

# Le dépistage génétique du cancer médullaire de la thyroïde à Alger



A. CHIKOUCHE <sup>(1)</sup>, N. OULD BESSI <sup>(1)</sup>, N. HABAK <sup>(1)</sup>, M. BOUDISSA <sup>(2)</sup>,  
M. SEMROUNI <sup>(3)</sup>, D. MESKINE <sup>(4)</sup>, S. FEDALA <sup>(4)</sup>, M.M. MEZZOUAD <sup>(4)</sup>,  
M. REZOUG <sup>(5)</sup>, L. AHMED ALI <sup>(5)</sup>, S.A. BENSARFAR <sup>(6)</sup>, L. GRIENE <sup>(7)</sup>.

(1) Laboratoire de Biochimie, Centre Pierre et Marie Curie, Alger, Algérie.

(2) Service d'Endocrinologie, Centre Pierre et Marie Curie, Alger, Algérie.

(3) Service d'Endocrinologie, Hôpital Issad Hassani, Béni Messous, Alger, Algérie.

(4) Service d'Endocrinologie, EHS Nouredine El Atlassi, Bologhine, Alger, Algérie.

(5) Service d'Endocrinologie, CHU Mohamed Lamine Debaghine, Bab El Oued, Alger, Algérie.

(6) Service de Chirurgie Générale, CCB Mustapha Bacha, Alger, Algérie.

(7) Laboratoire d'Hormonologie, Centre Pierre et Marie Curie, Alger, Algérie.

## Résumé

Le cancer médullaire de la thyroïde ou CMT se présente sous forme sporadique (75% des cas) ; et sous forme familiale (25% des cas) ; dans cette dernière situation, fait partie des Néoplasies Endocriniennes Multiples de type 2 (NEM2). Les NEM2 se subdivisent en NEM2A, NEM2B et CMTF ou CMT familial isolé. Les NEM2 sont des affections héréditaires rares, transmises selon le mode autosomique dominant, liées à des mutations du gène RET. Nous rapportons les résultats de l'étude génotypique réalisée au CPMC à Alger chez 209 cas index qui présentent un cancer médullaire de la thyroïde ou une NEM2 et 105 apparentés aux cas positifs. 24,40% des cas index sont classés comme NEM2 dont 47 sont porteurs de mutations germinales du gène RET ; et 45,71% des enfants apparentés étaient porteurs de mutations. Les mutations ont été retrouvées au niveau des 07 différents exons du gène RET.

### >>> Mots-clés :

Néoplasie endocrinienne multiple de type 2, cancer médullaire de la thyroïde, CMTF, proto-oncogène RET, mutation.

## Introduction

Le cancer médullaire de la thyroïde ou CMT est une tumeur des cellules C avec sécrétion de calcitonine (CT). Le CMT, qui peut être précédé d'une hyperplasie des cellules C de la thyroïde <sup>[5]</sup>, a une diffusion métastatique très précoce qui peut se faire au stade de microcarcinome. Deux moyens permettent d'arriver au diagnostic de CMT avant l'intervention : la cytoponction à l'aiguille fine <sup>[13]</sup> mais surtout le dosage de la Thyrocalcitonine (CT) <sup>[12,16,18]</sup>.

## Abstract

Medullary thyroid cancer or MTC occurs sporadically (75% of cases) and familial form (25% of cases) which, in the latter situation, is part of Multiple Endocrine Neoplasia type 2 (MEN2). The MEN2 are subdivided into MEN2A, MEN2B and FMTC or isolated family MTC. MEN2 are rare inherited conditions, transmitted in the autosomal dominant mode, linked to mutations in the RET gene. We report the results of the genotypic study carried out at the CPMC in Algiers in 209 index cases with medullary thyroid cancer or NEM2 and 105 related to positive cases. 24.40% of index cases are classified as NEM2, 47 of which carry germline mutations in the RET gene and 45.71% of related children were carriers of mutations. Mutations in the 07 different exons of the RET gene have been found.

### >>> Key-words :

Multiple endocrine neoplasia type 2, medullary thyroid carcinoma, FMTC, proto-oncogene RET, mutation.

