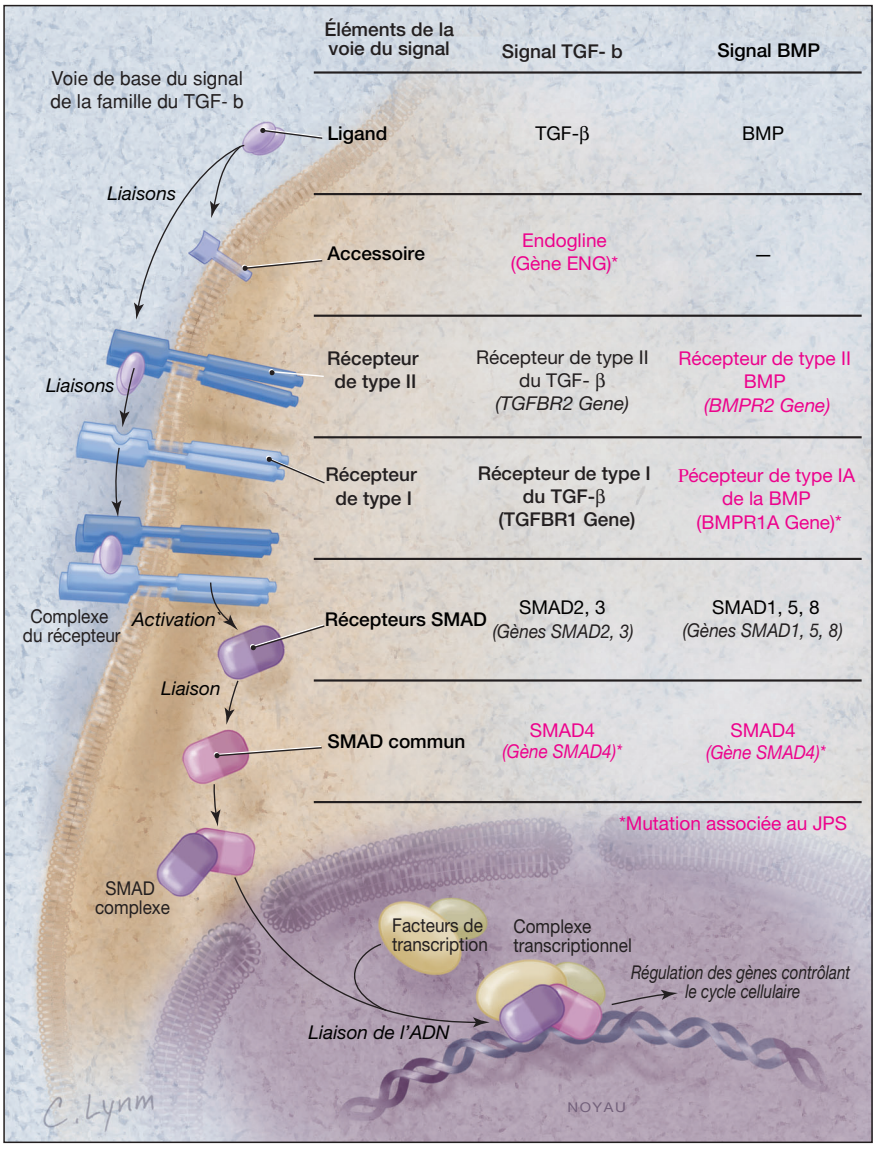
Le groupe 3 (**Tableau 4**) comprenait 23 patients ayant une combinaison de polypes hyperplasiques et d'adénomes. Onze patients répondaient aux critères de diagnostic de syndrome polypeux hyperplasique.[30] L'âge moyen au moment du diagnostic était de 47 ans. Cinq autres patients avaient un large polype unique hyperplasique (> 1 cm) parmi les autres polypes et un âge moyen au moment du diagnostic de 43 ans. Le reste avait des polypes multiples hyperplasiques et des adénomes avec un âge moyen au moment du diagnostic de 52 ans. Les rapports initiaux de pathology ont identifié un SSA chez seulement trois membres du groupe 3.

Les dossiers médicaux ont été demandés et des lames colorées à l'hématoxyline et éosine ont été recueillies. Les antécédents de cancers colo-rectaux ou autres ont été notés. La taille et la localisation des polypes ont été enregistrées à partir du formulaire accompagnant la coloscopie ou à partir de la description des rapports de pathologie. Les lames histopathologiques ont été revues de façon centrale par un pathologiste unique spécialisé en gastro-entérologie (J.W.) qui ignorait les découvertes moléculaires.

Analyses génétiques moléculaires

Une analyse de mutation a été effectuée en aveugle sur des échantillons codés. L'ADN

Figure. Mutations germinales associées au syndrome de polypose juvénile (JPS) dans les voies du TGB β (*Transforming Growth Factor* β) et de la protéine morphogénétique osseuse (BMP).



