



Analyse moléculaire d'une famille algérienne de NEM2A au CPMC, Alger.

Molecular analysis of an Algerian family of MEN2A at the CPMC, Algiers.

Ammar Chikouche^{1,3}, Nadia Ould Bessi^{2,3}, Nawel Habak^{2,3}

¹Département de médecine, Faculté de médecine d'Alger, Université d'Alger 1, Algérie.

²Département de Pharmacie, Faculté de médecine d'Alger, Université d'Alger 1, Algérie.

³Laboratoire de Biochimie, Centre Pierre et Marie Curie, Alger, Algérie.

Correspondance à :

Ammar CHIKOUCHE
chikouchea@gmail.com

DOI : <https://doi.org/10.48087/BMScr.2020.7230>

Historique de l'article :

Reçu le 17 juin 2020

Accepté le 06 octobre 2020

Publié le 09 novembre 2020

Il s'agit d'un article en libre accès distribué selon les termes de la licence Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0), qui autorise une utilisation, une distribution et une reproduction sans restriction sur tout support ou format, à condition que l'auteur original et la revue soient dûment crédités.

Pour citer l'article :

Ammar Chikouche, Nadia Ould Bessi, Nawel Habak. Analyse moléculaire d'une famille algérienne de NEM2A au CPMC, Alger. *Batna J Med Sci* 2020;7(2):197-200. <https://doi.org/10.48087/BMScr.2020.7230>

RÉSUMÉ

La NEM2A, qui se caractérise par l'association d'un cancer médullaire de la thyroïde (CMT) à un phéochromocytome et/ou une hyperparathyroïdie, fait partie avec la NEM2B et le CMTF des Néoplasies Endocriniennes Multiples de type 2 (ou NEM2). Ces NEM2 constituent des affections héréditaires rares, de transmission autosomique dominante dues à des mutations du proto-oncogène RET. La recherche de mutations du proto-oncogène RET chez un cas index NEM2A permet d'une part de conforter le diagnostic clinique et d'autre part d'identifier précocement grâce au dépistage génétique, parmi les apparentés du cas index, ceux qui sont porteurs de l'anomalie génétique, avant toute manifestation biologique ou clinique, pour une meilleure prise en charge. Les objectifs sont la caractérisation de la mutation ponctuelle du proto-oncogène RET chez le cas index et dépister chez les apparentés du cas index, les porteurs de la mutation germinale. Dans ce travail, nous avons mis au point les techniques de diagnostic génotypique par PCR/séquençage des 7 exons du proto-oncogène RET (8, 10, 11, 13, 14, 15, 16) les plus fréquemment affectés. L'étude a été réalisée chez une femme avec CMT et phéochromocytome bilatéral (NEM2A). La mutation retrouvée chez le cas index, a été recherchée chez les apparentés, 2 sœurs adultes présentant chacune un CMT et 07 enfants apparemment sains. La mutation identifiée chez le cas index (C634Y / exon 11) est retrouvée chez les 02 apparentés cliniquement atteints, ainsi que chez 04 des 07 enfants cliniquement sains. Cette mutation C634Y, commune au CMT et à la NEM2A, nous oblige à considérer les cas de CMT présentant cette mutation comme des NEM2A potentiels et de leur assurer une surveillance clinique et biologique identique. Une thyroïdectomie prophylactique sera proposée aux porteurs sains.

Mots clés : NEM2A, RET, Mutation.

ABSTRACT

The MEN2A, which is characterized by the association of medullary thyroid cancer (MTC), pheochromocytoma and / or hyperparathyroidism, belongs with MEN2B and FMTC in Multiple Endocrine Neoplasia type 2 (or MEN 2). These MEN2 are rare hereditary diseases, transmitted as autosomal dominant and due to mutations in the RET proto-oncogene. The search for mutations in the RET proto-oncogene in an index case MEN2A allows one hand to confirm the clinical diagnosis and secondly to identify through genetic testing, including the related index case, those carriers the genetic abnormality early before any biological or clinical manifestation, for better management. The objectives are to characterize the point mutation in the RET proto-oncogene in the index case and detect in relatives of the index case, the carriers of germline mutation. In this study, we developed genotypic diagnosis techniques by PCR / sequencing of the 7 exons of RET proto-oncogene (8, 10, 11, 13, 14, 15, 16) whose most frequently affected. The study was performed in a woman with MTC and bilateral pheochromocytoma (MEN2A). The mutation found in the index case, was investigated in relatives, two adult sisters each having a MTC and 07 apparently healthy children. The mutation identified in the index case (C634Y / exon 11) was found in 02 related clinically affected and in 04 of 07 clinically healthy children. The C634Y mutation, common in FMTC and MEN2A, forces us to consider the case of MTC this mutation as potential MEN2A and provide them an identical clinical and laboratory monitoring. Prophylactic thyroidectomy will be offered to healthy carriers.