Il se présente sous forme sporadique dans 75% et sous une forme familiale dans 25% des cas. Ces formes familiales constituent les Néoplasies Endocriniennes Multiples de type 2 ou NEM2. Celles-ci sont des affections héréditaires rares, de transmission autosomique dominante <sup>[19]</sup>, de pénétrance quasi complète et se caractérisent par la présence constante du cancer médullaire de la thyroïde primaire (CMT)

associé ou non à l'atteinte des médullosurrénales et des parathyroïdes et comportent.

- Le FMTC ou cancer médullaire de la thyroïde isolé familial <sup>[4]</sup> où le CMT est la seule manifestation clinique sans autre tumeur endocrine associée, représente 35% des NEM2.
- La NEM2A ou syndrome de Sipple <sup>[20]</sup> est la forme la plus fréquente (60% des NEM2) comporte un cancer médullaire de la thyroïde souvent associé à un phéochromocytome et/ou à une hyperparathyroïdie.
- La NEM2B ou syndrome de Gorlin <sup>[6]</sup>, la forme la plus rare (5%) qui associe au CMT, un phéochromocytome, des anomalies du développement et des neurones muqueux.

Le gène de prédisposition aux différentes formes de NEM2 <sup>[8,9,10]</sup> est le proto-oncogène RET (rearranged during transfection), identifié par Takahashi en 1985 <sup>[21]</sup>, et localisé sur le chromosome 10 (10q11.2) par Ishizaka en 1989 <sup>[11]</sup>. Il est constitué de 21 exons <sup>[14,17]</sup> qui code pour un récepteur transmembranaire à activité tyrosine-kinase <sup>[22]</sup>. Ce récepteur membranaire est formé d'une région extracellulaire N terminale avec un domaine riche en cystéine (CRD), d'une région transmembranaire et d'une région intracellulaire C terminale qui renferment deux domaines à activité tyrosine kinase <sup>[2]</sup>.

L'activation du récepteur RET procède de la manière suivante : un ligand homodimérique de la famille GFL (*GDNF Family Ligand*), qu'il soit le GDNF (*Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor*), la Neurturine, l'Artémine ou la Persépine, se lie à un corecepteur spécifique GFR $\alpha$  (*GDNF family receptors- $\alpha$ 1 à 4*). La liaison ligand-corecepteur sous forme dimérique entraîne la dimérisation du récepteur RET et son activation <sup>[1]</sup>.

Des mutations germinales de ce gène ont pu être identifiées dans 95% des FMTC <sup>[8]</sup>.

Les mutations retrouvées dans le FMTC entraînent une activation permanente du récepteur.

Ce sont des mutations ponctuelles ou des duplications, qui siègent par ordre de fréquence au niveau des exons 10, 11, 13, 14, 15, 8 et 16 (les 7 exons les plus fréquemment mutés) et entraînent un changement de codon type faux sens qui affectent des régions codantes spécifiques de RET. Ces mutations entraînent la substitution d'un acide aminé par un autre.

Certaines mutations sont spécifiques du FMTC et d'autres sont communes à la NEM2A et au FMTC <sup>[7,8]</sup>.

L'identification de ces mutations par des techniques de biologie moléculaire permet de confirmer le diagnostic de NEM2.

## Objectifs de notre étude

1. Rechercher chez les **patients** atteints de cancer médullaire de la thyroïde, par des techniques de biologie moléculaire, une mutation dans des exons du gène RET permettant de confirmer le 2- diagnostic de NEM2.
2. Dépister chez les **apparentés** les porteurs de la mutation génétique familiale

## Matériels et méthodes

Nous avons reçu les prélèvements sanguins de 209 patients diagnostiqués CMT (cancer médullaire de la thyroïde) isolé ou suspects de NEM2.

Parmi nos patients : 174 ont été diagnostiqués comme CMT isolé, 32 comme NEM2A et 03 comme NEM2B par les cliniciens.

Les prélèvements de sang total effectués sur tube avec EDTA, ont été adressés par les 03 services d'endocrinologie de la région d'Alger, centre.

