

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة والحياة

Département de Biologie Animale

قسم بيولوجيا الحيوان

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : *Génétique Moléculaire*

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

**Les polymorphismes du proto-oncogène RET dans le cancer
médullaire de la thyroïde**

Présenté par : BOUSSIF Mohammed

Le 13/06/2024

BRIHMOUCH Nour El Imen

METLAS Nawel

Jury d'évaluation :

Président du jury : SEDRATI Khadidja (MCA - UFMC 1).

Encadrante : SIFI Karima (PROF – USBC3).

Examineur : LATRECHE Fethi (MAA - UFMC 1).

**Année universitaire
2023 - 2024**

Remerciements

En préambule à ce mémoire, nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apportées leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce travail. Nous commençons par remercier le Professeur **K. SIFI**, qui en tant qu'encadreur professionnel, s'est toujours montrée à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce travail, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour. Nous exprimons aussi notre extrême gratitude à l'ensemble du corps médical et paramédicallaboratoire de biochimie du centre hospitalo-universitaire de Constantine.

Nous tenons à remercier les membres du jury qui nous ont fait l'honneur d'examiner ce travail :

Nos remerciements et gratitude à Mme **SEDRATI.K** d'être le président du jury et d'avoir accepté d'évaluer notre travail.

Nous remercions également Mr **LATRECHE.F** d'avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner notre travail.

Pour finir nous adressons nos remerciements à l'Université de Constantine 1, et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Merci a tous.

Dédicaces

To **"ALLAH"** who didn't disappoint me in my greatest moments of weakness.

To my dear father **"AMMAR"**, no dedication can express love, the esteem, devotion and respect that I have always had for you. This work is the fruit of the sacrifices you made for my education. I dedicate this work to you as a testimony of my deep love. May God preserve you and grant you health, long life and happiness.

To my dearest mother, honorable, kind **"ZINA"** you represent for me the symbol of goodness per excellence, the source of tenderness and the example of devotion which has never ceased to encourage me. Your prayer and blessing were a great help to me in completing my studies. No dedication could be enough to express what you deserve for all the sacrifices since my birth, during my childhood and even as an adult.

To my dear brothers **"SALAH-EDDINE"** and **"MOUAD"**, to my sisters **"TESNIM"** and **"KAOUTHER"** in testimony of the attachment, love and affection that I have for you. As your big brother you are always in my heart.

"LOAI" "WAIL" "NADA" "DJAMEL" "LYNA" "NADA-RAIHEN" "DHYKRA" I can't find the right and sincere words to express my affection and my thoughts to you, you are for me sisters and brothers on whom I can count. As a testimony to the friendship that unites us and the memories of all the moments we spent together, I dedicate this work to you and I wish you a life full of health and happiness. Love you so much guys.

To all my dear friends who I have known over the years, and to my partners **"NOOR"** and **"NAWEL"** wish you all the health and success in your future.

LAST BUT NOT LEAST I WANNA THANK ME ,FOR BELIEVING IN ME AND DOING ALL THIS HARD WORK, FOR NEVER QUITTING, FOR TRYING TO DO MORE RIGHT THAN WRONG. I WANNA THANK ME FOR JUST BEING ME.

MOHAMMED

À mes plus grands soutiens et sources d'inspiration, je dédie ce travail avec tout mon amour et ma reconnaissance infinie :

*À mon père " **abdel kader** " qui m'a appris l'importance du travail acharné, de la persévérance et de l'honnêteté. Tu as toujours été là pour me soutenir, m'encourager et me guider. Sans toi, ce rêve n'aurait jamais pu devenir réalité . Je te suis infiniment reconnaissante pour ton soutien , ta confiance et ton amour.*

*A ma mère **fatiha**, merci pour ton amour inconditionnel, ton soutien infatigable et tes innombrables sacrifices. Maman, ta foi en moi m'a donné le courage et la détermination nécessaires pour surmonter les obstacles et atteindre mes objectifs. Tu as été la lumière qui a éclairé mon chemin dans les moments sombres. Je t'aime*

*À mes frère **Nasser Eddine** et **Nadir** ainsi qu'à mes sœurs adorées **Sirin** et **Malak** , qui sont aussi mes meilleures amies, merci pour votre encouragement et vos mots de réconfort ont été des éléments cruciaux pour la réussite de ce mémoire. Vous êtes ma source de joie et de bonheur, et je suis fière de vous avoir dans ma vie.*

*A mes partenaires" **Nawal** " et "**Mohammed**" qui m'ont supportée durant ces derniers mois*

Je garde en mémoire les compagnons d'âme qui ont partagé ce chemin avec moi, ceux qui m'ont soutenus et encouragés à continuer, à mes fidèles compagnons, je vous exprime ma gratitude sincère.

Grâce à la miséricorde divine, je suis rempli de gratitude d'avoir atteint ce stade. Le chemin parcouru a été semé d'embûches et les obstacles nombreux, cependant, c'est grâce à Dieu que je me tiens aujourd'hui à l'aube de la cérémonie de remise des diplômes . Alhamdulillah

-NOUR EL IMEN-

Au nom de Dieu, mon Créateur et Facilitateur. Louange et merci à vous.

Je dédie ce succès d'abord à mon ambition, puis à tous ceux qui ont travaillé avec moi pour mener à bien ce voyage.

*Je dédie ce succès à mon ange dans la vie, la prunelle de mes yeux et la chose la plus précieuse que je possède, ma bien-aimée et le paradis de mon cœur, qui est resté éveillé et a été avec moi dans toutes mes circonstances, situations et pressions, la femme qui a fait de moi une fille ambitieuse et aimant les défis, celle dont les prières ont été le secret de ma réussite et dont la tendresse a été un baume pour mes blessures et un modèle pour moi "**Fahima**".*

*À celui qui m'a appris à donner sans retour, à celui dont je porte le nom avec fierté, toi qui as été mon soutien et qui es toujours mon cher père, "**Mohammed**".*

*À ces étoiles qui éclairent toujours mon chemin. Mes sœurs et frères, chacun avec son nom et sa position : « **Fadwa** », « **Assia** », « **Bassam** », « **Haithem** », « **Abd Nour** » et « **Bahaa El-Din** ».*

*À mes partenaires "**Nour**" et "**Mohammed**".*

Je remercie Dieu pour m'avoir donnée ce moment. J'espère que Dieu le Tout-Puissant me fera bénéficier de ce qu'Il m'a enseignée et m'apprendra ce que je ne connais pas et en fera un argument pour moi et non contre moi.

-NAWEL-

Sommaire

Remerciement	
Dédicaces	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Les aspects cliniques du CMT	3
I.1. Le CMT sporadique.....	3
I.2. Les formes familiales du cancer médullaire de la thyroïde : Le CMT des néoplasies endocriniennes multiples de type 2	3
I.2.1. La NEM2A (Syndrome de sipple).....	4
I.2.2. La NEM2B (syndrome de Gorlin).....	5
II.2. Les tests de stimulation de la CT utilisés pour le diagnostic des CMT	9
II.3. Autres paramètres biologiques.....	10
II.4. Diagnostic biologique des autres composantes de NEM2.....	10
II.4.1. Diagnostic biologique de l'HPT	10
II.4.2. Diagnostic biologique du phéochromocytome.....	11
III. Le proto-oncogène RET :.....	12
III.1. Circonstances de découverte du proto-oncogène RET :	12
III.2. Structure et localisation du proto-oncogène RET :.....	13

III.3. Expression de RET :	14
III.4.1. Le proto-oncogène RET et ses transcripts	14
IV. La protéine RET	16
IV.1. Structure de la protéine kinase RET	16
IV.2. Signalisation cellulaire médiée par RET.....	19
IV.2.1. Les ligands de RET	19
IV.2.3. L'activation et signalisation induite par la protéine RET	20
V. Les variants du proto-oncogène RET et corrélations phénotype /génotype	27
V.1. Les variants pathogènes de <i>RET</i>	27
V.1.1. Les variants ou mutations constitutionnelles du proto-oncogène RET.....	27
V.1.2. Les mutations somatiques du proto-oncogène RET.....	29
V.2. Les variants non pathogènes ou polymorphismes de RET.....	30
V.2.1. Les polymorphismes dans le CMTF et la NEM2A.....	30
V.2.2. Les polymorphismes dans le cancer modulaire de la thyroïde sporadique	31
V.3. Corrélation phénotype-génotype dans les NEM2.....	33
V.3.1. Corrélation phénotype-génotype dans les NEM 2A	33
V.3.2. Corrélation phénotype-génotype dans les NEM 2B.....	35
V.3.3. Corrélation phénotype-génotype dans les CMTF	36
VI. Corrélation phénotype-génotype dans les CMTs	39
VII. Prise en charge du CMT	40
VII.1. Bilan préopératoire	40
VII.2. Bilan d'une maladie résiduelle et/ou métastatique.....	40
VII.3. Traitements du CMT	41

VII.3.1. Traitement chirurgical de première intention.....	41
VII.3.2. Attitude thérapeutique devant une maladie résiduelle.....	41
VII.3.3 Autres traitements.....	42
VIII. Thérapie ciblée du CMT sporadique.....	42
IX. Dépistage génétique du cancer modulaire de la thyroïde	43

PARTIE PRATIQUE

I. Patients et Méthodes.....	47
I.1. Patients.....	47
I.1.1. Recrutement des cas index et apparentés: Critères de sélection.....	47
I.1.2. Les prélèvements biologiques	48
I.2. Méthodes.....	48
I.2.1. Etude génétique	48
I.2.2. L'analyse statistique des résultats :.....	70
II.1. Répartition des cas index et apparentés selon le sexe	71
II.1.1. Répartition des cas index selon le sexe.....	71
II.1.2. Répartition des apparentés des cas index mutés selon le sexe	71
II.2. Répartition des cas index et apparentés selon l'âge.....	72
II.2.1. La répartition des cas index selon l'âge	72
II.2.2. Répartition des apparentés selon l'âge	72
II.3. Répartition du CMT dans notre population d'étude	72
II.4. Résultats de l'analyse génétique des polymorphismes des exons 11 (G691S) et 15 (S904S) chez les cas index.....	73
II.4.1. Fréquence des différents polymorphismes G691S et S904S chez les cas index....	73

II.4.2. Fréquence des différents polymorphismes G691S et S904S chez les apparentés des cas index ayant présenté une mutation	74
III. Discussion	78
Conclusion	82
Références	83
Annexe	102
Résumé	111