Keywords: MEN2A, RET, mutation.

INTRODUCTION

Les NEM2 ou néoplasies Endocrines multiples de type 2 (NEM 2) sont des affections familiales de transmission autosomique dominante du cancer médullaire de la thyroïde (1) qui se présentent en trois sous-types cliniques : NEM2A, NEM2B et CMTF (2-5). Le CMT des NEM2 est appelé CMT familial et représente 25 % (6). Dans 75 % des cas le CMT est sporadique.

La NEM2A est caractérisée par la présence de cancer médullaire de la thyroïde (CMT) (dans 100% des cas), associé à un phéochromocytome (retrouvé 50-60% des cas) et à une hyperplasie des glandes parathyroïdes (présente dans 20 -30% des cas).

La NEM2B où on retrouve chez les patients un carcinome médullaire de la thyroïde associé à un phéochromocytome, un syndrome marfanoid et une neurogangliomatosis du tractus intestinal, mais il n'y a pas d'atteinte de la glande parathyroïdienne. Dans le carcinome médullaire de la thyroïde familial (CMTF), le carcinome médullaire de la thyroïde est la seule manifestation clinique de la maladie (5). Ces formes familiales, NEM2A, NEM2B et CMTF sont toutes dues à des mutations du proto-oncogène RET.

Le RET proto-oncogène localisé sur le chromosome 10 en 10q11.2. (13) code pour un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase (14), exprimé dans des cellules dérivées de la crête neurale (15).

Ce récepteur RET possède un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire.

Un facteur neurotrophique nommé GDNF (glial derived neurotrophic facteur), lui-même lié un récepteur (GDNF-R) amarré à la membrane cytoplasmique par un intermédiaire glycosylphosphatidyl-inositol, se lie au récepteur RET. Ces trois composants forment un complexe qui entraîne la transmission de signaux mitogènes (16, 17).

Nous rapportons la découverte, par des techniques de biologie moléculaire, d'une mutation du proto-oncogène RET chez un cas index de CMT confortant le diagnostic de forme familiale et permettant le dépistage génétique des apparentés du cas index porteurs de l'anomalie génétique cliniquement sains, avant toute manifestation biologique ou clinique, qui se verront proposer une thyroïdectomie prophylactique et d'assurer une surveillance clinico-biologique du cas index et de ses apparentés.

OBSERVATION

L'étude a été réalisée chez une femme de 50 ans avec CMT et phéochromocytome bilatéral (NEM2A). Cette patiente est la 3^{ème} d'une fratrie de 08. Dans les antécédents familiaux, la mère et la tante maternelle avaient un CMT associé à un phéochromocytome. Des prélèvements sanguins ont été réalisés sur tube EDTA après consentement éclairé de la patiente et suivi d'une demande d'analyse avec un résumé clinique.

La mutation retrouvée chez le cas index, a été recherchée chez des apparentés, 2 sœurs adultes (la 7^{ème} et la 8^{ème} de la fratrie) qui présentent chacune un CMT et un phéochromocytome.

Le dépistage génétique à la recherche de la mutation familiale a été réalisé chez 07 enfants apparemment sains. 01 enfant du cas index (le 3^{ème} de la fratrie de 4), les 03 enfants d'une sœur et les 03 autres enfants d'une autre sœur après consentement éclairé. L'ADN génomique a été extrait à partir de globules blancs selon la technique salting Out ou méthode aux sels.