Une demande d'analyse génotypique nous a été transmise accompagnée d'une lettre de consentement et d'une fiche où sont portés le diagnostic, un résumé clinique et le compte rendu de l'exploration biologique ainsi que de l'imagerie.

L'ADN Génomique a été extrait à partir des leucocytes du sang périphérique par la technique aux sels.

L'étude génétique s'est faite par amplification par PCR suivie par une purification sur plaque millipore, puis une PCR de séquence suivie d'une purification par gel filtration et séquençage.

Un algorithme décisionnel a été décidé selon l'ordre de l'exon le plus fréquemment muté.

Si le cas index est un CMT ou NEM2A, on commence par l'analyse des exons 10, 11 et 13 et si la mutation n'est pas retrouvée, l'analyse des exons 14, 15, 8 et 16 sera effectuée. Si c'est un cas de NEM2B on commence par l'étude des exons 16, s'il n'y a rien, on étudie le 15.

L'amplification des différents exons du proto-oncogène RET a été effectuée en utilisant les amorces fournies par *Applied Bio Systems* selon le protocole de l'hôpital George Pompidou à Paris, France.

## Résultats et discussion

### A. Résultats du travail par PCR et séquençage des cas index CMT ou NEM2.

L'étude a porté sur 209 cas index de CMT isolé ou NEM2 (tableau 01).

- On a retrouvé parmi les 174 cas diagnostiqués comme CMT isolé, 16 porteurs de mutation du gène RET sous

forme hétérozygote, 01 porteur d'un variant C515S de l'exon 8 sous forme hétérozygote et 03 porteurs d'un polymorphisme 648 de l'exon 13 dont 01 sous forme homozygote et 02 sous forme hétérozygote.

- Parmi les diagnostiqués NEM2A (au nombre de 32), 28 étaient porteurs de mutation du gène RET sous forme hétérozygote, 04 n'étaient pas porteurs de mutations délétères du gène RET parmi eux 01 était porteur d'un variant C515S de l'exon 8 sous forme hétérozygote et 02 étaient porteur du variant C515S de l'exon 8 sous forme homozygote.

- Les diagnostiqués NEM2B au nombre de 03 étaient tous porteurs de la même mutation spécifique aux NEM2B, la M918T.

Tableau 01 : Répartition des patients selon le diagnostic à l'arrivée.

Pathologie	Nombre
CMT	174
NEM2A	32
NEM2B	3
Total	209

- Répartition des différentes formes de NEM2 par rapport à tous les CMT selon l'étude génotypique de tous les cas Index (tableau 02).

Tableau 02 : Présence ou non de mutation du gène RET

Pathologie	Présence de mutation	Nombre	Fréquence
CMTs	Non	158	75,59%
CMTF	Oui	16	7,65%
NEM2A	Oui	32	15,32%
NEM2B	Oui	3	1,43%
Total	-	209	

- Distribution des NEM2 par rapport à tous les CMT (tableau 03)

Tableau 03 : Distribution des CMT sporadique et NEM2.

Pathologie	Nombre	Fréquence	Fréquence littérature
CMT Sporadiques	158	75,59%	75%
NEM2	51	24,40%	25%
Total	209		

- Fréquences des différentes formes de NEM2 par rapport à tous les CMT (tableau 04).

Tableau 04 : Distribution des différentes formes de NEM2.

Pathologie	Nombre	Fréquence	Fréquence littérature
CMTF	16	31,37%	35%
NEM2A	32	62,74%	60%
NEM2B	3	5,88%	5%
Total des NEM2	51		

Selon nos données, nos patients (209) se répartissent en 158 CMT sporadiques (75,59%) et 51 CMT familiaux ou NEM2 (24,40%).

Les NEM2 se répartissent en 03 NEM2B (5,88%), 16 CMTF (31,37%) et 32 NEM2A (62,74%). Ces pourcentages sont équivalents à ceux de la littérature.

#### Nature des mutations retrouvées

- Une mutation, a été retrouvée chez 3 patientes NEM2B, cette mutation la M918T, est spécifique des NEM2B (tableau 05).