Liste des figures

Figure 01 : Structure de la Calcitonine mature.....	6
Figure 02 : Gène de la Calcitonine et synthèse de la CT.....	7
Figure 03 : Le proto-oncogène RET ses exons et introns.....	14
Figure 04 : Les différentes isoformes 5' terminales du proto-oncogène RET.....	15
Figure05 : Organisation génomique de l'extrémité 3'terminale du proto-oncogène RET.....	16
Figure 06 : Les différentes régions de l'extrémité N terminale extracellulaire, les acides aminés et les exons correspondants.....	17
Figure 07 : Les trois isoformes de RET et leurs sites de signalisation.....	19
Figure 08 : Interaction des différents récepteurs alpha avec les ligands de la famille du GDNF.....	20
Figure 09 : Activation de RET en cis.....	21
Figure 10 : Activation de RET en trans	22
Figure 11 : Les protéines associées à RET en dehors et dans les rafts lipidiques.....	23
Figure 12 : Les différentes voies de signalisation de RET	26
Figure13 : Mécanismes d'activation oncogénique de la protéine RET.....	26
Figure 14 : Overview of the known germline mutations in the RET gene and their associated human disease.....	29
Figure 15 : schémas présentant un polymorphisme de simples nucléotides (SNP).....	32
Figure 16 : Stratégie de dépistage des formes familiales de cancer médullaire de la thyroïde (CMT) et des néoplasies endocriniennes multiples de type 2 (NEM2) à partir d'un cas index porteur d'un CMT.....	46
Figure 17 : Gestion des patients porteurs d'une mutation germinale RET détectée par dépistage génétique.....	47
Figure 18 : Histogramme montrant la répartition du CMT selon le sexe dans les deux populations de malades.....	56
Figure 19 : Eléctrophorégramme de l'exon 11 polymorphisme hétérozygote G691S (GGT>AGT).....	60
Figure 20 : Eléctrophorégramme de l'exon 11 polymorphisme homozygote G691S (GGT>AGT).....	60
Figure 21 : Eléctrophorégramme de l'exon 15 polymorphisme hétérozygote S904S (TCC>TCG).....	61
Figure 22 : Eléctrophorégramme de l'exon 15 polymorphisme homozygote S904S(TCC>TCG).....	61

Liste des tableaux

Tableau I: Interprétation du test à la pentagastrine(Pg)	10
Tableau II : Relation entre les mutations RET courantes et le risque de MTC agressif dans NEM2A et NEM2B, et avec l'incidence de PHEO, HPTH, CLA et HD dans NEM2A.....	38
Tableau III : Classification révisée de l'ATA basée sur des niveaux de risque en fonction du génotype.....	39
Tableau IV: Les conditions de conservation de l'ADN.....	39
Tableau V: Amorces utilisées.....	41
Tableau VI: Concentration des réactifs de la PCR.....	43
Tableau VII: Composition du mix de la PCR.....	44
Tableau VIII: La taille des exons 11 et 15 du proto-oncogèneRET.....	46
Tableau IX: les différents ddNTP, les fluorochromes de marquage et les couleurs correspondantes.....	49
Tableau X: Préparation du mix: de la PCR de séquence.....	50
Tableau XI: composition de la PCR de Séquence.....	50
Tableau XII : Répartition des patients en fonction de l'âge.....	57
Tableau XIII: La fréquence des pathologies liées aux CMT.....	58
Tableau XIV: Les fréquences des polymorphismes G691S/S904S chez les cas index.....	59
Tableau XV: les fréquences des polymorphismes G691S/S904S chez les apparentés.....	59
Tableau XVI : Code d'identification des bases des mélanges de bases par le séquenceur...	62

Liste des abréviations

- AA** : acide aminé.
- ACE** : Antigène carcinoembryonnaire .
- AKT**: *Acute transforming protéine.*
- Amorce F** : *Amorce Forward.*
- Amorce R** : *Amorce Reverse .*
- AP1** : *Activator protein 1.*
- ATTP** : désoxythymidylate triphosphate.
- BET** : Bromure d'éthidium .
- CCD** : *Charge Coupled Device.*
- CD** : *Cadhérine-like.*
- CHUC** : Centre Hospitalo-Universitaire de Constantine.
- CMT**: Cancer médullaire de la thyroïde.
- CMTF** : Cancer médullaire de la thyroïde familial .
- CMTS** : Cancer médullaire de la thyroïde sporadique .
- CREB** : *Cyclic AMP responsive element binding protein.*
- CT** : *Calcitonine.*
- dATP** : désoxyadénosine triphosphate .
- dCTP** : Désoxycytidine triphosphate.
- ddNTP** : Didésoxyribonucléotide.
- dGTP** : Désoxyguanosine triphosphate.
- DNTP** : Désoxyribonucléotides .
- DOK4/5** : *downstream of tyrosine kinase 4/5.*
- EDTA** : acide éthylènediaminetétraacétique .
- FGF** : *Fibroblast Growth Factor.*
- FRS2** : *Fibroblast Growth Factor Receptor Substrate 2.*
- GB** : Globules blancs .
- GDNF** : *Glial Derived Neurotrophic Factor .*
- GR** : Globules muges.
- GRB2** : *Growth Factor Receptor-Bound Protein 2.*
- HCC** : hyperplasie à cellules C .
- HPT** : Hyperparathyroïdie.
- HSCR** : *Hirschsprung.*

IRM : Imagerie par résonance magnétique.

IRS1/2 : *insulin receptor substrate1/2*.

IVS : *Intervening sequence*.

Mg⁺⁺ : Magnésium.

MgCl₂ : chlorure de magnésium.

MIBG : métaiodobenzylguanidine .

NaCl : chlorure de sodium.

NEM : Néoplasie endocrinienne multiple.

NEM2A : Néoplasie endocrinienne multiple de type 2A.

NEM2B : Néoplasie endocrinienne multiple type 2B.

N-F-KB : *Nuclear factor-kappa B*.

PCR : *Polymerase chain reaction* .

PHEO : Phéochromocytome.

PI3-K : *Phosphoinositide 3-kinase*.

PP : *Pyrazolopyrimidine*.

PTH : *Parathormone*.

RAS/ ERK : *Rat Aviary Sarcoma / Extracellular Signal-Regulated kinase*.

RET : *rearranged during transfection* .

SDS : *Sodium Dodecyl Sulfate* .

Shc ShcC : un adaptateur protéique spécifique des neurones.

SNP : *Single polymorphism nucleotide* .

STC1 : *Stanniocalcine 1* .

Taq : *Thermus aquaticus*.

TBE : *Tris-borate-EDTA*.

TDM : Tomodensitométrie.

TE : Tris-EDTA.

TK : *tyrosine kinase*.

TK1 : *Tyrosine Kinase 1*.

TK2 : *Tyrosine Kinase 2*.

Tm : *melting temperature*.

UV : *ultraviolets*.

VEGF : *Vascular endothelial growth factor*.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Introduction

Les cancers médullaires de la thyroïde (CMT) sont des tumeurs neuroendocrines issues des cellules C thyroïdiennes (Feingold *et al.*, 2000 ; Sifi *et al.*,2012). Ils représentent 5 à 15 % de tous les cancers thyroïdiens primitifs.

La calcitonine est un excellent marqueur pour ces tumeurs, qui peuvent également sécréter d'autres hormones (Mathew *et al.*,1987 ; Peix, 2000).

Le CMT est généralement diagnostiqué lors d'un bilan biologique (dosage de la calcitonine basale ou test à la pentagastrine) ou après une intervention pour nodule (s) froid (s) de la thyroïde (analyse histologique ou immunohistochimie) (Scheuba *et al.*,2009).

Le CMT peut se présenter sous différentes formes :

Sporadique : dans 70-75 % des cas.

Familiale : génétiquement déterminée, entrant dans le contexte de polyendocrinopathies ou néoplasies endocriniennes multiples de type 2 dans environ 25-30 % des cas (Santoro *et al.*,1998).

Cette association multiglandulaire s'explique par une origine embryologique commune des tissus endocriniens, dérivés des cellules de la crête neurale.

Les néoplasies endocriniennes multiples de type 2 comprennent deux syndromes héréditaires distincts :

- NEM2A : est la forme la plus fréquente, actuellement subdivisée en 4 types.

-Type 1 ou NEM2A classique associe au CMT un phéochromocytome et/ou une hyperparathyroïdie ou les 2,

-Type 2 associe à la NEM2A classique un lichen amyloïde,

-Type 3 comporte en plus de la NEM2A classique la maladie de Hirschsprung,

-Type 4 = CMTF.

-NEM2B : associant un CMT, un PHEO, des traits de type Marfan et une ganglioneuromatose digestive et sous-muqueuse (Ishida *et al.*,1995 ;Kommino ,2003 ; Samuel *et al.*,2015).

INTRODUCTION

Les formes familiales se transmettent de manière autosomique dominante avec une pénétrance de 100 % et sont liées à des mutations du proto-oncogène RET (Eng *et al.*,1994 ; Eng *et al.*,1995 ; Muller ,2003).

Le proto-oncogène RET (REarranged in Thyroid cancer) code pour une protéine transmembranaire à activité tyrosine kinase, exprimée principalement dans les cellules précurseurs des cellules de la crête neurale. Il est impliqué dans la différenciation, la prolifération et la migration de ces cellules du neuroectoderme.

Les mutations dans 7 exons (8, 10, 11, 13, 14, 15 et 16) sont connues pour causer les formes familiales de CMT.

Plusieurs SNPs et haplotypes de RET ont été décrits dans la population générale et en association avec les NEM2 et le CMT sporadique (Gimm *et al.*,1999).

Parmi les facteurs génétiques étudiés, les polymorphismes G691S et S904S du proto-oncogène RET ont suscités un intérêt particulier.

De nombreuses études récentes ont suggéré que l'haplotype G691S/S904S de RET a un effet modificateur sur l'âge de début des NEM2A et est associé à une susceptibilité accrue au CMT, bien que leur impact exact sur la pathogénèse et la progression de la maladie reste sujet de recherche actif (Elisei *et al.*, 2015).

Notre étude vise à étudier l'impact de ces polymorphismes chez des patients atteints de CMT de l'Est algérien. Pour cela :

Les objectifs de notre travail étaient :

- Rechercher les polymorphismes G691S et S904S chez les patients ayant un CMT par PCR séquençage.
- Démontrer l'impact de ces polymorphismes sur le cancer médullaire de la thyroïde.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les aspects cliniques du CMT

Le cancer médullaire de la thyroïde (CMT) est une forme rare de cancer thyroïdien qui se développe à partir des cellules parafolliculaires de la thyroïde, également appelées cellules C. Il se présente sous deux formes : sporadique vrai dans 75 à 80 % des cas et héréditaire dans environ 25 à 30 % des cas, Le CMT s'intègre alors dans les néoplasies endocriniens multiples de type 2 (NEM2) qui sont associés à des mutations du proto-oncogène RET. Ces mutations peuvent être détectées grâce à des tests génétiques (Wells Jr *et al.*, 2015).

Le CMT secrète souvent de la calcitonine, une hormone qui intervient dans le métabolisme phosphocalcique. Des niveaux accrus de calcitonine sont détectés par un dosage sérique au cours du CMT. Ils sont utilisés pour diagnostiquer et surveiller le CMT (Pacini *et al.*, 20

I.1. Le CMT sporadique

Le CMT se présente sous une forme sporadique dans 75 à 80 % des cas, avec un pic d'incidence entre la 4^{ème} et la 6^{ème} décennie de la vie (Pelizzo *et al.*, 2023), le plus souvent sous la forme d'un nodule thyroïdien solitaire. Les symptômes les plus courants comprennent une masse palpable du cou, un enrouement, des difficultés à avaler et des adénopathies cervicales précoces (Pelizzo *et al.*, 2023) (compartiment central entre 11 et 86 %, et compartiment cervical latéral entre 11 et 93 %)(Machens et Dralle,2010 ; Moley, 2010 ; Machens et coll, 2019 ; Viola et Elisei, 2019). Dans 30 % des cas seulement, il y a une symptomatologie endocrinienne associant diarrhée motrice et flushs (bouffées vasomotrices) pouvant révéler le CMT (Niccoli-Sireet *et al.*,2001 ;Pacini *et al.*,2010). Le seul caractère distinctif pourrait être sa localisation, au tiers moyen ou au tiers supérieur du lobe. Des métastases dans le foie, les poumons ou les os, sont observés au début de la maladie dans 10 à 20% des cas (Pacini *et al.*,2010) Aucun lien entre ce cancer et les antécédents familiaux n'est prouvé, la plupart des patients ont plus de 20 ans (Correia-Deur *et al.*, 2009).