L'analyse génétique à la recherche de la mutation germinale, a porté sur l'exon 11 du proto-oncogène RET fréquemment mutés dans les cas de NEM2A et a été réalisée par séquençage direct (Big Dye Terminator 1-1) sur ABI Prism 3130 (Applied). Les amorces oligonucléotidiques utilisées pour amplifier l'exon du gène RET ont été conçues sur les séquences introniques flanquantes et sont : 11F 5'-3': CAGAGCATACGCAGCCTGTA et 11R 5'-3': ACACAGCGCCTATGGAAAT. Les conditions PCR utilisées sont 4 µl d'ADN (25 ng/µl), 2,5 µl µl de tampon PCR 10X; 1,25 µl de dNTPs (2mM, 1,5 µl de MgCl2 à 25 mM, 1,25 µl de dNTP à 2 mM, 1,25 µl de solution d'amorces sens et antisens à 5 pmol/µl, 0,1 µl Taq polymérase Roche (5U/ µl) et 13,15 µl d'H2O.

L'amplification est programmée comme suit ; une étape de dénaturation initiale de 5 minutes à 94°C, puis 35 cycles d'amplification (comprenant dénaturation d'une minute à 94°C ; hybridation d'une minute à 60°C (pour l'exon 11) et élongation d'une minute à 72°C) suivis d'une étape d'élongation finale de 10 minute à 72°C. Le produit d'amplification était testé sur un gel d'agarose à 2% et les bandes visualisées par coloration au bromure d'éthidium. Les produits de PCR sont purifiés sur des plaques Millipore (Manu 30) et la réaction de PCR de séquence est réalisée avec 1,5 µl de produit PCR purifiée ; 0,8 µl de Big Dye terminator V1.1 (Applied Biosystem) ; 3,6 µl de tampon 5X (V1.1) et 2 µl d'amorce sens ou antisens (5 pmol/µl).

Pour l'exon 11 : l'amplification est programmée avec 25 cycles comportant une étape de 30 secondes à 95°C suivi d'une étape de 4 minutes à 60°C. Après purification par gel filtration au G50, les produits de PCR de séquence sont séparés par électrophorèse capillaire en utilisant la méthode de Sanger dans un séquenceur automatisé ABI Prism 3130 (Division Applied Biosystem). La présence de la mutation a été détectée par comparaison à la séquence de référence.

La patiente âgée de 50 ans présente une mutation due à une substitution de base une transition d'une guanine en une adénine en c.1901G>A à l'état hétérozygote, comme le montre la Figure1.

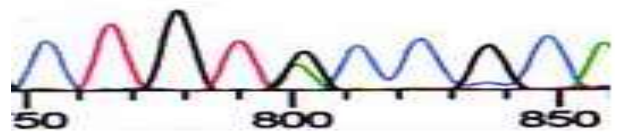
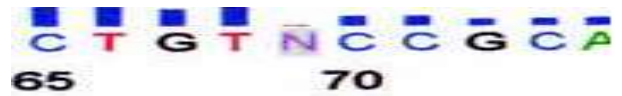


Figure 1. Mutation hétérozygote C634Y (TGC/TAC)

Ce remplacement de G par A conduit à la transformation du codon TGC en codon TAC et substitution d'une cystéine par une tyrosine au codon 634 au niveau de l'exon 11. Cette mutation germinale est notée C634Y. L'analyse génétique a été réalisée chez des apparentés (Figure 2).

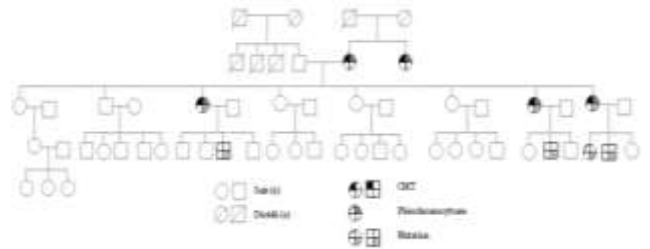


Figure 2. Arbre généalogique de la famille de NEM2A

La mutation identifiée chez le cas index est retrouvée chez les 02 sœurs cliniquement atteintes de NEM2A avec CMT et phéochromocytome, ainsi que chez 04 des 07 enfants cliniquement sains (Tableau 1).

