



Année 2022

Thèse N° 156/22

# LA NEOPLASIE ENDOCRIENIENNE MULTIPLE TYPE 2

(à propos de 27 cas)

THÈSE

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 14/04/2022

PAR

M. LAMAIBDEL ABDELHAQ

Né le 28 Juillet 1996 à Dar El Hamra Sefrou

POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MÉDECINE

MOTS-CLÉS :

Génotype - Phénotype - Corrélation - Gène RET

JURY

M. EL AZAMI EL IDRISSE MOHAMMED..... PRÉSIDENT

Professeur d'Immunologie

Mme. BOUGUENOUCHE LAILA..... RAPPORTEUR

Professeur agrégée de Génétique Médicale

M. OULDIM KARIM ..... } JUGES

Professeur de Génétique Médicale

Mme. BENNIS SANAAE.....

Professeur de Biologie Cellulaire

# SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS .....	7
LISTE DES FIGURES .....	9
LISTE DES TABLEAUX .....	12
INTRODUCTION .....	14
MATERIELS & METHODES .....	17
I. Patients et les données clinicopathologiques .....	18
1. Type de l'étude .....	18
2. Lieu de l'étude .....	18
3. La population de l'étude .....	18
3.1. Les critères d'inclusion .....	18
3.2. Les critères d'exclusion .....	18
4. Recueil des données .....	18
5. Paramètres étudiés .....	19
5.1. Profil épidémiologique .....	19
5.2. Caractéristiques clinicopathologiques .....	19
5.3. Profil génétique .....	19
6. Analyse statistique .....	19
6.1. Statistique descriptive .....	20
6.2. Statistique analytique .....	20
7. Considérations éthiques .....	20
II. L'étude moléculaire du gène RET .....	21
1. Prélèvement sanguin et conservation .....	21
2. Extraction d'ADN par Kit .....	22
2.1. Principe et milieu réactionnel .....	22
2.2. Protocole expérimental .....	23
3. Dosage de l'ADN extrait .....	24

---

4. Amplification de l'ADN extrait par PCR .....	25
5. Détection et analyse des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose .	30
5.1. Principe .....	30
5.2. Les réactifs nécessaires .....	30
5.3. Protocole expérimental .....	31
6. Séquençage des produits PCR .....	31
6.1. Purification par ExoSAP® .....	31
6.1.1. Principe et réactifs .....	31
6.1.2. Protocole expérimental.....	32
6.2. Réaction de séquence par BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	32
6.2.1. Réactifs .....	33
6.2.2. Protocole expérimental .....	33
6.3. Purification de la réaction de séquence avec BigDye XTerminator™ Purification Kit.....	34
6.3.1. Principe et réactifs .....	34
6.3.2. Protocole expérimental .....	34
6.4. Chargement de l'appareil .....	35
7. Outils bioinformatiques et analyse des séquences .....	36
7.1. Logiciel BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) .....	36
7.2. Logiciel NCBI (CCDS database) .....	36
7.3. Logiciel NCBI (CCDS variation viewer).....	36
<b>RESULTATS .....</b>	<b>37</b>
I. L'étude descriptive .....	38
1. Profil épidémiologique .....	38
1.1. Age du diagnostic (première manifestation) .....	38
1.2. Sexe .....	39

1.3. Origine géographique.....	39
2. Profil clinicopathologique .....	40
2.1. Antécédents personnels .....	40
2.2. Antécédents familiaux .....	40
2.3. Circonstance de découverte .....	41
2.4. Paraclinique .....	41
2.4.1. Taux de calcitonine basale .....	41
2.4.2. Taux de l'antigène Carcino embryonnaire (ACE) .....	42
2.4.3. Taux urinaire des dérivés methoxylés des catécholamines sur 24h (validé par créatinurie de 24h) .....	42
2.4.4. Bilan phosphocalcique .....	42
2.4.5. Echographie cervicale .....	43
2.4.6. L'étude radiologique du phéochromocytome .....	44
2.5. Résultats histopathologiques .....	45
2.5.1. Carcinome médullaire de la thyroïde (CMT) .....	45
2.5.2. Phéochromocytome .....	47
2.5.3. L'étude des glandes parathyroïdes .....	47
2.6. Résultats de l'étude moléculaire (profil genetique) .....	47
2.7. Métastases à distance .....	50
2.8. Le traitement chirurgical .....	51
2.8.1. La chirurgie du CMT .....	51
2.8.2. La chirurgie du phéochromocytome .....	51
II. ETUDE ANALYTIQUE.....	55
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>57</b>
I. LES ASPECTS PHENOTYPIQUES .....	58
1. Carcinome médullaire de la thyroïde et hyperplasie des cellules C (HCC).....	58

1.1. Manifestations cliniques .....	58
1.2. Manifestations biochimiques .....	61
1.3. Les manifestations histopathologiques .....	62
2. Phéochromocytome .....	66
2.1. Manifestations cliniques .....	66
2.2. Manifestations biochimiques .....	67
2.3. Imagerie .....	67
3. Hyperparathyroïdie .....	68
3.1. Manifestations cliniques .....	68
3.2. Manifestations biochimiques .....	69
3.3. Imagerie .....	69
4. Les phénotypes de la NEM type 2 : caractéristiques cliniques et relation entre le génotype et le phénotype .....	69
4.1. La néoplasie endocrinienne multiple type 2 A (NEM 2A) .....	69
4.2. NEM 2A et le lichen amyloïde cutané .....	71
4.3. NEM 2A et la maladie de Hirschsprung (MH) .....	72
4.4. Le carcinome médullaire de la thyroïde familial (CMTF) .....	73
4.5. La néoplasie endocrinienne multiple type 2B (NEM 2B) .....	74
II. LES ASPECTS GENETIQUES .....	76
1. La biologie moléculaire .....	76
1.1. Le gène RET .....	76
1.2. La protéine RET .....	77
1.3. L'analyse directe de l'ADN génomique à la recherche des mutations de l'oncogène RET .....	81
1.4. Les variants pathogènes, polymorphisme, variants de signification inconnue (VUS) .....	81

2. L'association génotype-phénotype et les implications cliniques .....	83
3. Le conseil génétique au cours de la consultation oncogénétique .....	91
III. LES MODALITES DE LA PRISE EN CHARGE .....	94
1. Evaluation après le diagnostic initial .....	94
2. Préventions des manifestations .....	94
2.1. Thyroïdectomie prophylactique chez les enfants atteints du CMT héréditaire .....	94
3. Traitement des manifestations .....	97
3.1. Carcinome médullaire de la thyroïde (CMT) .....	97
3.2. Phéochromocytome dans la NEM 2A et NEM 2B .....	98
3.3. Hyperparathyroïdie dans la NEM 2A .....	99
4. Problèmes éthiques rencontrés dans la prise en charge des patients atteints de NEM 2 .....	101
4.1. Le test génétique chez les adultes .....	101
4.2. Divulgence d'informations sans consentement .....	102
LIMITATIONS.....	103
CONCLUSION .....	105
RÉSUMÉS .....	107
BIBLIOGRAPHIE.....	115
Annexes .....	113

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>18 F-FDOPA</b>	: (6-[18F]-L-fluoro-L-3, 4-dihydroxyphenylalanine)
<b>ACE</b>	: Antigène Carcino-embryonnaire
<b>ADN</b>	: Acide Désoxyribonucléique
<b>AMM</b>	: L'autorisation de mise sur le marché
<b>ATA</b>	: American Thyroid Association
<b>ATA-H</b>	: High Risk
<b>ATA-HST</b>	: Highest Risk
<b>ATA-MOD</b>	: Moderate risk
<b>BDT</b>	: Big Dye Terminator
<b>BLAST</b>	: Basic Local Alignment Search Tool
<b>CCDS</b>	: Consensus Coding Sequence Project
<b>CMT</b>	: Carcinome médullaire de la Thyroïde
<b>CMTF</b>	: Carcinome Médullaire de la Thyroïde Familial
<b>Ctn</b>	: Calcitonine
<b>ddNTP</b>	: didésoxyribonucléique
<b>dNTP</b>	: didésoxyribonucléique
<b>EMA</b>	: European Medicines Agency
<b>FDA</b>	: Food and Drug Administration
<b>GDNF</b>	: Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor
<b>GFL</b>	: GDNF Family Ligands
<b>GFR-<math>\alpha</math> 1-4</b>	: GDNF Family Receptors- $\alpha$ 1-4
<b>HCC</b>	: Hyperplasie des cellules C
<b>HPP</b>	: Hyperparathyroïdie
<b>IHC</b>	: Immunohistochimie



---

<b>IRM</b>	: Imagerie par Résonance Magnétique
<b>LAC</b>	: Lichen amyloïde cutané
<b>MH</b>	: Maladie de Hirschprung
<b>MIBG</b>	: Métaiodobenzylguanidine
<b>NCBI</b>	: National Center for Biotechnology Information
<b>NEM 2</b>	: Néoplasie endocrinienne multiple type 2
<b>NEM 2A/2B</b>	: Néoplasie endocrinienne multiple type 2A/2B
<b>NGS</b>	: Next Generation Sequencing
<b>OMIM</b>	: Online Mendelian Inheritance in Man
<b>PCR</b>	: Polymerase Chain Reaction
<b>PHEO</b>	: Phéochromocytome
<b>PTH</b>	: Parathormone
<b>RET</b>	: Rearranged During Transfection
<b>RE</b>	: Réticulum endoplasmique
<b>SPECT</b>	: Single photon emission computed tomography
<b>TDM-TAP</b>	: Tomodensitométrie Thoraco-abdomino-pelvienne
<b>TEP</b>	: Tomographie par Emission de Positron
<b>VUS</b>	: Variants of Unkonwn Significance

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Spectrophotométrie «NANODROP» (Unité de génétique médicale et oncogénétique/ CHU Hassan II-Fès). .....	25
<b>Figure 3</b> : Thermocycleurs Applied Biosystems™ Veriti™ (Unité de génétique médicale et d'oncogénétique du CHU HASSAN II de Fès).....	30
<b>Figure 4</b> :Mécanisme de la fluorescence par la technique du transfert d'énergie par résonance.....	33
<b>Figure 5</b> :Applied Biosystems™ 3500 Dx Series Genetic Analyzer de l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique du CHU HASSAN II de Fès. ....	35
<b>Figure 6</b> : Représentation en histogramme de l'âge du diagnostic dans notre série. ....	38
<b>Figure 7</b> :Répartition des patients en fonction du sexe.....	39
<b>Figure 8</b> : Répartition des patients en fonction de leurs origines géographiques .....	40
<b>Figure 9</b> : Représentation en diagramme de dispersion des valeurs de calcitonine chez 21 cas de notre série, Ct : calcitonine, la barre noire représente la moyenne.....	41
<b>Figure 10</b> : .....	43
<b>Figure 11</b> : Répartitions des patients en fonction des résultats de l'échographie cervicale .....	44
<b>Figure 12</b> : Représentation graphique en secteur de la distribution de pT de CMT selon la classification de American Joint Committee on Cancer 7th edition.....	46
<b>Figure 13</b> : Représentation graphique en secteur de la distribution de pN de CMT selon la classification de American Joint Committee on Cancer 7th edition.....	47
<b>Figure 15</b> :Exemple de l'électrophérogramme de l'exon 11 du gène RET représentant la mutation faux sens par substitution c.1901G>A à l'état hétérozygote chez les 03 patients. ....	48
<b>Figure 20</b> . Représentation en digramme à barres des résultats de l'étude moléculaire	

du gène RET .....	49
<b>Figure 21.</b> Distribution des patients atteints de CMT en fonction du statut métastatique de la maladie.....	50
<b>Figure 22 :</b> Distribution des patients atteints de CMT, en fonction du type et l'étendu du curage ganglionnaire ; .....	52
<b>Figure 23.</b> Hyperplasie des cellules (HCC), avec une cinquantaine des cellules C visualisées par immunohistochimie (Ac anti-calcitonine). .....	64
<b>Figure 24.</b> Carcinome médullaire de la thyroïde (CMT). Le stroma desmoplastique et la bordure infiltrée sont caractéristiques .....	65
<b>Figure 25 :</b> Névromes muqueux au niveau des lèvres et de la langue chez un enfant de 13 ans atteint de NEM 2B ( Nagaoka R, Sugitani I, Sanada M, et al. The Reality of Multiple Endocrine Neoplasia Type 2B Diagnosis: Awareness of Unique Physical Appearance Is Important. J Nippon Med Sch 2018; 85).....	75
<b>Figure 26.</b> Localisation et structure de l'oncogène RET (Nicooli-sire et al. 2007). ....	76
<b>Figure 27 :</b> Dessin schématique de la protéine RET avec les quatre domaines extracellulaires de type cadhérine, la boîte riche en cystéine adjacente à la membrane plasmique, le domaine juxtamembranaire intracellulaire et le domaine tyrosine kinase .....	80
<b>Figure 28 :</b> La corrélation génotype phénotype entre les mutations de l'oncogène RET et les trois syndromes de NEM 2. Alors que NEM 2A et NEM 2B sont strictement corrélés à la Cys634 et à la Met918, respectivement, le CMTF est associé à plusieurs mutations RET cystéines et non cystéines. NEM 2, néoplasie endocrinienne multiple de type 2 ; CMTF, carcinome médullaire de la thyroïde familial ; NM, non muté. (Cristina.R et al. A comprehensive overview of the role of the RET proto-oncogene in thyroid carcinoma, Nature Reviews 2016) .....	84
<b>Figure 29 :</b> Mode de transmission du syndrome NEM2 (Burke, et al. 2002).....	91

**Figure 30** :Prise en charge des patients présentant une mutation germinale RET détectée lors du dépistage génétique. ....96

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I.</b> Les séquences d'amorces utilisées pour l'amplification des exons 10 et 11 du gène RET. ....	26
<b>Tableau II.</b> Les séquences d'amorces utilisées pour l'amplification des exons 13,15, et 16 du gène RET. ....	26
<b>Tableau III.</b> Les réactifs utilisés dans la PCR de l'exon 10 du gène RET .....	27
<b>Tableau IV.</b> Les réactifs utilisés dans la PCR de l'exon 11 du gène RET .....	27
<b>Tableau V.</b> Les réactifs utilisés dans la PCR des exons 13, 15 et 16 du gène RET .....	28
<b>Tableau VI.</b> Programme de cycle de T° pour l'amplification des exons 10 et 11 du gène RET dans le thermocycleur .....	28
<b>Tableau VII.</b> Programme de cycle de T° pour l'amplification des exons 13, 15 et 16 du gène RET dans le thermocycleur .....	29
<b>Tableau VIII.</b> . Programme de thermocycleur pour la première purification de produit de PCR. ....	32
<b>Tableau IX.</b> Volumes des réactifs du mix de la réaction de séquence .....	33
<b>Tableau X.</b> Programme utilisé au niveau du thermocycleur pour la réaction de séquence. ....	34
<b>Tableau XI.</b> Répartition des tumeurs en fonction de leurs tailles (n=20) .....	46
<b>Tableau XII :</b> . Caractéristiques cliniques et génétiques des 27 patients de notre série : .....	53
<b>Tableau XIII.</b> Comparaison des caractéristiques cliniques des patients atteints du phéochromocytome non porteurs de mutation RET Vs porteurs de mutation RET ; RET+/- : présence de mutation pathogène du gène RET / absence de mutation ; M : sexe masculin ; F : sexe féminin.....	55
<b>Tableau XIV.</b> Comparaison des caractéristique clinicopathologiques et génétiques des	

patients RET+ et RET- de notre série ; CMT : carcinome médullaire de la thyroïde ; RET+/RET- : mutation pathogène du gène RET/absence ; (‡) : A noter que 02 patient du groupe RET- et 04 groupe RET+ avaient un statut ganglionnaire inconnue (Nx) ..56

**Tableau XV.** Relation entre les mutations RET communes et le risque de CMT agressif dans les cas de NEM type 2A et de NEM type2B, et à l'incidence de PHEO, HPT, LAC et MH dans le NEM type 2A. ....87

**Tableau XVI :** . Comparaison de nos résultats sur les caractères épidémiologiques et clinicopathologiques (phénotypiques) et génétiques, avec d'autres populations dans la littérature .....88

# INTRODUCTION

La néoplasie endocrinienne multiple de type 2 (NEM 2), est un syndrome cancéreux autosomique dominant qui implique un risque de 50 % pour la descendance d'un porteur d'hériter de la maladie. L'incidence est estimée à 1 :200 000 dans la population générale. La prédisposition au NEM 2 est causée par des mutations activatrices germinales du proto-oncogène *RET* situé sur le chromosome 10.

Elle se caractérise cliniquement par la présence du carcinome médullaire de la thyroïde, phéochromocytome bilatéral et hyperparathyroïdie primaire chez un seul patient.

Trois formes cliniques distinctes ont été décrites en fonction du phénotype : le classique NEM 2A, le NEM 2B, une association de CMT, phéochromocytome et de névrome muqueux, le CMT familial avec une faible incidence d'autres endocrinopathies.

Historiquement en 1968, Steiner et ses collègues ont décrit une famille présentant à la fois un CMT, un phéochromocytome, une hyperparathyroïdie et le syndrome de Cushing. Ils ont suggéré que l'entité soit appelée néoplasie endocrinienne multiple de type 2 (NEM 2) en opposition à la maladie héréditaire précédemment décrite, NEM 1. Le syndrome que Steiner et ses associés ont décrit est maintenant connu sous le nom de NEM 2A.(OMIM #171400), avec un incidence de 1/1,973,500. Au fur et à mesure que d'autres familles ont été étudiées, le spectre de la maladie du NEM 2A s'est élargi pour inclure deux variantes : les patients présentant le lichen amyloïde cutané associé (LAC) et les patients présentant une maladie de Hirschprung.

Le syndrome NEM 2B (OMIM #162300, incidence 1/38 750 000) décrit de manière variable par Williams et Pollock, Schimke et ses collègues, ainsi que Gorlin et ses collègues, représente 5% des CMT héréditaires. Farndon et ses associés ont décrit le CMT familial (OMIM#155240).



Chaque variant de NEM 2 résulte d'une mutation différente du gène *RET* avec une bonne corrélation génotype–phénotype. Les tests génétiques permettent de détecter près de 100 % des porteurs de mutation et sont considérés comme le gold standard pour tous les apparentés du premier degré chez qui un CMT vient d'être diagnostiqué.

Les recommandations sur le timing de la thyroïdectomie prophylactique et sur l'étendue de la chirurgie sont basées sur une classification en trois niveaux de risque en utilisant les corrélations génotype–phénotype. Ainsi la NEM 2 offre un modèle unique sur l'intérêt du diagnostic présymptomatique (par étude moléculaire) dans la prévention et la guérison du cancer héréditaire. C'est dans ce cadre que s'inscrit notre étude dont les objectifs sont :

- Connaître le profil épidémiologique, phénotypique et génotypique dans notre série.
- Etudier l'association génotype–phénotype dans notre contexte.
- Comparaison des caractéristiques clinicopathologiques et génotypiques de notre série avec d'autres populations dans la littérature.
- Proposer une stratégie de prise en charge des patients et leurs apparentés en se basant sur la classification du risque ATA.

# **MATERIELS & METHODES**

# **I. Patients et les données clinicopathologiques :**

## **1. Type de l'étude :**

Il s'agit d'une étude rétrospective – transversale, descriptive et analytique ; menée sur une durée 5 ans : étalée de Janvier 2015 à Janvier 2020.

## **2. Lieu de l'étude :**

L'étude inclut les cas de NEM 2 suivis au service d'endocrinologie du CHU Hassan II Fès principalement, d'autres cas sont adressés par le CHU Ibn Rochd Casablanca et le CHU Mohamed VI Oujda à l'unité de génétique médicale et oncogénétique CHU Hassan II pour étude génétique.

## **3. La population de l'étude :**

### **3.1. Les critères d'inclusion :**

Les cas ayant des manifestations cliniques, biochimiques et radiologiques compatibles avec NEM 2 ou les cas apparentés (enquête familial) adressés à l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique du CHU Hassan II-FES ; ayant acceptés à participer à notre étude.

### **3.2. Les critères d'exclusion :**

- Les dossiers inexploitable ;
- Les patients ayant refusés de participer à l'étude ;

## **4. Recueil des données :**

Le recueil des données épidémiologiques, cliniques et paracliniques a été réalisé au sein du service d'endocrinologie du CHU HASSAN II de Fès à partir du système « HOSIX » et des dossiers des patients archivés au sein de l'unité de génétique et d'oncogénétique du même CHU.

Une fiche d'exploitation (voir ANNEXE) a été établie pour chaque patient permettant le recueil des données nécessaires à l'analyse statistique afin de répondre aux objectifs de notre étude.

## **5. Paramètres étudiés :**

### **5.1. Profil épidémiologique :**

- Age au diagnostic
- Sexe
- Origine géographique

### **5.2. Caractéristiques clinicopathologiques :**

- Les antécédents personnels et familiaux
- Circonstance de découverte
- Manifestations cliniques
- Manifestations biochimiques
- Manifestations radiologiques
- Manifestations histopathologiques
- Traitement chirurgical

### **5.3. Profil génétique :**

- Résultats de l'étude moléculaire de l'oncogène RET :

## **6. Analyse statistique :**

La saisie des données a été faite sur le logiciel Excel Microsoft Office 2013.

### **6.1. Statistique descriptive :**

Les analyses statistiques descriptives des caractéristiques épidémiologiques, cliniques et moléculaires ; ont fait appel au :

- Calcul des effectifs et des pourcentages, pour les variables qualitatives n(%) ;
- Calcul des mesures de tendances centrales (moyennes) et des mesures de dispersion (écart-type) pour les variables quantitatives.

### **6.2. Statistique analytique :**

L'étude du lien entre les caractéristiques épidémiologiques – cliniques et le groupe génétique (RET+/RET-) retrouvé à l'étude moléculaire a été réalisée à l'aide de deux tests :

- Le test de  $\chi^2$  ou FISHER pour la comparaison des variables qualitatives ;
- Le test T de STUDENT pour la comparaison des variables quantitatives

Pour l'élaboration des diagrammes nous avons utilisés GraphPad Prism version 8.0.1 (244).

## **7. Considérations éthiques :**

Après avoir expliqué à nos patients l'intérêt de l'étude génétique dans leur prise en charge et les objectifs de notre travail ; le consentement libre et éclairé des patients et des parents ou tuteurs légaux pour les mineurs a été obtenu afin de les inclure dans notre étude. La confidentialité des données a été respectée au cours des différentes étapes de cette étude.

## **II. L'étude moléculaire du gène *RET*:**

Le diagnostic de certitude pour NEM 2 repose sur l'analyse moléculaire du gène *RET* avec la mise en évidence d'une mutation germinale. L'analyse s'effectue sur un prélèvement d'ADN lymphocytaire d'une simple prise de sang par recherche directe des mutations.

Nous avons exploré les hotspots notamment les exons 10 et 11 du gène *RET* chez tous les cas, puis les exons 13, 15 et 16 en cas d'absence de mutations pathogènes.

Dès l'identification de la mutation germinale de *RET* chez le cas index, le diagnostic de NEM 2 est formel et doit conduire au dépistage génétique familial par la recherche directe de la mutation familiale sur l'ADN génomique des membres de la famille susceptibles d'être atteints après obtention de leur consentement éclairé.

Une extraction d'ADN à partir du sang total des différents patients d'abord réalisée, suivie d'une quantification par dosage spectrophotométrique. Une réaction PCR des échantillons d'ADN est réalisée par la suite pour amplifier les régions cibles. Le contrôle d'ADN amplifié se fait par une électrophorèse sur gel d'agarose. Finalement, on procède au séquençage du fragment amplifié qui permet l'identification des mutations recherchées.

### **1. Prélèvement sanguin et conservation :**

La plupart des prélèvements pour un diagnostic génétique se font sur une simple prise du sang périphérique. Pour chaque patient de la série d'étude, et dans des conditions aseptiques, un prélèvement du sang veineux a été réalisé (3 à 5 ml) dans un tube EDTA (Ethylène Diamine Tétra-acétique acide) qui peut être conservés à +4°C ou -20°C pour utilisation ultérieure.

## 2. Extraction d'ADN par Kit:

### 2.1. Principe et milieu réactionnel :

L'extraction de l'ADN est une technique permettant d'isoler l'ADN de cellules ou de tissus en quantité suffisante pour permettre son analyse et son utilisation pour des recherches de biologie moléculaire.

Un certain nombre de méthodes ont été décrites pour l'isolement de l'ADN génomique à partir du sang total. Au niveau du laboratoire de Génétique médicale et d'oncogénétique CHU Hassan II, l'extraction a été faite par Kit Pure Link™ Genomic DNA Kits.

Ce kit permet une purification rapide d'environ 6 µg d'ADN total à partir de 200 µl de sang total, les échantillons peuvent être frais ou congelés.

Pour cela nous avons utilisé :

- Kit Pure Link™ Genomic DNA Kits :
  - Pure Link™ Genomic Lysis / Binding Buffer : 10 ml
  - Pure Link™ collection tubes (2ml) : 100
  - Pure Link™ spin columns with collection tubes : 50
  - Pure Link™ Genomic Elution Buffer
  - Pure Link™ Genomic Wash Buffer 1 (concentré) :10 ml
  - Pure Link™ Genomic Wash Buffer 2 (concentré) :7,5 ml
  - RNase A (20 mg/ml) : 1 ml
  - Protéinase K (20 mg/ml) : 1 ml
- Ethanol absolu

## 2.2. Protocol expérimental :

➤ Lyse des cellules avec la protéinase K et le tampon de lyse :

Prévoir un bain marie à 55°C ou une étuve à 55°C

- Dans un tube Eppendorf de 1,5 ml :
  - ⇒ Ajouter 200 µL de sang
  - ⇒ Ajouter 20 µL de Protéinase K
  - ⇒ Ajouter 20 µL de RNase A
- Vortexer environ 15 secondes ;
- Incuber 2 minutes à température ambiante ;
- Ajouter 200 µL de Pure Link™ Genomic Lysis / Binding Buffer
- Vortexer environ 15 secondes ;
- Incuber 10 minutes à 55°C ;
- Ajouter 200 µL d'éthanol absolu,
- Vortexer environ 5 secondes ;
- Adsorption de l'ADN sur la membrane :
  - Mettre le mélange dans la colonne Pure Link™ et centrifuger 1 minute à 8000 rpm ;
  - Mettre la colonne dans un tube collecteur de 2 ml (fourni dans le Kit) et jeter le tube contenant le filtrat ;
- Elimination des contaminants résiduels :
  - Ajouter 400 µL de tampon Wash Buffer 1 et centrifuger 1 minute à 8000 rpm;
  - Mettre la colonne dans un tube collecteur de 2ml (fourni dans le kit) et jeter le tube contenant le filtrat. ;
  - Ajouter 400 µL de tampon Wash Buffer 2 et centrifuger 3 min à 14000 rpm
  - Mettre la colonne dans un tube Eppendorf de 1,5 ml ;
  - Mettre 50 ou 100 µL de tampon Pure Link™ Genomic Elution Buffer et incubé



- 1 à 5 minutes à température ambiante ;
- Centrifuger 1 minute à 8000 rpm ;
- Faire une deuxième élution : remettre les 50 µl dans la colonne et centrifuger 1 min à 8000rpm ;
- Conserver l'ADN extrait à +4°C ou -20°C.