I.2. Les formes familiales du cancer médullaire de la thyroïde : Le CMT des néoplasies endocriniennes multiples de type 2

Le CMT héréditaire s'intègre dans les néoplasies endocriniens multiples de type 2 ou NEM2, affections héréditaires monogéniques rattachées à des mutations germinales hétérozygotes du gène RET (REarranged during Transfection), codant une protéine à activité

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

tyrosine kinase (Wohllk *et al.*, 2010). La transmission est autosomique dominante et la pénétrance est élevée (McDonnell *et al.*, 2019).

Classiquement, deux syndromes sont décrits : la NEM2A ou syndrome de Sipple (95 % des NEM2) et la NEM2B ou syndrome de Gorlin (5 %) (Revised ATA guideline for management of MTC 2015) (Samuel A *et al.* 2015).

I.2.1. La NEM2A (Syndrome de sipple)

La NEM2A, est la forme la plus fréquente, actuellement subdivisée en 4 types :

le type I également appelé NEM2A classique associe au CMT un PHEO et/ou une HPT ou les deux.

le type II associe à la NEM2A classique un Lichen amyloïde,

le type III associe à la NEM2A classique une maladie de Hirshprung

le type IV qui comporte un CMT Familial isolé d'apparition plus tardive (25-30 ans), sans phéochromocytome (PHEO) ni hyperparathyroïdie (HPT) (Samuel A *et al.* 2015) (McDonnell *et al.*, 2019).

Le CMT des NEM2 est présent dans 90-95%. Il est multifocal, bilatéral, associé à une hyperplasie des cellules C.

Les PHEO se manifestent généralement dans 20 % à 50 % des cas (McDonnell *et al.*, 2019). Ils sont souvent bilatéraux avec parfois une dissociation dans le temps (Machens *et al.*, 2005 ; Lenders *et al.*, 2005). Et totalement asymptomatiques dans 60 % des cas et constituent par leur présence une réelle menace de mort subite. Leur recherche est absolument indispensable en présence d'un CMT car leur traitement doit précéder celui du CMT. L'hyperparathyroïdie primaire (HPT1) pratiquement toujours asymptomatique retrouvé dans 20 à 30 % des cas. Une diarrhée motrice et un flush peuvent également se voir. Environ 15% des CMT sont associés à une production ectopique d'ACTH et à un syndrome de Cushing (McDonnell *et al.*, 2019).

Williams et Pollock en 1966 et Gorlin et Vickers en 1971, ont tracé le phénotype de cette forme moins agressive du CMT qu'ils ont appelé CMT, mais ce n'est qu'en 1986 que le CMTF fut décrit comme une entité clinique distincte par Farndon (Farndon *et al.*, 1986).

Le diagnostic du CMTF est retenu, après un recul très long, lorsque 4 sujets d'une même famille présentent un cancer médullaire de la thyroïde, sans lésions médullosurrénaliennes ou parathyroïdiennes associées (Eng *et al.*, 1996).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Le CMTF représente 35-40% de toutes les NEM2. Il a été diagnostiqué plus fréquemment ces dernières années (Berndt *et al.*, 1998). L'expression de la maladie se limite au développement d'un CMT. Celui-ci est bilatéral dans 100% des cas, même si les lésions observées peuvent être dissociées dans leur degré de développement (hyperplasie des cellules C, cancer in situ, micro-cancer avec métastases ganglionnaires). Les autres composantes de la maladie sont initialement absentes et tout au long de l'évolution.

Sa définition, qui est en fait un diagnostic d'exclusion des autres formes de NEM2, semble actuellement pouvoir être remise en cause du fait de l'observation récente des autres composantes de la NEM2 dans des génotypes où jusqu'à présent seul le CMT était décrit (Berndt *et al.*, 1998 ; Samuel *et al.* 2015).

I.2.2. La NEM2B (syndrome de Gorlin)

NEM2B est une forme très rare (5 %). Décrite pour la 1ère fois en 1922 par Wagenmann et Froboese (Wagenmann et Froboese, 1922).

Puis par Williams et Pollock en 1966 (Williams et Pollock, 1966) et enfin par Gorlin et Vickers en 1971 (Gorlin et Vickers, 1971) Elle est caractérisée par son apparition très précoce, au cours de la première année de vie. Il s'agit d'une forme très agressive liée à une mutation du codon 918 du gène RET chez 95 % des patients (Wohlk *et al.*, 2010). 50 % des patients présentent un PHEO, souvent bilatéral, mais jamais d'hyperparathyroïdie primaire. Ce syndrome s'accompagne d'un syndrome dysmorphique et malformatif comprenant : un syndrome marfanoïde (déformation osseuse, laxité articulaire importante et cyphoscoliose), des névromes des lèvres et de la langue, une hypertrophie des vaisseaux cornéens et une ganglioneuromatose de l'intestin. Le diagnostic est généralement évoqué dans les premières années de vie par les pédiatres (Davila *et al.*, 2020).

II. Les aspects biologiques du CMT et des NEM2 :

II.1. La calcitonine sérique (CT) marqueur tumoral du CMT

La CT, synthétisée à partir de son précurseur polypeptidique, la procalcitonine (proCT), représente le marqueur le plus sensible pour la détection des CMT. La fréquence des CMT non associés à une hypercalcitoninémie n'est que de 0,8 % (Frank-Raue *et al.*, 2013). Néanmoins, elle n'est pas aussi spécifique dans les contextes cliniques où l'augmentation sérique est modérée (Boschin *et al.*, 2014). La calcitonine mature, composée de 32 acides

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

aminés, présente un pont disulfure reliant les cystéines en position 1-7(figure 01), créant un anneau à l'extrémité N-terminale.

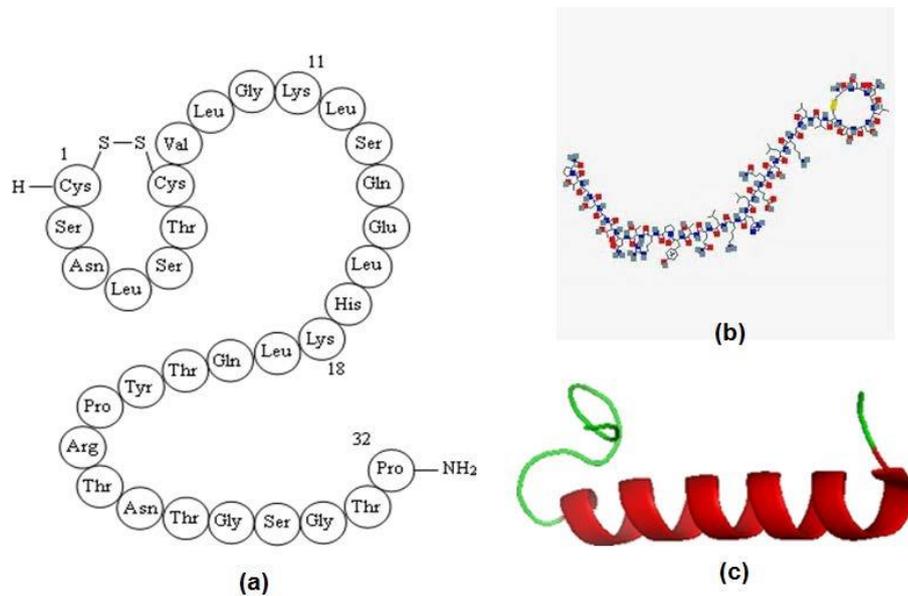


Figure 01 : Structure de la Calcitonine mature (Leclère *et al.*, 2001)

La pré-procalcitonine est codée par le gène Calc-1 localisé sur le chromosome 11. son clivage génère le peptide signal et la procalcitonine (PCT), qui est clivée en katalcalcine et CT immature, puis en CT mature (figure 02).

Les concentrations les plus élevées de CT sont retrouvées dans les cellules C de la thyroïde, bien qu'elles puissent également être présentes dans d'autres tissus tels que les parathyroïdes, le thymus, les poumons, l'intestin grêle, la vessie et le foie.

La CT mature exerce une activité biologique sur la régulation du métabolisme phosphocalcique, sur l'os, le système nerveux central, la fonction respiratoire, le système gastro-intestinal, le système reproductif et le rein. Sa sécrétion est potentiellement régulée par les concentrations plasmatiques de calcium et de gastrine. (Becker *et al.*, 1992 ; Leboulleux *et al.*, 2004 ; Niccoli-Sire et Conte-Devolx, 2007).

Toutes les calcitonines (CT) ont une activité antiostéoclastique bien documentée, agissant sur des récepteurs spécifiques situés sur les ostéoclastes. Administrée à des doses pharmacologiques, la CT inhibe complètement la résorption osseuse médiée par les ostéoclastes, entraînant une rétraction des ostéoclastes de la matrice osseuse et une disparition de leur bordure en brosse (Kallio *et al.*, 1972 ; Holtrop *et al.*, 1974). De plus, elle entrave la mobilité cytoplasmique des ostéoclastes, un mécanisme crucial dans son action en tant qu'inhibiteur de la résorption osseuse, car cette mobilité est nécessaire à la libération

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

extracellulaire d'enzymes impliquées dans la dégradation de la matrice osseuse (Chambers et Dunn, 1983). En plus de son effet direct sur les ostéoclastes, la CT provoque une division rapide des ostéoclastes en cellules mononucléées dépourvues de capacité de résorption osseuse et inhibe la fusion des cellules ostéoclastiques actives (Baron et Vignery, 1981).

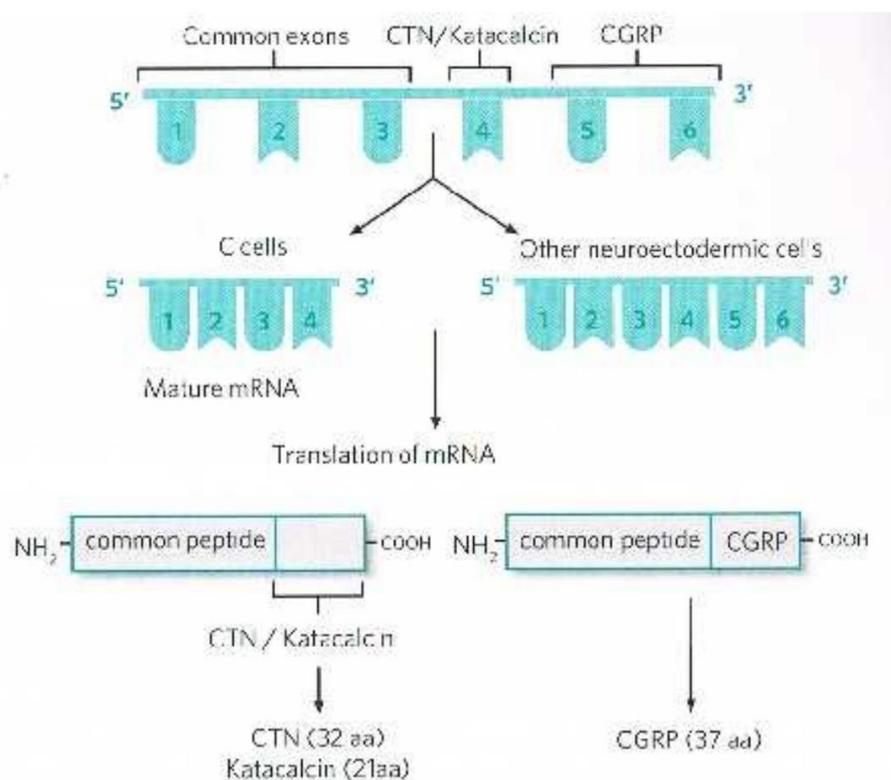


Figure 02 : Gène de la calcitonine et synthèse de la CT (Schlumberger *et al.*, 2015)

La CT est identifiée comme marqueur biologique du cancer médullaire de la thyroïde (CMT) dès 1968. Une augmentation de la CT basale, en particulier après stimulation par l'injection de pentagastrine, est associée à une pathologie des cellules C (HCC ou CMT). Les techniques de dosage immunométriques actuelles, utilisant des anticorps monoclonaux (l'un spécifique de la région N-terminale et l'autre de la région C-terminale), sont spécifiques de la CT mature monomère, permettent de la doser avec précision (Motte *et al.*, 1988 ; D'Herbomez *et al.*, 2001).