TGF-β est un des inhibiteurs naturels les plus puissants de la croissance cellulaire. La voie de signalisation du TGF-β est étroitement associée à la voie de la BMP, avec laquelle elle partage un élément commun, SMAD4. Les mutations germinales des gènes SMAD4 et BMPR1A ont été associés au JPS héréditaire. L'endogline est un élément accessoire du complexe du récepteur du TGF-β.

génomique a été extrait des leucocytes sanguins et l'ensemble de la séquence de codage, les limites exon-intron et les séquences bordantes de *PTEN, BMPR1A, SMAD4, STK11*, et *ENG* ont été analysées pour mutation à l'aide d'une PCR (polymerase chain reaction) – se basant sur une dénaturation du gradient du gel d'électrophorèse et un séquençage directe.[8,9,31-33] Des analyses de délétion *PTEN* et *BMPR1A* ont été effectuées.[34] Les réarrangements génomiques de *STK11* ont été explorés à l'aide d'une PCR quantitative multiplex à fluorescence courte.[35] Le dépistage ciblé de *BRAF* (exons 11 et 15), *MYH* (exons 7 et 13), et *BHD* (exons 7, 9, 11, 12 et 13), incluant les limites intron-exon, a été fait à l'aide d'un séquençage direct ou dénaturation par chromatographie liquide de haute performance.[36]

RÉSULTATS

Groupe 1

Dans le groupe 1, comprenant des sujets antérieurement négatifs pour des mutations, avec un diagnostic clinique de JPS ou PJS, 5 sur 17 (29 %) avaient des mutations germinales (**Tableau 2** et **Tableau 5**). Une revue centrale pathologique a confirmé le diagnostic de polypes juvéniles multiples chez les 14 patients avec JPS. Chez les 14 patients avec JPS négatifs pour les mutations dans les deux gènes connus, *SMAD4* et *BMPR1A*, 4 avaient des mutations germinales. En particulier, 2 patients avaient des mutations germinales pour *ENG*, codant l'endogline, précédemment associée seule-

Tableau 2. Groupe 1 : Caractéristiques démographiques des patients et classification histologique initiale et finale.

Patient	Age au premier polype, années	Nombre de polypes à l'examen histologique					Diagnostic de cancer (Age, années)	Antécédents familiaux de CRC	Revue centrale pathologique
		JP	PJ	HP	TA	MHAP			
Avec JPS									
A	2	13						–	JP
B*	1,5	> 50						–	JP
C	5	15						–	JP
D*	3	13						–	JP
E	4	17			1			–	JP
F	6	44						+	JP
G	5	5						+	JP
H*	31	33			2			+	JP
I	13	7						–	JP
J	13	30						+	JP
K	19	5					Phéochromocytome bilatéral (15, 18)	–	JP
L	7	5		3				+	JP
M	12	12						–	JP
N*	5	5						–	JP
Sans PJS									
O*	59		3	3	3	1	Ovaires (64)	–	JP, HP, et TA
P	11	11						+	JP
Q	28	5						–	Polypes des glandes fundiques

Abréviations : CRC, cancer colorectal ; HP, polypes hyperplasiques ; JP, polype juvéniles ; JPS, syndrome de polypose juvénile ; MHAP, polypes/adénomes hyperplasiques mixtes ; PJ, polypes de Peutz-Jeghers ; PJS, syndrome de Peutz-Jeghers ; TA, adénomes tubulaires.
* Découvert avec une mutation germinale (voir **Tableau 5**).

Tableau 3. Groupe 2 : Caractéristiques démographiques des patienets et classification histopathologique initiale et finale.

Patient	Age au premier polype, années	Nombre de polypes à l'examen histologique						Diagnostic de cancer (Age, années)	Antécédents familiaux de CRC	Revue centrale pathologique
		HA	JP	PJ	HP	TA	MHAJP			
A	40	1	1		3	3		Tératomes ovariens (15)	–	Polypes inflammatoires, HP, et TA
B	69	2	3						–	JP et HP
C*	33	> 5							–	JP
D	50	5				5			–	HP et TA
E	36	13							+	Polypes glandes fundiques
F*	17	> 70	3			3			+	JP et TA
G*	36	11	3			7	4	CRC (36)	+	JP et TA
H*	8	> 20				7	6		+	JP et TA
I	35	1				4		MFH (33), PTC (35)	–	HP et TA

Abréviations : CRC, cancer colorectal ; HA, polypes hamartomateux ; HP, polypes hyperplasiques ; JP, polypes juvéniles ; MHAJP, polypes juvéniles hyperplasiques/adénomateux juvéniles ; MFH, histiocytome malin fibreux ; PJ, polypes de Peutz-Jeghers ; PTC, cancer papillaire thyroïdien ; TA, adénomes tubulaires.
* Découvert avec une mutation germinale (voir **Tableau 5**).

ment à HHT (**Tableau 5**). Le patient 1N avait une mutation 1711C→T de l'exon 12, entraînant une modification sur l'acide aminé R571C. Un 2ème patient (1D) avait une mutation 1538 A→G (K513R) du l'exon 11 de l'*ENG*. La mutation K513R comprenait un résidu au sein du domaine de la zone pellucide qui est conservée de *Gallus gallus* à *Mus musculus*. Aucune mutation n'a été trouvée chez les 105 témoins nord-américains. Les deux patients présentaient une polypose juvénile de début inhabituellement précoce (âge 3 et 5 ans, respectivement), sans anomalie de pigmentation cutanée ou de traits compatibles avec un diagnostic de HHT (**Tableau 5**). Un troisième patient avec un JPS (1B) avait une délétion 1.2-Mb comprenant *BMPR1A* et *PTEN*. Ce patient présentait, à un âge précoce (18 mois), des polypes juvéniles multiples (**Tableau 5**). Ce tableau précoce de polypes distingue nettement ces trois patients (âge moyen, 3 ans ; extrêmes, 18 mois à 5 ans) des autres patients ayant un JPS dans le groupe 1 (âge moyen, 11 ans ; extrêmes, 2-31 ans).