### **3. Dosage de l'ADN extrait :**

En biologie moléculaire, ce test est utilisé après l'extraction de l'ADN, pour le quantifier et déterminer sa pureté. On utilise la longueur d'onde 260 nm qui est la zone d'absorbance maximale des acides nucléiques dans l'ultraviolet. Une seconde mesure à 280 nm permet de contrôler la pureté de l'extraction, à savoir la présence de protéines résiduelles dans la solution d'ADN.

Au laboratoire, Thermo Scientific™ NanoDrop™ est l'appareil utilisé pour réaliser le dosage. Il suffit de déposer dans l'appareil 2µl d'ADN extrait pour déterminer sa concentration et obtenir la courbe qui renseigne sur sa pureté



**Figure 1.** Spectrophotométrie «NANODROP» (Unité de génétique médicale et oncogénétique/ CHU Hassan II-Fès).

#### **4. Amplification de l'ADN extrait par PCR**

Pour la recherche des mutations affectant le gène *RET*, une réaction de polymérisation en chaîne est réalisée pour les exons 10 et 11 en premier puis les exons 13, 15 et 16 en cas d'absence de mutations pathogènes au niveau des hotspots.

La réaction PCR est réalisée avec un mélange réactionnel dans un tube de PCR en présence de : l'ADN génomique + dNTPs + MgCl<sub>2</sub> + Amorce F + Amorce R + Taq Polymérase + Tampon réactionnel + quantité suffisante d'eau distillée. Un témoin négatif est associé à chaque réaction pour vérifier l'absence de contamination.

**Tableau I. Les séquences d'amorces utilisées pour l'amplification des exons 10 et 11 du gène RET.**

Amorce F (amorce sens)	Amorce R (amorce anti-sens)	Taille de l'amplicon
10F : CAG-GAG-GCT-GAG-TGG-GCT-ACG	10R : GGT-CCC-GGC-CGC-CAC-CCA-CT.	175 bp
E11F : CCT-CTG-GCG-GTG-CCA-AGC-CT	11R : ATC-TTC-CCT-GCC-CCG-CAG-GG	325 bp

**Tableau II. Les séquences d'amorces utilisées pour l'amplification des exons 13,15, et 16 du gène RET.**

Amorce F (amorce sens)	Amorce R ( amorce anti-sens)	Taille de l'amplicon
13F : TTG-CAA-CTG-CTC-TGT-GCT-GCA	13R : CAC-CCT-GCA-GCT-GGC-CTT-AC	156 bp
15F : CAT-GGC-CTG-ACG-ACT-CGT-T	15R : CTA-GGC-TTC-CCA-AGG-GCA-CT	240 bp
16F : TCT-CCT-TTA-CCC-CTC-CTT-CC	16R : CAA-GAG-AGC-AAC-ACC-CAC-AC.	162 bp

**Tableau III. Les réactifs utilisés dans la PCR de l'exon 10 du gène RET**

Réactifs		Concentrations	Volume pour 1 réaction (µl)
Eau stérile		-	17,8
Tampon PCR		10 X	2,5
MgCl <sub>2</sub>		50 mM	0,5
dNTP		10 µM	1
Amorces	Amorce sens	10 µM	1
	Amorce anti-sens	10 µM	1
Taq DNA Polymerase recombinant		5 µ/µl	0,2
ADN		100 ng/µl	1
Volume total		25 µl	

**Tableau IV. Les réactifs utilisés dans la PCR de l'exon 11 du gène RET**

Réactifs		concentrations	Volume pour 1 réaction (µl)
Eau stérile		-	10,8
Tampon PCR		10 X	2
MgCl <sub>2</sub>		50 mM	2
dNTP		10 µM	2
Amorces	Amorce sens	10 µM	1
	Amorce anti-sens	10 µM	1
Taq DNA Polymerase recombinant		5 µ/µl	0,2
ADN		100 ng/µl	1
Volume total		20 µl	

**Tableau V. Les réactifs utilisés dans la PCR des exons 13, 15 et 16 du gène RET**

Réactifs		Concentrations	Volume pour 1 réaction (µl)
Eau stérile		-	12
Amorces	Amorce sens	10 µM	1
	Amorce anti-sens	10 µM	1
DreamTaq Green PCR Master Mix		5 µ/µl	10
ADN		100 ng/µl	1
Volume total			25 µl

Après avoir homogénéisé ce mélange réactionnel, on place le tube PCR dans le thermocycleur « Applied Biosystems ». pour effectuer les 3 cycles d'amplification : Dénaturation , hybridation, et élongation.

**Tableau VI. Programme de cycle de T° pour l'amplification des exons 10 et 11 du gène RET dans le thermocycleur**

Etapas	Températures	Temps	Cycles
Dénaturation initiale	94°C	5 min	1
Dénaturation	94°C	30 s	35
Hybridation	68°C	30 s	
Elongation	72°C	30 s	
Elongation finale	72°C	10 min	1

**Tableau VII. Programme de cycle de T° pour l'amplification des exons 13, 15 et 16 du gène RET dans le thermocycleur**

Etapes	Températures	Temps	Cycles
Dénaturation initiale	94°C	3 min	1
Dénaturation	95°C	30 s	35
Hybridation	59°C ou 61°C selon l'amorce	30 s	
Elongation	72°C	1 min	
Elongation finale	72°C	9 min	1

Après les 35cycles, la réaction se termine par une phase d'élongation terminale. Le produit est récupéré afin d'être analysé par électrophorèse sur gel d'agarose



**Figure 2 .Thermocycleurs Applied Biosystems™ Veriti™ (Unité de génétique médicale et d'oncogénétique du CHU HASSAN II de Fès)**

## **5. Détection et analyse des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose :**

### **5.1. Principe :**

Les produits PCR sont contrôlés sur gel d'agarose 2 % en présence d'un marqueur de taille, qui permet de vérifier la taille et la spécificité du produit amplifié.

### **5.2. Les réactifs nécessaires :**

Pour la préparation du gel nous avons utilisé : le poudre d'agarose, tampon d'électrophorèse (TBE 1X et TAE 1X), BET pour le marquage et une solution de charge composée d'eau, de saccharose et une teinture (xylène cyanol).

### **5.3. Protocol expérimental :**

Une dilution du tampon d'électrophorèse concentré (50X) avec l'eau distillée est réalisée afin d'obtenir du tampon (1X). On mélange 1g de la poudre d'agarose avec le tampon (1X) dans une fiole de 250 ml, on ajoute 2µl de BET et on procède à l'ébullition du mélange dans le microonde à haute température pendant 1 minute on retirant soigneusement la fiole du microonde.

Le gel est coulé dans un moule, on y installe un peigne qui sera retiré après refroidissement du gel en laissant à sa place des puits où sera déposé l'ADN, le moule est ensuite installé dans une cuve remplie du tampon de migration (TBE 1X). Dans chaque puits à l'aide d'une micropipette un mélange de 5 µl de produit PCR et de 2 µl de solution de charge est déposé.

La migration est réalisée à 100 V et les bandes d'ADN fluorescentes sont visualisées sous UV dont l'épaisseur et la distance de migration sont fonction de leur masse en paires de bases.

## **6. Séquençage des produits PCR :**

### **6.1. Purification par ExoSAP® :**

#### **6.1.1. Principe et réactifs :**

Avant de séquencer les produits PCR, il est nécessaire de passer par des étapes de préparation du produit à séquencer afin d'obtenir un résultat optimal ; alors, il faudra les purifier pour éliminer l'excès d'amorces, des sels, des enzymes et des dNTPs non incorporés et ne garder que l'ADN à séquencer. Pour cela nous avons utilisé le Kit de purification ExoSAP®. Il utilise deux enzymes hydrolytiques en une seule étape, l'exonucléase I qui permet de supprimer les amorces résiduelles et les ADNs simple brin et la phosphatase alcaline de crevette (Shrimp Alkaline Phosphatase) qui déphosphoryle les dNTPs libres en excès. Les enzymes sont actives à 37°C et inactives



à 80°C.

### **6.1.2. Protocol expérimental :**

Dans un tube Eppendorf, 1.5 µl de l'enzyme ExoSAP est ajouté à 3 µl du produit PCR (la dilution dépend de la bande obtenue lors de la migration), Le tube est ensuite placé au niveau du thermocycleur selon le programme

**Tableau VIII. . Programme de thermocycleur pour la première purification de produit de PCR.**

Stade	Température	Temps	Cycles
1	37°C	30 min	1
2	80°C	15 min	1
3	10°C	∞	1

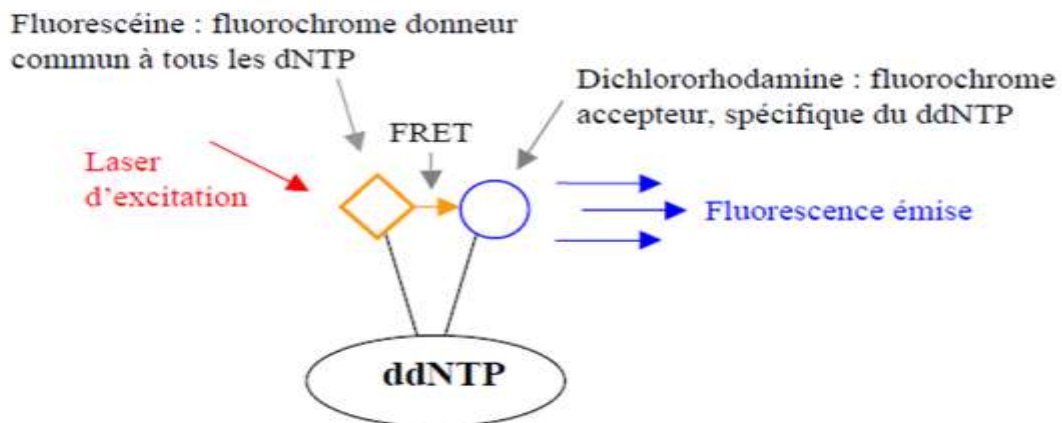
### **6.2. Réaction de séquence par BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit :**

#### ➤ Principe :

La réaction de séquence utilisée au laboratoire repose sur la méthode de SANGER. Elle repose sur l'incorporation aléatoire par l'ADN polymérase de didéoxynucléotides interrupteurs de chaîne (ddNTP) eux aussi présents dans le milieu réactionnel.

La technologie Big Dye Terminator (BDT) utilise un système de transfert d'énergie par résonance (FRET) entre deux fluorochromes fixés sur le même ddNTP et reliés entre eux par un linker. Le premier est une fluorescéine (6 carboxyfluorescéine) appelé fluorochrome donneur, commun aux quatre ddNTP. Le second est une dichlororhodamine (dRhodamine) qui joue le rôle de fluorochrome accepteur. Le fluorochrome accepteur ou dichloroRhodamine est différent pour chaque type de ddNTP. Le spectre de la fluorescence réémise sera ainsi spécifique de chaque type de ddNTP. Le transfert du signal de la fluorescéine vers la dRhodamine permet une

amplification du signal et, par conséquent, une augmentation de la sensibilité de la technique.



**Figure 3 . Mécanisme de la fluorescence par la technique du transfert d'énergie par résonance.**

### 6.2.1. Réactifs :

Le milieu réactionnel est composé des produit PCR purifié, amorces spécifiques, eau stérile et kit de la réaction de séquence BigDye® Terminator V1.1 cycle sequencing qui contient principalement : Taq polymérase FS\_ (ABI), ddNTP marqués, tampon et MgCL2

### 6.2.2. Protocole expérimental :

Deux tubes sont préparés pour chaque patient et les volumes des réactifs ajoutés pour chaque exon sont les mêmes, comme le montre le tableau suivant :

**Tableau IX. Volumes des réactifs du mix de la réaction de séquence**

Réactif	Volume (µl)
BigDye	1
Eau stérile	4
Amorce F	1
Produit PCR purifié	4

Ensuite, on centrifuge puis on place les tubes dans le Thermocycleur pour effectuer une amplification en 25 cycles répétés selon un programme spécifique correspondant aux conditions spécifiques à la réaction de séquence. Chaque cycle comprend 3 étapes.

**Tableau X. Programme utilisé au niveau du thermocycleur pour la réaction de séquence.**

Etape	T°	Durée	Nombre de cycle
Dénaturation	95°C	10 secs	X 25
Hybridation	50°C	5 secs	
Elongation	60°C	2 min	

Une fois l'étape de thermocyclage effectuée, les tubes sont récupérés, et les produits de la réaction de séquence feront l'objet d'une purification.

### **6.3. Purification de la réaction de séquence avec BigDye XTerminator™**

#### **Purification Kit :**

#### **6.3.1. Principe et réactifs :**

Le kit BigDye® Xterminator™ permet la purification des produits de réaction de séquence en capturant les dyes non incorporés dans la réaction, les sels et autres molécules chargées qui pourraient interférer lors de la détection des bases par le séquenceur. Ce kit contient un flacon "SAM Solution" (stockage à T° ambiante) et un flacon: « XTerminator Solution (stockage à 4°C, ne pas congeler).

#### **6.3.2. Protocol expérimental :**

En premier temps, 10 µl de produits de réaction de séquence sont déposés dans le puits de la plaque Applied. Un mix contenant 45 µl de solution SAM et 10 µl de XTerminator Solution par puits est préparé dans des cônes spécifiques.. Ensuite, Le mélange est vortexé et 55µl du mix préparé est ajouté dans chaque puits. La plaque est scellée correctement avec un film adhésif. Une agitation légère pendant 30 min est

réalisée sur l'agitateur Eppendorf Mix Mate, suivie d'une centrifugation à 13000 pendant 3 minutes. Le surnageant contenant les fragments à séquencer est enfin transféré dans les puits de la plaque du séquenceur. Le run est lancé sur le séquenceur.

#### **6.4. Chargement de l'appareil :**

Les séquences d'ADN sont déterminées par séquençage automatique (séquenceur à 8 capillaires Applied Biosystems™ 3500 Dx Series Genetic Analyzer). La plaque est placée dans le séquenceur qui est un automate d'électrophorèse capillaire qui lance un flux électrique d'ions à travers un capillaire, ce qui entraîne la migration des fragments d'ADN. Une fois arrivés au site de détection, les quatre fluorochromes des ddNTP terminaux seront excités. Suite à cette excitation, chaque fluorochrome émettra une lumière à une longueur d'onde différente qui sera détectée puis convertie en séquence par le logiciel d'analyse des séquences.



**Figure 4.** Applied Biosystems™ 3500 Dx Series Genetic Analyzer de l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique du CHU HASSAN II de Fès.

## **7. Outils bioinformatiques et analyse des séquences :**

### **7.1. Logiciel BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) :**

BLAST est un algorithme utilisé en bioinformatique permettant de trouver les régions similaires entre deux ou plusieurs séquences de nucléotides ou d'acides aminés. Dans notre étude, on a utilisé l'outil BLAST pour comparer les séquences obtenues après séquençage avec les séquences répertoriées dans la banque de données.

### **7.2. Logiciel NCBI (CCDS database)**

Ce logiciel permet de localiser la mutation au niveau de la partie codante du gène étudié et éventuellement de connaître l'acide aminé touché par la mutation sur la séquence protéique correspondante.

### **7.3. Logiciel NCBI (CCDS variation viewer)**

Dès qu'on arrive à localiser la mutation, ce logiciel nous permet d'évaluer l'impact clinique de celle-ci (pathogénique ou pas), son origine (germinale ou somatique), son positionnement sur le génome entier et si elle a déjà été rapportée par d'autres auteurs.

# RESULTATS

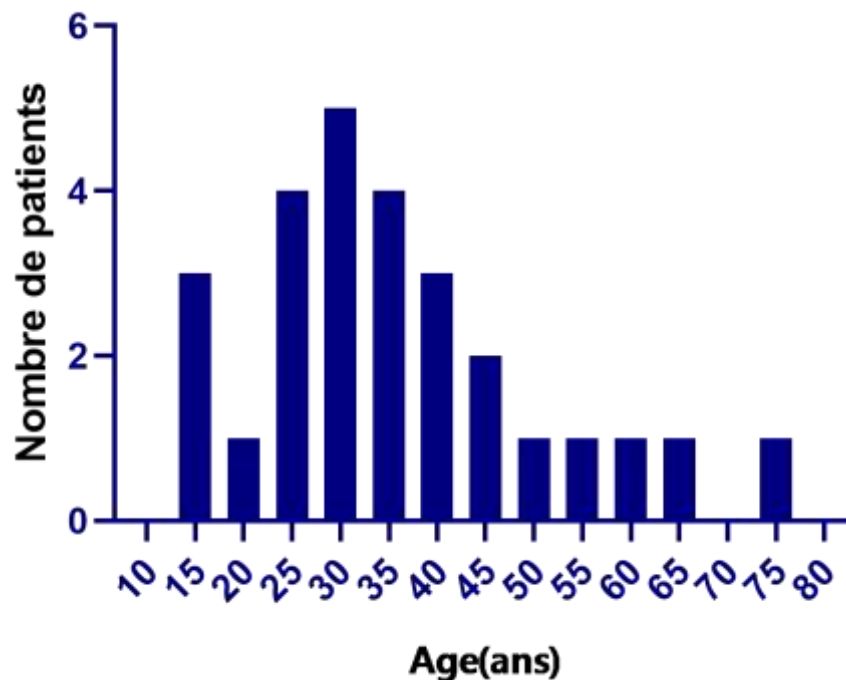
## I. L'étude descriptive :

Notre étude a été menée sur un échantillon de 27 cas, ayant des signes cliniques, biochimiques et radiologiques compatibles avec le diagnostic de NEM 2, appartenant à 22 familles non apparentées. 5 cas ont été adressés dans le cadre d'une enquête familiale.

### 1. Profil épidémiologique :

#### 1.1. Age du diagnostic (première manifestation) :

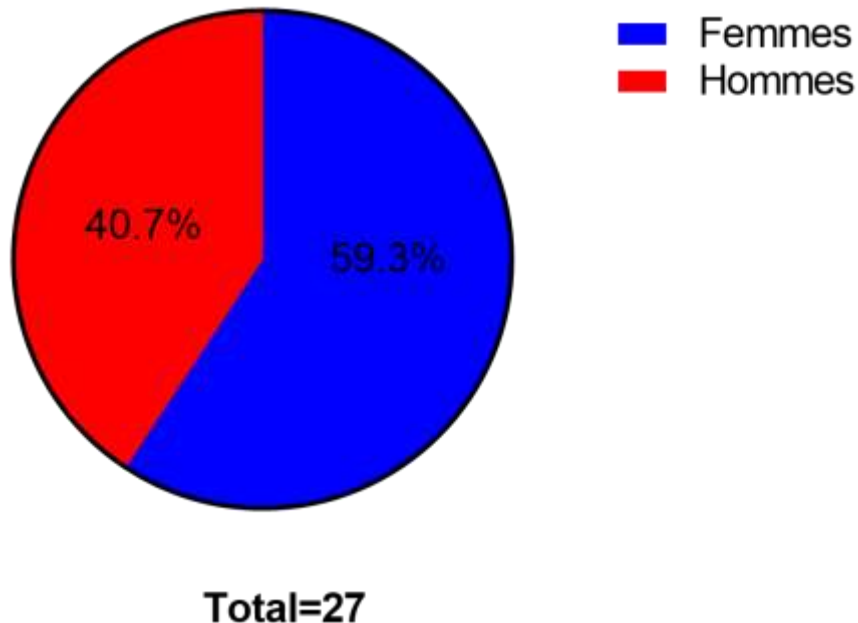
L'âge moyen de nos patients était de  $36.19 \pm 15.09$  ans avec des extrêmes d'âge allant 13 à 75 ans.



**Figure 5 .** Représentation en histogramme de l'âge du diagnostic dans notre série.

### 1.2. Sexe :

Dans notre étude : 11 patients (40.7%) étaient de sexe masculin et 16 (59.3%) de sexe féminin. Sexe-ratio (masculin/féminin)=0,68



**Figure 6 . Répartition des patients en fonction du sexe.**

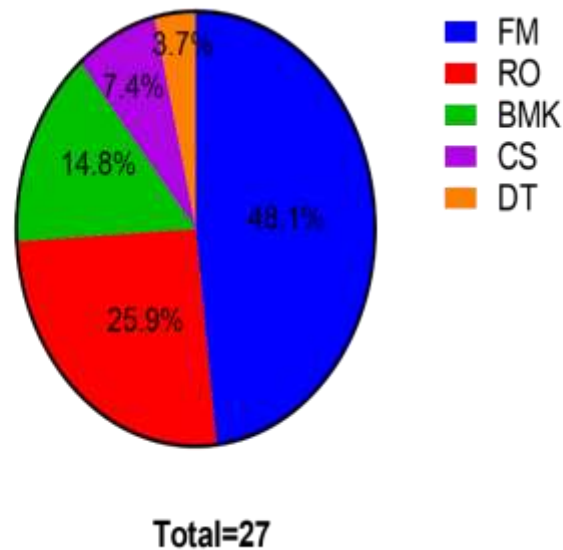
### 1.3. Origine géographique :

Les origines géographiques de nos patients répartis comme suit :

- 13 patients provenaient de la région de Fés-Méknes (48.1%)
- 07 patients provenaient de la région de l' Oriental (25.9%)
- 04 patients provenaient de la région Beni Mellal-Khenifra (14.8%)
- 02 patients provenaient de la région Casablanca-Settat (7.4%)
- 01 patient provenait de la région Darâa -Tafilalt (3.7%)

La majorité de nos patients est originaire de la région moyenne et nord-est du Maroc (88.8%).





**Figure 7.** Répartition des patients en fonction de leurs origines géographiques ; FM : Fés–Méknes, RO : Région de l’Oriental, BMK : Beni Mellal–Khenifra ; CS : Casablanca–Settat ; DT : Darâa–Tafilalt

## **2. Profil clinicopathologique :**

### **2.1. Antécédents personnels :**

- 13 patients n’avaient aucun antécédent personnel (pathologie thyroïdienne, irradiation cervicale...) (48.1%).
- 06 patients avaient une HTA secondaire (22.2%)
- 04 ont été suivis pour un goitre multinodulaire toxique (14.8%)
- 02 patients ont été alcoolo–tabagique chronique (7.4%)
- 02 patients avaient des antécédents d’autres néoplasies (cancer du cavum et de l’endomètre) (7.4%)

### **2.2. Antécédents familiaux :**

- 08 patients avaient des cas similaire dans la famille (29.6%).

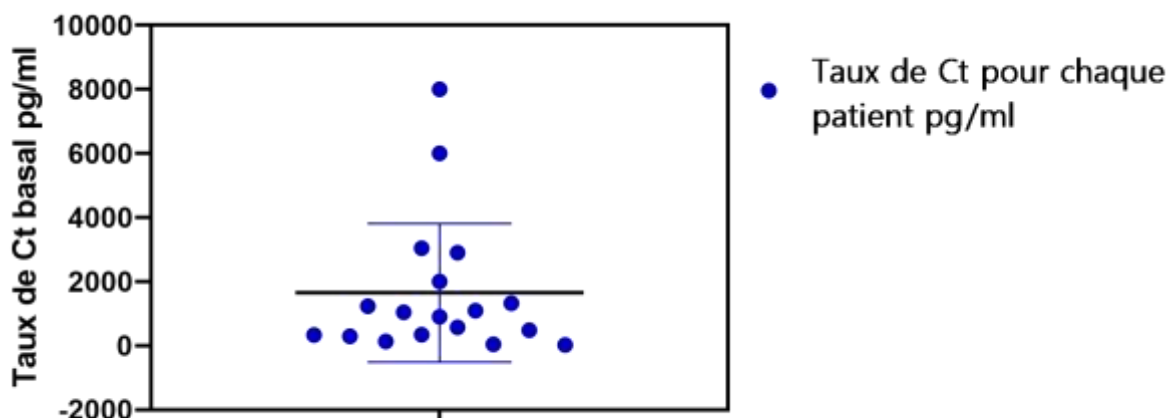
### 2.3. Circonstance de découverte :

- 13 patients avaient une tuméfaction latéro-cervicale (48.1%)
- 05 patients ont été découverts à l'issu d'une enquête familiale (18.5%)
- 05 patients avaient des signes compatibles avec la triade de Menard (céphalée, palpitations et sueurs) et/ou lors d'un bilan pour HTA secondaire (18.6%)
- 02 patients avaient des signes de compression et/ou des adénopathies cervicales (7.4%)
- 01 patient avait un goitre multinodulaire toxique (3.7%)
- 01 patient avait un nodule surrénalien de découverte fortuite lors d'un bilan (3.7%).

### 2.4. Paraclinique :

#### 2.4.1. Taux de calcitonine basale :

- Le taux de calcitonine était significativement élevé ( $>10\text{pg/ml}$ ) chez 21 patients (77.8%) ;
- Le taux moyen de calcitonine basale chez nos patients était de  $3682 \pm 9090$  pg/ml, avec des valeurs extrêmes allant de 21.85 à 40200 pg/ml



**Figure 8 .** Représentation en diagramme de dispersion des valeurs de calcitonine chez 21 cas de notre série, Ct : calcitonine, la barre noire représente la moyenne.

#### **2.4.2. Taux de l'antigène Carcino embryonnaire (ACE) :**

Le taux de ACE a été réalisé chez 3 patients, dont 2 avaient des valeurs > 5ng/ml : 15.67 et 517 ng/ml, ces patients avaient des taux de Ct respectivement de 3040pg/ml et 2000 pg/ml.