Tableau 05 : Nature des mutations et fréquence dans les NEM2B

NEM2	Mutation	Nombre	%
NEM2B	M918T	3	100

- Parmi les 32 patients NEM2A, 28 étaient porteurs de mutations connues et décrites dans la littérature : la C634R chez 15 cas, la C634Y chez 11 cas, la C620R chez 1 cas et la C634G chez 1 cas :

- 04 cas n'étaient pas porteurs de mutation germinale (tableau 06).

Tableau 06 : Nature des mutations et fréquence dans les NEM2A

Variation de séquence	Nombre	Pathologies associées
Muthtz C620R (TCG/CGC)	1	CMT et NEM2A
Muthtz C634G (TGC/GGC)	1	NEM2A
Muthtz C634R (TGC/CGC)	15	NEM2A
Mut htz C634Y (TGC/TAC)	11	CMT et NEM2A
Pas de mutations classiques	4	-

• Parmi les (174) patients diagnostiqués comme CMT, 16 étaient porteurs de mutations germinales, la C618Y, la C634F, la L790F, la V804M, la S891A chez 02 cas, la E768D chez 4 cas (formes GAG/GAT chez 03 cas et sous forme GAG/GAC chez 01 cas) et la C634Y chez 6 cas (tableau 07).

Tableau 07 : Nature des mutations et fréquence dans les CMTF

Variation de séquence	Nombre
Muthztz C618Y (tGC/TAC)	1
Muthztz C634F (TGC/TTC)	1
Muthztz C634Y (TGC/TAC)	6
Muthztz G768D (GAG/GAT)	3
Muthztz G768D (GAG/GAC)	1
Muthztz L790F (TTG/TTT)	1
Muthztz V804M (GTG/ATG)	1
Muthztz S891A (TCG/GCG)	2

Ces mutations germinales sont toutes retrouvées sous forme hétérozygote.

47 mutations génétiques du gène RET ont été retrouvées dans notre série.

12 mutations différentes. Ces mutations sont connues et décrites dans la littérature.

Parmi ces 12 mutations :

- 02 sont spécifiques des NEM2A, la C634R (TCG/CGC) et la C634G (TCG/GGC).
- 01 est spécifique des NEM2B, la M918T (ATG/ACG).
- 04 sont spécifiques aux CMTF, les 02 E768D (GAG/GAC et GAG/GAT), la V804M (GTG/ATG) et la S891A (TCG/GCG)
- 05 sont communes aux NEM2A et aux CMTF, la C618Y (TGC/TAC), la C620R (TCG/CGC), la C634F (TGC/TTC), la C634Y (TGC/TAC) et la L790F (TTG/TTT).