Un 4ème patient avec un JPS (1H) avait une mutation 1524T→A (W508R) de l'exon 11 de *SMAD4*. Cette mutation n'a pas été trouvée chez les 100 sujets témoins normaux. Cette mutation n'avait pas été vue au cours des analyses précédentes par un laboratoire de recherche extérieur mais a été confirmée lors la ré-analyse.

Chez les 3 sujets présentant un diagnostic de PJS, le patient1O avait une délétion hémizygote impliquant la région promoteur de *PTEN* et l'exon 1. Il est intéressant à noter que les 3 patients n'avaient pas de pigmentation muco-cutanée caractéristique et avaient seulement été diagnostiqués sur les résultats histologiques du polype. En effet, la nouvelle revue centrale des résultats du polype n'a pas confirmé les observations initiales clinico-pathologiques chez aucun des patients avec PJS (**Tableau 2**).

Groupe 2

Parmi les 9 sujets ayant des polypes hamartomateux non définis, 4 (44 %) avaient des mutations germinales (**Tableaux 3 et 5**). Le patient 2C avait une délétion de la paire de base 29 (bp) de l'exon 1 de *STK11* et un polymorphisme IVS7-32 (A→T) de *SMAD4*. La revue centrale pathologique se basant sur les 5 lésions était compatible avec le diagnostic de polypes juvéniles. Aussi, de façon inattendue, une mutation germinale *STK11*, antérieurement associée seulement à PJS, a été trouvée chez un sujet ayant des polypes juvéniles.

Le patient 2F avait une mutation germinale IVS3 + 5G-C de *BMPR1A*. L'extraction de l'ARN et une PCR ont révélé que cette mutation avait conduit à une altération d'épissage, entraînant une insertion intronique 97-bp entre les séquences de codage des exons 3 et 4. La revue centrale pathologique a noté des polypes juvéniles, dont certains ayant des modifications

Tableau 4. Groupe 3 : Caractéristiques démographiques et classification histologique initiale et finale.

Patient	Age au premier polype, années	Nombre de polypes à l'examen histologique			Diagnostic de cancer (Age, années)	Antécédents familiaux de HPS	Antécédents familiaux de CRC	Revue centrale pathologique
		HP	TA	SSA				
A	41	31	3		Sigmoïde (41)	–	+	HP, TA, et SSA
B	57	74	8			–	–	HP, TA, et SSA
C	19	52	3		Caecum (19)	–	+	HP, TA, et SSA
D	68	30	5	4	Sigmoïde (68) Caecum (68) Côlon ascendant (69) Côlon transverse (70)	–	+	HP, TA, et SSA
E	62	3 (2 > 1,0 cm)		2		–	+	HP, TA, et SSA
F	50	9 (2 > 1,0 cm)	1	1		–	+	HP, TA, et SSA
G	45	> 30	2		Angle gauche (45)	–	+	HP et TA
H*	16	> 10	> 10			+	+	HP et TA
I	54	> 30	2			–	–	HP, TA, et SSA
J	62	> 20 (2 > 1,0 cm)	9			–	–	HP, TA, et SSA
K	40	22	–			+	+	HP, TA, et SSA
Avec un seul HP (>1 cm)								
L	23	10	2		Caecum (26)	–	+	HP, TA, et SSA
M	38	12	3			–	+	HP et TA
N	58	14	3		Caecum (60)	–	+	HP, TA, et SSA
O	43	12	1			–	+	HP et TA
P	53	13	34			–	–	HP, TA, et SSA
Avec de multiples HP								
Q	52	10	1			–	+	HP et TA
R	58	8	8		CLL (54)	–	–	HP, TA, et SSA
S	47	3	5			–	+	HP et TA
T	59	6	11		GIST (60)	–	+	HP et TA
U*	63	5	9		NSCL (63), sein (64)	–	–	HP et TA
V	37	2	3		Séminomes (35)	–	+	HP et TA
W	45	2	6			–	+	HP et TA

Abréviations : CLL, leucémie lymphocytaire chronique ; CRC, cancer colorectal ; GIST, tumeur stromale gastro-intestinale ; HP, polypes hyperplasiques ; HPS, syndrome polyposique hyperplasique ; NCSL, cancer du poumon non à petites cellules ; SSA, adénome dentelé sessile ; TA, adénomes tubulaires.
* Découvert avec une mutation germinale (voir **Tableau 5**).

adénomateuses, à chaque coloscopie.

Une deuxième mutation d'épissage du site, IVS1 + 1 (G – T) de *BMPR1A*, a été trouvée chez le patient 2G. Un quatrième patient dans ce groupe (2H) avait une insertion 4-bp (c.1409 + 10insCCCT) au niveau de l'exon 10 de *SMAD4*. Il est à noter que ces deux sujets (2G et 2H) avaient eu une recherche moléculaire antérieure négative pour une forme atténuée de polypose familiale adénomateuse avant l'inclusion dans l'étude. La revue centrale pathologique a noté un degré plus élevé de polypose juvénile ayant une prédisposition marquée à une transformation adénomateuse par rapport aux autres cas de l'étude.