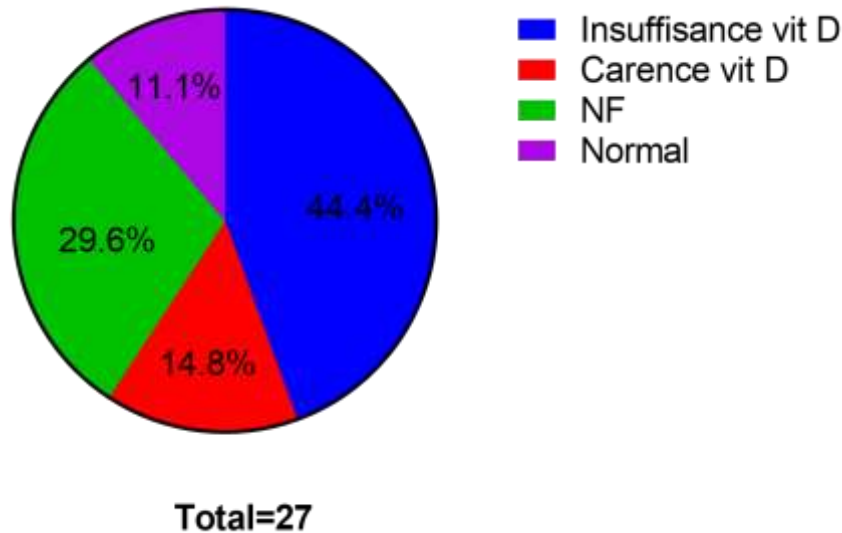
#### **2.4.3. Taux urinaire des dérivés méthoxylés des catécholamines sur 24h (validé par créatinurie de 24h) :**

- 11 patients avaient un taux urinaire de métanéphrine et/ou normétanéphrine sur 24h élevé (40.7%).
- Le taux moyen urinaire sur 24h de métanéphrine est  $3.35 \pm 4.53$   $\mu\text{mol}/24\text{h}$ , avec des extrêmes allant de 0.38 à 14.47  $\mu\text{mol}/24\text{h}$  (x14N).
- Le taux moyen urinaire sur 24h de normétanéphrine est  $16.29 \pm 22.74$   $\mu\text{mol}/24\text{h}$ , avec des extrêmes allant de 0.18 à 57.22  $\mu\text{mol}/24\text{h}$  (x 28N).

#### **2.4.4. Bilan phosphocalcique :**

- Taux de parathormone intacte (PTH 1–84) :
  - Le taux de PTH était élevé chez 04 patients (14.8%), le taux moyen était de  $144.8 \pm 75.59$  pg/ml avec des extrêmes allant de 78.9 (x1.1 N) à 228.3 pg/ml (x3N).
  - Le dosage de PTH est non réalisé chez 07 patients (25.9%).
- Calcémie corrigée :
  - Le taux de calcémie était élevé ou normal haut chez 04 patients (14.8%).
- Calciurie de 24h :
  - La calciurie de 24h était élevé chez un seul patient (3.7%) ;
  - Le dosage de calciurie de 24h est non réalisé chez 22 patients (81.4%).
- Phosphoremie :
  - La phosphoremie était basse chez un seul cas (3.7%).
- Dosage de la vitamine D (25OHD) :

- 12 patients avaient une insuffisance vitaminique D (44.4%) ; (10–30 ng/ml)
- Chez 8 patients le dosage de la vitamine n'a pas été fait (29.6%)
- 04 patients avaient une carence vitaminique D (14.8%) (<10 ng)
- 03 patients avaient un taux normal de la vitamine D (11.1%) (30–70 ng/ml)



**Figure 9 . Répartition des patients en fonction du dosage de vitamine D ; NF : non fait**

Le diagnostic de l'hyperparathyroïdie primaire a été retenu chez 02 patients (7.4%).

#### **2.4.5. Echographie cervicale :**

L'échographie cervicale a été réalisée pour les indications suivantes :

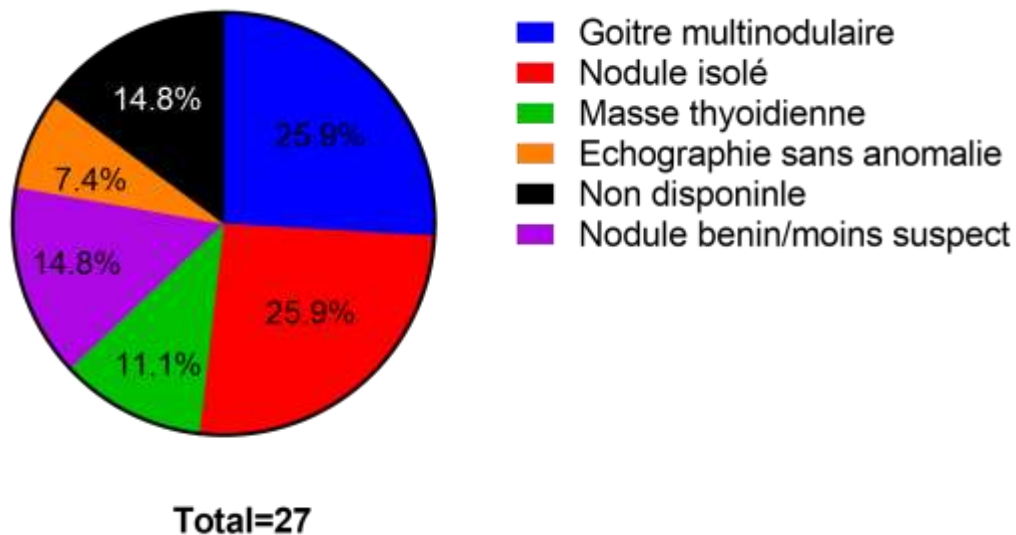
- Une anomalie à l'examen clinique de la loge thyroïdienne (nodule, goitre...)
- Dans le cadre du bilan de la NEM 2.

Les résultats de l'échographie cervicale sont comme suit :

- 07 patients avaient un goitre multihétéronodulaire (25.9%), dont 05 ont été classés TIRADS5 et 02 TIRADS4B, un patient avait des signes de compression de la trachée + adénopathies, et un autre patient avait des adénopathies bilatérales.
- 07 patient avait un nodule thyroïdien isolé (25.9%), dont 06 ont été classés TIRADS5 et 01 TIRADS4B, un patients avait des adénopathies cervicales

unilatérales.

- 03 patients avaient une masse thyroïdienne, dont 02 ont été classées TIRADS5 et une TIRADS4B, un patient avait des adénopathies cervicales bilatérales.
- 04 patients avaient des lésions moins suspectes et/ou probablement bénignes (14.8%), dont 02 ont été classées TIRADS3 et 02 TIRADS4A.
- 02 patients avaient une échographie sans anomalie (7.4%)
- Chez 04 patients les résultats de l'échographie sont non disponibles (14.8%).



**Figure 10.** Répartitions des patients en fonction des résultats de l'échographie cervicale

#### 2.4.6. L'étude radiologique du phéochromocytome :

Une TDM abdomino-pelvienne et/ou une IRM abdomino-pelvienne a été faite pour les indications ci-dessous :

- Chez les patients présentant des signes clinique et biologique évoquant un phéochromocytome ;
- Dans le cadre du bilan de NEM 2.

Les résultats de la TDM et/ou de l'IRM sont comme suit :

- Un phéochromocytome surrénalien a été retrouvé chez 11 patients (40.7%), dont 4(14.8%) avaient une localisation bilatérale.
- La taille moyenne était  $4.5 \pm 2.6$  cm, avec des valeurs extrêmes allant de 1,9 à 9.5 cm.
- La scintigraphie au MIBH I131 n'a été disponible que pour un seul cas, confirmant un phéochromocytome unilatéral par un foyer de fixation isolé de MIBH I131.

## **2.5. Résultats histopathologiques :**

### **2.5.1. Carcinome médullaire de la thyroïde (CMT) :**

Le diagnostic du carcinome médullaire de la thyroïde a été confirmé par étude anatomopathologique sur pièce de thyroïdectomie + curage ganglionnaire ou ischmolobectomie (complétée en 2eme temps), chez les patients ayant des signes cliniques, radiologiques et biochimiques évoquant ce diagnostic et après une ponction à l'aiguille fine évocateur.

Les résultats histopathologiques sont comme suit :

- 20 patients avaient un CMT (74.1%) confirmé sur pièce de thyroïdectomie totale chez 17 patients et sur pièce d'ischmolobectomie chez 03 patients.
- 08 patients avaient une tumeur multifocale (29.6%).
- La moyenne de la taille des tumeurs était  $2.2 \pm 1.2$  cm, avec des extrêmes allant de 0.05 à 5 cm.
- Les renseignements anatomopathologiques étaient non disponibles pour un cas ayant un taux de calcitonine positif, mais sans documentation d'un CMT.

Pour les métastases ganglionnaires locorégionales (curage ganglionnaire) :

- 06/20 patients avaient des métastases ganglionnaires locorégionales (30.0%).

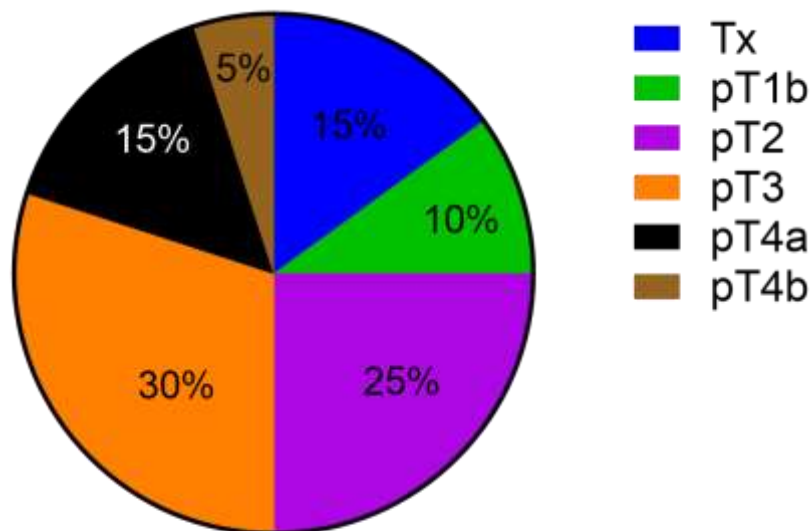
- 05/20 patients avaient un statut ganglionnaire inconnu (25.0%).
- 09/20 patients n'avaient aucune métastase ganglionnaire documentée (45.0%)

Le tableau suivant montre la répartition des tumeurs en fonction de leurs tailles (la plus grande tumeur) :

**Tableau XI. Répartition des tumeurs en fonction de leurs tailles (n=20)**

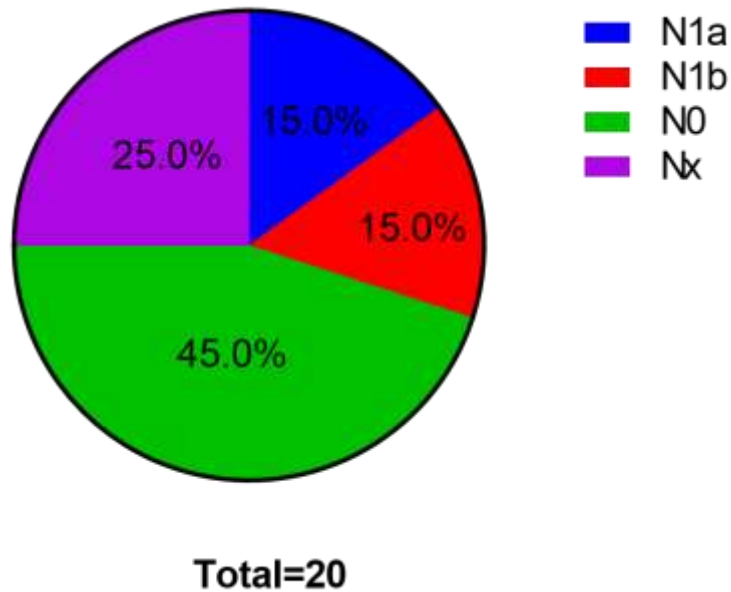
Taille des tumeurs	Nombre de patients n(%)
<1 cm	2(10%)
1-2cm	7(35%)
>2cm	10(50%)

- Pour la classification TNM pathologique des tumeurs :



**Total=20**

**Figure 11 . Représentation graphique en secteur de la distribution de pT de CMT selon la classification de American Joint Committee on Cancer 7th edition**



**Figure 12 .** Représentation graphique en secteur de la distribution de pN de CMT selon la classification de American Joint Committee on Cancer 7th edition

### **2.5.2. Phéochromocytome :**

L'étude anatomopathologique de la pièce de surrénalectomie unilatérale ou bilatérale a révélé :

- 10 patients avaient des phéochromocytomes à caractère bénin ; PASS score < 3 (90.9%)
- 01 patient avait un phéochromocytome avec potentiel malin ; PASS score =4

### **2.5.3. L'étude des glandes parathyroïdes :**

- Nous ne disposons pas de données anatomopathologiques des glandes parathyroïdiennes des 02 patients atteints d'hyperparathyroïdie primaire.

### **2.6. Résultats de l'étude moléculaire (profil génétique) :**

Tous les patients de notre série ont bénéficié d'un séquençage de l'ADN génomique sur le produit d'amplification des exons 10-11 en premier temps du gène



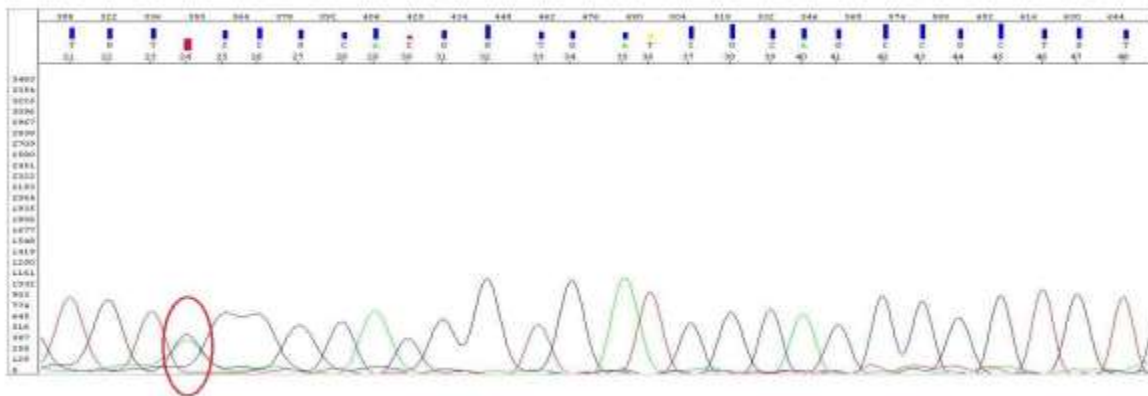
RET, complété en 2ème temps par les exons 13, 14 et 15 pour certain patients.

Les résultats du séquençage de l'exon 10 sont comme suit :

- Mutation faux-sens de substitution c.1901G>A (C634Y) chez 03 patients (11.1%) à l'état hétérozygote ; (02 familles)
- Absence de mutation de l'exon 10 chez 25 patients (92.6%).

Les résultats du séquençage de l'exon 11 sont comme suit :

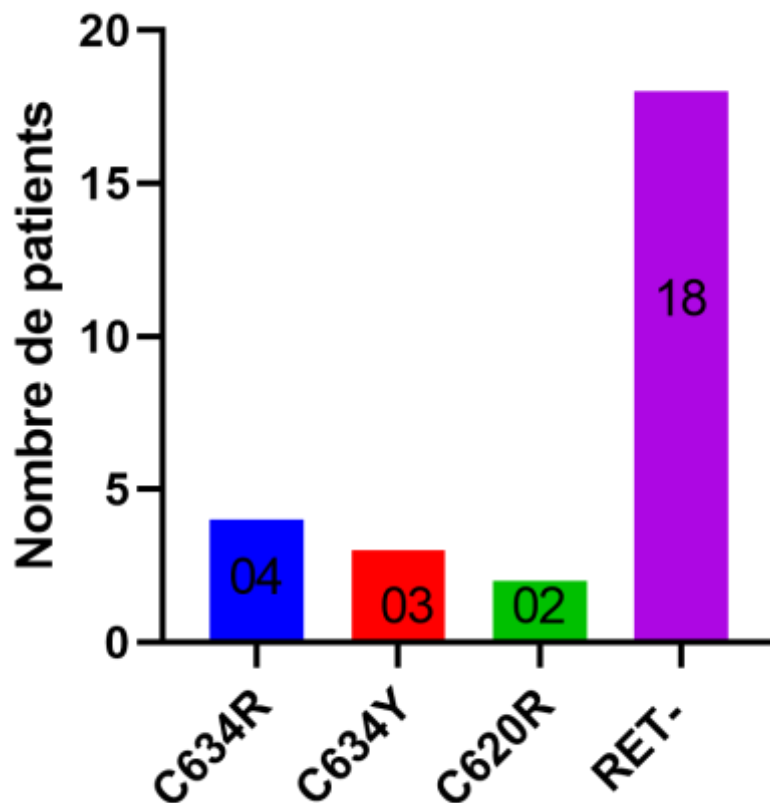
- Mutation faux-sens de substitution c.1900 T>C, (pC634R) chez 04 patients (15%) à l'état hétérozygote ;
- Mutation faux-sens de substitution c.1901G>A (C634Y) chez 03 patients (11%) à l'état hétérozygote ;
- Absence de mutation pathogène dans cet exon chez 20 patients (74%).



**Figure 13 . Exemple de l'électrophérogramme de l'exon 11 du gène RET représentant la mutation faux sens par substitution c.1901G>A à l'état hétérozygote chez les 03 patients.**

Pour les 18 (66.7%) patients qui n'avaient aucune mutation pathogène des exons 10 et 11, une étude complémentaire a été faite pour 14 patients (non faite pour 4 cas) en analysant le reste des hotspots notamment les exons 13, 15, et 16. Mais nous n'avons pas trouvé une mutation pathogène chez ces patients.

- Au total :
  - 09 patients avaient une mutation pathogène du gène RET (33.3%) ;
  - Absence de mutations ou mutation bénigne chez 18 patients (66.67%)



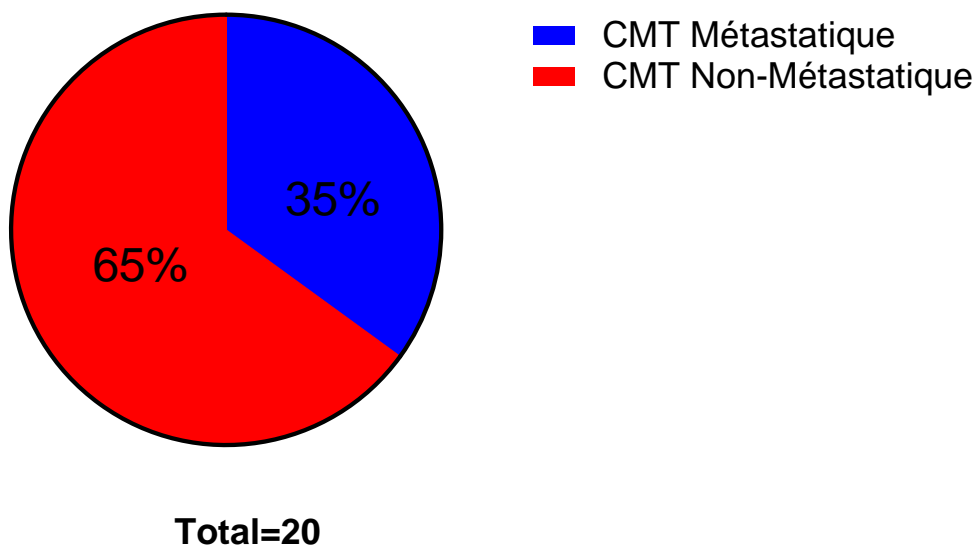
**Figure 14.** Représentation en digramme à barres des résultats de l'étude moléculaire du gène RET ; RET- : Absence de mutations ; A noter que l'étude complémentaire des exons 12-16 n'est pas faite chez 04 cas.

## 2.7. Métastases à distance :

Les patients qui avaient un carcinome médullaire de la thyroïde (20 patients) ont bénéficiés d'un bilan d'extension pour la recherche des métastases à distance, les résultats de ce bilan sont comme suit :

- 07 patients avaient des métastases à distance (35.0%), repartis aux sites suivants :
  - ⇒ Poumon : 04 patients
  - ⇒ Ganglions lymphatiques à distance : 05 patients
  - ⇒ Os : 02 patients
  - ⇒ Foie : 02 patients

N.B : Certains patients ont des métastases dans plusieurs sites.



**Figure 15.** Distribution des patients atteints de CMT en fonction du statut métastatique de la maladie.

## **2.8. Le traitement chirurgical :**

### **2.8.1. La chirurgie du CMT :**

La chirurgie du CMT a été réalisée chez 20 cas. L'étendue de cette dernière est fonction des résultats du bilan d'extension (échographie cervicale, taux de Ctn et ACE, évaluation peropératoire...) :

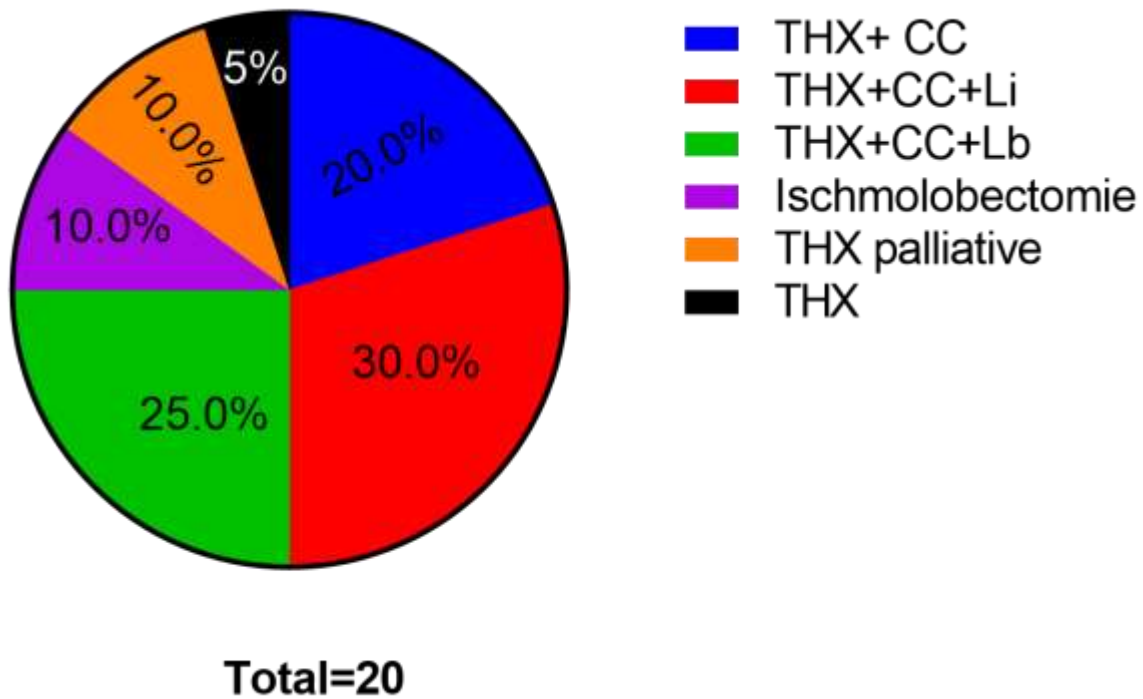
- Thyroïdectomie totale + curage central (Niveau VI) : 04 patients (20.0%)
- Thyroïdectomie totale + curage central (Niveau VI) et latéral ipsilatéral (Niveau II-V) : 06 patients (30.0%)
- Thyroïdectomie totale + curage central et latéral bilatéral (Niveau II-VI) : 05 patients (25.0%)
- Ischmlobectomie (complétée par totalisation + curage en 2ème temps) : 02 patients (10.0%)
- Thyroïdectomie palliative : 02 patients (10.0%)
- Thyroïdectomie totale seule : 01 patient (5.0%)

N.B : Les patients qui avaient un phéochromocytome synchrone ont bénéficié d'une surrénalectomie en premier temps.

### **2.8.2. La chirurgie du phéochromocytome :**

Le diagnostic du phéochromocytome a été confirmé chez 11 patients, après un dosage positif des métabolites des catécholamines urinaire sur 24h et étude radiologique des surrénales (TDM et/ou IRM), éventuellement par le PET-Scan à la 18F-FDOPA ou la scintigraphie au MIBG marqué à l'iode radioactif. Ensuite ces patients ont bénéficié d'une surrénalectomie :

- Surrénalectomie unilatérale/bilatérale transpéritonéale par cœlioscopie : 10 patients (90.9%)
- Surrénalectomie unilatérale par laparotomie : 01 patient (9.1%)



**Figure 16.** Distribution des patients atteints de CMT, en fonction du type et l'étendu du curage ganglionnaire ; THX : Thyroïdectomie totale ; CC : Curage central ; Li : curage latéral ipsilateral ; Lb : curage latéral bilatéral

**Tableau XII : . Caractéristiques cliniques et génétiques des 27 patients de notre série**: **Sexe** : F = féminin ; M=masculin ; **CMT** : Carcinome médullaire de la thyroïde ; **PHEO**: **phéochromocytome** ; **bilat** : localisation bilatérale du phéochromocytome ; **HPP** :**Hyperparathyroïdie primaire** ; **H-ATA** : Haut risque ; **MOD-ATA** : risque modéré ;**CMTF** : **carcinome médullaire de la thyroïde familiale**

Patients	Sexe	Age de 1 <sup>e</sup> manifestation (ans)	CMT	Ctn basale (pg/ml)	PHEO	HPP	Phénotype	Mutation pathogène	Catégorie de risque ATA
P 01	F	13	-	> 10	Non	Non	NEM 2A	c.1858T>C (C620R)	MOD-ATA
P02	F	17	Oui	6000	Oui (bilat)	Non	NEM 2A	c.1900T>C (C634R)	H-ATA
P03	F	24	Oui	345	Non	Non	NEM 2A /CMTF	c.1901G>A (C634Y)	H-ATA
P04	F	27	Oui	1230	Non	Non	NEM 2A/ CMTF	c.1901G>A (C634Y)	H-ATA
P05	F	31	Oui	905	Non	Non	NEM 2A/ CMTF	c.1901G>A (C634Y)	H-ATA
P06	M	35	Oui	3040	Oui (bilat)	Oui	NEM 2A	c.1900T>C (C634R)	H-ATA
P07	F	40	Oui	1098	Oui (bilat)	Non	NEM 2A	c.1858T>C (C620R)	MOD-ATA
P08	M	46	Oui	-	Oui	Oui	NEM 2A	c.1900T>C (C634R)	H-ATA
P09	M	63	Oui	21.85	Oui (bilat)	Non	NEM 2A	c.1900T>C (C634R)	H-ATA
P10	F	16	Oui	333	Non	Non	CMT isolé	Absence	-
P11	M	24	Oui	578	Non	Non	CMT isolé	Absence	-
P12	F	27	Oui	1040	Non	Non	CMT isolé	Absence	-
P13	M	30	Oui	2900	Non	Non	CMT isolé	Absence	-
P14	F	31	Oui	480	Non	Non	CMT isolé	Absence	-

P15	F	31	Oui	40200	Non	Non	CMT isolé	Absence	-
P16	M	34	Oui	2000	Non	Non	CMT isolé	Absence	-
P17	F	39	Oui	290	Non	Non	CMT isolé	Absence	-
P18	F	46	Oui	NA	Non	Non	CMT isolé	Absence	-
P19	F	52	Oui	NA	Non	Non	CMT isolé	Absence	-
P20	M	57	Oui	1328	Non	Non	CMT isolé	Absence	-
P21	M	75	Oui	8000	Non	Non	CMT isolé	Absence	-
P22			Non	Négatif	Oui	Non	PHOE isolé	Absence	-
P23	M	18							
			Non	Négatif	Oui	Non	PHOE isolé	Absence	-
P24	F	29							
			Non	Négatif	Oui	Non	PHOE isolé	Absence	-
P25	M	35							
			Non	Négatif	Oui	Non	PHOE isolé	Absence	-
P26	F	37							
			Non	NA	Oui	Non	PHOE isolé	Absence	-
P27	M	42							
			Non	NA	Oui	Non	PHOE isolé	Absence	-
	F	58							

## II. ETUDE ANALYTIQUE

Nous avons dans un deuxième temps étudié le lien entre les caractéristiques suivantes:

- Age de présentation, le sexe, l'origine géographique, le taux de calcitonine basal, la taille des tumeurs, les métastases ganglionnaires locorégionales, les métastases à distance entre les patients atteints du CMT porteurs de mutations RET pathogènes (héréditaire) et non porteurs de mutations (CMT sporadique). Nous n'avons pas révélé une différence significative entre les deux groupes ( $p > 0.05$ ).
- Age de présentation, le sexe et la taille de la tumeur entre les patients atteints de phéochromocytome porteurs et non porteurs de la mutation *RET*.