Dans des conditions normales, les niveaux de CT basale sont inférieurs à 10 pg/ml chez 100 % des individus sains (Wion-Barbot *et al.*, 1997) et chez 97 % des patients atteints d'autres affections thyroïdiennes que le CMT (Niccoli *et al.*, 1997).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Il existe une corrélation entre le taux de CT et la masse tumorale (Cohen *et al.*, 2000), et des valeurs élevées de CT basale, généralement supérieures à 100 pg/ml, sont fortement indicatives de la présence d'un CMT. Des valeurs modérément élevées de CT basale, inférieures à 50 pg/ml, peuvent être associées à un CMT microscopique mais également à une hyperplasie des cellules C (HCC) fonctionnelle pouvant entrer dans le cadre d'une thyroïdite par exemple (Niccoli *et al.*, 1996). Ainsi, un nodule thyroïdien palpable accompagné d'une élévation modérée de la CT (< 50 pg/ml) exclut la possibilité d'un CMT, suggérant plutôt la présence d'une HCC ou d'un microcarcinome médullaire de la thyroïde. Pour des valeurs de CT dépassant 10 pg/ml, 41 % des patients atteints de pathologie nodulaire thyroïdienne sont diagnostiqués avec un CMT, donnant une sensibilité de 70 % et une spécificité de 97,6 % (Niccoli *et al.*, 1997). Basé sur des études internationales, il est actuellement recommandé de dépister le CMT par le dosage de la CT en routine devant une pathologie uni-ou multinodulaire thyroïdienne (Ozgen *et al.*, 1999 ; Hahms *et al.*, 2001 ; Elisei *et al.*, 2004 ; Karges *et al.*, 2004). D'autres conditions physiopathologiques peuvent également entraîner une élévation de la CT, telles que les tumeurs endocrines, les thyroïdites lymphocytaires ou les lésions tumorales thyroïdiennes bénignes ou malignes autres que le CMT, elle est liée dans ce cas à l'existence d'une HCC diffuse ou focale (Guyetant *et al.*, 1994 ; Albores-Saavedra *et al.*, 1988 ; Karanikas *et al.*, 2004 ; Gibelin *et al.*, 2005). De plus, une hyper-CT peut être observée chez 25 % des patients dialysés présentant une insuffisance rénale sévère (Niccoli *et al.*, 1995 ; Lissak *et al.*, 1998). Ces diverses causes d'hyper-CT peuvent entraîner des résultats de dépistage faussement positifs, Une approche attentiste avec surveillance régulière des niveaux de CT est préconisée, car une diminution voire une normalisation spontanée des taux de CT peut parfois être observée.

En pratique, toute valeur de CT basale supérieure à 10 pg/ml doit être vérifiée à nouveau : pour des valeurs limites supérieures ou modérées, il convient de tenir compte des conditions de prélèvement, notamment l'absence de jeûne, qui pourrait artificiellement augmenter les valeurs de CT. Ensuite, il est important de vérifier les normes de la trousse utilisée, d'exclure toute prise médicamenteuse pouvant être responsable de l'hyper-CT (comme les inhibiteurs de la pompe à protons) et d'éliminer les causes évidentes telles que l'insuffisance rénale et la thyroïdite chronique de Hashimoto. Une hyper-CT basale confirmée devrait ensuite entraîner la réalisation d'un test de stimulation par la pentagastrine (Pg).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

II.2. Les tests de stimulation de la CT utilisés pour le diagnostic des CMT

Le test de stimulation par la pentagastrine (Pg) est couramment utilisé pour diagnostiquer le CMT. Il implique une injection intraveineuse lente de 0,5 µg/kg d'un analogue synthétique de la gastrine (pentagastrine - Peptavlon®), suivie de prélèvements sanguins à plusieurs intervalles. Alors que la réponse habituelle de la CT à la pentagastrine indique un CMT, elle peut également se produire dans d'autres situations pathologiques ou physiologiques. Il convient de noter que la tolérance à ce test est souvent limitée, avec des effets secondaires tels que des malaises, des rougeurs et des nausées.

Chez un adulte en bonne santé, le pic de CT stimulé est généralement inférieur à 30 pg/ml dans 96 % des cas (et à moins de 10 pg/ml dans 80 % de ces cas), tandis qu'il est systématiquement inférieur à 30 pg/ml chez les sujets de moins de 20 ans (Wion-Barbot *et al.*, 1997). Seulement 4 % des adultes en bonne santé présentent un pic de CT stimulé compris entre 30 et 50 pg/ml, avec une variation significative des valeurs de CT en fonction du sexe, qui sont plus élevés chez l'homme.

Dans le CMT, il est généralement observé lorsque que le pic de CT stimulée dépasse 100 pg/ml (Hahms *et al.*, 2001 ; Elisei *et al.*, 2004 ; Karges *et al.*, 2004). Cependant, certains CMT authentiques, notamment les microcarcinomes, peuvent présenter une réponse de la CT inférieure à ce seuil. En revanche, certaines anomalies thyroïdiennes autres que les CMT, telles que les goitres multinodulaires, les adénomes colloïdes, les cancers thyroïdiens différenciés et les thyroïdites chroniques, peuvent également entraîner une réponse à la pentagastrine, généralement inférieure à 100 pg/ml (Niccoli *et al.*, 1997 ; Iacobone *et al.*, 2002 ; Karanikas *et al.*, 2004), témoignant d'une HCC réactionnelle (Tableau I).

En réalité, la combinaison des valeurs de CT basale et stimulée se révèle être la méthode la plus sensible et spécifique pour diagnostiquer un CMT. Une CT basale égale ou supérieure à 30 pg/ml et une réponse de la CT à la pentagastrine égale ou supérieure à 200 pg/ml sont des indicateurs fortement prédictifs d'un CMT, avec une sensibilité de 90,5 % et une spécificité de 80,6 % (Iacobone *et al.*, 2002).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau I : Interprétation du test à la pentagastrine

(Pg) (Iacobone *et al.*, 2002).

Valeur du pic de CT après Pg (pg/ml)	
< 10	Normal
< 30	96 % des témoins adultes sains
30-50	4 % des témoins adultes sains
50-100	Possible CMT Autres pathologies thyroïdiennes
> 100	Probable CMT

II.3. Autres paramètres biologiques

L'antigène carcino-embryonnaire (ACE) est un marqueur non spécifique et moins fiable que la CT. Il peut être un marqueur de différenciation d'un CMT et à ce titre un marqueur de mauvais pronostic (Machens *et al.*, 2007).

La procalcitonine (PCT) est potentiellement un autre marqueur de CMT avec des performances diagnostiques proches (Algeciras-Schimnich *et al.*, 2009) ou un peu inférieures à celle-ci. Le rapport PCT/CT est un facteur pronostique des CMT (Walter *et al.*, 2010).

II.4. Diagnostic biologique des autres composantes de NEM2

Chacune des atteintes du syndrome dispose de marqueurs biologiques permettant d'en faire le diagnostic mais aussi d'assurer la surveillance post-thérapeutique (Niccoli-Sire et Conte-Devolx, 2007).

II.4.1. Diagnostic biologique de l'HPT

Le diagnostic est posé facilement par l'existence d'une hypercalcémie associée à une augmentation de la parathormone (PTH) 1-84 ou d'une normocalcémie avec une PTH élevée. Les techniques d'imagerie complémentaires ne sont généralement pas nécessaires car le diagnostic de l'HPT des NEM2A nécessite une exploration chirurgicale des quatre parathyroïdes pour la plupart des équipes chirurgicales. Cependant, l'imagerie préopératoire permet parfois d'identifier un site médiastinal parathyroïdien (Niccoli-Sire et Conte-Devolx, 2007).

II.4.2. Diagnostic biologique du phéochromocytome

C'est en première intention un diagnostic biologique fait sur l'élévation des méthoxyamines (normétadrénaline et métadrénaline) urinaires ou plasmatiques (Pacak *et al.*, 2005). Le dosage des méthoxyamines urinaires est réalisé sur le plasma ou les urines de 24 heures, avec une sensibilité de 98–100 % (Eisenhofer *et al.*, 1999 ; Prêteurs *et al.*, 2002 ; Weise *et al.*, 2002). La chromogranine A est également un marqueur diagnostique spécifique des tumeurs endocrines, dont la sensibilité pour le phéochromocytome est équivalente à celle des méthoxyamines urinaires (85–100 %) (Nehar *et al.*, 2004). L'imagerie surrénalienne n'est à réaliser qu'en seconde intention lorsque le diagnostic biologique est établi pour localiser le ou les phéochromocytomes.

La sensibilité et la spécificité de ces explorations sont respectivement de 98 et 92 % pour la tomодensitométrie, de 100 % pour l'IRM, et de 60–90% et 95–100 % pour la scintigraphie à la mono-iodobenzylguanidine (MIBG) (Prêteurs *et al.*, 2002 ; Pacak *et al.*, 2005 ; Prêteurs *et al.*, 2005).

III. Le proto-oncogène RET :

III.1. Circonstances de découverte du proto-oncogène RET :

Au cours de ces dernières décennies, il a été observé que de nombreux gènes, dont les produits jouent un rôle dans la régulation de la croissance cellulaire normale et du développement, présentent également la capacité d'induire la formation de tumeurs malignes.

En 1976, Stéhelin et ses collègues ont démontré que les oncogènes n'étaient pas spécifiques aux rétrovirus, mais que l'on retrouvait des séquences presque identiques dans le génome de toutes les cellules des vertébrés (Stehelin *et al.*,1976). Il s'agit des oncogènes cellulaires, ou encore des proto-oncogènes.

En 1985, l'identification du proto-oncogène *RET* par Masahide Takahashi et Geoffrey Cooper était à la fois fortuite et exemplaire, lors d'expériences de transfection de fibroblastes murins avec de l'ADN génomique extrait de lymphomes T humains (Takahashi *et al.*,1985). Lors de cette transfection, il s'est produit un réarrangement entre deux séquences d'ADN différentes, impliquant un gène codant une protéine kinase.

La protéine chimère issue de cette recombinaison a été responsable de la transformation de fibroblastes. Et le gène en question, a été appelé *RET* pour « *Rearranged during transfection* » ou « *réarrangé pendant la transfection* » (Iwamoto *et al.*,1993 ; Naoya *et al.*,2006 ; Ibanez,2013)

Le gène chimérique résultant code une protéine de fusion comportant une région N-terminale avec un motif dimérisé (Takahashi *et al.*,1987 ; Castellone et Santoro,2008)

Plus tard, le nom *RET* a été retenu pour indiquer le gène codant pour un récepteur à activité tyrosine kinase avec un domaine tyrosine kinase provenant de cet oncogène avec lequel il a fusionné. Il a ensuite été cloné et identifié comme récepteur à activité tyrosine kinase. La partie C-terminale de la protéine codée par ce gène est homologue de 40-50% aux autres tyrosines kinases (Paul ,1994 et al.).