Groupe 3

Parmi les 23 patients ayant une combinaison de polypes hyperplasiques et adénomateux, 2 (9 %) avaient une mutation germinale *PTEN* (**Tableaux 4** et **5**). La revue du phénotype clinique a révélé des traits réminiscents, mais pas diagnostiques, de syndrome de Cowden (**Tableau 5**).[37] Le patient 3H, ayant une mutation 612insC de l'exon 6 du gène *PTEN*, présentait des antécédents de polypose de 20 ans et des antécédents familiaux significatifs. Le patient 3U avait une mutation IVS3-3~7delCTTTT de *PTEN*, un antécédent de cancer pulmonaire non à petites cellules et de carcinome tubulaire du sein et 5 polypes hyperplasiques et 9 adénomes identifiés depuis l'âge de 63 ans. Aucun patient positif pour la mutation *PTEN* n'a eu de SSA à la revue centrale pathologique.

La revue centrale des rapports pathologiques a révélé la fréquence la plus élevée de différences dans le groupe 3. Les rapports pathologiques initiaux ont identifié seulement 3 patients sur 23 (13 %) ayant un SSA. La revue centrale pathologique a noté qu'au moins 13 patients sur 23 (57 %) avaient au moins un 1 SSA. Parmi les 11 patients ayant un HPS, 9 avaient au moins 1 SSA, la majorité (78 %) retrouvée dans le côlon proximal. Sept carcinomes coliques sont survenus chez 4 patients avec HPS (âge moyen au moment du diagnostic, 54 ans; extrêmes, 19-70 ans). Dans la cohorte restante des patients du groupe 3, 4 avaient au moins 1 SSA. Parmi ceux-ci, 2 (âgés de 26 et 60 ans, respectivement) ont eu un diagnostic de carcinome du caecum.

COMMENTAIRES

Notre évaluation systématique histopathologique et moléculaire de 49 patients sans liens familiaux présentant une polypose hamartomateuse inexpliquée ou des polypes mixtes a révélé que onze (22 %) avaient des mutations germinales. Parmi ceux-ci, nous avons caractérisé une forme génétique nouvellement définie de polypose juvénile chez deux patients ayant des mutations germinales *ENG* précédemment observées seulement chez des sujets ayant un HHT. Sept patients supplémentaires avaient des mutations germinales des gènes connus de polypose et deux autres avaient une mutation *PTEN*, bien que leurs antécédents cliniques n'aient pas été diagnostiques de syndrome de Cowden syndrome (**Tableau 5**). Les polypes colorectaux apparaissent avec une fréquence accrue chez les patients ayant un syndrome

Tableau 5. Mutation, résultats et traits cliniques.

Groupe/Patient	Mutation	Age au moment du diagnostic, années	Résultat pathologique final	Localisation du polype	Traits extra-coloniques
Groupe 1					
B	Délétion hémizygote de *BMPR1A* et *PTEN*	1,5	JP	Duodénum et côlon	Macrocéphalie (OFC, 53,5 cm); bosse frontale; dépression; racine du nez; Arche palatine creuse; Pouces et orteils élargis; ASD avec VSD en absence de veine porte; études cytogénétiques de 46, XX, t (2; 10) (q31; p15).
D	*ENG*, K513R (1538 A→G)	3	JP	Pancolonique	Aucun rapporté
H	*SMAD4*, W508R (1524T→A)	31	JP et TA	Pancolonique	Aucun rapporté
N	*ENG,* R571C (1711C→T)	5	JP	Distal descendant et caecum	Macrocéphalie (OFC, 54,5 cm); bosse frontale; fentes palpébrales tombantes; sillon sous-nasal allongé; arche palatine creuse
O	Délétion hémizygote du promoteur et exon 1 *PTEN*	59	JP, HP, et TA	Gastrique et pancolonique	Adénocarcinome mucineux ovarien (64 ans); thrombose veineuse profonde
Groupe 2					
C	*STK11,* 191-219 del 29 de l'exon 1; *SMAD4*, IVS7-32 (A→T)	33	JP	Pancolonique	Aucun rapporté
F	*BMPR1A*, IVS3 + 5 (G→C)	17	JP et TA	Pancolonique	Aucun rapporté
G	*BMPR1A*, IVS1 + 1 (G→T)	36	JP et TA	Pancolonique	Angle droit CRC (36 y)*
H	*SMAD4* c.1409_10insCCCT	8	JP et TA	Pancolonique	Aucun rapporté
Groupe 3					
H	PTEN, 612insC	16	HP et TA	Rectosigmoïde	Macrocéphalie (OFC 64,4 cm); lipome unique; kératose palmo-plantaire familiale héréditaire
U	PTEN, IVS3-3 ~ 7delCTTTT	63	HP et TA	Pancolonique	Macrocéphalie (OFC 58,0 cm); Cancer du poumon non à petites cellules (62 ans); Carcinome invasif ductal (63 ans)*

Abréviations: ASD, anomalie du septum auriculaire; CRC, cancer colorectal; HP, polypes hyperplasiques; JP, polypes juvéniles; OFC, circonférence occipito-frontale; PJ, polypes de Peutz-Jeghers; SSA, adénomes dentelés sessiles; TA, adénomes tubulaires; VSD, anomalie du septum ventriculaire.
* Les chiffres entre parenthèses indiquent l'âge au moment du diagnostic.

de Cowden, parfois dès l'âge de 5 ans, et sont typiquement observés distalement jusqu'au niveau de l'angle droit du côlon.[38,39] Habituellement, ce sont des polypes hamartomateux, bien que des adénomes et des polypes hyperplasiques et inflammatoires aient été rapportés.[38,39] Il reste à savoir quel rôle le gène *PTEN* joue dans le développement des polypes colorectaux. Globalement, nous avons reclassé 6 patients (1B, 1O, 2C, 2F, 2G, 2H), non seulement sur la base d'une analyse moléculaire plus approfondie, mais aussi par réévaluation des résultats histologiques des polypes.