Nous n'avons pas révélé une différence significative entre les deux groupes.

### Tableau XIII. Comparaison des caractéristiques cliniques des patients atteints du phéochromocytome non porteurs de mutation RET Vs porteurs de mutation RET ;

RET+/- : présence de mutation pathogène du gène RET / absence de mutation ; M :

sexe masculin ; F : sexe féminin

Caractéristiques cliniques	<i>RET</i> +	<i>RET</i> -	Valeur p
Age de présentation	40.2±16.7 ans	36.5±13.6 ans	0.69
Sexe (M/F)	3/2	3/3	>0.99
Taille moyenne de tumeur (cm)	3.5±1.1 cm	5.5±3.2 cm	0.22



**Tableau XIV. Comparaison des caractéristique clinicopathologiques et génétiques des patients RET+ et RET- de notre série ; CMT : carcinome médullaire de la thyroïde ; RET+/RET- : mutation pathogène du gène *RET*/absence ; (‡) : A noter que 02 patient du groupe RET- et 04 groupe RET+ avaient un statut ganglionnaire inconnue (Nx)**

Mutation du gène RET	Négative	Positive	
Nombre des patients	18	9	Total= 27
CMT n(%)	12 (66.7%)	8 (88.9%)	-
Age de présentation (ans)	37.83±15.1 ans	35.38±14.41 ans	P=0.70
Sexe F (%)	10 (55.7%)	6 (66.7%)	P>0.999
Calcitonine basal (pg/ml)	5715±12335 pg/ml	1424±1958 pg/ml	P=0.317
Taille de tumeur (cm)	2.14±0.53 cm	2.24±1.54 cm	p = 0.856
Métastases ganglionnaires locorégionales, n(%)	5(41.67%) ‡	1(12.5%) ‡	p>0.999
Métastases à distance, n(%)	6(50.0%)	1(12.5%)	p = 0.669
Phéochromocytome, n(%)	6(30.0%)	5 (55.56%)	-
Hyperparathyroïdie, n(%)	0	2(22.22%)	

# DISCUSSION

## **I. LES ASPECTS PHENOTYPIQUES:**

La néoplasie endocrinienne multiple de type 2 (NEM2) est un syndrome cancéreux héréditaire autosomique-dominant causé par des mutations faux-sens dans le proto-oncogène RET (REarranged during Transfection), entraînant un gain de fonction du récepteur tyrosine kinase codant<sup>1</sup>. La prévalence estimée est de 2,5 pour 100 000 dans la population générale<sup>2</sup>. NEM 2 présente une pénétrance élevée pour le carcinome médullaire de la thyroïde (CMT), qui est une tumeur rare sécrétant de la calcitonine (Ct) et dérivée des cellules parafolliculaires ou cellules C de la thyroïde ; ces cellules sont elles-mêmes dérivées de la crête neurale. La majorité des patients atteints de CMT présentent la forme sporadique (c'est-à-dire non familiale) de la tumeur, tandis que 25-30% présentent la forme héréditaire. Le syndrome NEM 2 se présente sous trois variétés cliniquement distinctes avec une pénétrance variable du CMT, phéochromocytome et hyperparathyroïdie. L'identification précoce des patients atteints de CMT change la présentation d'une tumeur cliniquement évidente à une maladie préclinique, ce qui se traduit par un taux de guérison plus élevé chez les patients atteints et un meilleur pronostic.<sup>3</sup> Chaque variété de NEM 2 résulte d'une mutation différente du gène RET avec une bonne corrélation génotype-phénotype

### **1. Carcinome médullaire de la thyroïde et hyperplasie des cellules C (HCC)**

#### **1.1. Manifestations cliniques :**

Le CMT chez les personnes atteintes de NEM 2 se présente généralement à un âge plus jeune que le CMT sporadique<sup>4</sup> et est plus souvent associé à une hyperplasie des cellules C ainsi qu'à une multifocalité ou bilatéralité.

Dans une série de la Corée du sud, K.Y. Jung et al. ont comparé les caractéristiques clinocopathologiques et moléculaires entre des cas du CMT sporadique et héréditaire, ils ont trouvé que l'âge de présentation des cas héréditaires est  $34.2 \pm 14.8$  ans<sup>4</sup>, sexe-ratio (M/F) = 0.72 . Une autre large étude chinoise portée sur 147 cas (20 familles) a rapporté un âge moyen des cas de NEM 2A de  $43.0 \pm 13.9$  ans, sexe-ratio (M/F) = 0.615. Des résultats similaires ont été retrouvés par B.İ. Aydoğan et al. (Turquie), où ils ont retrouvés aussi un âge moyen des cas de NEM 2A situé à  $35.6 \pm 2.78$  ans<sup>6</sup>. Une autre étude au Moyen-Orient menée par S.G. Glasberg et al. (Israël) rapporte un âge plus jeune ( âge moyen =  $26.7 \pm 10.2$  ans) des cas héréditaires ( tous phénotype confondu )<sup>7</sup>. M. Lebeault et al. ont mené en France une large étude nationale étalée sur 10 ans et portée sur 5109 cas index et 2214 cas apparentés, l'âge moyen des cas NEM 2A était  $41.8 \pm 13.0$  ans<sup>8</sup> ; sexe-ratio (M/F) = 0.67.

Dans notre série l'âge de présentation du CMT dans la NEM 2A était de  $35.38 \pm 14.41$  ans, concordant alors avec la majorité des résultats cités ci-dessus. Nous ne constatons également aucune différence quant à l'âge de présentation du CMT héréditaire (NEM 2A) et sporadique ;  $35.38 \pm 14.41$  Vs  $37.83 \pm 15.1$  ans ( $p > 0.05$ ). Par contre les études ci-dessus qui ont comparé les cas de CMT sporadiques vs héréditaire ont constaté que l'âge de présentations de ce dernier est plus précoce : K.Y. Jung et al. ( $50.4 \pm 11.6$  ans vs  $37.6 \pm 13.5$  ans ;  $p < 0.001$ ) ; B.İ. Aydoğan et al. ( $47.6 \pm 1.05$  vs  $35.6 \pm 2.78$  ;  $p < 0.01$ ) ; S. G-Glasberg et al. ( $51.8 \pm 17$  ans vs  $26.7 \pm 10.2$  ans ;  $p = 0.001$ )

Les symptômes du CMT comprennent une masse ou une douleur cervicale avant l'âge de 35 ans. La diarrhée (le symptôme systémique le plus fréquent) survient chez les personnes affectées dont la concentration plasmatique de calcitonine est  $> 10$  ng/mL et implique un mauvais pronostic.<sup>9</sup> Jusqu'à 70 % des personnes présentant une masse thyroïdienne palpable ou une diarrhée ont déjà de métastases ganglionnaires cervicales<sup>10</sup>. Les métastases régionales ganglionnaires (parathyroïdes, paratrachéaux,

chaîne jugulaire et médiastin supérieur) ou à distance, notamment le foie, les poumons ou les os, sont également fréquentes chez les personnes symptomatiques.<sup>10,11</sup>,

Nous rapportons aussi dans notre série un pourcentage de 30% de métastases ganglionnaires régionales, et 35% de métastases à distance au moment du diagnostic, chez les patients atteints d'un carcinome médullaire héréditaire. Par contre l'étude coréenne rapporte un pourcentage plus faible chez les cas index de métastases ganglionnaire de 28% et 1.9% de métastase à distance. Dans le même sens Grozinsky-Glasberg et al. ont retrouvé des métastases ganglionnaires chez 40% cas de CMT héréditaire et aucun cas de métastases à distance dans ce groupe.

Environ 25 à 30 % des personnes atteintes d'un carcinome médullaire de la thyroïde présentent une variante pathogène RET. Dans une grande série italienne de personnes atteintes d'un carcinome médullaire de la thyroïde simplex (c'est-à-dire sans antécédents familiaux connus de CTM ou antécédents personnels d'autres maladies endocriniennes), environ 7 % présentaient une variante pathogène RET germinale.<sup>12</sup> Soulevant ainsi l'intérêt de l'étude moléculaire chez tous cas apparu sporadique.

Nous avons retrouvé une mutation pathogène du gène RET dans plus de 33% des cas testés, ce pourcentage est assez similaire de celui de Grozinsky-Glasberg et al. (n =51), estimé à 39.1% parmi les cas testés. une fréquence de moins de 25% a été décrite dans les populations de l'Asie de l'Est dans par des études plus larges 4,1 4. L'étude française nationale (n=480) a retrouvé une mutation pathogène chez 18.5% des cas étudiés (cas index et leurs apparentes).

## 1.2. Manifestations biochimiques :

Le CMT et l'hyperplasie des cellules C (HCC) sont suspectés en présence d'une concentration plasmatique élevée de calcitonine, un marqueur sensible et spécifique. Dans les tests de provocation, la concentration plasmatique de calcitonine est mesurée avant (niveau basal), puis deux et cinq minutes après l'administration intraveineuse de calcium (niveau stimulé). D'autres sécrétagogues de la calcitonine tels que la pentagastrine sont également utilisés. Tous les individus présentant une variante pathogène prédisposant au CMT et n'ayant pas subi de thyroïdectomie prophylactique, présentent des signes biochimiques de CMT avant l'âge de 35 ans<sup>14</sup>.

Le taux moyen de Ctn basale dans notre étude est  $3682 \pm 9090$  pg/ml reparti en fonction du statut du gène RET comme suit : RET+ :  $1424 \pm 1958$  pg/ml vs RET - :  $5715 \pm 12335$  pg/ml ;  $p > 0.05$ .

K.Y. Jung et al. (n= 331) n'ont pas retrouvé une différence significative entre le taux de Ctn basale des patients atteints de CMT RET+ et RET- ( $1078.4 \pm 1775.3$  pg/ml vs  $1213.3 \pm 2633.8$  pg/ml ;  $p > 0.05$ ), par contre ce paramètre était significativement bas chez les cas RET + détectés par dépistage familiale ( $1213.3 \pm 2633.8$  pg/ml vs  $338.1 \pm 418.4$  pg/ml ;  $p < 0.05$ ). Cette constatation montre le potentiel du dépistage familial présymptomatique à détecter la maladie à des stades très précoces, sachant que le taux de Ctn plasmatique est extrêmement corrélé à la progression clinique du CMT<sup>15</sup>. Dans le même sens Grozinsky-Glasberg et al. ont rapporté des résultats similaires.

D'autres auteurs ont trouvé une différence significative du taux de Ctn plasmatique entre les cas sporadiques (RET-) et héréditaires (RET+), notamment Aydoğan Bî et al. ( $1072 \pm 1102$  pg/ml vs  $704 \pm 594$  pg/ml ;  $p < 0.05$ ).

### 1.3. Les manifestations histopathologiques :

Le CMT trouve son origine dans les cellules productrices de calcitonine (cellules C) de la glande thyroïde. D'un point de vue embryologique ces cellules dérivent de la crête neurale pour cette raison le CMT est considéré comme une tumeur neuroendocrinienne, mais classée comme une tumeur thyroïdienne pour sa localisation anatomique.

Macroscopiquement, le CMT est ferme et de couleur blanchâtre, brunâtre ou rosâtre.

Le CMT sporadique se présente généralement sous la forme d'une tumeur solitaire et unilatérale, alors que le CMT héréditaire est plutôt multicentrique et bilatéral.

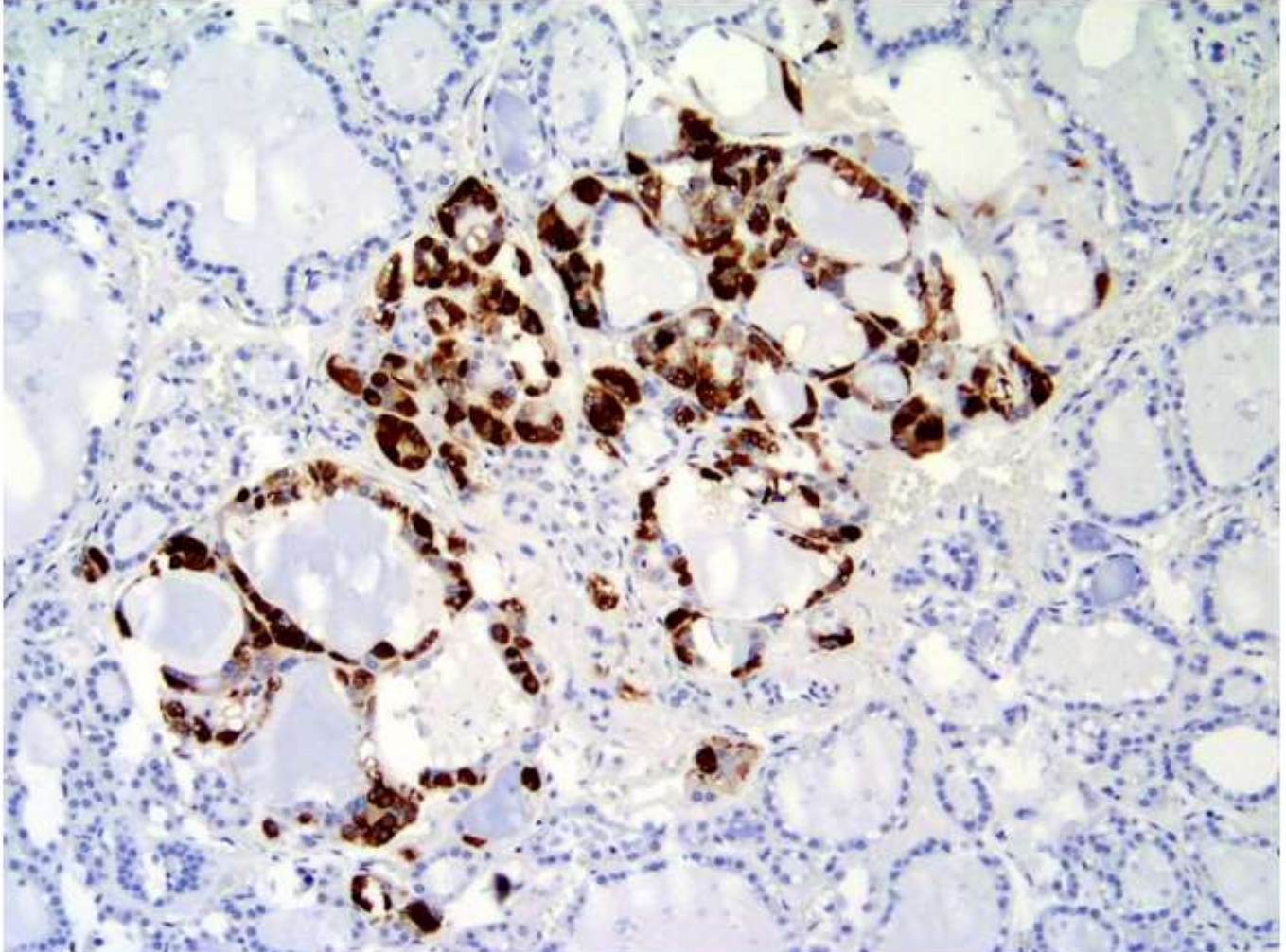
Le CMT est diagnostiqué histologiquement lorsque des nids de cellules C semblent s'étendre au-delà de la membrane basale et infiltrer et détruire les follicules thyroïdiens (Figure 18). L'étude par immunohistochimie pour l'expression de la calcitonine peut être réalisée en complément du diagnostic pathologique. A l'examen histologique, les cellules du CMT sont typiquement rondes, polyédriques ou fusiformes et forment des feuilles ou des nids avec une disposition périphérique en palissade dans un stroma vasculaire. Le matériel amyloïde présent dans plus de la moitié des CTM est en fait composé des molécules du Ctn complète <sup>16</sup>. Les cellules CMT expriment des cytokératines, principalement CK7 et CK18, NKX2.1 (TTF1) et la chromogranine A, mais les marqueurs diagnostiques les plus importants sont le Ctn et le CEA.

La coloration immunohistochimique (IHC) du Ctn peut varier en intensité et en étendue, mais en l'absence de cette coloration, le diagnostic du CMT doit être remis en question. La réactivité de la Ctn est souvent réduite dans les tumeurs indifférenciées, alors que la coloration pour le CEA est presque toujours fortement positive <sup>17</sup>.

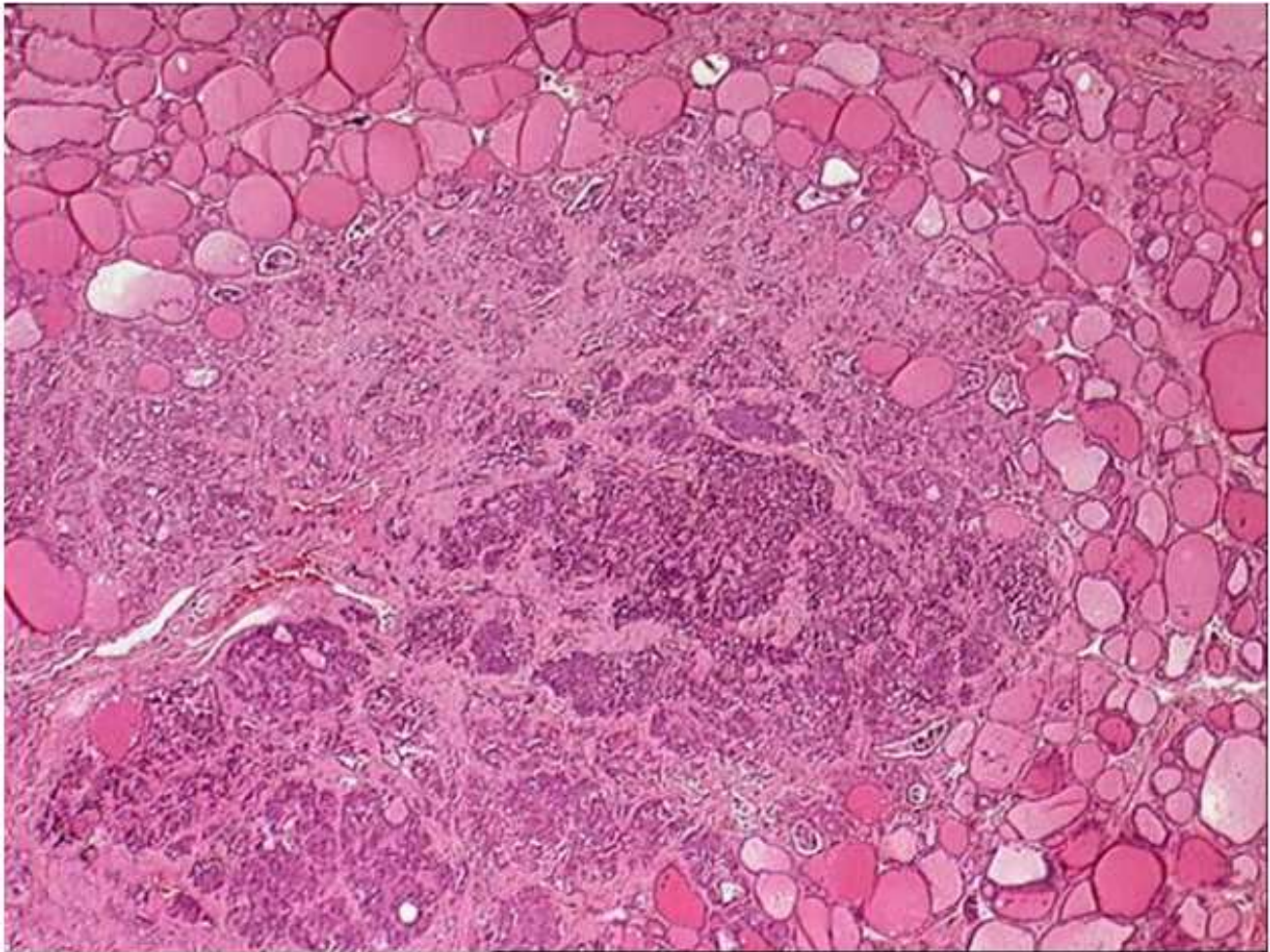
Dans le cas du CMT héréditaire, l'entité HCC précède le développement du CMT et est mieux mise en évidence par IHC avec des anticorps anti-Ctn (Fig. 4) <sup>18</sup>. HCC est en fait un terme erroné. Compte tenu de son caractère multicentrique, cette entité représente très probablement la prolifération clonale de multiples progéniteurs des cellules C transformés. Par conséquent, des termes tels que carcinome in situ des cellules C ou néoplasie à cellules C sont plus appropriés<sup>19</sup>. Les critères de diagnostic de l'HCC sont controversés ; cependant, la plupart des pathologistes s'accordent à considérer que le diagnostic est justifié s'il y a plus de sept cellules C par groupe, des follicules complets entourés de cellules C et une distribution des cellules C au-delà de la localisation anatomique normale<sup>20</sup>. Les cellules C sont normalement limitées à la jonction du tiers supérieur et des deux tiers inférieurs des lobes latéraux ; l'extension au-delà de cette région est considérée comme indiquant d'une prolifération anormale des cellules C. Les cellules C atypiques qui franchissent la membrane basale ou envahissent le stroma adjacent ont le potentiel de métastaser.

Dans le cas du syndrome NEM 2, l'âge de la transformation de l'HCC en CMT varie en fonction des différents variants germinaux pathogènes du gène RET<sup>3</sup>.





**Figure 17.** Hyperplasie des cellules (HCC), avec une cinquantaine des cellules C visualisées par immunohistochimie (Ac anti-calcitonine). Les cellules C (volumineuses) sont pratiquement exclusivement détectables dans les follicules plus ou moins grands ( Ting S et al. 2015)



**Figure 18.** Carcinome médullaire de la thyroïde (CMT). Le stroma desmoplastique et la bordure infiltrée sont caractéristiques. Fille de neuf ans atteinte de NEM 2A. Zone pâle de 0,4 cm de diamètre visible sur la surface de coupe du lobe droit.

Microcarcinomes médullaires bilatéraux (Ashworth M. et al. 2004)

## 2. Phéochromocytome :

### 2.1. Manifestations cliniques :

Les manifestations cliniques du phéochromocytome associé à la NEM 2 est similaire à celle observée dans les cas sporadiques, avec des symptômes tels que les céphalées, palpitations, la nervosité, la tachycardie et l'hypertension<sup>2</sup>.

Les phéochromocytomes chez les individus atteints de NEM 2 sont presque toujours surrenaliens et souvent bilatéraux<sup>21,22,23</sup>. Un résultat que nous notons également, parmi les 05/09 patients porteurs de la mutation et qui présentaient un phéochromocytome, 04/09 avaient une localisation bilatérale.

Bien que les phéochromocytomes chez les individus atteints de NEM 2 forment rarement des métastases, ils peuvent être mortels en raison d'une hypertension réfractaire ou de crises hypertensives induites par l'anesthésie.

L'âge moyen de découverte de phéochromocytome dans la NEM 2A chez nous dans notre étude est  $40.2 \pm 16.7$  ans (17– 61 ans). Dans trois études portant sur des patients atteints de NEM 2, l'âge moyen à la présentation des phéochromocytomes était de 25 ans (intervalle 18 – 40 ans), de 25,5 ans (intervalle 19–31 ans) et 32,4 ans (intervalle : 15–41 ans), respectivement<sup>23–25</sup>. L'étude chinoise (Y.Zhou et al.) retrouverait que l'âge moyen du diagnostic du phéochromocytome chez les patients NEM 2A était de  $35.4 \pm 12.3$  ans (12–70 ans), significativement élevé à l'âge moyen du diagnostic du CMT ;  $p < 0.005$ . Malheureusement on n'a pas pu atteindre le seuil de significativité pour détecter une telle différence entre l'âge moyen d'apparition des deux tumeurs vu le nombre très limité des cas. Donc souvent les patients développent au premier le CMT puis quelques années plus tard le phéochromocytome, avec quelques exceptions où on trouvera un phéochromocytome au premier sans CMT chez des cas avec une mutation pathogène du gène RET. Dans la dernière étude ils décrivent

04 cas porteurs de la mutation C634F qui avaient un phéochromocytome comme manifestation initiale de la NEM 2A ; l'étude française (M. Lebeault et al.) a rapporté que le phéochromocytome était la première manifestation dans 71 des 366 cas de NEM 2A (19.4%)

## **2.2. Manifestations biochimiques :**

Le phéochromocytome est suspecté lorsque le dépistage biochimique révèle une excrétion élevée de catécholamines et de métabolites de catécholamines (par exemple, norépinéphrine, épinéphrine, métanéphrine et acide vanillylmandélique [AVM]) dans le plasma ou les urines de 24 heures<sup>22,26</sup>.