Tableau 1. Résultats de l'analyse génotypique

Diagnostic	Sexe	Age	Mutation
NEM2A	F	50	Présente
NEM2A	F	40	Présente
NEM2A	F	38	Présente
Enfant	M	23	Présente
Enfant	F	18	Absente
Enfant	M	10	Présente
Enfant	M	03	Absente
Enfant	F	08	Présente
Enfant	M	06	Présente
Enfant	F	01	Absente

DISCUSSION

La mutation retrouvée chez le cas index, une femme de 50 ans, et chez certains membres de sa famille au nombre de 06 est une mutation faux-sens, retrouvée au niveau du codon 634 (TGC/TAC) de l'exon 11. Cette mutation entraîne le changement d'une cystéine de la partie extracellulaire de la protéine RET en une tyrosine, elle est dénommée Cys634Tyr ou C634Y (8). Cette mutation C634Y est commune aux cas de NEM2A (8) et du CMTF.

La plupart des mutations de RET retrouvées dans les NEM 2A (95%) ont été trouvées dans les exons 10 et 11, qui code pour le domaine extracellulaire du récepteur. Ce sont des mutations faux-sens qui affectent l'un des codons correspondant à un résidu de cystéine positionnés dans la région juxta-membranaire riche en cystéine (8; 9; 11; 18).

Les patients CMTF ont des mutations au niveau des mêmes codons que lors de l'atteinte sous forme de NEM2A mais avec d'autres substitutions d'acides aminés et au niveau de codons dans d'autres exons du gène RET.

La NEM2B est presque exclusivement associée à une mutation au niveau du codon 918 dans l'exon 16 (8; 9; 11; 18) et à une mutation la A883F au niveau de l'exon 15.

Il a été suggéré que les résidus cystéine du domaine extracellulaire du récepteur RET sauvage forment des ponts disulfures intramoléculaires.

Donc à chacun de ces syndromes, NEM2A, NEM2B et CMTF, des mutations spécifiques du proto-oncogène RET sont associés (7- 11) (Tableau 2).

Le mécanisme pathogénique sous-entendu est que dans les NEM2A, les résidus cystéine non appariés du récepteur RET mutant forment des ponts disulfures intermoléculaires. Un changement d'une cystéine en un autre acide aminé, va automatiquement faire en sorte qu'une cystéine ne sera pas appariée. Cet état de fait fera que la cystéine non appariée d'un monomère RET va automatiquement s'apparier avec une cystéine d'en face d'un autre monomère RET.

Ces changements de conformation, suivies de la dimérisation du récepteur, entraîneront l'activation du domaine Tyrosine Kinase (19). Cette dimérisation constitutive de RET entraînant l'activation de RET est indépendante du ligand (1 ; 20).

Tous les cas de NEM 2A rapportés à ce jour ont ce même mécanisme d'activation (1). Les mutations NEM 2A confèrent un potentiel de transformation dominant à l'allèle muté de RET (1 ; 20).

La présence de la mutation la C634Y chez le cas index, qui présente un CMT et un phéochromocytome bilatéral confirme le diagnostic de NEM2A ainsi que pour ses 02 sœurs qui sont cliniquement affectées.

Les enfants cliniquement sains porteurs de la mutation familiale doivent être considérés comme étant des patients NEM2A. Ils doivent impérativement subir une thyroïdectomie prophylactique assez précoce avant que les signes du CMT n'apparaissent

Cela impose de rechercher un phéochromocytome, une hyperparathyroïdie et d'assurer une surveillance biologique et médicale aux patientes affectées et aux porteurs de la mutation.

CONCLUSION

Nous rapportons l'identification d'une famille de NEM2A avec cancer médullaire de la thyroïde et phéochromocytome, associée à une mutation du gène RET.

Chez cette famille, les patientes cliniquement affectées, au nombre de 03, sont porteuses de la même mutation germinale C634Y, localisée au niveau de l'exon 11 du proto-oncogène RET.

Les sujets apparentés sains mais porteurs de cette mutation, au nombre de 04, doivent être considérés comme étant des sujets qui présenteront une NEM2A. Ils doivent bénéficier d'une thyroïdectomie prophylactique et d'une surveillance adaptée au dépistage des différentes atteintes organiques potentielles (médullo-surrénale et parathyroïde).

Les apparentés non porteurs de la mutation sont rassurés et ne nécessitent aucune surveillance médicale particulière. L'étude génotypique d'autres apparentés est nécessaire.

Déclaration d'intérêts : les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêt en rapport avec cet article.

Remerciements : Nous remercions Dr Daoud Chafia pour l'aide à l'élaboration de travail.