En 1987, des analyses de liaison ont permis de localiser le gène de prédisposition à la NEM2A dans la région péricentrique du chromosome 10 (Mathew,1987 ; Simpson,1987). Par la suite, plusieurs équipes ont démontré que le CMT familial et les NEM2B étaient liés au même locus de prédisposition (Donis-Keller,1993 ; Mulligan,1993).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Une carte génétique de la région péricentrique du chromosome 10 a été progressivement élaborée et la localisation du locus NEM2 précisée par rapport aux marqueurs de cette carte (Norum *et al.*,1990).

Les études menées par divers groupes au cours des six années suivantes ont confirmé les premières observations et ont permis une compréhension plus approfondie des mécanismes par lesquels ces mutations induisent une transformation néoplasique et ont mis en lumière un possible rôle du complexe récepteur RET dans le développement embryonnaire normal (Donis-Keller *et al.*,1993) .

Par ailleurs des mutations somatiques de RET ont été identifiées dans le CMT et le phéochromocytome sporadique.

III.2. Structure et localisation du proto-oncogène RET :

Le proto-oncogène RET humain a été localisé sur le bras court du chromosome 10 (10q11.2). Il est constitué de 21 exons, s'étendant sur plus de 60 kb d'ADN génomique (Ishida *et al.*,1995). RET code pour un récepteur membranaire doté d'une activité tyrosine kinase (Kommino,1997). Il possède un site unique de début de transcription (Toh *et al.*,1992) et code pour la protéine RET, un récepteur à activité tyrosine kinase formée de 3 domaines (Ivanchuk *et al.*,1997).

Les exons 1 à 11 codent le domaine extracellulaire de la protéine se lie aux ligands , il comporte quatre répétitions de type cadhérine possédant un site de liaison au calcium ainsi qu'une région riche en cystéine qui joue un rôle crucial dans la dimérisation du récepteur.

L'exon 12 code le domaine transmembranaire, Il s'agit d'un domaine hydrophobe qui traverse la membrane cellulaire.

L'exon 13 et les exons suivants codent le domaine intracellulaire, constitué de deux sous-domaines à activité tyrosine kinase, à savoir TK1 et TK2 impliqués dans l'activation de plusieurs voies de transduction des signaux intracellulaires (Zordan *et al.*,2006).

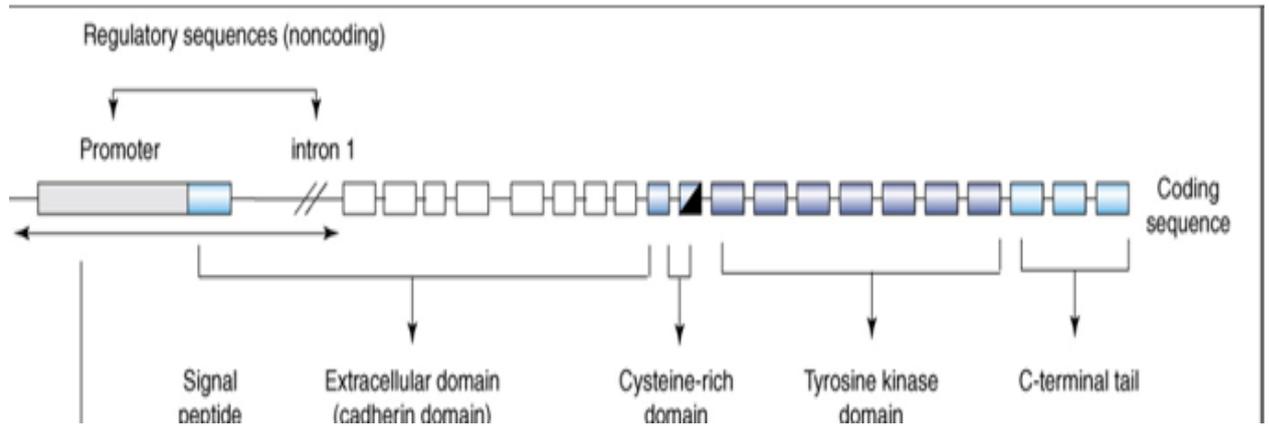


Figure 03 : Le proto-oncogène RET ses exons et introns (Ivanchuk *et al.*,1997).

III.3. Expression de RET :

L'expression du gène RET est un mécanisme complexe ayant une importance capitale dans le développement embryonnaire.

Elle est généralement observée dans les tumeurs neuroendocrines, telles que le PHEO, le CMT et l'HPT. Dans les tissus normaux, RET est présent dans les tissus neuronaux, notamment les neurones entériques périphériques, sympathiques et sensoriels, dans les neurones moteurs, dopaminergiques et noradrénergiques, ainsi que dans le développement du système excréteur (le canal mésonéphrique et le bourgeon urétéral ramifié) et dans les spermatogonies (Baloh *et al.*,2000 ; Airaksinen et Saarma ,2002 ; Airaksinen *et al.*,2006 Ibanez ,2013).

III.4.1. Le proto-oncogène RET et ses transcripts

III.4.1.1. L'épissage alternatif en 5' de RET

Des isoformes de RET où le domaine cadhérine en N-terminal est absent ont été identifiées mais leur fonction reste inconnue. Un groupe distinct de trois variantes de transcripts a été décrit dans la région codant pour le domaine extracellulaire de RET (Vargas-Leal et Alemagne ,2003).

Deux de ces variants résultent d'un saut de l'exon 3 (RET2/4) ou des exons 3, 4, 5 (RET2/6). Ils codent pour des protéines avec des délétions dans le domaine extracellulaire de fixation du ligand.

Le troisième variant, RET2/5, qui résulte d'un saut des exons 3 et 4, code pour l'isoforme tronquée sécrétée de RET (Vargas-Leal et Alemagne ,2003) (Figure 4).

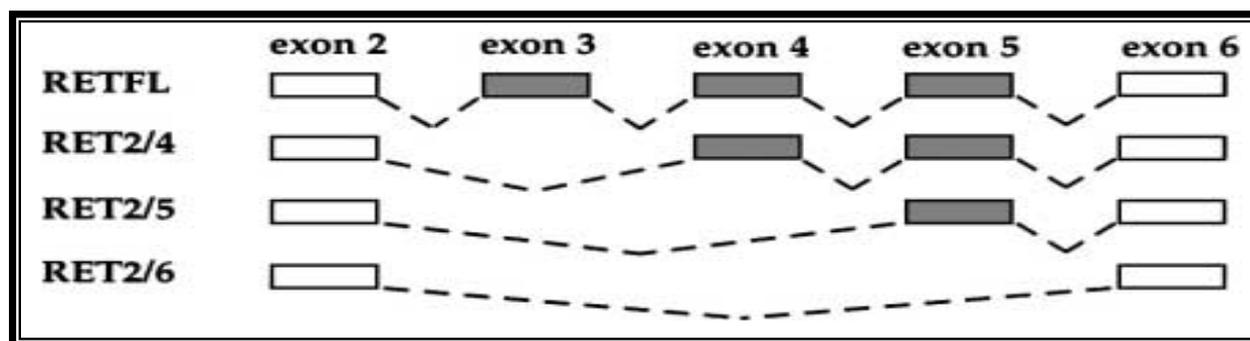


Figure 04 : Les différentes isoformes 5' terminales du proto-oncogène RET (Vargas-Leal et Alemagne ,2003)

Les transcrits pleine longueur sont trois fois plus exprimés que les transcrits des isoformes RET2/4 et RET2/6 dans le cerveau et le rein du fœtus humain.

Ces transcrits codent pour des protéines sans domaine transmembranaire : ce sont les formes solubles de RET (Vargas-Leal et Alemagne ,2003).

III.4.1. 2. L'épissage alternatif en 3' de RET :

Les derniers exons de RET subissent un épissage alternatif, ce qui conduit à la production de trois isoformes protéiques avec des queues C-terminales différentes, les isoformes longues, intermédiaires, et courtes de RET désignées RET51, RET43 et RET9. Elles diffèrent par les 51,43, et 9 acides aminés de l'extrémité C-terminale respectivement (Schimke et Hartmann ,1965).

-Les transcrits codant les isoformes courtes RET9 et longues RET51 sont les plus abondamment exprimés. Ils comportent les 19 premiers exons de RET (Myers *et al.*,1995).

-Les transcripts RET51 sont produits quand l'exon 19 est directement épissé à l'exon 20.

-Les transcripts RET43 sautent l'exon 20 et possèdent l'exon 19 et l'exon 21.

-Les transcripts RET9 ne subissent pas d'épissage en aval de l'exon19 (Figure 05).

Une partie de la séquence de l'intron 19 codera les neuf derniers acides aminés de la protéine RET9.

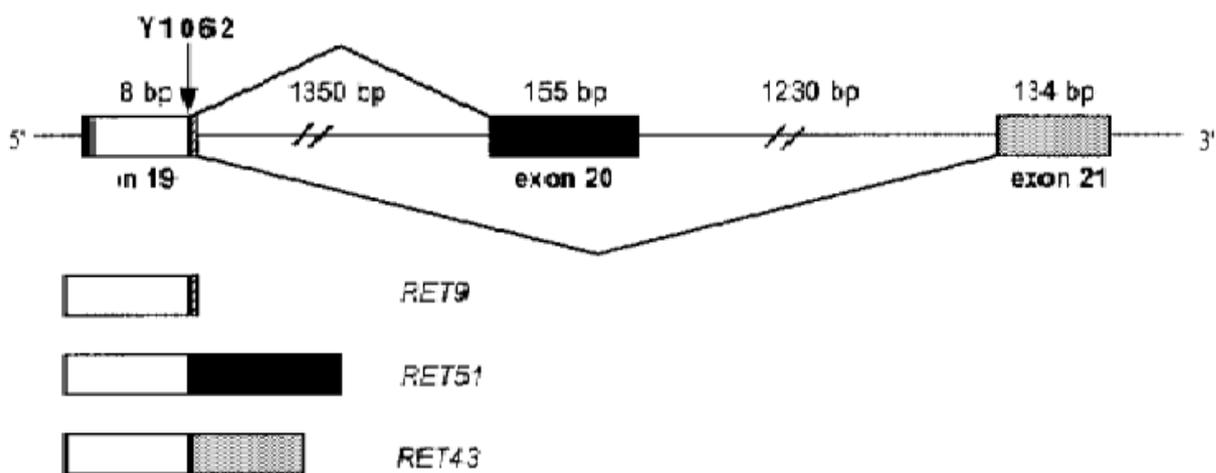


Figure. 05 : Organisation génomique de l'extrémité 3' terminale du proto-oncogène RET

(LeHir *et al.*,2000)

Les transcripts RET9 et RET51 sont relativement plus abondants, alors que celui de RET43 possède un faible niveau d'expression dans tous les tissus étudiés (Ivanchuk *et al.*,1998 ; Carter *et al.*,2001).

Des études fonctionnelles suggèrent que les trois isoformes de RET possèdent des rôles biologiques tout à fait différents (Asai *et al.*,1995) .