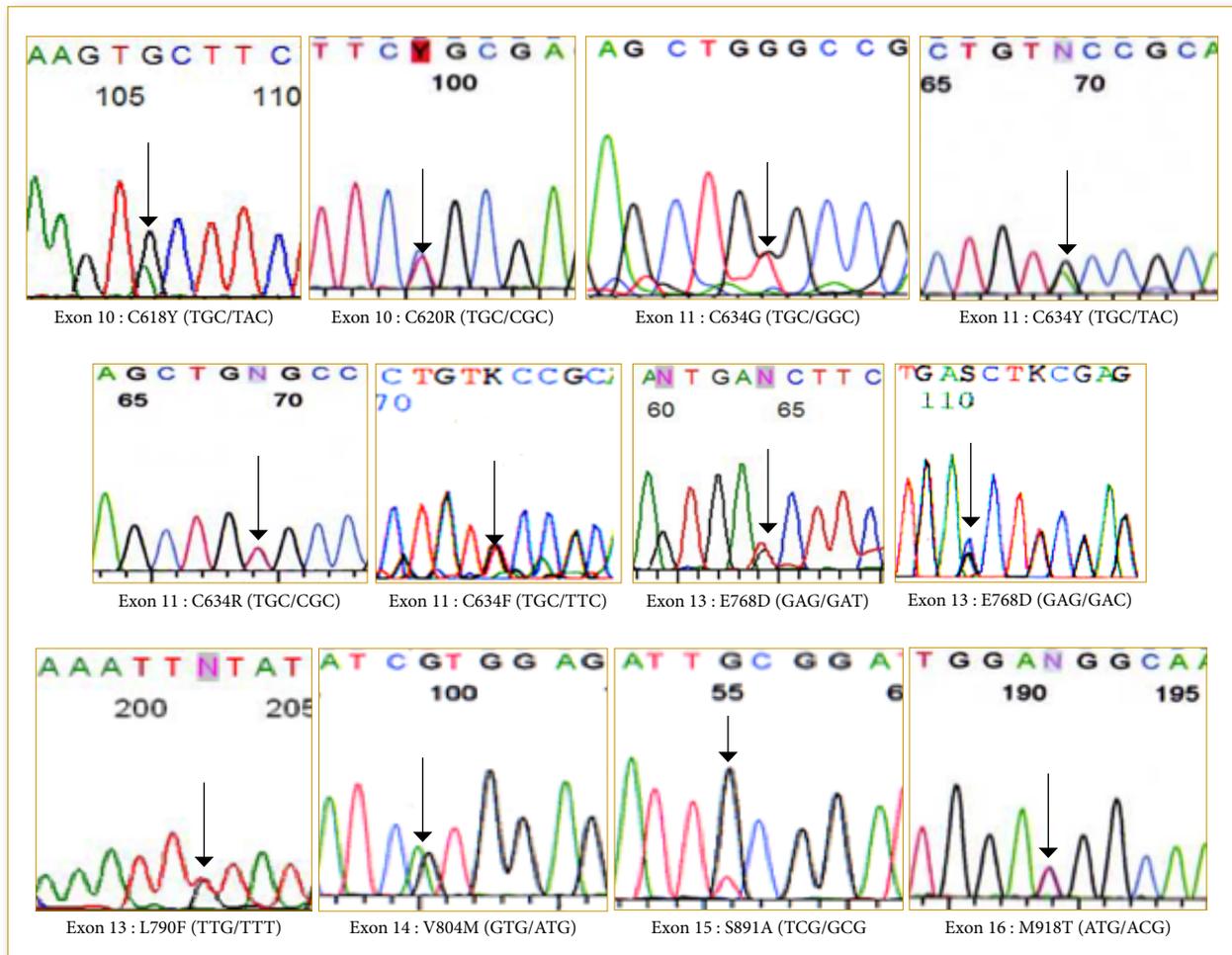


Figure 1 : Les chromatogrammes des différentes mutations recherchées.

## B. Résultats du travail par PCR et séquençage des apparentés de 1<sup>er</sup> degré des cas index NEM2 avec mutation connue.

La recherche de la mutation familiale du gène RET permet de rassurer les non-porteurs et préconiser une thyroïdectomie prophylactique à différents âges selon la nature de la mutation

Tableau 08 : Conduite à tenir stratifiée devant un CMT selon les mutations du proto-oncogène RET<sup>(15)</sup>.

Codons mutés	Exon	Syndrome(s)	Niveau d'agressivité	Action(s) recommandée(s)
883	15	NEM2B	D	Thyroïdectomie prophylactique dans les premiers mois de la vie.
918, 922	16			
634	11	NEM2A, CMTF	C	Thyroïdectomie prophylactique entre 2 et 5 ans
609, 611, 618, 620	10	NEM2A, CMTF	B	Thyroïdectomie prophylactique avant l'âge de 5 ans
768, 790, 791	13	NEM2A, CMTF	A	- Thyroïdectomie prophylactique entre 5 et 10 ans ; ou - Si absence de thyroïdectomie prophylactique, dosage annuel de la calcitonine stimulée par la Pg
804	14			
891	15			

Nous avons pu réaliser l'étude génétique chez les apparentés de certains cas index, en explorant le gène RET de manière ciblée (la mutation ayant été précédemment identifiée chez les cas index) :

Le dépistage génétique a concerné ainsi 105 apparentés • 96 apparentés appartenant à 21 familles de cas index porteurs de mutation, cette étude a concerné 26 adultes et 70 enfants de 5 mois à 17 ans apparemment sains.