Dans le syndrome NEM 2, les phéochromocytomes produisent systématiquement de de l'épinéphrine et de la norépinéphrine<sup>26</sup>. Dans notre étude nous avons fait le dosage de métanéphrine et normétanéphrine urinaire de 24 heures. Une surproduction des catécholamines est confirmée si au moins le dosage d'un seul métabolite revient positif.

## **2.3. Imagerie :**

Une IRM abdominale et/ou un scanner sont réalisés si les valeurs de catécholamines plasmatiques ou urinaires sont augmentées ou si un phéochromocytome est suspecté cliniquement. L'IRM est plus sensible que la TDM pour la détection d'un phéochromocytome. La TEP à la 18F-FDOPA est la meilleure modalité d'imagerie globale pour la localisation des phéochromocytomes<sup>27</sup>.

Si la TEP à la 18F-FDOPA n'est pas disponible, la scintigraphie au MIBG (métaiodobenzylguanidine marquée au 123I ou au 131I) doit être utilisée pour évaluer davantage les personnes présentant des signes biochimiques ou radiographiques de phéochromocytome<sup>28</sup>.

Presque pour tous les malades, l'étude des phéochromocytomes a été réalisée par la TDM injectée et IRM. Les résultats de la scintigraphie au MIBG I131, n'ont été disponible que pour un seul cas, montrant un foyer de fixation surrénal unilatéral.

### **3. Hyperparathyroïdie**

#### **3.1. Manifestations cliniques :**

L'hyperparathyroïdie primaire est souvent cliniquement occulte et ne diffère pas de celle observée chez les patients atteints d'une légère hyperparathyroïdie primaire sporadique<sup>2</sup>.

Les anomalies parathyroïdiennes peuvent aller des adénomes parathyroïdiens bénins à une hyperparathyroïdie cliniquement évidente avec hypercalcémie et calculs rénaux. Les cas d'hyperparathyroïdie primaire que nous avons présenté dans notre série n'avaient aucune manifestation clinique ou complication secondaire à l'hyperparathyroïdie.

Dans une étude portant sur 188 patients atteints de NEM 2A (catégorie ATA-H), 36 (19.14%) présentaient une hyperparathyroïdie<sup>29</sup>, d'autres études ont rapporté une pénétrance minime de 10.5% chez les patients de la catégorie ATA-H appartenant à une population asiatique<sup>4</sup>. L'hyperparathyroïdie se manifeste principalement chez les patients présentant des mutations de l'exon 11, le plus souvent chez ceux qui présentent des mutations du codon 634, et moins fréquemment chez les patients présentant des mutations du codon exon 1030.

En général, la pénétrance de l'hyperparathyroïdie ne dépasse pas 30% en cas de mutations du codon 634<sup>19</sup>. Nous avons confirmé ces résultats dans notre série.

### **3.2. Manifestations biochimiques :**

Les anomalies parathyroïdiennes sont présentes lorsqu'un taux élevé de calcium sérique se présente simultanément avec une hormone parathyroïdienne (PTH) élevée ou normale haut. Nous avons retrouvé comme manifestation chez les deux cas, une hypercalcémie normale haute, un taux de PTH élevé, une hypophosphatémie chez un seul cas et une hypercalciurie chez un seul cas.

### **3.3. Imagerie :**

L'étude postopératoire de localisation de la parathyroïde par scintigraphie au <sup>99m</sup>Tc-sestaMIBI peut être utile en cas de récurrence de l'hyperparathyroïdie. Pour la localisation préopératoire des adénomes, la tomographie tridimensionnelle par émission monophotonique (SPECT) peut également être utilisée<sup>31</sup>. Malheureusement nous ne disposons pas des résultats de l'étude par scintigraphie au MIBI des parathyroïdes des deux cas décrits ci-dessus.

## **4. Les phénotypes de la NEM type 2 : caractéristiques cliniques et relation entre le génotype et le phénotype**

Trois sous-types cliniques distincts du syndrome NEM 2 ont été caractérisés. Ils diffèrent en termes d'incidence, génétique, de la pénétrance liée à l'âge, de l'association avec d'autres maladies, l'agressivité du CMT et le pronostic<sup>19,32</sup>.

### **4.1. La néoplasie endocrinienne multiple type 2 A (NEM 2A) :**

Le syndrome NEM 2A (OMIM : 171400) est caractérisé par la présence d'un CMT, d'un phéochromocytome bilatéral et/ou de multiples tumeurs des glandes parathyroïdes (hyperparathyroïdie primaire) chez un même patient ou dans une même famille. Il s'agit de la forme la plus courante du syndrome NEM 2, représentant 55 % des cas<sup>33</sup>.

La fréquence du CMT est de >90 % chez les patients atteints du syndrome NEM 2A, tandis que les fréquences du phéochromocytome et d'hyperplasie multiple des glandes parathyroïdes sont respectivement de 40 à 50 % et de 10 à 20%.<sup>2</sup> Ces fréquences citées ci-dessus dépendent des mutations germinales spécifiques du gène RET. Par exemple, les mutations du codon 634 sont associées à une pénétrance élevée du phéochromocytome, qui, dans une étude, augmente avec l'âge, soit 25 % à l'âge de 30 ans, 52 % à l'âge de 50 ans et 88 % à l'âge de 77 ans, et 88 % à l'âge de 77 ans<sup>34</sup>. A l'instar de ces résultats la pénétrance du phéochromocytome dans notre série, chez les porteurs des mutations du codon 634 est élevé 57.1% (4/7). Les phéochromocytomes sont presque toujours bénins et sont généralement multicentriques, bilatérales et confinées à la glande surrénale. Ces tumeurs sont généralement associées à une hyperplasie nodulaire diffuse de la médullosurrénale, en particulier chez les patients présentant des mutations germinales du gène RET dans les codons 918 et 634<sup>35</sup>. Les patients atteints du syndrome NEM 2A et présentant un phéochromocytome unilatéral développent généralement un phéochromocytome controlatérale dans les 10 ans<sup>35</sup>. Ce qu'en témoigne l'incidence élevée des localisations bilatérales que nous avons trouvées chez presque tous les cas (4/5). Nous soulignons aussi la nécessité de la surveillance régulière pour éventuel développement ultérieure du phéochromocytome des cas porteurs d'une mutation associée à une pénétrance modérée à élevée de cette tumeur (P01,P03,P04 et P05 Tableau XII) ou les cas opérés pour une localisation unilatérale (P08 ;Tableau XII).

Notre étude montre une pénétrance modérée supérieure à 28% (2/7) de l'hyperparathyroïdie parmi les patients porteurs de la mutation p. C634R, une pénétrance similaire a été rapportée aussi dans plusieurs études<sup>36,19,37</sup>. Cependant les 2 patients porteurs de la mutation du codon 620 ne présentaient aucune manifestation de l'hyperparathyroïdie primaire lors de l'évaluation initiale, d'ailleurs la

pénétrance de l'hyperparathyroïdie associée aux mutations des codons 609, 611, 618 et 620 est estimée de 2 à 12%<sup>36,37</sup>. Pour des raisons pratiques, le dépistage de l'hyperparathyroïdie doit être effectué en même temps que le dépistage du phéochromocytome.

#### **4.2. NEM 2A et le lichen amyloïde cutané :**

Le lichen amyloïde cutané est une maladie rare qui est généralement sporadique, mais qui peut se présenter sous une forme héréditaire, soit en tant qu'entité distincte, soit en association avec d'autres maladies, dont la NEM 2A<sup>38</sup>. Le lichen amyloïde dans la NEM 2A est caractérisé par des lésions dermatologiques qui sont particulièrement évidentes dans la région scapulaire du dos correspondant aux dermatomes T2–T6<sup>39,40</sup>. Le symptôme classique du lichen amyloïde est un prurit intense qui s'améliore avec l'exposition au soleil et qui s'aggrave pendant les périodes de stress. Des lésions hyperpigmentées se développent plus tard, apparemment à la suite d'un grattage. La lésion incitative semble être la notalgie paresthésique, une neuropathie sensitive impliquant les nerfs spinaux dorsaux<sup>38</sup>. Le lichen amyloïde peut être présent dès le plus jeune âge et même avant l'apparition du CMT cliniquement évident, servant ainsi de précurseur pour le syndrome<sup>39,40</sup>. Le lichen amyloïde chez les patients atteints de NEM 2A se développe presque exclusivement chez les patients présentant la mutation RET du codon 634, bien qu'il ait été décrit chez un patient ayant une mutation codon 804<sup>41,42</sup>. Néanmoins aucun malade n'a présenté cette lésion dermatologique dans notre série. Par contre dans une étude, le lichen amyloïde, ou un prurit régional sans cette lésion, sont apparus chez 36 % des patients présentant la mutation du codon 634 du gène RET<sup>40</sup>.



### 4.3. NEM 2A et la maladie de Hirschsprung (MH) :

Les mutations germinales du gène *RET* sont présentes chez 50 % des patients atteints de MH héréditaire et chez 15 à 20 % des patients atteints de MH sporadique<sup>43</sup>. Plus de 100 mutations *RET* ont été décrites dans la MH, notamment des microdélétions et insertions, mutations ponctuelles non-sens ou faux-sens, mutations de site de l'épissage ou des délétions englobant des segments du gène *RET* <sup>44</sup>. Les mutations *RET* chez les patients atteints de NEM 2A et de MD sont des mutations ponctuelles impliquant des codons dans l'exon 10 : 609 (15 %), 611 (5 %), 618 (30 %) et 620 (50 %) <sup>45,46</sup>. La MH se produit chez environ 7 % des patients atteints de NEM 2A<sup>47,48</sup>. Dans notre étude actuelle, nous ne rapportons aucun cas de NEM 2A associé à la MH, ce qui pourrait s'expliquer par la rareté de cette association et par le nombre très limité de cas avec une mutation exon 10.

La MH est presque toujours apparente peu après la naissance ; Cependant, il est important d'exclure la MH chez les patients plus âgés atteints de NEM 2A mutés au niveau de l'exon 10 du gène *RET* et qui présentent des symptômes évoquant la MH. À l'inverse, les patients atteints de MH qui présentent des mutations *RET* exon 10 doivent être évalués pour le syndrome NEM 2A.

Il semble paradoxal que la NEM 2A et la MH se produisent ensemble puisque les mutations *RET* associées à la MH sont des mutations de " loss of function ", alors que les mutations *RET* associées à la NEM 2A sont des " gain of function ". L'explication généralement acceptée de cette double occurrence est que l'activation constitutive de *RET* est suffisante pour déclencher la transformation néoplasique des cellules C et des cellules chromaffines surrénales, mais insuffisante pour générer une réponse trophique dans les neurones précurseurs en raison d'un manque d'expression de la protéine *RET* à la surface des cellules<sup>49</sup>.

#### 4.4. Le carcinome médullaire de la thyroïde familial (CMTF) :

CMTF (OMIM#155240), est caractérisé par la présence d'une mutation germinale *RET* dans les familles atteintes du CMT (ou individus isolés atteints de CMT et sans antécédents familiaux de CMT) qui ne développent ni phéochromocytome ni hyperparathyroïdie. À la base, des critères stricts définissaient le diagnostic de CMTF : plus de dix membres de la famille doivent être atteints du CMT et plusieurs cas porteur de la mutation { dans la même famille} ou affectés âgés de plus de 50 ans, avec disponibilité des antécédents médicaux suffisants (en particulier chez les membres les plus âgés de la famille) afin d'exclure la présence du phéochromocytome et de l'hyperparathyroïdie<sup>32</sup>. Une définition moins stricte était la présence chez au moins quatre membres de la famille de CMT sans autres manifestations de NEM 2A<sup>50</sup>. Définir et distinguer le CMTF de NEM 2A a été un défi, la controverse s'est concentrée sur la crainte que la catégorisation prématurée d'une famille avec le CMTF pourrait aboutir à l'échec de l'identification d'un phéochromocytome<sup>51</sup>. Ceci est illustré par les familles présentant la mutation du codon G533C du gène *RET* située dans l'exon 8. En 2003, une grande famille brésilienne de six générations présentant cette mutation, dont 76 étaient porteurs d'une mutation du gène *RET* (29 avec CMT et aucun avec phéochromocytome ou hyperparathyroïdie), a été décrite comme ayant un CMTF<sup>52</sup>. De plus, deux familles grecques avec la mutation *RET* du codon G533C, dont 20 porteurs, six avec CMT et aucun avec phéochromocytome ou hyperparathyroïdie, ont été signalés comme ayant un CMTF<sup>53</sup>. Par la suite, un patient de la famille brésilienne a développé un phéochromocytome, et des auteurs en Grèce et aux Etats-Unis ont signalé d'autres familles présentant la mutation *RET* du codon G533C qui présentaient un CMT et un phéochromocytome, ce qu'a permis de montrer que cette mutation est associée à la NEM 2A<sup>54,55,56,57</sup>. Actuellement, il n'y a que trois familles documentées qui répondent aux les critères originaux stricts décrits pour le CMTF<sup>32,58,59,60</sup>.

L'opinion de la plupart des experts est que le CMTF ne devrait pas être une entité indépendante, il devrait plutôt représenter une variante du spectre d'expression de la maladie dans NEM 2A<sup>19</sup>.

#### 4.5. La néoplasie endocrinienne multiple type 2B (NEM 2B) :

Chez les patients atteints de NEM 2B, le CMT se manifeste souvent dans la petite enfance et est très agressif, se métastasant précocement aux ganglions lymphatiques régionaux et au-delà. Environ 75 % des cas de NEM 2B sont sporadiques et les patients affectés présentent des mutations *RET* de novo, tandis que 25 % des cas surviennent dans des familles ayant déjà des manifestations de NEM 2B. Environ 95 % des patients avec NEM 2B présentent des mutations germinales *RET* dans l'exon 16 (codon M918T) et moins de 5 % présentent des mutations germinales de *RET* dans l'exon 15 (codon A883F)<sup>61,62,63,64</sup>. Presque tous les rapports publiés sur le syndrome NEM 2B concernent des patients présentant la mutation *RET* codon M918T. On dispose de peu de données concernant le comportement clinique des patients porteurs de la mutation du codon A883F. Cependant, des rapports récents suggèrent que les patients avec la mutation du codon A883F présentent un CMT moins agressif par rapport aux patients avec la mutation du codon M918T<sup>65</sup>.

Environ 50 % des patients atteints de NEM 2B développent des phéochromocytomes. Ils ont également une apparence physique unique caractérisée par un faciès typique, des signes ophtalmologiques (incapacité à produire des larmes dans la petite enfance, paupières épaissies et éversées, ptosis léger, et nerfs cornéens proéminents), malformations squelettiques (morphologie marfanoïde, faciès long et étroit, pieds creux, pectus excavatum, palais ogival, scoliose, et épiphysiolyse fémorale supérieure), et une ganglioneuromatose généralisée dans l'ensemble des voies aérodigestives (Fig. 6). La plupart des patients ont des symptômes abdominaux caractérisés par des ballonnements, constipation intermittente et diarrhée, et certains

patients ont besoin d'une chirurgie pour une obstruction intestinale<sup>66,67</sup>. Il est important d'établir le diagnostic de NEM 2B à un âge précoce, lorsqu'il y a une possibilité que la thyroïdectomie soit curative. Cependant, la réalité est que la plupart des patients atteints de NEM 2B sont diagnostiqués lorsque le CMT est cliniquement évident et à un stade trop avancé pour être traité <sup>68</sup>.



**Figure 19.** Névromes muqueux au niveau des lèvres et de la langue chez un enfant de 13 ans atteint de NEM 2B ( Nagaoka R, Sugitani I, Sanada M, et al. The Reality of Multiple Endocrine Neoplasia Type 2B Diagnosis: Awareness of Unique Physical Appearance Is Important. J Nippon Med Sch 2018; 85)

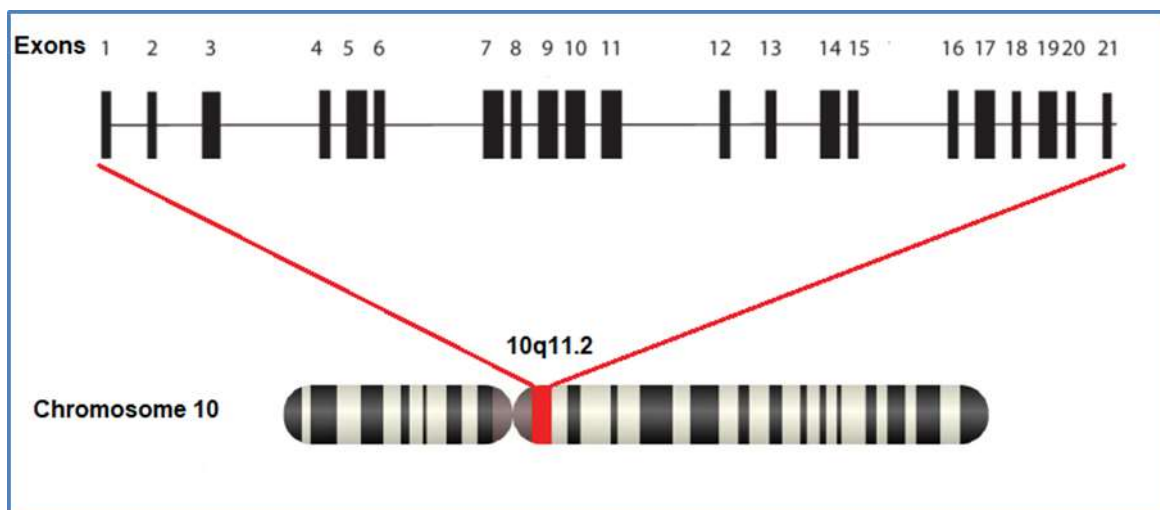
## II. LES ASPECTS GENETIQUES

### 1. La biologie moléculaire :

#### 1.1. Le gène *RET* :

Le seul gène connu lié au syndrome de NEM 2 est le gène *RET* (REarranged during Transfection). Ce gène porte le nom de sa découverte par Masahide Takahashi en 1985 à partir de la transfection des cellules NIH/3T3 (un modèle utilisé pour identifier les gènes à potentiel oncogène) avec l'ADN du lymphome humain. Il a été démontré qu'une forme réarrangée de ce gène cause la transformation de ces cellules. Le gène a été identifié alors comme un oncogène activé par la recombinaison de l'ADN<sup>69</sup>.

Le gène *RET* se positionne sur la région péri-centromérique du chromosome 10, plus précisément, dans la région 11, sous-région 2 du bras long (10q11.2) Figure 20. Il contient 21 exons couvrant 60 Kb de l'ADN génomique et code pour une protéine transmembranaire à activité tyrosine kinase.



**Figure 20.** Localisation et structure de l'oncogène RET (Nicooli-sire et al. 2007).

## 1.2. La protéine RET:

### 1.2.1. Structure et biosynthèse :

Le proto-oncogène *RET* code pour un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase activé par les ligands de la famille GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) comme neurturine, artémine et perséphine.

La région N-terminale du gène *RET* code pour une séquence signal qui dirige RET vers le réticulum endoplasmique (RE). A ce niveau elle subit une glycosylation importante pour former une protéine RET de 150 KDa plus stable. Une autre modification prend place dans l'appareil de Golgi pour former une protéine RET mature de 170 kDa.

La protéine RET se diffère des autres récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) par son domaine extracellulaire qui contient des répétitions de type cadhérine. Cette partie du RET est constituée de quatre domaines cadhérine-like (CLDs 1-4), 110aa chacun, avec une région riche en cystéine. Le domaine extracellulaire du récepteur RET possède 12 sites de glycosylation et un site de liaison au calcium situé entre CLD2 et CLD3. La liaison du ligand est dépendante du calcium, et les ions calcium sont nécessaires à la formation du complexe *RET*-ligand, qui induit ensuite l'autophosphorylation de *RET*. Le calcium est aussi nécessaire pour le repliement correct de *RET* dans le RE<sup>70</sup>.

La région extracellulaire comprend également 120 résidus de la région riche en cystéine, qui est adjacente au domaine transmembranaire. Le domaine intracellulaire de RET contient un domaine kinase typique contenant 12 sites d'autophosphorylation (Y687, Y752, Y806, Y809, Y826, Y900, Y905, Y928, Y981, Y1015, et Y1062). L'épissage alternatif de *RET* donne lieu à trois isoformes protéiques différentes, à savoir RET9 (1072 acides aminés), *RET43* (1106 acides aminés) et *RET51* (1114 acides aminés)<sup>71,72</sup>.

Dans la plupart des tissus, toutes ces isoformes sont co-exprimées. La dimérisation de *RET* induite par un ligand entraîne l'autophosphorylation de divers résidus tyrosine et active ensuite des cascades de signalisation intracellulaire, ce qui affecte un certain nombre de processus cellulaires. Dans des conditions normales, *RET* est activé par les cellules gliales<sup>73</sup>

### **1.2.2. Mécanisme de fonctionnement :**

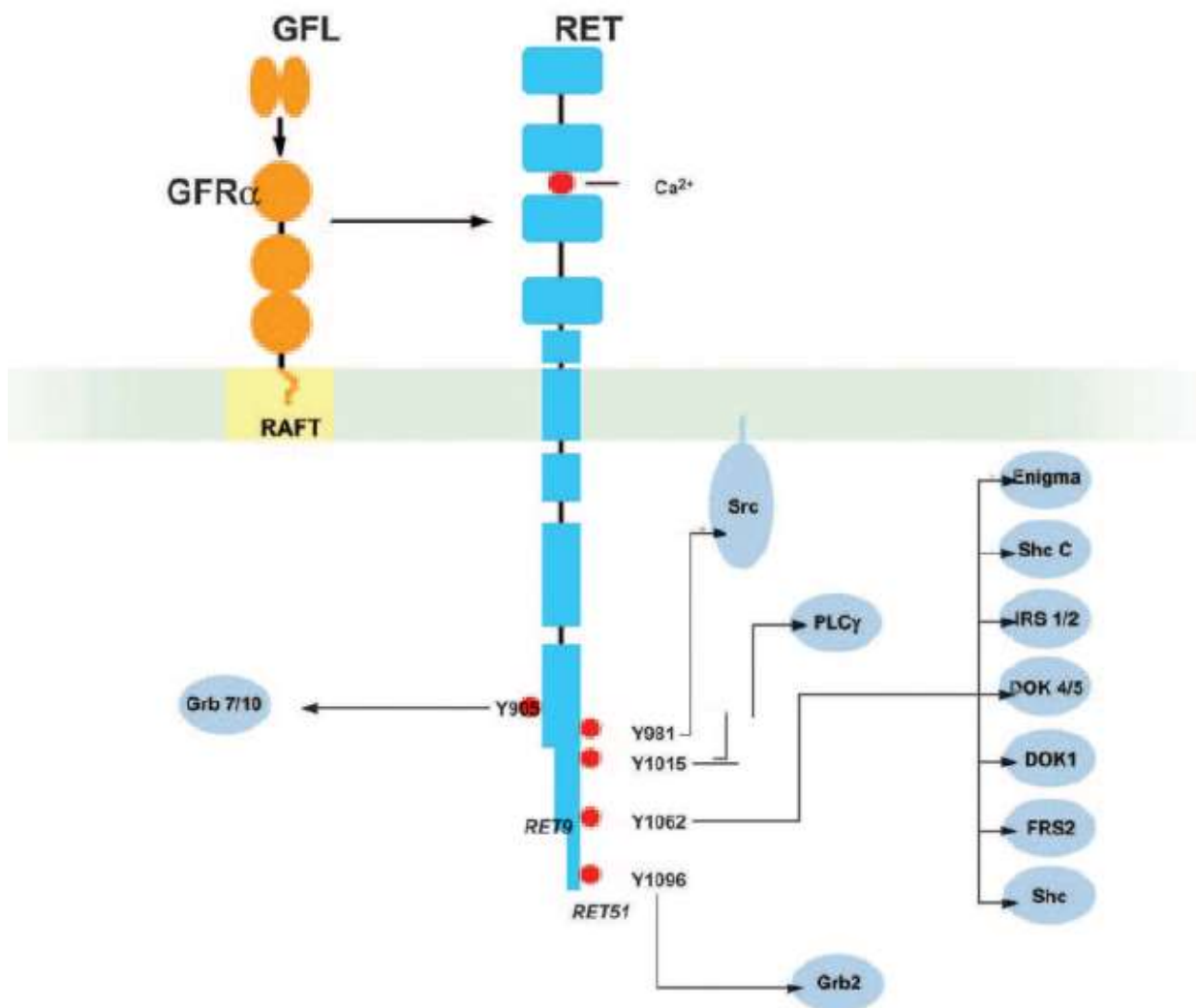
Contrairement aux autres récepteurs tyrosine kinase, la protéine *RET* est unique en son genre. Au lieu de fixer directement le ligand, elle se lie au complexe co-récepteur des ligands de la famille du facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales (GDNF), composé du GDNF, de la neurturine (NRTN), de l'artémine (ARTN) ou de la perséphine (PSPN) et de l'un des quatre récepteurs- $\alpha$  de la famille du GDNF ( $GFR\alpha$ ). ). La liaison du récepteur *RET* avec les complexes des corécepteurs et leurs ligands conduit à la dimérisation des deux récepteurs *RET* voisins, ce qui va activer le domaine catalytique.

Le complexe lié à *RET* est ensuite incorporé dans des sous-domaines transmembranaires riches en cholestérol appelés radeaux lipidiques, où des protéines adaptatrices et de signalisation se lient aux résidus tyrosine kinase intracellulaires de *RET* qui ont subi une dimérisation et une autophosphorylation. Ces protéines de signalisation se lient ensuite à des sites de phosphorylation, principalement la phosphotyrosine 1062 (pY1062) et pY1096, ce qui entraîne l'activation de voies de signalisation telles que la voie RAS/MAPK, la voie RAS/ERK et la voie PI3K/AKT/JNK. Ces voies jouent un rôle dans la différenciation, la croissance, la migration et la survie des cellules. Le récepteur codé joue un rôle important dans le développement du système nerveux, ainsi que dans le développement des organes et des tissus dérivés de la crête neurale.<sup>74</sup> Ce proto-oncogène peut subir une activation oncogène à la fois par réarrangement cytogénétique et par des mutations ponctuelles activatrices. Les

mutations de ce gène sont associées, autre que la NEM type 2, à la maladie de Hirschsprung et au syndrome d'hypoventilation centrale et été identifié chez des patients présentant une agénésie rénale<sup>75</sup>.