Il est prévisible qu'un pourcentage de patients ayant une polypose partage des traits cliniques et moléculaires, compte tenu des échanges croisés et des interactions qui se produisent entre de nombreux gènes connus. Ainsi, la voie de signalisation du TGF-b est un mécanisme important de la pathogenèse de nombreuses maladies héréditaires, dont la polypose juvénile, la HHT et l'hypertension pulmonaire primitive (Figure). Les patients ayant des mutations de *ALK1* ont besoin d'une évaluation soigneuse et d'une prise en charge des complications, non seulement de la HHT mais aussi de l'hypertension pulmonaire primitive. De même, des mutations du gène *SMAD4* peuvent être à l'origine d'un syndrome combiné de polypose juvénile et de la HHT.[8] D'autres gènes candidats de la famille du TGF- b ont été étudiés chez des patients ayant une polypose juvénile, mais aucune mutationi n'a été identifié.[10] L'endogline, une protéine du gène *ENG* précédemment associée à seulement la HHT, agit comme corécepteur et protéine accessoire de cette voie de signalisation. Antérieurement, de faibles séries de patients (n = 7) ayant des traits à la fois de HHT et de JPS ont été étudiées pour des mutations de *ENG, ACVRL1* ou *SMAD4*; chacune a été trouvée comme ayant une mutation germinale *SMAD4*.[8] Ceci représente en conséquence le premier rapport d'une mutation germinale de *ENG* à l'origine d'une polypose juvénile. Il est intéressant de noter que deux patients ayant une mutation *ENG* dans nos séries présentaient une polypose juvénile à début inhabituellement précoce (**Tableau 5**). Aucun patient n'avait des stigmates de HHT, bien que les deux aient été jeunes. Ceci suggère soit qu'un sous-groupe de patients ayant un JPS et des mutations *ENG* aura une polypose sans HHT, comme ce peut être le cas avec les familles à mutation positive *BMPR1A*, ou que HHT peut avoir une pénétrance liée à l'âge. La pénétrance des symptômes de HHT à l'âge de 8 ans est d'environ 25 % (D.A.M., données non publiées). L'éclosion de la maladie clinique pourrait être aussi dépendante du site et du type de mutation au sein d'un gène particulier. Il est intéressant de noter que la vaste majorité des mutations spécifiques faux-sens de type 1 de la HHT survient entre les exons 1 et 9, par rapport aux nouvelles mutations *ENG* associées au JPS qui se produisent au niveau des exons 11 et 12.[40] Il est tentant de spéculer que les mutations faux sens dans cette région de la protéine puissent être des mutations « gain-de-fonction ». Ceci a déjà été observé dans l'achondroplasie[41] et au niveau du récepteur NEU/erbB2,[42] dans lequel les mutations des domaines transmembranaires sont activées en raison d'altération des propriétés de dimérisation des protéines.

Il existe actuellement un grand intérêt pour l'angiogenèse et son rôle potentiel dans le développement des tumeurs solides comme celles du carcinome colorectal. On sait que l'angiogenèse promeut le développement de petits polypes adénomateux, avec des preuves récentes montrant des modifications de la microvasculature à des stades même plus précoces de carcinogenèse du côlon.[43-45] L'endogline est une glycoprotéine homodimérique transmembranaire exprimée dans les cellules endothéliales vasculaires, mais aussi présente dans plusieurs tissus non endothéliaux.[6,46] Des élévations des taux d'expression d'endogline ont été détectées dans l'endothélium humain microvasculaire et sur les cellules vasculaires endothéliales dans les tissus et les tumeurs subissant une angiogenèse active.[46-48] En fait, l'endogline sert de marqueur pronostique utile, lorsque la densité des microvaisseaux augmente au cours des stades de la carcinogenèse colorectale.[6,46,49,50] Les mutations « gain-de-fonction » peuvent servir à mieux surréguler l'expression de l'endogline dans le tissu vasculaire, qui, avec des gènes modificateurs et l'environnement, contribue au développement des polypes et à la carcinogenèse. Récemment, Lebrin et al[51] ont impliqué l'endogline comme modulateur de l'équilibre entre les voies de signalisation TGF-b/ACVRL1 et TGF-B/ALK-5 dans les cellules endothéliales (**Figure**). Le déséquilibre entre les voies de signalisation peut donc être une clé pour comprendre le rôle biologique de l'endogline dans le contexte du JPS et de la HHT. Le syndrome de polypose hyperplasique n'est pas une simple entité, l'analyse histologique et l'analyse moléculaire ayant montré un tableau mixte. Cet état est caractérisé par des polypes multiples et larges hyperplasiques. De récentes études suggèrent que le SSA pourrait être un élément du HPS et, en tant que tel, être associé à une augmentation du risque de néoplasie.[13-16,24-26] On ne sait toujours pas si le SSA provient de polypes hyperplasiques traditionnels ou est un polype unique en lui-même, de même quel est le nombre de voies moléculaires peuvant être impliquées. Dans nos séries de patients ayant un HPS, la plupart des polypes étaient des polypes hyperplasiques, indistincts des polypes communs sporadiques hyperplasiques mis à part pour le nombre, et, dans certains cas, la taille importante et la localisation proximale. La découverte que la plupart (81 %) de nos patients ayant un HPS avaient au moins 1 SSA, tandis que 4 des 11 (36 %) avaient un diagnostic antérieur de cancer colorectal, est en faveur des résultats des travaux précédents.[19,24,26]