RÉFÉRENCES

1. Santoro M, Carlomagno F, Romano A, Bottaro DP, Dathan NA, Greco M, et al. Germline mutations of MEN2A and MEN2B activate RET as a dominant transforming gene by different molecular mechanisms. *Science* 1995 ; 267:381-383.
2. Modigliani E. Les néoplasies endocriniennes de type 2. *Presse Med* 1998; 27:628-640.
3. Conte-Devolx B, Niccoli-Sire P. Néoplasies endocriniennes multiples de type 2. *EMC, Endocrinologie-Nutrition* 1999; 10-036-A-08.
4. Murat A, Niccoli-Sire P. Le cancer médullaire de la thyroïde. *Mt endocrinologie* 2000; 2 :430-437.
5. Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C , et al. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:5658-5671.
6. Schimke RN. Genetic aspects of multiple endocrine neoplasia. *Annu Rev Med* 1994; 35:25-31.
7. Block MA, Jackson CE, Greenawald KA, Yott JB, Tashjian AH. Clinical characteristics distinguishing hereditary from sporadic medullary thyroid carcinoma treatment implications. *Arch Surg* 1980; 115:142-148.
8. Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, Lenoir G, Cote G, Gagel RF, et al. The relationship between specific ret proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2: international ret mutation consortium analysis. *JAMA* 1996 ; 276:1575-1579.
9. Mulligan LM, Kwok JBJ, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, et al. Germline mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 1993; 363:458-460
10. Fagin JA. Molecular genetics of human thyroid neoplasms; *Annu Rev Med* 1994; 45:45-52.
11. Eng Charis. RET Proto-Oncogene in the Development of Human Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1999; Vol 17, Issue 1: 380
12. Arighi E, Borrello MG, Sariola H ; 2005; RET tyrosine kinase signaling in development and cancer; *Cytokine Growth Factor Rev* 16:441-467.

12. Ishizaka Y, Itoh F, Tahira T, Ikeda I, Sugimura T, Tucker J, et al. Human ret proto-oncogene mapped to chromosome 10q11.2. *Oncogene* 1989; 4:1519-1521.
13. Takahashi M, Buma Y, Hiai H. Isolation of ret proto-oncogene cDNA with an amino-terminal signal sequence. *Oncogene* 1989; 4:805-806.
14. Takahashi M, Buma Y, Iwamoto T, Inaguma Y, Ikeda H, Hiai H. Cloning and expression of the ret protooncogene encoding a tyrosine kinase with two potential transmembrane domain. *Oncogene* 1988; 3:571-578.
15. Durbec P, Marcos-Gutierrez CV, Kilkenny C, Grigoriou M, Wartiwaara K, Suvanto P, et al. GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature* 1996; 381:789-793.
17. Treanor JJ, Goodman L, de Sauvage F, Stone DM, Poulsen KT, Beck CD et al. Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature* 1996; 382:80-83.
18. Donis-Keller H, Dou S, Chi D, Carlson KM, Toshima K, Lairmore TC, et al. Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Hum Mol Genet* 1993; 2:851-856.
19. Borrello MG, Smith DP, Pasini B, Bongarzone I, Greco A, Lorenzo MJ, et al. RET activation by germline MEN2A and MEN2B mutations. *Oncogene* 1995; 11:2419-2427.
20. Asai N, Iwashita T, Matsuyama M, Takahashi M. Mechanism of activation of the ret proto-oncogene by multiple endocrine neoplasia 2A mutations. *Mol Cell Biol* 1995; 15:1613-1619.

Cet article a été publié dans le « *Batna Journal of Medical Sciences* » **BJMS**, l'organe officiel de « *l'association de la Recherche Pharmaceutique – Batna* »

Le contenu de la Revue est ouvert « Open Access » et permet au lecteur de télécharger, d'utiliser le contenu dans un but personnel ou d'enseignement, sans demander l'autorisation de l'éditeur/auteur.

Avantages à publier dans **BJMS** :

- *Open access* : une fois publié, votre article est disponible gratuitement au téléchargement
- Soumission gratuite : pas de frais de soumission, contrairement à la plupart des revues « Open Access »
- Possibilité de publier dans 3 langues : français, anglais, arabe
- Qualité de la lecture : des relecteurs/reviewers indépendants géographiquement, respectant l'anonymat, pour garantir la neutralité et la qualité des manuscrits.

Pour plus d'informations, contacter BatnaJMS@gmail.com ou connectez-vous sur le site de la revue : www.batnajms.net