Cette étude a pu permis de retrouver que 32 enfants

apparemment sains sur 70 sont porteurs de la mutation familiale (ce qui représente 45,71% de tous les enfants analysés), dont certains ont pu bénéficier d'une thyroïdectomie prophylactique à Alger.

- L'étude a porté aussi sur 09 apparentés sains de 03 familles, porteurs de variant C515S qui a objectivé 01 porteur du variant homozygote et 08 sujets porteurs du variant hétérozygote.

Les résultats de ce travail des apparentés sont résumés dans le tableau suivant (tableau 09).

Tableau 09 : Résultats de l'étude sur les apparentés des cas index.

Nombre de famille	Mutation	Apparentés analysés	Adultes		Enfants			
			AS (36)		ESNP (38)		ESP (32)	
			F	M	F	M	F	M
1	C634F	5	0	0	0	2	2	1
1	C634G	6	1	2	1	0	1	1
6	C634R	26	4	5	2	6	6	3
5	C634Y	29	4	4	5	5	4	7
1	E768D	7	0	0	2	3	1	1
1	E768D	2	2	0	0	0	0	0
1	L790F	5	0	1	3	0	0	1
1	V804M	1	0	0	0	0	1	0
1	S891A	5	0	0	1	1	1	2
3	M918T	10	1	2	3	4	0	0
<b>21</b>		<b>96</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>17</b>	<b>21</b>	<b>16</b>	<b>16</b>

AS : adultes sains ; ESP : enfants sains porteurs de mutation ; ESNP : enfants sains non porteurs de mutation ; F : Sexe féminin, M : sexe masculin.

## Conclusion

Dans cette étude pionnière réalisée à Alger :

- Sur les 209 cas index de CMT et de NEM2, 51 cas sont classés comme NEM2 dont 47 sont retrouvés porteurs de mutations germinales du gène RET (12 mutations différentes) et 04 cas de NEM2A où aucune mutation n'a été retrouvée.
- Les mutations les plus fréquemment retrouvées dans les NEM2A sont la C634R à 38,88% et la C634Y à 27,77%.
- Dans les cas de CMT Familial, les mutations prépondérantes sont la C634Y à 38,46%, et la G768D à 30,76%.
- La mutation M918T retrouvée dans les 03 cas de NEM2B, est la plus fréquemment citée dans la littérature.
- Un variant rare (C515S) a été retrouvé dans les cas NEM2A où aucune mutation classique n'était présente, sous forme homozygote dans 1 cas et sous forme hétérozygote dans 2 cas. De même que ce variant a été retrouvé sous forme hétérozygote chez 1 cas de CMT sporadique.
- Parmi les 105 apparentés apparemment sains, aucun adulte (26) n'est porteur de mutation alors que sur les 70 enfants, 32 (45,71%) présentent une mutation germinale. Parmi ces enfants porteurs de mutation du gène RET, certains ont pu bénéficier d'une thyroïdectomie prophylactique.
- Le variant rare C515S a été recherché chez 9 apparentés sains de porteurs de ce variant. Il a été retrouvé sous forme homozygote chez un adulte et sous forme hétérozygote chez les 8 autres.

La recherche de la mutation familiale chez les apparentés d'un cas index de NEM2 est indispensable pour la prise en charge précoce des cas porteurs de cette mutation, vu que la thyroïdectomie prophylactique représente la seule alternative curatrice.

Nous tenons à remercier le Dr Daoud C. pour l'aide apportée à l'écriture de cet article.

## Date de soumission

19 Mai 2020.

## Liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

## Références

1. Airaksinen Matti S. et Saarna Mart; 2002; The GDNF Family: Signaling, biological, functions and therapeutic value (Review); Nature Reviews | Neuroscience Vol | May 2002.
2. Arighi E, Borrello MG, Sariola H; 2005; RET tyrosine kinase signaling in development and cancer; Cytokine Growth Factor Rev 16:441-467.