Les isoformes RET9 et RET 51 présentent des propriétés biochimiques et biologiques distinctes et pourraient jouer différents rôles dans le développement et la tumorigenèse.

IV. La protéine RET

IV.1. Structure de la protéine kinase RET

Le proto-oncogène *RET* de l'être humain code pour un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase, essentiel pour la croissance normale des cellules dérivées de la crête neurale, telles que les cellules thyroïdiennes.

La protéine RET comporte :

- **Quatre domaines cadhérine-like : (résidus 29-516)**

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Codée par les exons 1-8 ; les cadhérines sont des protéines d'adhésion cellulaire calcium dépendante dont les propriétés d'adhésion dépendent des domaines cadhérine répétés, constitués d'environ 110 résidus acides aminés localisés dans la région extracellulaire. Un site de fixation pour le calcium est souvent présent entre les domaines (Figure 06) (Brigitte *et al.*,2004).

Récemment, il a été démontré que ces domaines participent à la fixation du calcium, menant à la stabilisation (linéarisation et rigidité) de la région extracellulaire (Ponder ,1999).

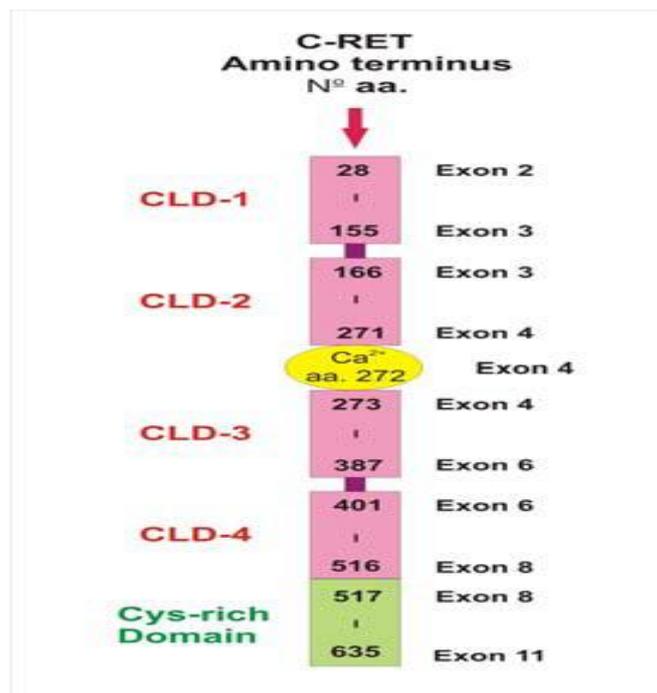


Figure 06 : Les différentes régions de l'extrémité N terminale extracellulaire, les acides aminés et les exons correspondants (Fluge *et al.*,2001)

- La région riche en cystéine : (résidus 517-635)

Codée par les exons 8-11, elle comporte 28 cystéines (Cys), 27 des 28 résidus Cys du domaine sont conservées parmi les espèces, indiquant un rôle critique pour ces résidus dans la formation des ponts disulfures intramoléculaires corrects et la dimérisation du récepteur (Ponder ,1995).

Le domaine extracellulaire de la molécule contient plusieurs sites de glycosylation (Tsui-Pierchala *et al.*,2002). Les domaines Cadhérine-like et le domaine riche en cystéines sont

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

insérés dans le réticulum endoplasmique (RE) et deviennent glycosylés pendant le transport de RET à travers le R.E. et l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane plasmique.

- Un domaine hydrophobe transmembranaire : (résidus 636-657)

Caractérisé par une séquence hydrophobe dont la fonction est d'ancrer le récepteur à la membrane plasmique (Masatoshi *et al.*,2004).

- Une partie intra-cytoplasmique : (résidus 657-1016)

Codée par les exons 12-18, elle comporte une partie juxtamembranaire (résidus 658-723) et un domaine tyrosine kinase situé au-delà du domaine transmembranaire.

Elle possède deux domaines tyrosine kinase, formés chacun de deux parties (résidus 724-1016) :

- une partie N terminale capable de fixer l'ATP complexée aux ions Mn^{2+} ou Mg^{2+}
- une partie C- terminale dotée d'une activité phosphotransférase.

L'activité kinase, résultant de l'autophosphorylation sur des résidus tyrosines dans le domaine catalytique, est cruciale pour l'activation des voies de transduction et pour l'induction des réponses cellulaires comme la survie, la prolifération et la différenciation.

Ce domaine intracellulaire de RET possède de nombreuses tyrosines (Y) (entre 16 et 18) selon les différentes isoformes. Les isoformes courtes et moyennes de RET contiennent 16 résidus tyrosine, dont 10 sont situés dans le domaine kinase, deux dans le domaine intracellulaire juxtamembranaire, un dans le domaine d'insertion de la kinase et trois dans la partie carboxy-terminale.

L'isoforme pleine longueur de RET a deux tyrosines additionnelles à son extrémité C-terminale (Ishizaka *et al.*,1989).

RET51 est une protéine de 1114 AA, RET 43 contient 1106 AA et RET 9 est une protéine plus petite de 1072 AA (Scott *et al.*,2005).

RET51 et RET9 partagent 1063 résidus AA de l'extrémité N-terminale et diffèrent l'une de l'autre seulement dans leur extrémité C-terminale (Ivanchuk *et al.*,1998) (Figure 7).

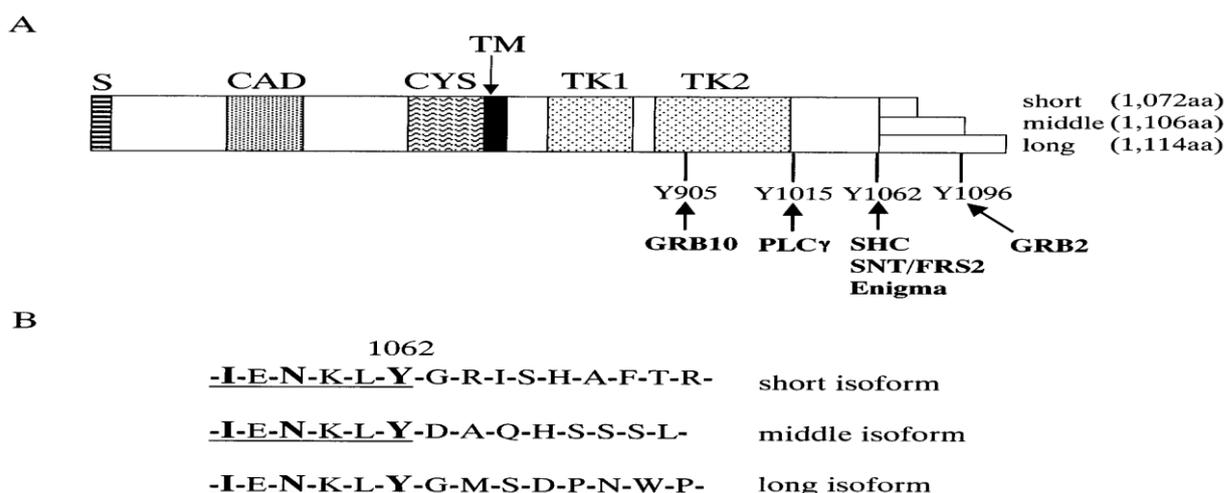


Figure 07 : Les trois isoformes de RET et leurs sites de signalisation (Kotzbauer *et al.*,1996)

Les complexes de signalisation associés à RET51 et RET9 sont nettement différents, suggérant que les isoformes distinctes puissent exercer différentes fonctions physiologiques de RET (Masatoshi *et al.*,2004) RET9 et RET51 sont les produits principaux *in vivo*.

IV.2. Signalisation cellulaire médiée par RET

IV.2.1. Les ligands de RET

Le GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*) est un des ligands de RET. D'autres membres de la famille du GDNF ou GDNF Ligands Family (GLFs) : la neurturine, l'artemine et la persephine ont été caractérisés et ont montré qu'ils se lient aussi à RET et l'activent (Ibanez,1998). Il s'agit de protéines impliquées dans la différenciation et la migration des cellules du neuroectoderme.

Les GLFs sont des facteurs neurotrophiques proches de la famille du TGFβ (*transforming growth factor* β). Ils fonctionnent sous forme d'homodimères.

La fonction principale du GDNF est liée à la croissance, à la migration et à la survie des cellules de la crête neurale qui migrent au niveau du rein et au niveau du système nerveux entérique (ENS). Il régule la croissance et la différenciation de toutes les classes de neurones périphériques à savoir sympathiques, parasympathiques sensoriels et entériques (Mildbrandt *et al.*,1998) .

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

IV.2.2. Les corécepteurs de RET

Les ligands de RET ne se lient pas directement au récepteur RET, mais à une première molécule membranaire ou corécepteur, le GFR α (GDNF family Recepteur alpha). Il existe 4 GFR α 1-4 (Worley *et al.*,2000), qui sont des molécules ancrées à la face externe de la membrane par un petit groupe d'AA attaché ou associé au glycosyl phosphatidyl inositol (Figure 8).

Les GFR α sont habituellement liés à la membrane plasmique, mais leur clivage par une phospholipase inconnue ou des protéases produit les formes solubles de ces corécepteurs (Lindahl *et al.*,2001).

Dans tous les cas, l'activation de RET par son ligand nécessite la présence de l'un des 4 corécepteurs GFR α 1- 4. Ils permettent la fixation du ligand et déterminent ainsi la spécificité du complexe pour le ligand.

Le GDNF se lie préférentiellement au GFR α 1, la neurturine au GFR α 2, l'artémine au GFR α 3 et la perséphine au GFR α 4). Cependant, des interférences entre les ligands et les corécepteurs ont été observées in vitro (Vega *et al.*,1996) (Figure 8).

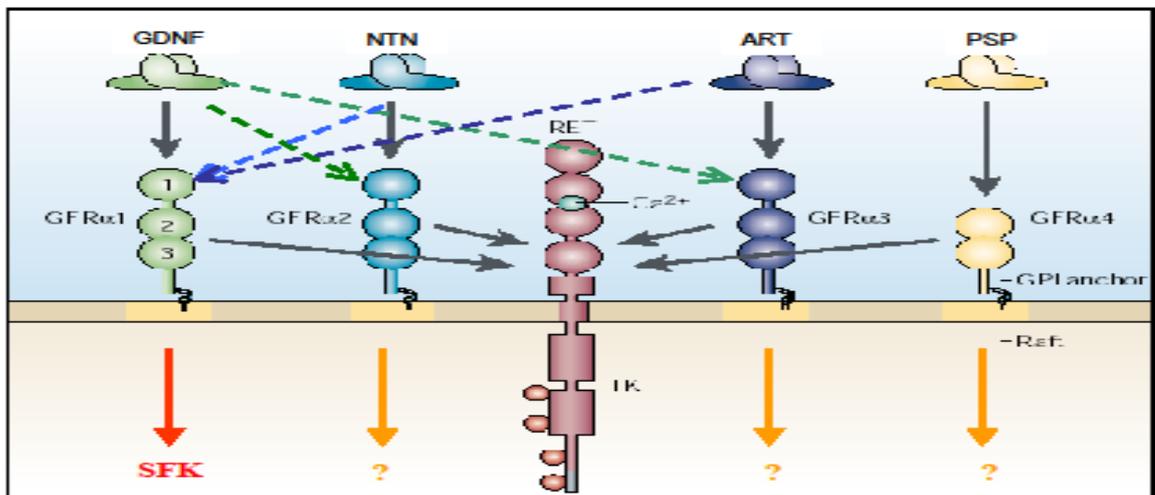


Figure 08 : Interaction des différents récepteurs alpha avec les ligands de la famille du GDNF (Fluge *et al.*,2001)

IV.2.3. L'activation et signalisation induite par la protéine RET

L'activation de *RET* se produit par étapes

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Le gène *RET* est stimulé indirectement par ses ligands, le GDNF, la neurturine, l'artémine et la persépine. L'activation de *RET* par le GDNF nécessite la fixation d'ions calcium à l'un des quatres domaines cadhérines.