Les variants pathogènes à l'origine de NEM type 2 entraînent une activation constitutive (c'est-à-dire un gain de fonction) de la tyrosine kinase. La mutation de la cystéine extracellulaire dans le codon 634 de l'exon 11 provoque une dimérisation indépendante du ligand des molécules réceptrices, une phosphorylation accrue des substrats intracellulaires et une transformation cellulaire. La mutation de la tyrosine kinase intracellulaire (codon 918) n'a aucun effet sur la dimérisation du récepteur mais entraîne une activation constitutive des voies de signalisation et entraîne également une transformation cellulaire. Il y'a une progression significative liée à l'âge de l'HCC au CMT qui est en corrélation avec la capacité de transformation de la mutation *RET* particulière<sup>3</sup>. Les mutations qui activent fortement le proto-oncogène *RET* sont associées à une forme plus agressive de CMT qui se manifeste plus tôt, et les mutations qui entraînent une activation plus faible du *RET* donnent lieu à une forme moins agressive de la maladie qui se manifeste plus tard. Sur la base de cette constatation, une stratégie de stratification des risques a été élaborée. Le CMT est généralement la première manifestation néoplasique observée chez les patients atteints de NEM 2 en raison de son âge d'apparition plus précoce et de son taux de pénétrance plus élevé par rapport au phéochromocytome ou à l'hyperplasie parathyroïdienne. Cela indique que les cellules C sont plus susceptibles à une activation oncogène que les cellules médullaires des surrénales ou parathyroïdiennes<sup>2</sup>.





**Figure 21 .** Dessin schématique de la protéine *RET* avec les quatre domaines extracellulaires de type cadhérine, la boîte riche en cystéine adjacente à la membrane plasmique, le domaine juxtamembranaire intracellulaire et le domaine tyrosine kinase . Les deux formes alternativement épissées, *RET9* et *RET51*, sont indiquées. *RET* est stimulé par des complexes de GFL avec des corecepteurs GFR qui sont distribués dans des rafts lipidiques. Les sites d'autophosphorylation de *RET* sont indiqués (points rouges) avec leurs cibles intracellulaires directes. Les séquences de *RET9* et *RET51* sont identiques jusqu'à Y1062 et divergent ensuite (Santoro et al. Minireview: *RET: Normal and Abnormal Functions*, Endocrinology 2004)

### **1.3. L'analyse directe de l'ADN génomique à la recherche des mutations de l'oncogène *RET***

Un changement de séquence dans le gène *RET* est considéré comme une mutation causale de NEM 2 si elle ségrège avec l'expression clinique de la maladie au sein d'une famille comprenant au moins deux personnes présentant le phénotype NEM 2A ou NEM 2B.

Les patients atteints de CMT apparemment sporadique ou les cas index de NEM 2 doivent être soumis systématiquement au dépistage génétique et au moins les exons 5, 8, 10, 11, 13–15 et 16 de *RET* devraient être analysés par séquençage Sanger<sup>76</sup>. Comme alternative, une approche de séquençage de nouvelle génération (NGS) pourrait être adoptée pour séquencer une plus grande portion du gène<sup>77</sup>. Une fois que la mutation "familiale" a été découverte les apparentés peuvent être analysés que pour cette mutation spécifique. Certains laboratoires utilisent une approche à deux niveaux, en commençant par l'analyse des " Hotspots " les plus fréquemment mutés. Puis ils complètent par séquencer les exons restants si l'analyse initiale est négative ou si le phénotype du patient est incompatible avec la mutation initialement identifiée.

Les patients doivent signer un consentement éclairé pour l'analyse de leur ADN. Les parents des enfants doivent également signer pour consentir à la procédure et aussi pour prendre la responsabilité d'informer l'enfant *RET* positif, lorsqu'ils seront en mesure de le faire, sur son état et sur ce que cela signifie pour sa vie future<sup>78</sup>.

### **1.4. Les variants pathogènes, polymorphisme, variants de signification inconnue (VUS) :**

Jusqu'à la réalisation de ce travail 199 mutations<sup>79</sup> (51.4% classées de signification inconnue, 44.8% pathogènes, 3,3% bénignes et 0.5% sont à l'origine de la maladie de Hirschprung), ont été décrites et rapportées dans une base de données publique continuellement mise à jour : Associated Regional and University Pathologists

online Scintific Resource RET database

Une variante pathogène est à l'origine de la NEM type 2 et ségrège avec les symptômes de la maladie de NEM type 2 au sein d'une famille. La famille doit compter au moins deux individus affectés par la mutation pour démontrer la ségrégation du génotype avec la maladie NEM type 2.<sup>50</sup>

La mutation pathogène la plus fréquente dans notre étude est celle du codon 634 de l'exon 11 dans 77.78% des cas ; C634R (n=4) et C634Y (n=3), suivie par C620R dans 22.22% (n=2) des cas. D'autres études plus large et sur plusieurs populations, notamment coréenne(37.1%), japonaise(60%), chinoise (72.5%) 4,5,80, germanique(67.6%)<sup>36</sup>, espagnole (73%)<sup>81</sup> et turque(52,2%)<sup>6</sup> indique que le codon 634 est le site le plus fréquent des mutations. Ce qui concerne la population marocaine, la mutation du codon 634 a été rapporté comme étant la seule retrouvée chez 9 patients atteints du CMT82, par une étude publiée en 2009 par Ainahi, et al. Ils ont trouvé une mutation pathogène chez 03 patients répartie comme suit : p.C634F (n=1) ; p.C634R (n=1) ; p.C634W (n=1).

Polymorphisme : il s'agit de modification bénigne et germinale de la séquence du gène *RET*, qui ne sont pas responsable de la NEM type 2 ou de maladie de Hirschsprung<sup>79</sup>, Cinq polymorphismes *RET* courants, dont la fréquence allélique est supérieure à 1 %, sont situés dans les zones du proto-oncogène *RET* associées à la NEM type 2 : p.G691S, p.L769L, p.S836S, p.S904S, and c.2608-24G4A<sup>83,84,85, 86</sup>. D'ailleurs nous avons retrouvés chez un cas atteint d'un CMT a priori sporadique, la mutation G691S décrite non pathogène. Ce variant a été considéré par certains auteurs comme ' modificateur génétique ' est donc il pourrait avoir une influence sur l'évolution du CMT et ses caractéristiques cliniques<sup>85,87</sup>.

Variantes de signification inconnues (VUS) : modification de la séquence du gène *RET* de signification clinique inconnue, ne disposant pas de suffisamment d'informations cliniques associées pour déterminer son statut pathogène <sup>79</sup>.

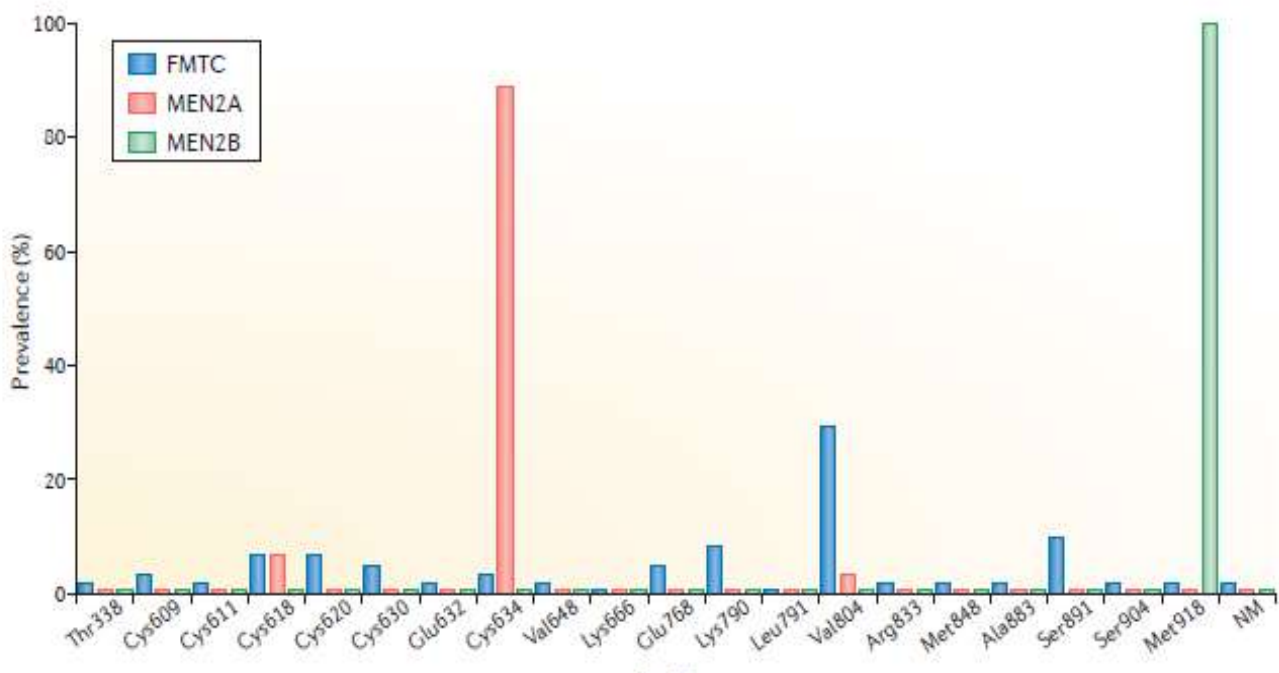
## **2. L'association génotype-phénotype et les implications cliniques :**

Des associations claires ont été documentées entre des mutations spécifiques du gène *RET* (génotype) et l'âge d'apparition, l'agressivité du carcinome médullaire (CMT), ainsi que la présence ou l'absence d'autres néoplasies endocriniennes (phénotype), tel qu'un phéochromocytome ou une hyperparathyroïdie.<sup>88 50 89</sup> (Figure 22)

Ces associations génotype-phénotype peuvent être utilisées pour prédire le phénotype et faire des recommandations concernant l'âge auquel il faut effectuer une thyroïdectomie prophylactique et commencer le dépistage biochimique du phéochromocytome et de l'hyperparathyroïdie.<sup>2</sup> Ceci est particulièrement le cas chez les porteurs présymptomatiques de la mutation *RET*, car une thyroïdectomie prophylactique doit être effectuée avant le développement du CMT, ou du moins lorsque le CMT est confiné dans la glande thyroïde et avant que la maladie ne se propage au-delà de la glande. La nature multicentrique et bilatérale du CMT héréditaire implique une thyroïdectomie totale.

Des recommandations ont été élaborées par un groupe des experts de l'association américaine de la thyroïde (ATA) en 2009 et actualisées en 2015, concernant le timing de la thyroïdectomie prophylactique et l'étendue de la résection chirurgicale ainsi que le moment où on commence le dépistage des autres endocrinopathies, tout cela a été basé sur un modèle qui utilise ces associations entre génotype et phénotype pour stratifier les mutations en trois catégories de risque<sup>19</sup> :

- Plus haut risque ( ATA–HST category ) : comprend les patients atteints de NEM type 2B et la mutation du codon M918T du gène *RET*.
- Haut risque ( ATA–H category ) : comprend les patients présentant des mutations du codon C634 et codon A883F.
- Risque modéré ( ATA–MOD) : inclut les patients présentant des mutations des codons autres que M918T, C634 et A883F.



**Figure 22 . La corrélation génotype phénotype entre les mutations de l'oncogène *RET* et les trois syndromes de NEM 2. Alors que NEM 2A et NEM 2B sont strictement corrélés à la Cys634 et à la Met918, respectivement, le CMTF est associé à plusieurs mutations RET cystéines et non cystéines. NEM 2, néoplasie endocrinienne multiple de type 2 ; CMTF, carcinome médullaire de la thyroïde familial ; NM, non muté. (Cristina.R et al. A comprehensive overview of the role of the RET proto-oncogene in thyroid carcinoma, Nature Reviews 2016)**

L'association entre le phénotype et le génotype peut également avoir des implications importantes pour la gestion des présentations cliniques autres que le CTM chez les patients atteints de NEM type 2 et leurs familles. Si le génotype pouvait être entièrement corrélé avec certaines caractéristiques phénotypiques, le clinicien pourrait alors utiliser le génotype d'un patient pour décider si un dépistage intensif du PHEO ou de HPP est nécessaire chez les patients présentant des mutations associées à un plus grand risque de maladie (Tableau XV).

Le phéochromocytome est associé à des mutations du codon 634 et 918 chez environ 50 % des patients, avec des mutations de l'exon 10 (codons 609, 611, 618 et 620) chez jusqu'à 17 % des patients<sup>90</sup>, et rarement avec des mutations dans les exons 13–15 (codons 791 et 804)<sup>91,92</sup>. L'hyperparathyroïdie dans le cas de NEM 2A est le plus souvent associée aux mutations du codon 634 et en particulier C634R<sup>29</sup>.

Dans notre étude, les patients qui appartiennent à la catégorie du risque haut (ATA-H) sont :

- 04 patients avec la mutation p.C634R (17, 35, 46 et 63 ans): ils ont tous développé le CMT et phéochromocytome synchrone (n=4), dont (n=3) avaient une localisation bilatérale ; 02 avaient aussi une hyperparathyroïdie primaire ;
- 03 patients avec la mutation p.C634Y (24, 27 et 31 ans) : Ils ont tous développé le CMT, mais aucun de ces patients n'a présenté les autres manifestations de NEM 2A au moment du bilan initial.

Pour les patients qui appartiennent à la catégorie du risque modéré (ATA-MOD) :

- 02 patients (01 famille) avec la mutation p.C620R : un seul patient avait un CMT à l'âge de 40 ans et un phéochromocytome bilatéral synchrone ; l'autre patient un enfant de 13 ans, il avait un taux de Ctn > 10pg/ml mais sans documentation pathologique de CMT.

Nos résultats convergent avec les données de la littérature sur la stratification du risque par l'application de la corrélation génotype - phénotype, rendant ainsi facile la prédiction du comportement de la pathologie (âge de début, manifestations associées, agressivité du CMT..) et par la suite proposer une stratégie thérapeutique adéquate (Timing de la thyroïdectomie prophylactique, surveillance, dépistage des apparentés. Ces données sont résumées dans Tableau XV.

Plusieurs études <sup>4,6,8,93</sup> que la mutation C634R/Y est associée à une pénétrance élevée du CMT, une pénétrance modérée du phéochromocytome et une faible pénétrance de l'HPP.

Bien que nous ayons discerné seulement deux cas de mutation C620R, leur évolution clinique suggère une progression lente de la maladie, tel que démontré par la littérature et retenu dans les recommandations de l'ATA.

Tous les cas de NEM 2A associés à la maladie de Hirschsprung sont dus à des mutations dans l'exon 10 (codons 609, 611, 618 et 620).<sup>90</sup>La NEM type 2A avec lichen amyloïde cutané est associé à des mutations du codon 634 à des mutations dans le codon 804<sup>94</sup>.

**Tableau XV. Relation entre les mutations RET communes et le risque de CMT agressif dans les cas de NEM type 2A et de NEM type 2B, et à l'incidence de PHEO, HPT, LAC et MH dans le NEM type 2A. a : , b : risque de l'agressivité du CMT( MOD : modere, H : haut, HST : plus haut), c : incidence du PHEO et HPT : + ≈10% ; ++ ≈20%-30% ; +++ ≈50%. d : N = absence d'association, Y= présence d'association. CMT/MTC : carcinome médullaire de la thyroïde ;PHEO = phéochromocytome ; HPT/HPTH : hyperparathyroïdie ; LAC/CLA : Lichen amyloïde cutané ; HD/MH : maladie de Hirschsprung (Wells et al.Revised American Thyroid Association Guidelines for the Management of Medullary Thyroid Carcinoma, Thyroid 2015)**

RET mutation <sup>a</sup>	Exon	MTC risk level <sup>b</sup>	Incidence of PHEO <sup>c</sup>	Incidence of HPTH <sup>c</sup>	CLA <sup>d</sup>	HD <sup>d</sup>
G533C	8	MOD	+	-	N	N
C609F/G/R/S/Y	10	MOD	+ / ++	+	N	Y
C611F/G/S/Y/W	10	MOD	+ / ++	+	N	Y
C618F/R/S	10	MOD	+ / ++	+	N	Y
C620F/R/S	10	MOD	+ / ++	+	N	Y
C630R/Y	11	MOD	+ / ++	+	N	N
D631Y	11	MOD	+++	-	N	N
C634F/G/R/S/W/Y	11	H	+++	++	Y	N
K666E	11	MOD	+	-	N	N
E768D	13	MOD	-	-	N	N
L790F	13	MOD	+	-	N	N
V804L	14	MOD	+	+	N	N
V804M	14	MOD	+	+	Y	N
A883F	15	H	+++	-	N	N
S891A	15	MOD	+	+	N	N
R912P	16	MOD	-	-	N	N
M918T	16	HST	+++	-	N	N



**Tableau XVI : . Comparaison de nos résultats sur les caractères épidémiologiques et clinicopathologiques (phénotypiques) et génétiques, avec d'autres populations dans la littérature : CMTh : Carcinome médullaire de la thyroïde héréditaire càd les patients atteints de CMT dans le cadre d'une NEM 2A ,2B,CMTF, ou les patients avec antécédents de CMT dans la famille sans critères de CMTF ; PHEO : phéochromocytome ; HPP : Hyperparathyroïdie ; *RET*+ : Mutation pathogène dans le gène *RET* ;(\*) Seuls les données des cas diagnostiqués NEM 2A sont rapportés dans le tableau ;(†) : Seuls les pourcentages du PHEO et HPP chez les cas porteurs des mutations du codon 634 sont représentés ; (‡) Seul l'âge au diagnostic des cas porteurs des mutation du codon 634 est représentés**

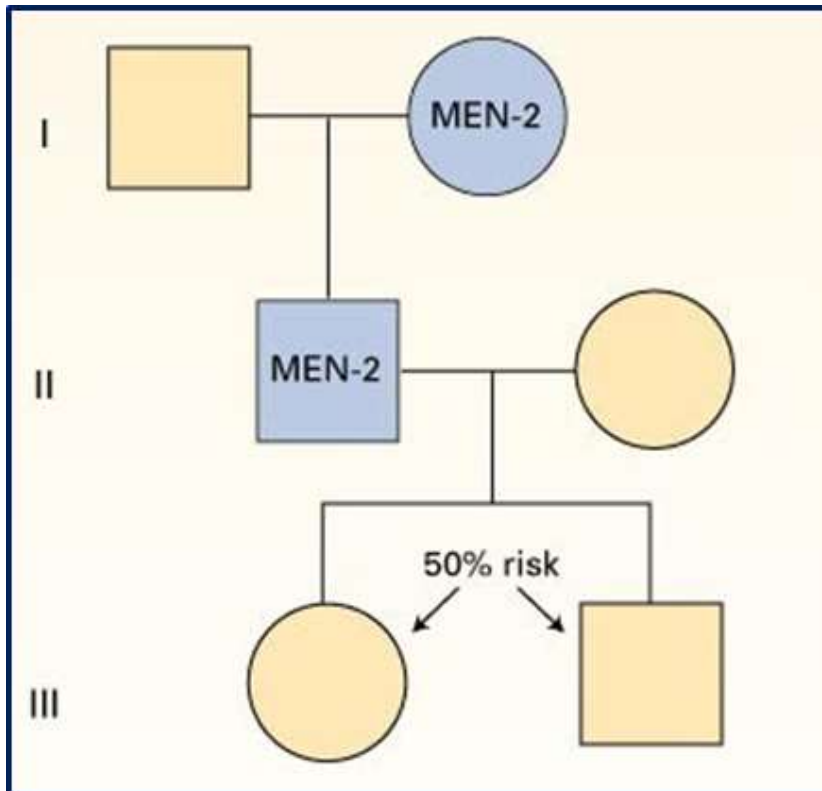
L'étude	Nb de cas	Age au diagnostique ‡	Female (%)	CMTh (%)	Ctn basal (pg/ml)	Métastases ganglionnaires	Métastase à distance	PHEO† (%)	HPT† (%)	RET+(%)	C634 N(%)	C620 N(%)
Notre étude (2022) Nord-Est et Moyen Maroc	27	35.38±1 4.41	6(66.7%)	13(48.14%)	1424±1958 pg/m	1(12.5%)	1(12.5%)	5(55.7%)	2(22.2%)	9(33.3%)	7(77.8%)	2(22.2%)
K.Y. Jung et al. (2018) Corée du Sud	172	34.2 ± 14.8 ans	57.9%	57(33.2%)	1078.4 ± 1775.3 pg/ml	41.8%	1.9%	35.1%	7%	33.13	37.1%	2.9%
Aydoğan Bı et al. (2016)	319	41.3±2.9 ans	--	117 (60.9%)	704±594 pg/ml	15%	21%	--	--	71( 37.2%)	39 (54.9%)	0%

Turquie												
M.Lebeault et al. (2018) France	480	--	--	366(76.3 %)	--	---	---	55 (49.1%)	7(6.3 %)	477 (99.3%)	112 (23.5%)	7(6.3%)
A.Machens et al. (2018) Allemand	597	30.2 ans (25,6 ; 34.9)	--	93.4%	--	28.8%	---	---	---	93.4%	32.5%	5.7%
S. Grozinsky- Glasberg et al. (2007) Israël	51	46.9 ± 18.7	56.9%	19.6%	3903 pg/ml (48-83,750)	23%	3%			17.6 % (9/23)	--	--
Y.Zhou et al. (2007)* Chine	147	33·6 ± 12·4 ans	59%	91.9%				56.8%	10.8%	42(28. 6%)	41.2%	0%
C. Romei et al. (2010) Italie	250	--	--	--	--	--	--	--	--	96.0%	34.8%	2.4%
K.Kameyama et al. (2004) Japon	75	--	--	100%	--	--	--	--	--	100%	60.0%	6.6%
D.Bergant et al. (2006) Slovanie	69	36.0±15. 98	68.9%	26(37.8%)	---	37.0%	0%	80%	40%	42.0%	51.7%	0%

H-L Sarika et al. (2015) Grèce	188	30.5±7.9	--	58(30.8%)	--	--	--	52.6%	15.7%	30.85 %	32.8% (2 <sup>e</sup> après codon 533)	6.9%
B.Sánchez et al. (1999) Espagne	49	--	---	--	--	--	--	--	--	(41) 83.7%	73.4%	2.4%

### 3. Le conseil génétique au cours de la consultation oncogénétique :

Le conseil génétique est le processus qui consiste à fournir aux individus et aux familles des informations sur la nature, le(s) mode(s) d'hérédité et les implications des troubles génétiques afin de les aider à prendre des décisions médicales et personnelles éclairées.



**Figure 23.** Mode de transmission du syndrome NEM2 (Burke, et al. 2002)

- Mode d'hérédité : Tous les sous-types de néoplasie endocrinienne multiple de type 2 (NEM 2) sont transmis selon un mode autosomique dominant.
- Le risque pour les membres de la famille :
  - Les parents d'un proband : La proportion d'individus atteints de NEM type 2 qui ont un parent affecté varie selon le sous-type :
    - NEM type 2A : 95% des individus diagnostiqués ont un parent affecté. 5% des cas sont de novo

Il est approprié d'évaluer les parents d'un individu atteint de NEM type 2A pour détecter les manifestations de la maladie et de proposer un test de génétique si le variant pathogène *RET* a été identifié chez le proband.

- CMT familial : Par définition, les personnes atteintes de FMTC ont plusieurs membres de leur famille qui sont touchés.
- NEM type 2B : 50 % des personnes diagnostiquées NEM type 2B ont un parent atteint et 50% des cas surviennent de novo. La majorité des mutations de novo sont d'origine paternelle, cependant des cas d'origine maternels ont été rapportés.<sup>95</sup>
  - La fratrie d'un proband :
    - Si un des parents du proband porte une mutation germinale pathogène du gène *RET*, le risque pour les frères et sœurs d'hériter de cette variante est de 50 %.
    - La descendance d'un proband :
      - Chaque enfant d'une personne atteinte de NEM type 2, a 50 % de chances d'hériter la mutation.
      - Autres membres de la famille :
        - Le risque pour les autres membres de la famille dépend du statut des parents du proband : si un parent porte une mutation germinale pathogène *RET*, les membres de sa famille sont exposés à un risque accru. Le risque est évalué en analysant l'arbre généalogique de la famille. Un test génétique est indiqué ensuite chez les membres à risque.
- Planification familiale :
  - Le moment optimal pour la détermination du risque génétique et la disponibilité du test prénatal est avant la grossesse.
  - Il est approprié d'offrir un conseil génétique (y compris une discussion sur

les risques potentiels pour la descendance et les options de reproduction) aux jeunes adultes qui sont affectés ou à risque.

▪ Test prénatal et le test génétique préimplantatoire :

- Une fois que le variant pathogène *RET* a été identifié chez un membre de la famille affecté, il est possible d'effectuer un test prénatal pour une grossesse à risque accru et un test génétique préimplantatoire.

- Des différences de point de vue peuvent exister entre les professionnels de la santé et au sein des familles concernant l'utilisation des tests prénataux, en particulier si le test est envisagé dans le but d'interrompre la grossesse plutôt que de poser un diagnostic précoce.

▪ La banque d'ADN :

- C'est la conservation de l'ADN (généralement extrait des globules blancs) en vue d'une éventuelle utilisation future, dans la mesure où il est probable que la méthodologie des tests et notre compréhension des gènes, des variants alléliques et des maladies s'amélioreront à l'avenir, il convient d'envisager de mettre en banque l'ADN des personnes concernées.

### **III. LES MODALITES DE LA PRISE EN CHARGE**

#### **1. Evaluation après le diagnostic initial :**

Pour établir l'étendue de la maladie et les besoins d'un individu diagnostiqué comme ayant une néoplasie endocrinienne multiple de type 2 (NEM 2), les évaluations suivantes sont recommandées si elles n'ont pas déjà été effectuées :

- Orientation vers un endocrinologue ;
- Consultation génétique ;
- Evaluations biochimiques : calcitonine plasmatique, Catécholamines et métanéphrines plasmatiques et/ou urinaire de 24h, calcémie et PTH
- Bilan d'extension pour les patients avec un CMT : TDM TAP injectée, IRM hépatique en cas de présence d'une pathologie nodulaire ou calcitonine > 400 pg/mL.

#### **2. Préventions des manifestations :**

##### **2.1. Thyroïdectomie prophylactique chez les enfants atteints du CMT héréditaire :**

La chirurgie prophylactique s'applique surtout aux patients atteints de syndromes cancéreux héréditaires et doivent idéalement répondre aux critères suivants :

- La mutation génétique à l'origine de la malignité est caractérisée par une pénétration complète ou quasi complète ;
- Il existe un test très fiable pour détecter la mutation ;
- L'organe à risque est sacrificable, ou s'il ne l'est pas, il existe une thérapie pour remplacer la fonction de l'organe ;
- L'organe précancéreux peut être enlevé avec une morbidité minimale et une mortalité quasi nulle ;

- Il existe un test fiable pour déterminer si la chirurgie a été curative.