Nos observations globales dans cette série recueillie prospectivement illustrent l'importance de définir un diagnostic moléculaire pour influencer la surveillance et les stratégies d'intervention médicales pour le patient et permettre la détermination du statut de la maladie pour les membres des familles à risque. Ceci parce que chaque syndrome spécifique comporte des risques différents de néoplasie spécifiques d'organe. Beaucoup de nos patients, antérieurement diagnostiqués et pris en charge comme ayant une forme particulière de polypose, ont été reclassés sur la base d'analyses moléculaires approfondies et de revue des résultats histopathologiques. Les traits phénotypiques pouvant être partagés par un nombre de syndromes d'hamartomes, une analyse moléculaire d'une batterie de gènes connus de susceptibilité (*PTEN, BMPR1A, SMAD4*, et *STK11*) devrait être envisagée chez les patients qui ont des traits cliniques et histopathologiques suggestifs, mais qui sont négatifs pour des mutations dans les gènes les plus évidents. Enfin, compte tenu des différences significatives observées dans les rapports histologiques, un nouvel examen par un anatomopathologiste spécialisé en gastro-entérologie devrait être envisagé, car ceci peut permettre une sélection précise des gènes qui doivent être évalués.

Affiliations des auteurs : Clinical Cancer Genetics Program, Human Cancer Genetics Program, Comprehensive Cancer Center (Drs Zhou, Sawada, Patocs, et Eng et Mssrs Sweet et Pilarski), Division of Human Genetics, Department of Internal Medicine (Dr Eng et Mssrs Sweet et Pilarski), et Department of Pathology (Drs Prior et Heinz et Mr Bridgeman),

Ohio State University, Columbus ; Genomic Medicine Institute, Lerner Research Institute, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, Ohio (Drs Patocs et Eng) ; Department of Pathology, University Hospitals Health System (Dr Willis) et Department of Genetics, Case Western Reserve University School of Medicine (Dr Eng), Cleveland ; Department of Molecular Genetics and Microbiology, Duke University Medical Center, Durham, NC (Drs Gallione and Marchuk) ; Biomedicum Helsinki, Department of Medical Genetics and Molecular and Cancer Biology Research Program, University of Helsinki, Helsinki, Finland (Drs Alhopuro et Aaltonen et Mr Lehtonen) ; Cancer Genetics Laboratory, Van Andel Research Institute, Grand Rapids, Mich (Drs Khoo and Teh) ; Department of Genetics, Faculty of Medicine University Hospital of Rouen, Rouen, France (Drs Martin et Frebourg) ; Cancer Research UK Human Cancer Genetics Research Group, University of Cambridge, Cambridge, England (Dr Eng).

Contributions des auteurs : le Dr Eng a eu un accès complet à toutes les données de l'étude et accepte la responsabilité de l'intégrité des données et de l'exactitude de l'analyse des données.

Conception et schéma de l'étude : Sweet, Aaltonen, Eng.

Recueil des données : Sweet, Willis, Gallione, Sawada, Alhopuro, Khoo, Martin, Bridgeman, Heinz, Pilarski, Prior, Frebourg, Teh, Marchuk, Aaltonen, Eng.

Analyse et interprétation des données : Sweet, Zhou, Gallione, Alhopuro, Patocs, Martin, Bridgeman, Lehtonen, Prior, Frebourg, Marchuk, Aaltonen, Eng.

Rédaction du manuscrit : Sweet, Willis, Alhopuro, Aaltonen, Eng.

Revue critique du manuscrit : Sweet, Zhou, Gallione, Sawada, Alhopuro, Khoo, Patocs, Martin, Bridgeman, Heinz, Pilarski, Lehtonen, Prior, Frebourg, Teh, Marchuk, Aaltonen, Eng.

Analyse statistique : Sweet, Eng.

Obtention du financement : Aaltonen, Eng.

Aide administrative, technique ou matérielle : Willis, Zhou, Alhopuro, Patocs, Martin, Heinz, Pilarski, Lehtonen, Aaltonen, Eng.

Supervision de l'étude : Frebourg, Aaltonen, Eng.

Liens financiers : aucun rapporté.

Financement/soutien : cette étude a bénéficié du soutien financier partiel de l'American Cancer Society (bourse RSG02-151-01-CCE au Dr Eng). Le Dr Eng est le receveur du prix Doris Duke Distinguished Clinical Scientist Award. Le Dr Aaltonen a reçu des bourses de l'Academy of Finland (44870, Finnish Center of Excellence Program 2000 – 2005), Finnish Cancer Society, Sigrid Juselius Foundation et de la Commission européenne (GLG2-CT-2001-01861).