Activation ou signalisation en cis de RET :

Dans un premier temps, deux monomères de $GFR\alpha$ liés à la membrane plasmique, localisés dans des domaines membranaires particuliers appelés rafts lipidiques se lient à un homodimère de GDNF (Tansey *et al.*,2000).

Ainsi, la fixation du GDNF au $GFR\alpha$ -RET permet le rapprochement physique de deux molécules de RET qui sont en quelque sorte, pompées par le complexe GDNF- $GFR\alpha$ recrutant ainsi RET aux rafts lipidiques de la membrane plasmique (Jing Baloh *et al.*,2000). Par la suite le complexe formé par le GDNF et son récepteur α se fixe sur le site de liaison extra-membranaire de RET permettant son homodimérisation et son activation (Figure 9).

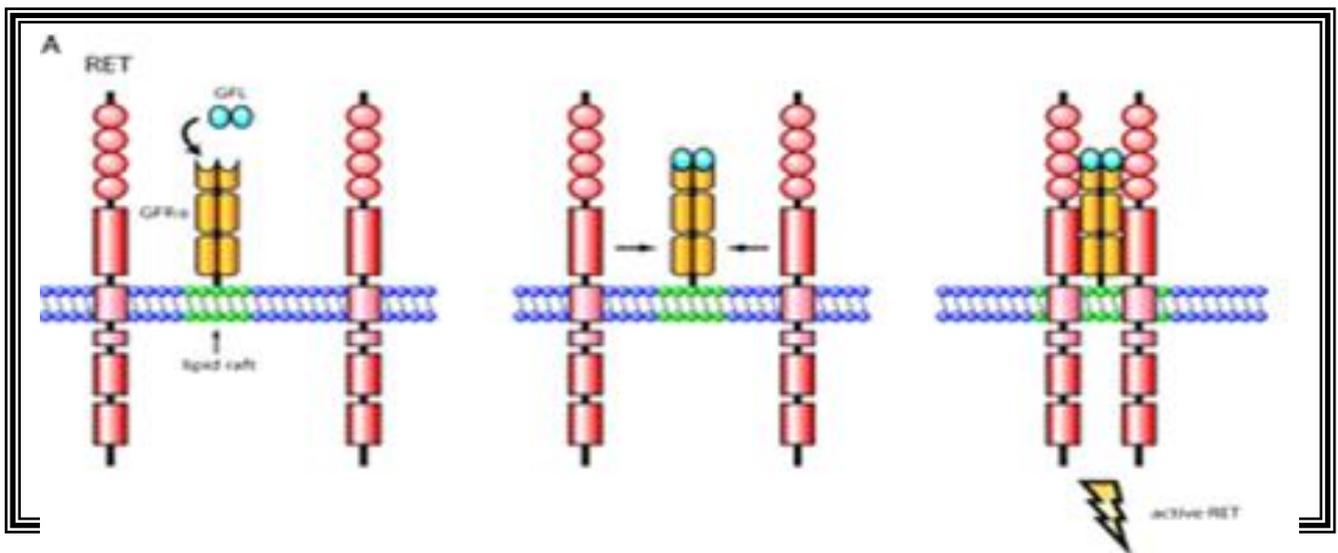


Figure 09 : Activation de RET en cis (Jan Willem *et al.*,2006)

L'activation ou signalisation en trans de RET :

Pendant la signalisation trans, les formes solubles de $GFR\alpha 1$ non fixées à la membrane plasmique, localisées en dehors des rafts lipidiques et complexées au GDNF, pourraient

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

activer RET en dehors des compartiments des rafts lipidiques, puis induire sa translocation dans les rafts lipidiques selon un processus dépendant de l'activité catalytique de RET (Moura *et al.*,2009) (Figure 10) .

En dehors des rafts lipidiques, RET peut être phosphorylé mais les réponses biologiques observées suite à l'activation par le GDNF paraissent atténuées (Moura *et al.*,2009).

L'activation de RET en trans a également comme conséquence la mobilisation de RET au niveau des rafts lipidiques de la membrane plasmique. Le récepteur, une fois phosphorylé, pourrait initier différentes voies de signalisation.

La protéine RET activée par son ligand est préférentiellement associée à la protéine adaptatrice Shc en dehors des rafts, et à FRS2 du récepteur FGF dans les rafts (figure 11) (Lindahl *et al.*,2001) .

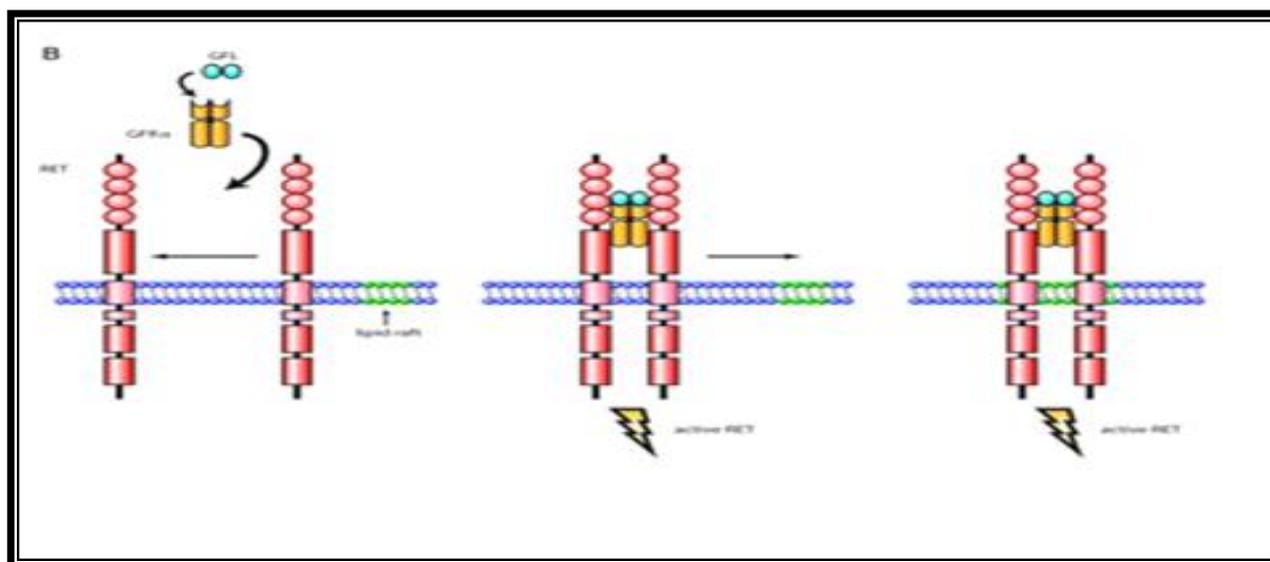


Figure 10 : Activation de RET en trans (Jan Willem *et al.*,2006)

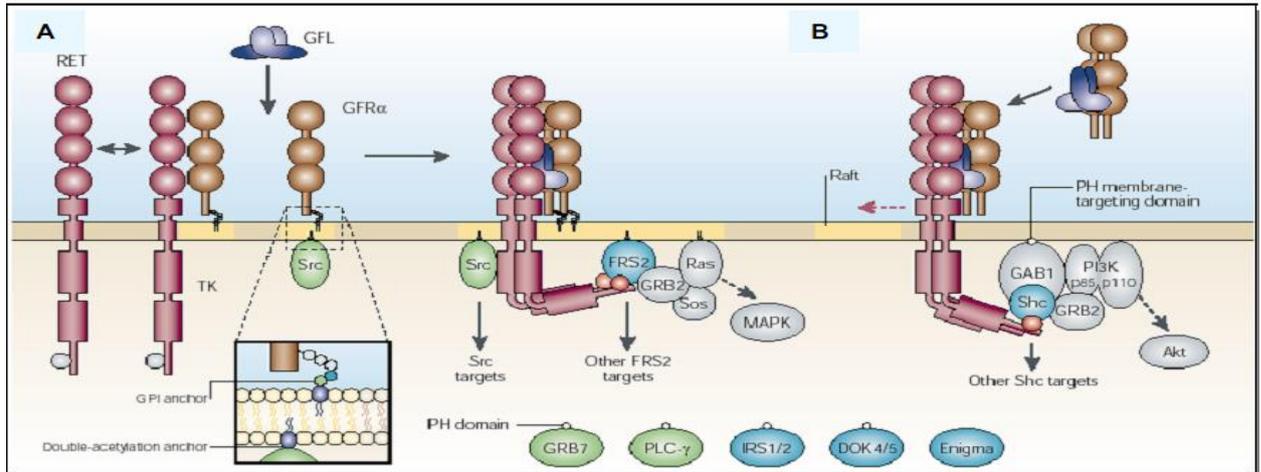


Figure 11 : Les protéines associées à RET en dehors et dans les rafts lipidiques (Fluge *et al.*,2001)

Signalisation proprement dite :

L'activation de la région intracytoplasmique du domaine tyrosine kinase catalytique de RET, permet la transphosphorylation mutuelle des résidus tyrosines de RET (Iwashita *et al.*,1996 ; Schuringa *et al.*,2001).

Ces tyrosines vont servir de sites de fixation aux protéines de signalisation intracellulaire. Toutes les tyrosines sont potentiellement impliquées dans la transduction du signal de prolifération, différenciation et survie cellulaire. Elles n'ont pas été toutes étudiées en détail, mais parmi elles, au moins quatre semblent se lier à des protéines effectrices : Y905, Y1015, Y1062, Y1090 et Y1096 (Schuringa *et al.*,2001) (Figure 12).

Parmi les résidus tyrosines intracellulaires, les Y1015 et Y1062 sont d'une importance capitale pour la signalisation intracellulaire.

La Y1062 semble jouer un rôle essentiel. Cette tyrosine située dans la partie C-terminale du récepteur, hors du domaine kinase, peut se lier à au moins six différentes protéines effectrices : FRS2, DOK4/5 (downstream of tyrosine kinase 4/5), IRS1/2 (insulin receptor substrate1/2), Rai enigma , Shc ShcC (un adaptateur protéique spécifique des neurones) (Figure 12) et la protéine adaptatrice SHC à comme conséquence le recrutement de GRB2 et de GAB1–GAB2 suivi de l'activation de la voie t PI3K (Bessee *et al.*,2000)(Figure 12).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Alternativement, la PI3-K stimule la sérine-thréonine kinase AKT, menant à des réponses cellulaires multiples, telles que la signalisation de survie assurée par l'activation de N-F-KB et la progression accélérée du cycle cellulaire (Melillo *et al.*,2001) (Figure 12).

En outre, la fixation de SHC, comme celle de SNT–FRS2, aux complexes GRB2–SOS résulte de l'activation de RAS/ ERK (Rat Sarcoma oncogène / Extracellular Signal-Regulated kinase (Melillo *et al.*,2001 ; Watanabe *et al.*,2002).qui contribue à la signalisation mitogène par l'activation des facteurs CREB et du facteur AP1 de transcription aboutissant à la prolifération cellulaire (Borrello *et al.*,1995).