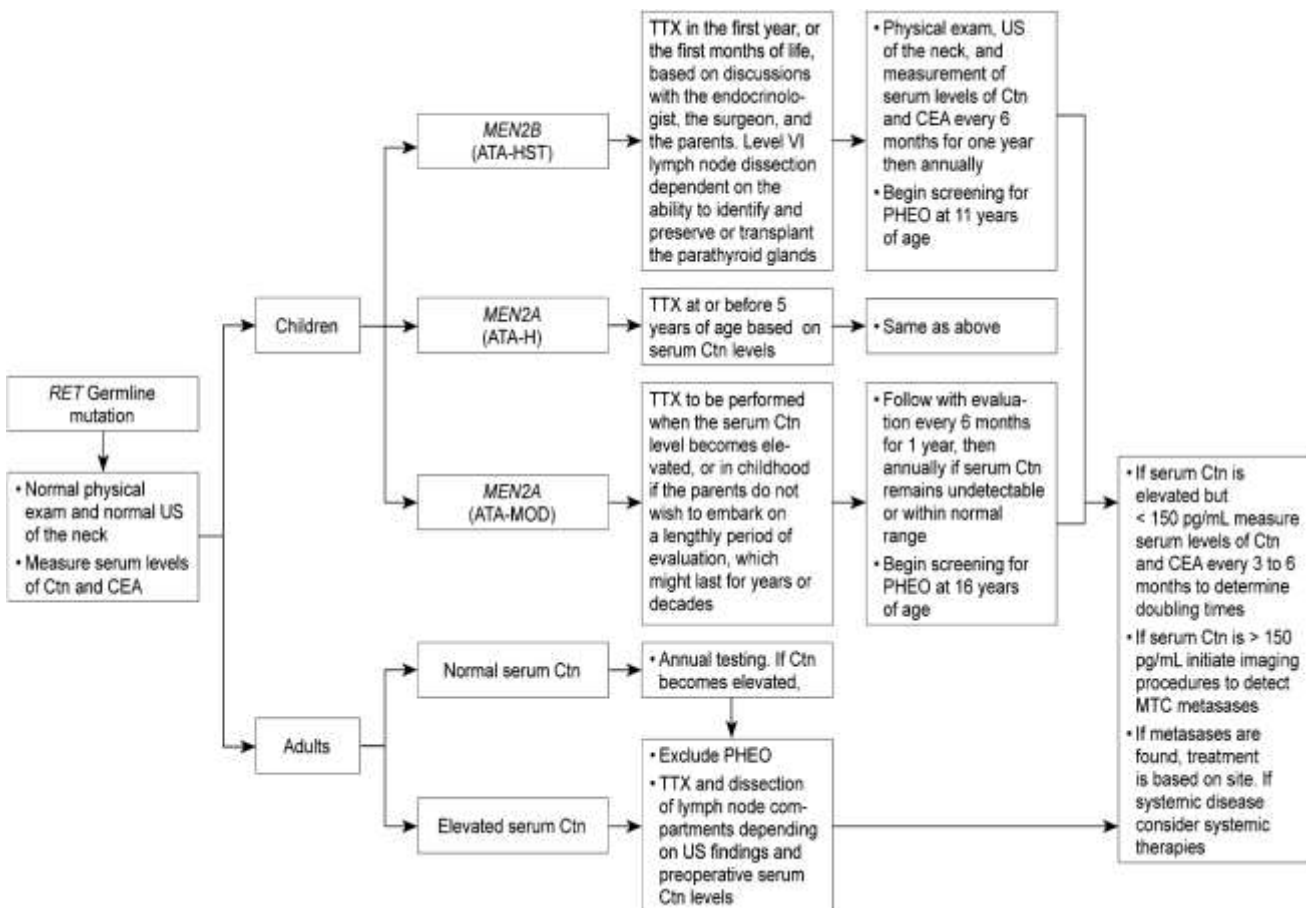
De nombreux syndromes cancéreux héréditaires répondent à certains de ces critères, mais pas à tous, alors que la NEM 2A et NEM 2B répondent à chacun d'entre eux<sup>19</sup>. Chez les patients atteints de CMT héréditaire, on observe une progression classique de l'HCC vers le CTM, puis vers les métastases ganglionnaires locorégionaux et enfin vers les métastases à distance, un processus qui se déroule sur plusieurs mois à plusieurs années et dépend largement de la mutation *RET*<sup>96,97</sup>. Dans ce cas, il est possible d'enlever la thyroïde avant qu'elle ne devienne cancéreuse, ou si le cancer s'est développé, il est confiné à la glande.

Dans le présent contexte, le terme " prophylactique " est utilisé pour définir l'ablation de la thyroïde avant l'apparition du CMT ou pendant qu'il est cliniquement non évident et confiné à la glande. La thyroïdectomie pratiquée à temps pour le CMT modifie favorablement la morbidité et la mortalité qui y sont associées. La question n'est donc pas de procéder à une thyroïdectomie prophylactique chez les patients atteints de CMT héréditaire, mais à quel âge ?

Avec la découverte que les mutations de l'oncogène *RET* causent les syndromes NEM 2 et la reconnaissance de la corrélation entre le génotype et le phénotype, le diagnostic précoce s'est déplacé vers l'analyse directe de l'ADN ( auparavant basé sur la biochimie), Cependant, il est rapidement apparu qu'il existait une grande hétérogénéité dans l'âge d'apparition et l'agressivité du CMT, non seulement entre les différentes familles présentant la même mutation *RET* (à l'exception des mutations du codon 634 et du codon 918), mais au sein des familles ayant la même mutation.

Compte tenu de l'évolution de nos connaissances sur le CMT héréditaire, la décision concernant l'âge de la thyroïdectomie prophylactique ne repose plus sur la seule analyse directe de l'ADN, se repose en outre sur des données cliniques, dont le plus important étant le taux sérique de calcitonine basale ou provoquée<sup>98</sup>.





**Figure 24.** Prise en charge des patients présentant une mutation germinale RET détectée lors du dépistage génétique. ATA, catégories du risque de l'Association Américaine de la Thyroïde pour le carcinome médullaire agressif de la thyroïde (MTC) ( HST : plus haut risque ; H : haut risque ; MOD : risque modéré ) ; Ctn , calcitonine ; CEA, antigène carcinoembryonnaire ;HPTH, hyperparathyroïdie ; PHEO, phéochromocytome ; RET, REarranged during Transfection ; TTX, total thyroidectomy ; US, ultrasound. (Wells et al. 2015)

### **3. Traitement des manifestations :**

#### **3.1. Carcinome médullaire de la thyroïde (CMT) :**

La thyroïdectomie totale et curage des ganglions lymphatiques cervicaux en fonction des taux de Ctn sériques et des résultats de l'échographie cervicale, est le traitement standard des patients atteints de CMT sporadique ou héréditaire<sup>19</sup>. Les patients ayant un nodule thyroïdien palpable présentent un risque élevé de métastases ganglionnaires qui échappent souvent à une détection en préopératoire ou même en peropératoire. Dans une étude, des métastases ganglionnaires ont été détectées chez 27 (75 %) des 36 patients atteints de CMT lors d'une thyroïdectomie totale et du curage ganglionnaire du compartiment central (Niveau VI) et latéral (Niveaux II à V)<sup>99</sup>. De même, dans une autre étude, des métastases ganglionnaires ont été trouvées chez plus de 75 % des 73 patients atteints de CMT traités par thyroïdectomie totale et curage ganglionnaire cervicale fonctionnel central et bilatéral immédiat ou différé<sup>100</sup>. Si on considère tous les patients dans notre série, CMT héréditaire et sporadique, le taux des métastases ganglionnaires cervicaux sera 30.0% (n= 6), un pourcentage bien évidemment moins élevé que celui rapporté dans les études citées ci-dessus. Parmi les vingt patients atteints de CMT, nous n'avons pas pu connaître le statut des ganglions lymphatiques chez 06 patients en raison de l'absence de documentation anatomopathologique des pièces opératoires et souvent ces patients ont été adressés des autres CHU pour étude moléculaire. Cela pourrait contribuer à la sous-estimation de métastase ganglionnaire dans notre série.

Le taux sérique basal de Ctn préopératoire est également utile pour déterminer l'étendue des métastases ganglionnaires.<sup>15</sup>

Bien qu'imparfaite, la détermination du taux sérique basal de Ctn fournit des informations utiles pour la prise en charge chirurgicale des patients atteints de CMT, des informations importantes peuvent également être obtenues à partir des taux sériques de ACE<sup>97</sup>. En présence des métastases locorégionales étendues ou à distance, une chirurgie moins agressive au niveau du compartiment central et latéral du cou peut être appropriée pour préserver la parole, la déglutition, la fonction parathyroïdienne et la mobilité de l'épaule. La radiothérapie externe (EBRT), une thérapie médicale systémique et d'autres thérapies non chirurgicales doivent être envisagées pour obtenir un contrôle local de la tumeur, dans ce contexte plusieurs inhibiteurs de la kinase – vandétanib (AMM en 2012 par FDA et EMA), cabozantinib (AMM en 2011 par FDA et EMA) et BLU-667 – ont amélioré la survie sans progression et, dans certains cas, ont fait régresser la maladie dans les cas de CMT non résécable ou métastatiques avancés<sup>101,102,103</sup>.

### **3.2. Phéochromocytome dans la NEM 2A et NEM 2B :**

Les phéochromocytomes se manifestent généralement au cours de la troisième ou de la quatrième décennie de la vie. Chez les patients atteints de NEM 2A et le diagnostic est généralement posé en même temps que le diagnostic de CMT ou à la suite de celui-ci. Un phéochromocytome non diagnostiqué chez un patient subissant une thyroïdectomie peut entraîner une morbidité importante, voire le décès. Ainsi, chez les patients atteints de CMT héréditaire, il est essentiel d'exclure la présence d'un phéochromocytome avant la thyroïdectomie en mesurant les métanéphrines libres ou les métanéphrines urinaires fractionnées, ou les deux. Soit la TDM ou l'IRM peuvent confirmer la localisation d'un phéochromocytome. Si un patient présente à la fois un CMT et un phéochromocytome, ce dernier doit toujours être traité en premier. Chez les patients qui présentent un CMT, et dont on ne sait pas s'il est sporadique ou familial, un phéochromocytome doit être exclu avant la thyroïdectomie si la détermination du

statut RET prend un temps excessif. Un phéochromocytome doit également être exclu chez les patientes atteintes de NEM 2 qui souhaitent être enceintes. Les phéochromocytomes diagnostiqués pendant la grossesse doivent être réséqués avant le troisième trimestre si possible<sup>19</sup>. Après une surrénalectomie bilatérale, il existe un risque d'insuffisance surrénalienne, la surrénalectomie unilatérale est donc indiquée chez les patients présentant une phéochromocytome solitaire, bien que la majorité d'entre eux développeront un phéochromocytome controlatéral dans les 10 ans<sup>35,104</sup>. Les phéochromocytomes bilatéraux doivent être réséqués avec une couverture de corticostéroïdes en peropératoire et en postopératoire. Les patients dépourvus de glandes surrénales ont besoin d'un traitement substantif par glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes et doivent être surveillés attentivement pour s'assurer que leurs taux de stéroïdes sont adéquats.

La surrénalectomie laparoscopique ou la surrénalectomie rétropéritonéoscopique est la procédure de choix pour le traitement des phéochromocytomes unilatéraux ou bilatéraux<sup>105</sup>. La surrénalectomie subtotale qui préserve 10 % à 15 % du tissu cortical surrénalien résiduel semble offrir une capacité de stress surrénalien suffisante pour éviter la nécessité d'une supplémentation en corticostéroïdes chez plus de 80 % des patients des patients<sup>106,107</sup>. Le risque de récurrence du phéochromocytome est cependant de 20 % dans les 20 ans suivant une surrénalectomie subtotale<sup>108</sup>.

### **3.3. Hyperparathyroïdie dans la NEM 2A :**

La surveillance de l'hyperparathyroïdie doit comprendre une mesure de la calcémie corrigée ou une mesure du calcium sérique ionisé (avec ou sans taux de PTH intacte dans le sérum) à partir de l'âge de 11 ans chez les patients de la catégorie ATA-H et à l'âge de 16 ans chez les patients de la catégorie ATA-MOD<sup>19</sup>.

Plusieurs choix de traitement sont possibles pour les patients atteints d'hyperparathyroïdie sans chirurgie du cou préalable :

- La parathyroïdectomie subtotale laissant une glande ou un morceau de glande in situ ;
- Une parathyroïdectomie totale avec totale avec autotransplantation de petites lamelles de tissu parathyroïdien parathyroïde dans un site hétérotopique ;
- La résection des glandes hypertrophiées uniquement, avec surveillance peropératoire de la PTH, afin de documenter une ablation complète de l'hyperfonctionnement du tissu parathyroïdien<sup>109</sup>.

Au fur et à mesure que la prise en charge chirurgicale des patients atteints de NEM 2A et d'hyperparathyroïdie a évolué, l'option 3 est devenue la procédure préférée<sup>109,110</sup>. La prise en charge de l'hyperparathyroïdie chez l'enfant est similaire à celle de l'adulte ; Cependant, en raison de la rareté de la maladie chez les jeunes, il existe peu de données sur les résultats à long terme.

Une situation plus difficile se présente lorsque l'hyperparathyroïdie se développe après une thyroïdectomie. Dans ce contexte, la recherche préopératoire (à l'aide d'une scintigraphie au MIBI, d'une échographie ou d'un scanner) doit précéder une nouvelle exploration du cou. Lors de la réintervention, toutes les parathyroïdes hypertrophiées doivent être enlevées et les parathyroïdes de taille normale doivent être laissées in situ. Par contre si une seule parathyroïde hypertrophiée est identifiée et qu'il y a une documentation histologique confirmant que trois glandes parathyroïdes ont été enlevées lors de la première intervention, une partie de la glande hypertrophiée doit être soit laissée in situ avec une vascularisation adéquate, soit greffée sur un site hétérotopique<sup>19</sup>.

#### **4. Problèmes éthiques rencontrés dans la prise en charge des patients atteints de NEM 2:**

##### **4.1. Le test génétique chez les adultes :**

Le CMT familial se distingue des autres maladies héréditaires pour lesquelles le dépistage génétique des apparentés est pratiqué, car les tests sont précis, les résultats sont relativement faciles à interpréter, la pénétrance de la maladie est élevée et la chirurgie prophylactique est très efficace. Par conséquent, la prise de décision médicale et les avantages cliniques qui en découlent sont inexorablement liés aux résultats. En outre, les résultats des tests génétiques dans le CMT ont une influence sur la prise en charge médicale du patient index en ce qui concerne le diagnostic et la prise en charge ultérieure d'autres pathologies liées à la NEM type 2 et fournissent des informations pronostiques sur son CMT, et ont également un impact sur les membres de sa famille.

D'un point de vue éthique, le principe d'autonomie accorde à un individu la liberté de refuser un test génétique en supposant qu'il ou elle soit pleinement informé(e) des risques, des avantages et des conséquences de la décision, et qu'elle/il a la capacité de prendre cette décision<sup>111</sup>. Un dilemme éthique se pose dans les rares cas où un patient chez qui on a diagnostiqué un CMT familial refuse que les membres de sa famille soient informés de leur risque, ainsi que dans les cas où les parents ou tuteurs d'enfants à risque refusent qu'ils soient testés. Il existe donc un paradoxe selon lequel l'expression de l'autonomie d'une personne limite implicitement la capacité des autres à exercer leur propre autonomie, Quelle autonomie respectons-nous ? Bien que l'obligation première du médecin soit envers son patient, les individus et leurs maladies n'existent pas en vase clos, et il existe toujours un devoir de protéger les autres<sup>112</sup>. La seule façon de concilier ces revendications contradictoires est de reconnaître l'autonomie d'un individu dans le contexte d'un dialogue ouvert qui reconnaît les intérêts de toutes les

parties concernées<sup>113</sup>.

#### **4.2. Divulgence d'informations sans consentement :**

La société américaine de la génétique humaine, décrit les " circonstances exceptionnelles " qui autorisent la divulgation des risques génétiques aux membres de la famille sans le consentement du patient. D'abord, dans de telles situations, on suppose que le préjudice qui peut résulter de la non-divulgation d'une information dépasse le préjudice qui peut résulter de la divulgation elle-même. Une fois que ce critère est rempli, " la divulgation devrait être autorisée lorsque les tentatives d'encourager la divulgation de la part du patient ont échoué ; lorsque le préjudice est hautement susceptible de se produire et qu'il est grave et prévisible ; lorsque les membres à risque sont identifiables ; et lorsque la maladie est évitable/traitable ou les recommandations médicales indiquent qu'une surveillance précoce réduira le risque génétique"<sup>114</sup>.

# LIMITATIONS



Ce travail présente certaines limitations, principalement la nature rétrospective de la collecte des données et l'hétérogénéité des observations des patients, ce qui nous a obligés d'exclure les dossiers inexploitable et pourrait conduire ainsi vers un biais de sélection. En plus le nombre très limité des cas ne nous a pas permis de détecter une éventuelle différence statistiquement significative entre les paramètres étudiés épidémiologiques et clinicopathologiques des cas sporadiques et héréditaires d'un côté, et entre les différents groupes moléculaires de l'autre coté.

# CONCLUSION

La néoplasie endocrinienne multiple type 2 est un syndrome cancéreux héréditaire qui offre un modèle unique sur le rôle pivot de l'information génétique dans la prise en charge et la guérison d'un patient atteint du cancer héréditaire. Nos résultats préliminaires suggèrent que le codon 643 de l'exon 11 est le site fréquent des mutations du gène RET chez les cas de NEM 2A provenant de la région moyenne et nord-est du Maroc, à l'instar des autres ethnies.

L'association génotype-phénotype, qui constitue la base de la stratification du risque, permet de prédire l'âge d'apparition du CMT et la pénétrance des endocrinopathies associées, et donc de guider la stratégie de surveillance. Nous avons aussi montré l'utilité de la classification ATA (American Thyroid Association) pour établir le risque et proposer le moment de la thyroïdectomie prophylactique et l'âge de début de la surveillance à vie du phéochromocytome et l'hyperparathyroïdie. Nous soulignons également l'importance du dépistage génétique auprès des apparentés à risque d'un cas index, après un conseil génétique claire et simple lors de la consultation oncogénétique.

Au final L'identification précoce des patients atteints de CMT héréditaire à l'aide d'un dépistage moléculaire par étude du proto-oncogène RET a permis de contourner la présentation d'une tumeur cliniquement évidente (cas index) à une maladie préclinique (cas de dépistage), ce qui permet d'obtenir un taux de guérison élevé pour les patients atteints en recourant à des traitements préventifs, une meilleure espérance et qualité de vie.

En perspective, nous visons à concevoir une étude de plus grande envergure afin de mieux caractériser le profil de nos patients et de surmonter les limites actuelles. Nous souhaitons également pouvoir séquencer le gène entier pour lesquels (patients) nous n'avons pas trouvé de mutation dans les exons étudiés.

# RÉSUMÉS

## Résumé

**Introduction :** La néoplasie endocrinienne multiple type 2 (NEM2), est une affection multigandulaire héréditaire autosomique dominante à pénétrance complète, associant en fonction du phénotype, le carcinome médullaire de la thyroïde, le phéochromocytome, l'hype

rparathyroïdie, des manifestations cutanées, ganglioneuromatose digestive et sous-muqueuse et dysmorphie marfanoïde. Plusieurs mutations germinales du gène RET ((REarranged during Transfection) ont été associées à certaines caractéristiques clinicopathologiques (âge de début du carcinome médullaire de thyroïde, l'agressivité du CMT et l'association avec d'autre endocrinopathies) rendant la corrélation génotype-phénotype forte.

**Méthodologie :** Notre travail consiste à réaliser une étude rétrospective-transversale, étalée sur 5 ans, allant de Janvier 2015 à Janvier 2020 concernant 27 cas, portant sur les caractéristiques clinicopathologique (phénotype) et génotypiques chez les cas atteints de NEM 2. Les données clinicopathologiques et moléculaires obtenues par séquençage du gène RET, ont été collectées des dossiers des malades auprès de l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique au CHU Hassan II- Fès.

**Résultats :** Nous avons détecté une mutation pathogène du gène RET chez 09 patients (33.33%). La mutation C634R a été retrouvée chez 04 patients (04 familles) ; C634Y chez 03 patients (02 familles) ; C620R chez 02 patients (01 famille). Parmi les 20 patients qui avaient un CMT, 6(30.0%) présentaient des métastases ganglionnaires locorégionales et 7(35.0%) des métastases à distance au moment du diagnostic, l'âge du diagnostic était de  $36.19 \pm 15.09$  ans. L'étude analytique des paramètres épidémiologiques et clinicopathologiques n'a pas montré une différence statistiquement significative entre les cas héréditaires (RET+) et sporadiques (RET-) du

CMT. La pénétrance des tumeurs endocrinienne dans les cas ayant la mutation C634R/Y (catégorie du risque haut de l'ATA) était : 07 cas du CMT (100%) ; 04 cas du PHEO (57.1%) dont 03 sont bilatérales ; 02 cas d'HPP (28.6%). Pour la mutation C620R (catégorie du risque modéré de l'ATA) nous avons deux cas ; un avait 40 ans au moment du diagnostic de CMT et un phéochromocytome bilatérale synchrone, l'autre un enfant de 13 ans qui avait seulement un taux de Ctn >10pg/ml sans aucune documentation pathologique du CMT.

## Summary

**Introduction:** Multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN2) is an autosomal dominant multiglandular disorder with complete penetrance, associating, depending on the phenotype, medullary thyroid carcinoma, pheochromocytoma, hyperparathyroidism, cutaneous manifestations, digestive and submucosal ganglioneuromatosis and marfanoid dysmorphism. Several germline mutations of the RET (REarranged during Transfection) gene have been associated with certain clinicopathological features (age of onset of medullary thyroid carcinoma, aggressiveness of CMT and association with other endocrinopathies) making the genotype–phenotype correlation strong.

**Methodology:** Our study consists in carrying out a retrospective–transversal study, extended over 5 years, from January 2015 to January 2020, concerning 27 cases, on the clinicopathological (phenotype) and genotypic characteristics of cases with MEN 2. The clinicopathological and molecular data obtained by sequencing of the RET gene were collected from the patients' records at the medical genetics and oncogenetics unit at the Hassan II University Hospital in Fez.

**Results:** We identified a pathogenic mutation of the RET gene in 09 patients (33.33%). The C634R mutation was found in 04 patients (04 families); C634Y in 03 patients (02 families); C620R in 02 patients (01 family). Among the 20 patients who had CMT, 6(30.0%) had locoregional lymph node metastases and 7(35.0%) had distant metastases at the time of diagnosis, the age at diagnosis was  $36.19 \pm 15.09$ . The analytical study of the epidemiological and clinicopathological parameters did not show a statistically significant difference between hereditary (RET+) and sporadic (RET–) cases of MTC. The penetrance of endocrine tumours in cases with C634R/Y mutation (high risk category of ATA) was: 07 cases of MTC (100%); 04 cases of PHEO (57.1%) of

which 03 are bilateral; 02 cases of HPP (28.6%) For the C620R mutation (moderate risk category of ATA) we have two cases; one was 40 years old at the time of diagnosis of CMT and a synchronous bilateral pheochromocytoma, the other a 13 year old child who only had a Ctn level  $>10\text{pg/ml}$  without any pathological documentation of MTC.



## ملخص

**مقدمة:** الورم الصماوي المتعدد من النوع الثاني هو اضطراب وراثي جسمي سائد متعدد الغدد مع انتفاذ كامل، مرتبط حسب النمط الظاهري بسرطان الغدة الدرقية النخاعي، ورم القواتم ، فرط نشاط الدرقية، أعراض جلدية ، أورام العصب العصبي الهضمي وتحت المخاطي والتشوهات مرفانية. ارتبطت العديد من طفرات التناسلية في المورثة RET ببعض السمات الإكلينيكية المرضية {عمر ظهور سرطان الغدة الدرقية النخاعي ، عدوانيته، والارتباط مع اعتلالات الغدد الصماء الأخرى} مما يجعل ارتباط النمط الجيني والنمط الظاهري قويًا.

**المنهجية:** تتكون دراستنا من إجراء دراسة استعادية مستعرضة ، ممتدة على مدى 5 سنوات ، من يناير 2015 إلى يناير

2020 ، تتعلق بـ 27 حالة ، على الخصائص الإكلينيكية المرضية (النمط الظاهري) والخصائص الوراثية للحالات المصابة بالورم الصماوي المتعدد من النوع الثاني - البيانات الإكلينيكية والجزئية المتعلقة بالتسلسل الجيني لمورثة تم الحصول عليها من سجلات المرضى بوحدة الوراثة الطبية وعلم الوراثة في مستشفى الجامعي الحسن الثاني بفاس.

**النتائج :** حددنا طفرة ممرضة في المورثة RET عند 09 مرضى {33.33%}؛ تم تحديد الطفرة C620R عند 04 مرضى {04 عائلات} ؛ و الطفرة C634Y عند 03 مرضى {02 عائلات} ؛ و الطفرة C620R عند 02 مرضى {عائلة واحدة من بين 20 مريضًا مصابًا بسرطان الغدة الدرقية النخاعي، كان 6 مرضى (30.0%) مصابين بنقائل العقد الليمفاوية المرضية و 7 مرضى (35.0%) لديهم نقائل بعيدة في وقت التشخيص، كان العمر عند التشخيص  $36.19 \pm 15.09$  سنة. لم تظهر الدراسة التحليلية للمتغيرات الوبائية والمرضية الإكلينيكية فروق ذات دلالة إحصائية بين الحالات الوراثية (الحاملة لطفرة) و الفردانية للأورام الغدد الدرقية و القواتم.

كان انتفاذ أورام الغدد الصماء في حالات طفرة C634R / Y (فئة عالية الخطورة حسب تصنيف الجمعية الأمريكية للغدة الدرقية) : 07 حالات سرطان الغدة الدرقية النخاعي (100%) ؛ 04 حالات ورم القواتم (57.1%) منها 03 حالات ثنائية ؛ 02 حالة من فرط نشاط الدرقية (28.6%) بالنسبة لطفرة C620R (فئة الخطر المتوسط حسب تصنيف الجمعية الأمريكية للغدة الدرقية) لدينا حالتان ؛ كان أحدهم يبلغ من العمر 40 عامًا في وقت تشخيص سرطان الغدة الدرقية النخاعي مع ورم القواتم الثنائي المتزامن ، والآخر كان يبلغ من العمر 13 عامًا وجدنا عنده مستوى مرتفع من هرمون الكالسيتونين أكبر من 10 بيكوغرام/ملل) دون أي توثيق مرضي لسرطان الغدة الدرقية.