3. Eng C, Smith DP, Mulligan LM, Healey CS, Zvelebil MJ, Stonehouse TJ, Ponder MA, Jackson CE, Waterfield MD, Ponder BA; 1995; A novel point mutation in the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma and in a family with FMTC; Oncogene 10:509-513.
4. Farnon JR, Leight GS, Dilley WG; 1986; Familial medullary thyroid carcinoma without associated endocrinopathies: a new clinical entity; Br J Surg; 73: 278-281
5. Franc B, Modigliani E; 1998; Le carcinome médullaire de la thyroïde: évolution des concepts; Arch Anat Cytol Pathol; 46: 100-111.
6. Gorlin RJ, Sedano HO, Vickers RA, Cervenja J; 1968; Multiple mucosal neuromas, pheochromocytoma and medullary carcinoma of the thyroid: a syndrome; Cancer; 22: 293-296
7. Groupe d'Etude des tumeurs endocrines G T E; 2006; Cancer Médullaire de la Thyroïde et Néoplasies Endocriniennes Multiples de type 2; Recommandations pour la Prise en Charge Diagnostique et Thérapeutique; Edition Janvier 2006.
8. Hansford JR, Mulligan LM; 2000; Multiple endocrine neoplasia type 2 and RET: from neoplasia to neurogenesis; J Med Genet 37:817-827.
9. Heyningen Van V; 1994; One gene-four syndromes; Nature; 367: 319-320
10. Hofstra RMW, Landsvater RM, Ceccherini I, Stulp RP, Stelwagen T, Yin L, Pasini B, Hoppener JWM, Ploos van Amstel HK, Romeo G, Lips CJM, Buys CHCM ; 1994; A mutation in the RET protooncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma ; Nature 367:375-376
11. Ishizaka Y, Itoh F, Tahira T, Ikeda I, Sugimura T, Tucker J, Fertitta A, Carrano AV, Nagao M; 1989; Human ret proto-oncogene mapped to chromosome 10q11.2; Oncogene 4:1519-1521.
12. Karges W, Dralle H, Raue F; 2004; Calcitonin measurement to detect medullary thyroid carcinoma in nodular goiter: German evidenced-based consensus recommendations; Exp Clin Endocrinol Diabetes, 112:52-58.
13. Kini SR, Miller JM, Hamburger JI, Smith MJ; 1984; Cytopathologic features of medullary carcinoma of the thyroid; Arch Pathol Lab Med; 108: 156-159
14. Kwok JB, Gardner E, Warner JP, Ponder BA, Mulligan LM; 1993; Structural analysis of the human RET proto-oncogene using exon trapping; Oncogene 8: 2575-2582.
15. Kloos Richard T; Medullary Thyroid Cancer: Management Guidelines of the American Thyroid Association, 2009.
16. Miraillé E, Iacobone M, Sebag F, Henry JF; 2004; Results of surgical treatment of sporadic medullary thyroid carcinoma following routine measurement of serum calcitonin; Eur J Surg Oncol 30:790-795.
17. Myers SM, Eng C, Ponder BA, Mulligan LM; 1995; Characterization of RET proto-oncogene 3' splicing variants and polyadenylation sites: a novel C-terminus for RET; Oncogene 11:2039-2045
18. Niccoli P, Wion-Barbot N, Caron P, Henry J F, De Micco C, Saint André J P; 1997; Interest of routine measurement of serum calcitonin (CT): study in a large series of thyroidectomized patients; J Clin Endocrinol Metab, 82:338-341.
19. Santoro M, Carlomagno F, Romano A, Bottaro DP, Dathan NA, Grieco M, Fusco A, Vecchio G, Matoskova B, Kraus MH, Di Fiore PP; 1995; Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B; Science 267:381-383.
20. Sipple JH; 1961; The association of pheochroma with Carcinoma of the thyroid gland; Am J Med, 31, 163-165,
21. Takahashi M, Ritz J, Cooper GM; 1985; Activation of a novel human transforming gene, RET, by DNA rearrangement; Cell 42:581-588
22. Takahashi M and Cooper GM; 1987; ret transforming gene encodes a fusion protein homologous to tyrosine kinases; Mol Cell Biol 7:1378-1385.