Rôle des sponsors : les agences de financement n'ont joué aucun rôle dans le schéma et la conduite de l'étude, le recueil, le contrôle et l'analyse et l'interprétation des données ou la préparation, la revue ou l'approbation du manuscrit.

Remerciements : nous remercions les conseillers généticiens, les médecins et les familles qui ont contribué si gracieusement à cette étude ; en particulier, Barbara Kunz, MS, CGC, et Joy Larsen Haidle, MS, CGC, Hubert Humphrey Institute, Minneapolis, Minn ; Katherine Hunt, MS, CGC, University of Texas, San Antonio ; John Quillin, MS, CGC, Virginia Commonwealth University, Richmond ; Shonee Lesh, MS, CGC, Kaiser Permanente, Sacramento, Calif ; Dawn Allain, MS, CGC, Waukesha Memorial Hospital, Waukesha, Wis et Aimée Fiorito, MS, CGC.

BIBLIOGRAPHIE

1. Nagy R, Sweet K, Eng C. Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene*. 2004; 23: 6445-6470.

2. National Center for Biotechnology Information. *Online Mendelian Inheritance in Man*. Available at: http://www/ncbi. nlm. nih. gov/entrez/query. fcgi? db-OMIM. Accessed October 6, 2005.

3. Jeghers H, Katz K. Generalized intestinal polyposis and melanin spots of the oral mucosa, lips and digits: a syndrome of diagnostic significance. N Engl J Med. 1949; 241: 993-1005. 4. Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, et al. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature*. 1998; 391: 184-187.

5. Newman JH, Wheeler L, Lane KB, Loyd E, Gaddipati R, Phillips JA III, Loyd JE. Mutation in the gene for bone morphogenetic protein receptor II as a cause of primary pulmonary hypertension in a large kindred. *N Engl J Med.* 2001; 345: 319-324.

6. Waite KA, Eng C. From developmental disorder to heritable cancer: it's all in the BMP/TGF- family. *Nat Rev Genet.* 2003; 4: 763-773.

7. Blobe G, Schiemann W, Lodish H. Role of transforming growth factor in human disease. *N Engl J Med.* 2000; 342: 1350-1358.

8. Gallione CJ, Repetto GM, Legius E, et al. A combined syndrome of juvenile polyposis and hereditary haemorrhagic telangiectasia associated with mutations in MADH4 (SMAD4). *Lancet*. 2004; 363: 852-859.

9. Zhou XP, Woodford-Richens K, Lehtonen R, et al. Germline mutations in BMPR1A/ALK3 cause a subset of cases of juvenile polyposis syndrome and of Cowden and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndromes. *Am J Hum Genet.* 2001; 69: 704-711.

10. Howe JR, Sayed MG, Ahmed AF. The prevalence of MADH4 and BMPR1A mutations in juvenile polyposis and absence of MBPR2, BMPR1B, and ACVR1 mutations. *J Med Genet.* 2004; 41: 484-491.

11. Imperiale TF, Wagner DR, Lin CY, Larkin GN, Rogge JD, Ransohoff DF. Results of screening colonoscopy among persons 40 to 49 years of age. *N Engl J Med*. 2002; 346: 1781-1785.

12. DiSario J, Foutch PG, Mai H, Pardy K, Manne R. Prevalence and malignant potential of colorectal polyps in asymptomatic, average-risk men. *Am J Gastroenterol*. 1991; 86: 941-945.

13. Hawkins NJ, Ward RL. Sporadic colorectal cancers with microsatellite instability and their possible origin in hyperplastic polyps and serrated adenomas. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93: 1307-1313.

14. Wynter CV, Walsh MD, Higuchi T, Leggett BA, Young J, Jass JR. Methylation patterns define two types of hyperplastic polyp associated with colorectal cancer. *Gut.* 2004; 53: 573-580.

15. Hawkins NJ, Bariol C, Ward R. The serrated neoplasia pathway. *Pathology*. 2002; 34: 548-555.

16. Jass J, Whitehall V, Young J, Leggett B. Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology.* 2002; 123: 862-876.

17. Jass J. Serrated adenoma of the colorectum: a lesion with teeth. *Am J Pathol*. 2003; 162: 705-708.

18. Bariol C, Hawkins N, Turner J, Meagher A, Williams DB, Ward R. Histopathological and clinical evaluation of serrated adenomas of the colon and rectum. *Mod Pathol.* 2003; 16: 417-423.

19. Snover DC, Jass JR, Fenoglio-Preiser C, Batts KP. Serrated polyps of the large intestine: a morphologic and molecular view of an evolving concept. *Am J Clin Pathol.* 2005; 124: 380-391.

20. Torlakovic E, Skovlund E, Snover DC, Torlakovic G, Nesland J. Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps. *Am J Surg Pathol*. 2003; 27:65-81.

21. Yang S, Farraye F, Mack C, Posnik O, O'Brien M. BRAF and KRAS mutations in hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colorectum: relationship to histology and CpG island methylation status. *Am J Surg Pathol*. 2004; 28: 1452-1459.

22. Kambara T, Simms LA, Whitehall VL, et al. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut*. 2004; 53: 1137-1144.