# ANNEXES

## Observation Médicale

- ❖ Identité :
- Sexe :
- Age au diagnostic :
- ATCDs personnels :
- ATCDs familiaux :
- Circonstance de diagnostic :
  - Cas index :
  - Dépistage familiale
- ❖ Examen clinique :
- ❖ Examen paraclinique :
  - Echographie cervicale :
  - TDM/IRM /autres :
  - Calcitonine basale / après stimulation :
  - CEA :
  - Métaéphrine/normétaéphrine urinaire de 24h
  - Calcémie corrigée/ionisée :
  - PTH 1-84 :
  - Vtt D :
- ❖ Etude histopathologie :
  - CMT :
  - Ganglions cervicaux
  - PHEO :
  - HPT :
- ❖ Etude génétique :
  - Exon 10 :
  - Exon 11 :
  - Exon 8,13, 14, 15, et 16 :
- ❖ Diagnostic retenu :

- ❖ Prise en charge thérapeutique :
  - CMT :
    - Thyroïdectomie prophylactique.
    - Thyroïdectomie curative :
    - Curage ganglionnaire :
    - Radiothérapie externe :
    - Thérapie ciblée :
    - Métastases à distance :
    - Surveillance/rechute :
  - PHEO :
    - Surrénalectomie par laparoscopie :
    - Chirurgie d'épargne surrénalienne :
    - Surveillance /rechute
  - HPT :
    - Parathyroïdectomie subtotale :
    - Parathyroïdectomie totale + autogreffe :
    - Surveillance /rechute : |

# BIBLIOGRAPHIE

- 1 Raue F, Frank–Raue K. Update multiple endocrine neoplasia type 2. *Fam Cancer* 2010; **9**: 449–57.
- 2 Raue F, Frank–Raue K. Genotype–phenotype correlation in multiple endocrine neoplasia type 2. *Clinics* 2012; **67**: 69–75.
- 3 Machens A, Niccoli–Sire P, Hoegel J, et al. Early malignant progression of hereditary medullary thyroid cancer. *N Engl J Med* 2003; **349**: 1517–25.
- 4 Jung KY, Kim SM, Kim MJ, et al. Genotypic characteristics and their association with phenotypic characteristics of hereditary medullary thyroid carcinoma in Korea. *Surgery* 2018; **164**: 312–8.
- 5 Zhou Y, Zhao Y, Cui B, et al. RET proto–oncogene mutations are restricted to codons 634 and 918 in mainland Chinese families with MEN2A and MEN2B. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007; **67**: 570–6.
- 6 Aydoğan Bİ, Yüksel B, Tuna MM, et al. Distribution of RET Mutations and Evaluation of Treatment Approaches in Hereditary Medullary Thyroid Carcinoma in Turkey. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2016; **8**: 13.
- 7 Grozinsky–Glasberg S, Benbassat CA, Tsvetov G, et al. Medullary thyroid cancer: A retrospective analysis of a cohort treated at a single tertiary care center between 1970 and 2005. *Thyroid* 2007; **17**: 549–56.
- 8 Lebeault M, Pinson S, Guillaud–bataille M, et al. Nationwide French Study of RET Variants Detected from 2003 to 2013 Suggests a Possible Influence of Polymorphisms as Modifiers To cite this version: HAL Id: hal–01731580 Nationwide French study of RET variants detected from 2003 to 2013 suggests a possi. 2018.
- 9 Callender GG, Rich TA, Perrier ND. Multiple endocrine neoplasia syndromes. *Surg Clin North Am* 2008; **88**: 863–95.

- 10 Cohen MS, Moley JF. Surgical treatment of medullary thyroid carcinoma. *J Intern Med* 2003; **253**: 616–26.
- 11 Moley JF, Debenedetti MK, Dilley WG, Tisell LE, Wells SA. Surgical management of patients with persistent or recurrent medullary thyroid cancer. *J Intern Med* 1998; **243**: 521–6.
- 12 Elisei R, Romei C, Cosci B, et al. RET genetic screening in patients with medullary thyroid cancer and their relatives: experience with 807 individuals at one center. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; **92**: 4725–9.
- 13 Yun JC, Kim HH, Kim HJ, et al. RET proto-oncogene mutations are restricted to codon 634 and 618 in Korean families with multiple endocrine neoplasia 2A. *Thyroid* 2004; **14**: 813–8.
- 14 DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU EC. *Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs*. 2004.
- 15 Machens A, Dralle H. Biomarker-based risk stratification for previously untreated medullary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; **95**: 2655–63.
- 16 Khurana R, Agarwal A, Bajpai VK, et al. Unraveling the amyloid associated with human medullary thyroid carcinoma. *Endocrinology* 2004; **145**: 5465–70.
- 17 Mendelsohn G, Jr SAW, Baylin S 6. Relationship of Tissue Carcinoembryonic Antigen and Calcitonin to Tumor Virulence in Medullary Thyroid Carcinoma An Immunohistochemical Study in Early, Localized, and Virulent Disseminated Stages of Disease. .
- 18 Wolfe HJ, Melvin KEW, Cervi-Skinner SJ, et al. C-cell hyperplasia preceding medullary thyroid carcinoma. *N Engl J Med* 1973; **289**: 437–41.
- 19 Wells SA, Asa SL, Dralle H, et al. Revised American thyroid association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2015; **25**: 567–610.

- 20 Mete O, Asa SL. Precursor lesions of endocrine system neoplasms. *Pathology* 2013; **45**: 316–30.
- 21 Pomares FJ, Cañas R, Rodriguez JM, Hernandez AM, Parrilla P, Tebar FJ. Differences between sporadic and multiple endocrine neoplasia type 2A pheochromocytoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998; **48**: 195–200.
- 22 Pacak K, Ilias I, Adams KT, Eisenhoffer G. Biochemical diagnosis, localization and management of pheochromocytoma: focus on multiple endocrine neoplasia type 2 in relation to other hereditary syndromes and sporadic forms of the tumour. *J Intern Med* 2005; **257**: 60–8.
- 23 Thosani S, Ayala-Ramirez M, Palmer L, et al. The characterization of pheochromocytoma and its impact on overall survival in multiple endocrine neoplasia type 2. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; **98**. DOI:10.1210/JC.2013-1653.
- 24 Machens A, Lorenz K, Dralle H. Peak Incidence of Pheochromocytoma and Primary Hyperparathyroidism in Multiple Endocrine Neoplasia 2: Need for Age-Adjusted Biochemical Screening. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; **98**: E336–45.
- 25 Modigliani E, Vasen HM, Raue K, et al. Pheochromocytoma in multiple endocrine neoplasia type 2: European study. The Euromen Study Group. *J Intern Med* 1995; **238**: 363–7.
- 26 Ilias I PK. Diagnosis, localization and treatment of pheochromocytoma in MEN 2 syndrome – PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19856714/> (accessed Dec 29, 2021).
- 27 Fiebrich HB, Brouwers AH, Kerstens MN, et al. 6-[F-18]Fluoro-l-Dihydroxyphenylalanine Positron Emission Tomography Is Superior to Conventional Imaging with 123I-Metaiodobenzylguanidine Scintigraphy, Computer Tomography, and Magnetic Resonance Imaging in Localizing Tumors Causing Catecholamine Excess. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; **94**: 3922–30.

- 28 Ilias I, Chen CC, Carrasquillo JA, et al. Comparison of 6–18F–fluorodopamine PET with 123I–metaiodobenzylguanidine and 111In–pentetreotide scintigraphy in localization of nonmetastatic and metastatic pheochromocytoma. *J Nucl Med* 2008; **49**: 1613–9.
- 29 Schuffenecker I, Virally–Monod M, Brohet R, et al. Risk and penetrance of primary hyperparathyroidism in multiple endocrine neoplasia type 2A families with mutations at codon 634 of the RET proto–oncogene. Groupe D’étude des Tumeurs à Calcitonine. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; **83**: 487–91.
- 30 Carling T, Udelsman R. Parathyroid surgery in familial hyperparathyroid disorders. *J Intern Med* 2005; **257**: 27–37.
- 31 Brenner ME, Jacene HA. Recurrent or residual hyperparathyroidism and thyroid cancer effectively evaluated with scintigraphy. *Otolaryngol Clin North Am* 2008; **41**: 1117–33.
- 32 Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, et al. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86**: 5658–71.
- 33 Change in the spectrum of RET mutations diagnosed between 1994 and 2006 – PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17605401/> (accessed Dec 31, 2021).
- 34 Imai T, Uchino S, Okamoto T, et al. High penetrance of pheochromocytoma in multiple endocrine neoplasia 2 caused by germ line RET codon 634 mutation in Japanese patients. *Eur J Endocrinol* 2013; **168**: 683–7.
- 35 Lairmore TC, Ball DW, Baylin SB, Wells SA. Management of pheochromocytomas in patients with multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes. *Ann Surg* 1993; **217**: 595–603.
- 36 Frank–Raue K, Rybicki LA, Erlic Z, et al. Risk profiles and penetrance estimations in multiple endocrine neoplasia type 2A caused by germline RET mutations located in exon 10. *Hum Mutat* 2009; **32**: 51–8.



- 37 Herfarth KKF, Bartsch D, Doherty GM, et al. Surgical management of hyperparathyroidism in patients with multiple endocrine neoplasia type 2A. *Surgery* 1996; **120**: 966–74.
- 38 Tanaka A, Arita K, Lai-Cheong JE, Palisson F, Hide M, McGrath JA. New insight into mechanisms of pruritus from molecular studies on familial primary localized cutaneous amyloidosis. *Br J Dermatol* 2009; **161**: 1217–24.
- 39 Gagel RF, Levy ML, Donovan DT, Alford BR, Wheeler T, Tschen JA. Multiple endocrine neoplasia type 2a associated with cutaneous lichen amyloidosis. *Ann Intern Med* 1989; **111**: 802–6.
- 40 Verga U, Fugazzola L, Cambiaghi S, et al. Frequent association between MEN 2A and cutaneous lichen amyloidosis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003; **59**: 156–61.
- 41 Cecherini I, Romei C, Barone V, et al. Identification of the Cys634-->Tyr mutation of the RET proto-oncogene in a pedigree with multiple endocrine neoplasia type 2A and localized cutaneous lichen amyloidosis. *J Endocrinol Invest* 1994; **17**: 201–4.
- 42 Rothberg AE, Raymond VM, Gruber SB, Sisson J. Familial medullary thyroid carcinoma associated with cutaneous lichen amyloidosis. *Thyroid* 2009; **19**: 651–5.
- 43 Attié T, Pelet A, Edery P, et al. Diversity of RET proto-oncogene mutations in familial and sporadic Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 1995; **4**: 1381–6.
- 44 Amiel J, Sproat-Emison E, Garcia-Barcelo M, et al. Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. *J Med Genet* 2008; **45**: 1–14.
- 45 Mulligan LM, Eng C, Attlé T, et al. Diverse phenotypes associated with exon 10 mutations of the RET proto-oncogene. *Hum Mol Genet* 1994; **3**: 2163–8.
- 46 Mulligan LM, Ponder BAJ. Genetic basis of endocrine disease: multiple endocrine neoplasia type 2. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; **80**: 1989–95.

- 47 Verdy M, Weber AM, Roy CC, Morin CL, Cadotte M, Brochu P. Hirschsprung's disease in a family with multiple endocrine neoplasia type 2. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1982; **1**: 603-7.
- 48 Decker RA, Peacock ML. Occurrence of MEN 2a in familial Hirschsprung's disease: a new indication for genetic testing of the RET proto-oncogene. *J Pediatr Surg* 1998; **33**: 207-14.
- 49 Asai N, Jijiwa M, Enomoto A, et al. RET receptor signaling: dysfunction in thyroid cancer and Hirschsprung's disease. *Pathol Int* 2006; **56**: 164-72.
- 50 The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET mutation consortium analysis – PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8918855/> (accessed Nov 17, 2021).
- 51 Moers AMJ, Landsvater RM, Schaap C, et al. Familial medullary thyroid carcinoma: not a distinct entity? Genotype-phenotype correlation in a large family. *Am J Med* 1996; **101**: 635-41.
- 52 Álvares Da Silva AM, Maciel RMB, Dias Da Silva MR, Toledo SRC, De Carvalho MB, Cerutti JM. A novel germ-line point mutation in RET exon 8 (Gly(533)Cys) in a large kindred with familial medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; **88**: 5438-43.
- 53 Kaldrymides P, Mytakidis N, Anagnostopoulos T, et al. A rare RET gene exon 8 mutation is found in two Greek kindreds with familial medullary thyroid carcinoma: implications for screening. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; **64**: 561-6.
- 54 Oliveira MNL, Hemerly JP, Bastos AU, et al. The RET p.G533C mutation confers predisposition to multiple endocrine Neoplasia type 2A in a Brazilian kindred and is able to induce a malignant phenotype in vitro and in vivo. *Thyroid* 2011; **21**: 975-85.

- 55 Peppas M, Boutati E, Kamakari S, et al. Multiple endocrine neoplasia type 2A in two families with the familial medullary thyroid carcinoma associated G533C mutation of the RET proto-oncogene. *Eur J Endocrinol* 2008; **159**: 767–71.
- 56 Bethanis S, Koutsodontis G, Palouka T, et al. A newly detected mutation of the RET protooncogene in exon 8 as a cause of multiple endocrine neoplasia type 2A. *Hormones (Athens)* 2007; **6**: 152–6.
- 57 Castro MR, Thomas BC, Richards ML, Zhang J, Morris JC. Multiple endocrine neoplasia type 2A due to an exon 8 (G533C) mutation in a large North American kindred. *Thyroid* 2013; **23**: 1547–52.
- 58 Siggelkow H, Melzer A, Nolte W, Karsten K, Höppner W, Hübner M. Presentation of a kindred with familial medullary thyroid carcinoma and Cys611Phe mutation of the RET proto-oncogene demonstrating low grade malignancy. *Eur J Endocrinol* 2001; **144**: 467–73.
- 59 Boccia LM, Green JS, Joyce C, Eng C, Taylor SAM, Mulligan LM. Mutation of RET codon 768 is associated with the FMTC phenotype. *Clin Genet* 1997; **51**: 81–5.
- 60 Jimenez C, Dang GT, Schultz PN, et al. A novel point mutation of the RET protooncogene involving the second intracellular tyrosine kinase domain in a family with medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**: 3521–6.
- 61 Carlson KM, Dou S, Chi D, et al. Single missense mutation in the tyrosine kinase catalytic domain of the RET protooncogene is associated with multiple endocrine neoplasia type 2B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**: 1579–83.
- 62 Eng C, Smith DP, Mulligan LM, et al. Point mutation within the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2B and related sporadic tumours. *Hum Mol Genet* 1994; **3**: 237–41.

- 63 Smith DP, Houghton C, Ponder BAJ. Germline mutation of RET codon 883 in two cases of de novo MEN 2B. *Oncogene* 1997; **15**: 1213-7.
- 64 Gimm O, Marsh DJ, Andrew SD, et al. Germline dinucleotide mutation in codon 883 of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2B without codon 918 mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 3902-4.
- 65 Jasim S, Ying AK, Waguespack SG, et al. Multiple Endocrine Neoplasia Type 2B with a RET Proto-Oncogene A883F Mutation Displays a More Indolent Form of Medullary Thyroid Carcinoma Compared with a RET M918T Mutation. *Thyroid* 2011; **21**: 189.
- 66 Smith V V., Eng E, Milla PJ. Intestinal ganglioneuromatosis and multiple endocrine neoplasia type 2B: implications for treatment. *Gut* 1999; **45**: 143-6.
- 67 Cohen MS, Phay JE, Albinson C, et al. Gastrointestinal manifestations of multiple endocrine neoplasia type 2. *Ann Surg* 2002; **235**: 648-55.
- 68 Waguespack SG, Rich TA, Perrier ND, Jimenez C, Cote GJ. Management of medullary thyroid carcinoma and MEN2 syndromes in childhood. *Nat Rev Endocrinol* 2011; **7**: 596-607.
- 69 Takahashi M, Cooper GM. ret transforming gene encodes a fusion protein homologous to tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* 1987; **7**: 1378-85.
- 70 Mahato AK, Sidorova YA. RET Receptor Tyrosine Kinase: Role in Neurodegeneration, Obesity, and Cancer. *Int J Mol Sci* 2020; **21**: 1-21.
- 71 Carter MT, Yome JL, Marcil MN, Martin CA, Vanhorne JB, Mulligan LM. Conservation of RET proto-oncogene splicing variants and implications for RET isoform function. *Cytogenet Genome Res* 2001; **95**: 169-76.
- 72 Kwok JBJ, Gardner E, Warner JP, Ponder BAJ, Mulligan LM. Structural analysis of the human ret proto-oncogene using exon trapping. *Oncogene* 1993; **8**: 2575-82.

- 73 Runeberg–Roos P, Virtanen H, Saarma M. RET(MEN 2B) is active in the endoplasmic reticulum before reaching the cell surface. *Oncogene* 2007 2657 2007; **26**: 7909–15.
- 74 RET ret proto–oncogene [Homo sapiens (human)] – Gene – NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5979> (accessed Nov 16, 2021).
- 75 Machens A, Lorenz K, Dralle H. Kidney malformations and Hirschsprung’s disease in carriers of cysteine mutations in exon 10 of the RET proto–oncogene. *Endocrine* 2021; **73**: 217–22.
- 76 Romei C, Cosci B, Renzini G, et al. RET genetic screening of sporadic medullary thyroid cancer (MTC) allows the preclinical diagnosis of unsuspected gene carriers and the identification of a relevant percentage of hidden familial MTC (FMTC). *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011; **74**: 241–7.
- 77 Simbolo M, Mian C, Barollo S, et al. High–throughput mutation profiling improves diagnostic stratification of sporadic medullary thyroid carcinomas. *Virchows Arch* 2014; **465**: 73–8.
- 78 Elisei R, Bottici V, Cappagli V, et al. Clinical utility of genetic diagnosis for sporadic and hereditary medullary thyroid carcinoma. *Ann Endocrinol (Paris)* 2019; **80**: 187–90.
- 79 Margraf RL, Crockett DK, Krautscheid PMF, et al. Multiple endocrine neoplasia type 2 RET protooncogene database: repository of MEN2–associated RET sequence variation and reference for genotype/phenotype correlations. *Hum Mutat* 2009; **30**: 548–56.
- 80 Kameyama K, Okinaga H, Takami H. RET oncogene mutations in 75 cases of familial medullary thyroid carcinoma in Japan. *Biomed Pharmacother* 2004; **58**: 345–7.

- 81 High prevalence of the C634Y mutation in the RET proto-oncogene in MEN 2A families in Spain – PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9950371/> (accessed Jan 27, 2022).
- 82 Abdelhakim A, Anne B, Mohamed K, et al. RET genetic screening in patients with medullary thyroid cancer: The Moroccan experience. *J Cancer Res Ther* 2009; **5**: 198.
- 83 Baumgartner-Parzer SM, Lang R, Wagner L, et al. Polymorphisms in exon 13 and intron 14 of the RET protooncogene: genetic modifiers of medullary thyroid carcinoma? *J Clin Endocrinol Metab* 2005; **90**: 6232–6.
- 84 Ceccherini I, Hofstra RMW, Luo Y, et al. DNA polymorphisms and conditions for SSCP analysis of the 20 exons of the ret proto-oncogene. *Oncogene* 1994; **9**: 3025–9.
- 85 Elisei R, Cosci B, Romei C, et al. RET exon 11 (G691S) polymorphism is significantly more frequent in sporadic medullary thyroid carcinoma than in the general population. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**: 3579–84.
- 86 Gimm O, Neuberg DS, Marsh DJ, et al. Over-representation of a germline RET sequence variant in patients with sporadic medullary thyroid carcinoma and somatic RET codon 918 mutation. *Oncogene* 1999; **18**: 1369–73.
- 87 Skalniak A, Trofimiuk-Müldner M, Przybylik-Mazurek E, Hubalewska-Dydejczyk A. Modifier Role of Common RET Variants in Sporadic Medullary Thyroid Carcinoma. *Int J Mol Sci* 2021; **22**. DOI:10.3390/IJMS222111794.
- 88 Machens A, Niccoli-Sire P, Hoegel J, et al. Early malignant progression of hereditary medullary thyroid cancer. *N Engl J Med* 2003; **349**: 1517–25.

- 89 Frank–Raue K, Höppner W, Frilling A, et al. Mutations of the ret protooncogene in German multiple endocrine neoplasia families: relation between genotype and phenotype. German Medullary Thyroid Carcinoma Study Group. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; **81**: 1780–3.
- 90 Frank–Raue K, Rybicki LA, Erlic Z, et al. Risk profiles and penetrance estimations in multiple endocrine neoplasia type 2A caused by germline RET mutations located in exon 10. *Hum Mutat* 2011; **32**: 51–8.
- 91 Quayle FJ, Fialkowski EA, Benveniste R, Moley JF. Pheochromocytoma penetrance varies by RET mutation in MEN 2A. *Surgery* 2007; **142**: 800–805.e1.
- 92 Machens A, Brauckhoff M, Holzhausen HJ, Thanh PN, Lehnert H, Dralle H. Codon-specific development of pheochromocytoma in multiple endocrine neoplasia type 2. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; **90**: 3999–4003.
- 93 Machens A, Lorenz K, Weber F, Dralle H. Genotype-specific progression of hereditary medullary thyroid cancer. *Hum Mutat* 2018; **39**: 860–9.
- 94 Kouvaraki MA, Shapiro SE, Perrier ND, et al. RET proto-oncogene: a review and update of genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid cancer and associated endocrine tumors. *Thyroid* 2005; **15**: 531–44.
- 95 Parent-of-origin effects in multiple endocrine neoplasia type 2B – PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7977365/> (accessed Nov 24, 2021).
- 96 Lips C, Landsvater RM, Hoppener J, et al. Clinical screening as compared with DNA analysis in families with multiple endocrine neoplasia type 2A. *N Engl J Med* 1994; **331**: 828–35.
- 97 Machens A, Ukkat J, Hauptmann S, Dralle H. Abnormal carcinoembryonic antigen levels and medullary thyroid cancer progression: a multivariate analysis. *Arch Surg* 2007; **142**: 289–93.

- 98 Elisei R, Romei C, Renzini G, et al. The timing of total thyroidectomy in RET gene mutation carriers could be personalized and safely planned on the basis of serum calcitonin: 18 years experience at one single center. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; **97**: 426–35.
- 99 Weber T, Schilling T, Frank–Raue K, et al. Impact of modified radical neck dissection on biochemical cure in medullary thyroid carcinomas. *Surgery* 2001; **130**: 1044–9.
- 100 Moley JF, DeBenedetti MK. Patterns of nodal metastases in palpable medullary thyroid carcinoma: recommendations for extent of node dissection. *Ann Surg* 1999; **229**: 880–8.
- 101 Elisei R, Schlumberger MJ, Müller SP, et al. Cabozantinib in Progressive Medullary Thyroid Cancer. *J Clin Oncol* 2013; **31**: 3639.
- 102 Wells SA, Pacini F, Robinson BG, Santoro M. Review: Multiple Endocrine Neoplasia Type 2 and Familial Medullary Thyroid Carcinoma: An Update. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; **98**: 3149.
- 103 Subbiah V, Gainor JF, Rahal R, et al. Precision Targeted Therapy with BLU–667 for RET–Driven Cancers. *Cancer Discov* 2018; **8**: 836–49.
- 104 Asari R, Scheuba C, Kaczirek K, Niederle B. Estimated risk of pheochromocytoma recurrence after adrenal–sparing surgery in patients with multiple endocrine neoplasia type 2A. *Arch Surg* 2006; **141**: 1199–205.
- 105 Laparoscopic adrenalectomy compared to open adrenalectomy for benign adrenal neoplasms – PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8673301/> (accessed Jan 16, 2022).
- 106 Brauckhoff M, Stock K, Stock S, et al. Limitations of intraoperative adrenal remnant volume measurement in patients undergoing subtotal adrenalectomy. *World J Surg* 2008; **32**: 863–72.



- 107 Scholten A, Valk GD, Ulfman D, Borel RIHM, Vriens MR. Unilateral subtotal adrenalectomy for pheochromocytoma in multiple endocrine neoplasia type 2 patients: a feasible surgical strategy. *Ann Surg* 2011; **254**: 1022-7.
- 108 Brauckhoff M, Dralle H. Funktionserhaltende Adrenalektomie bei Nebennierentumoren. *Der Chir* 2012; **6**: 519-27.
- 109 Irvin GL, Carneiro DM, Solorzano CC, et al. Progress in the operative management of sporadic primary hyperparathyroidism over 34 years. *Ann Surg* 2004; **239**: 704-11.
- 110 Scholten A, Schreinemakers JM, Pieterman CRC, Valk GD, Vriens MR, Borel Rinkes IHM. Evolution of surgical treatment of primary hyperparathyroidism in patients with multiple endocrine neoplasia type 2A. *Endocr Pract* 2011; **17**: 7-15.
- 111 Buchanan A. Mental capacity, legal competence and consent to treatment. *J R Soc Med* 2004; **97**: 415-20.
- 112 Offit K, Groeger E, Turner S, Wadsworth EA, Weiser MA. The 'duty to warn' a patient's family members about hereditary disease risks. *JAMA* 2004; **292**: 1469-73.
- 113 Shuman AG, Shaha AR, Tuttle RM, et al. EDUCATIONAL REVIEW-HEALTHCARE POLICY AND OUTCOMES Medullary Thyroid Carcinoma: Ethical Issues for the Surgeon. 2012. DOI:10.1245/s10434-012-2235-4.
- 114 ASHG statement. Professional disclosure of familial genetic information. The American Society of Human Genetics Social Issues Subcommittee on Familial Disclosure. *Am J Hum Genet* 1998; **62**: 474.



أطروحة رقم 22/156

سنة 2022

## الورم الصماوي المتعدد من النوع الثاني (بصدد 27 حالة)

### الأطروحة

قدمت و نوقشت علانية يوم 2022/04/14

### من طرف

السيد عبدالحق لمعبدال

المزداد في 28\07\1996 بدار الحمراء صفرو

## لنيل شهادة الدكتوراه في الطب

### الكلمات المفتاحية

النمط الظاهري - النمط الوراثي - الارتباط - المورثة RET

### اللجنة

الرئيس	..... السيد محمد الأزمي الإدريسي أستاذ علم المناعة
المشرف	..... السيدة ليلى بوكنوش أستاذة مبرزة في علم الوراثة
أعضاء	..... السيد كريم العظيم أستاذ في علم الوراثة
	..... السيدة سناء بنيس أستاذة في علم الإحياء الخلوي