23. Chan T, Zhao W, Project CG, Leung S, Yuen S. BRAF and KRAS mutations in colorectal hyperplastic polyps and serrated adenomas. *Cancer Res*. 2003; 63: 4878-4881.

24. Leggett BA, Devereaux B, Biden K, Searle J, Young J, Jass J. Hyperplastic polyposis: association with colorectal cancer. *Am J Surg Pathol.* 2001; 25: 177-184.

25. Jass JR, Iino H, Ruszkiewicz A, et al. Neoplastic progression occurs through mutator pathways in hyperplastic polyposis of the colorectum. *Gut*. 2000; 47:43-49.

26. Rashid A, Houlihan P, Booker S, Petersen G, Giardiello FM, Hamilton S. Phenotypic and molecular characteristics of hyperplastic polyposis. *Gastroenterology*. 2000; 119: 323-332.

27. Hohenstein P, Molenaar L, Elsinga J, et al. Serrated adenomas and mixed polyposis caused by a splice acceptor deletion in the mouse Smad4 gene. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002; 36: 273-282.

28. Jass J, Williams CB, Bussey HJR, Morson B. Juvenile polyposis—a precancerous condition. *Histopathology*. 1988; 13: 619-630.

29. Aaltonen LA, Jarvinen H, Gruber SB. Peutz- Jeghers syndrome. In: Hamilton S, Aaltonen LA, eds. *Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System.* Lyon, France: IARC Press; 2000: 74-76.

30. Jass J, Burt R. Hyperplastic polyposis. In: Hamilton S, Aaltonen LA, eds. *Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*. Lyon, France: IARC Press; 2000: 136-138.

31. Marsh DJ, Coulon V, Lunetta KL, et al. Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in Cowden disease and Bannayan-Zonana syndrome, two hamartoma syndromes with germline PTEN mutation. *Hum Mol Genet.* 1998; 7: 507-515.

32. Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, et al. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92: 924-931.

33. Roth S, Sistonen P, Hemminki A, et al. SMADgenes in juvenile polyposis. *Genes Chromosomes Cancer.* 1999; 26: 54-61.

34. Zhou XP, Waite KA, Pilarski R, et al. Germline PTEN promoter mutations and deletions in Cowden/Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome result in aberrant PTEN protein and dysregulation of the phosphoinositol- 3-kinase/Akt pathway. *Am J Hum Genet.* 2003; 73: 404-411.

35. Le Meur N, Martin C, Saugier-Veber P, et al. Complete germline deletion of the STK11 gene in a family with Peutz-Jeghers syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2004; 5: 415-418.

36. Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, et al. Inherited variants ofMYHassociated with somatic G: C•T: A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet.* 2002; 30: 227-232.

37. Eng C. Will the real Cowden syndrome please stand up: revised diagnostic criteria. *J Med Genet.* 2000; 37: 828-830.

38. Lashner BA, Riddell RH, Winans CS. Ganglioneuromatosis of the colon and extensive glycogenic acanthosis in Cowden's disease. *Dig Dis Sci.* 1986; 31: 213-216.

39. Weber HC, Marsh D, Lubensky I, Lin A, Eng C. Germline PTEN/MMAC1/TEP1mutations and association with gastrointestinal manifestiations in Cowden disease. *Gastroenterology*. 1998; 114S: G2902.

40. Lux A, Gallione CJ, Marchuk DA. Expression analysis of endoglin missense and truncation mutations: insights into protein structure and disease mechanisms. *Hum Mol Genet.* 2000; 22: 745-755.

41. Naski MC, Wang Q, Xu J, Ornitz DM. Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Nat Genet.*

1996; 2: 233-237.
42. Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA. Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. *Cell.* 1986; 45: 649-657.
43. Wali RK, Roy HK, Kim YL, et al. Increased microvascular blood content is an early event in colon carcinogenesis. *Gut*. 2005; 54: 654-660.
44. Aotake T, Lu CD, Chiba Y, Muraoka R, Tanigawa N. Changes in angiogenesis and tumor cell apoptosis during colorectal carcinogenesis. *Clin Cancer Res*. 1999; 5: 135-142.
45. Shpitz B, Gochberg S, Neufeld D, et al. Angiogenic switch in earliest stages of human colonic tumorigenesis. *Anticancer Res*. 2003; 23: 5153-5157.
46. Fonsatti E, Maio M. Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. *J Transl Med*. 2004; 2: 18.
47. Wong SH, Hamel L, Chevalier S, Philip A. Endoglin expression on human microvascular endothelial cells association with betaglycan and formation of higher order complexes with TGF- signalling receptors. *Eur J Biochem.* 2000; 267: 5550-5560.
48. Miller DW, Graulich W, Karges B, et al. Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-- receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int J Cancer.* 1999; 81: 568-572.
49. Saad RS, Liu Y, Nathan G, Celebrezze J, Medich D, Silverman JF. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. *Mod Pathol*. 2003; 17: 197-203.
50. Akagi K, Ikeda Y, Sumiyoshi Y, et al. Estimation of angiogenesis with anti-CD105 immunostaining in the process of colorectal cancer development. *Surgery*. 2002; 131 (1 suppl): S109-S113.
51. Lebrin F, Goumans MJ, Jonker L, et al. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-/ALK1 signal transduction. *EMBO J.* 2004; 23: 4018-4028.