La Y1062 phosphorylée de RET stimule également p38MAPK et la voie ERK5 (Besseet *et al.*,2000).

Dans les NEM2 et le FMTC, l'activation oncogénique de RET dépend de la position de l'AA substitué.

Des mutations dans le domaine extracellulaire riche en cystéine sont généralement retrouvées dans les NEM2A. Elles convertissent un résidu cystéine en un autre résidu. Normalement, ces résidus cystéines sont impliqués dans la formation de ponts disulfures intra moléculaires dans RET. La mutation laisse un résidu cystéine non apparié dans un monomère de RET. Cette cystéine libre va former un pont disulfure intermoléculaire anormal avec un autre monomère muté de RET. Les deux molécules mutées de RET sont constitutivement actives (dimérisées et activent RET en trans) (Jan Willem *et al.*,2006).

Les mutations dans le domaine tyrosine kinase intracellulaire, qui sont généralement retrouvées dans les NEM2B et le FMTC, activent les tyrosines et altèrent la spécificité de l'enzyme au substrat qui est due aux changements dans la structure de la poche de liaison du domaine tyrosine kinase de RET et cette altération entraîne une auto-activation constitutive du domaine tyrosine kinase du récepteur, indépendamment du ligand (Cinzia *et al.*,2009) (Figure 13). Par conséquent, RET muté n'a plus besoin de se dimériser pour devenir actif (Murakami *et al.*,1999).

L'activité de transformation de RET NEM2A dépend de la phosphorylation de la Y905. Il a été démontré que dans RET/ NEM2B la phosphorylation de la Y1062 est augmentée et celle de la Y1096 est réduite, tandis que dans RET/NEM2A, la phosphorylation de la Y1096 est augmentée et celle de la Y1062 est diminuée.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Les voies PI3K/Akt et RAS/MAPK sont plus augmentées dans RET-NEM2B que dans RET-NEM2A (Chiariello *et al.*,1998).

La protéine DOK1 est fortement associée à la Y1062 dans RET-NEM 2B (Figure 12), fournissant de ce fait une explication possible pour le phénotype plus agressif des NEM2B comparé aux NEM2A.

DOK1 lie la protéine RET à la voie JNK par la protéine adaptatrice NCK. Cependant, DOK1 est également associé aux protéines RET-NEM2A, indiquant que l'affinité pour DOK1 ne peut à elle seule expliquer les différences de phénotype entre les NEM2A et les NEM2B (Drosten *et al.*,2003) (Figure 12).

Les criblages génétiques utilisant un modèle *in vitro* de cellules NIH/3T3 exprimant RET/NEM2A et RET/NEM2B ont identifié que 10 gènes sont induits et huit gènes sont réprimés par des mutations dans le proto-oncogène RET (Borrello *et al.*,1995).

Les gènes induits incluent la cycline D1, la cofiline, et la cathepsine L et B, qui sont connues pour être impliquées dans la croissance des cellules, la progression de tumeur et l'invasion. Les gènes réprimés ont inclus le collagène de type 1, lysyl oxydase, l'annexine 1 et les gènes TIMP3 qui sont suppresseurs de tumeur.

En outre, RET/NEM2A induit principalement six gènes et RET/MEN2B, en induit cinq gènes. Parmi ces gènes, l'expression de ITGA6 jouerait un rôle dans le phénotype des NEM2A, et STC1 dans celui des NEM2B (Lorenzo *et al.*,1997).

Généralement toutes ces voies contribuent à la transformation cellulaire après activation, tandis que, dans des conditions normales, elles participent à la signalisation de survie médiée par RET (Machens *et al.*,2003 ; Niccoli-Sire *et al.*,2005).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

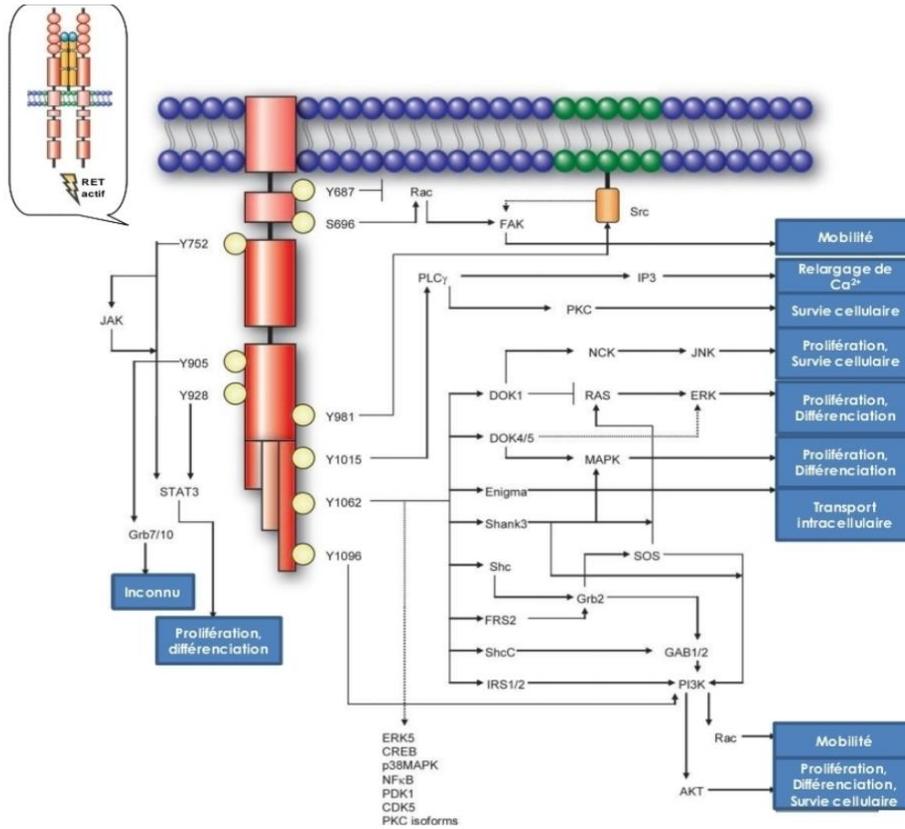


Figure 12: Les différentes voies de signalisation de RET (Groot *et al.*,2006)

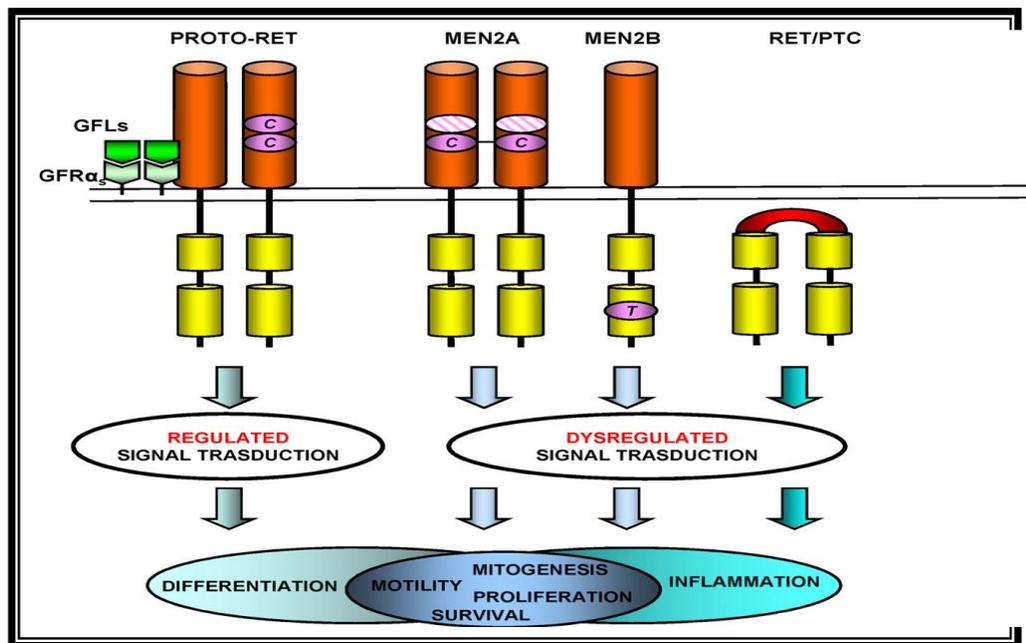


Figure 13 : Mécanismes d'activation oncogénique de la protéine RET (mehlen et Bredsen,2000)

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

V. Les variants du proto-oncogène RET et corrélations phénotype /génotype

Les variants peuvent être de plusieurs types (5 types) cependant deux variants sont les plus mentionnées dans les travaux : Les variants pathogènes que l'on nomme généralement les mutations et les variants non pathogènes qui sont les polymorphismes.

V.1. Les variants pathogènes de RET

Les mutations germinales de *RET* sont liées aux CMT héréditaire (NEM2A, NEM2B et CMTF), alors que le CMT sporadique est secondaire à des mutations somatiques de l'ADN les cellules tumorales.

V.1.1. Les variants ou mutations constitutionnelles du proto-oncogène RET

Des mutations germinales du proto-oncogène RET sont retrouvées dans 99 % des NEM2B, 98 % des NEM2A et 95 % des CMTF.

Les premiers variants pathogènes de *RET* ont été rapportés en 1993 par deux groupes de chercheurs indépendants (Mulligan *et al.*, 1993 ; Donis-Keller *et al.*, 1993), et dès lors, plus de 100 variants pathogènes de *RET* ont été identifiés avec un pourcentage élevé chez les patients NEM2A chez lesquels un diagnostic clinique de CMT, de PHEO ou HPT a été observé (Mulligan *et al.*, 2014 ; Raue *et al.*, 2019 ; Maciel *et al.*, 2021).

Les variants pathogènes les plus fréquemment retrouvées sont localisés dans les exons 5, 8, 10, 11, 13, 14, 15 et 16 du proto-oncogène *RET* (Mulligan *et al.*, 1993 ; Da Silva *et al.*, 2003) et, selon l'American Thyroid Association (ATA) et l'European Thyroid Association (ETA), elles sont classées en trois niveaux de risque : risque le plus élevé (ATA-HST), élevé (ATA-H) et modéré (ATA-MOD) (Brandi *et al.*, 2001 ; Kloos *et al.*, 2008 ; Elisei *et al.*, 2013 ; Wells *et al.*, 2015 ; Maciel *et al.*, 2021).

Les mutations faux-sens sont principalement localisées dans les exons 5, 8, 10, 11, 13, 14, 15 et 16 (domaine extracellulaire de RET et Tyrosine kinase) (Segouffin *et al.*, 2000 ; Raue et Frank, 2010 ; Zarif *et al.*, 2011) à l'exception d'une duplication de 9 pb (après le codon 531, dans l'exon 8) et duplications de 9 et 12 paires de bases (codons 634-636) duplication des codons 634/640.

La NEM2B survient dans environ 95% des cas suite à la mutation spécifique M918T de l'exon 16, qui entraîne une altération de la structure du domaine intracellulaire TK de la protéine RET. En effet , ces mutations n'ont aucun effet sur la dimérisation du récepteur mais, elles favorisent l'activation constitutive des voies de signalisation intracellulaire, ce qui aboutit à la transformation cellulaire (Machens *et al.*, 2003 ; Yeganeh *et al.*, 2015).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chez environ 2 à 3% des patients atteints de NEM 2B, le génotype A883F (GCT → TTT, exon 15) peut être retrouvé (Smith *et al.*, 1995 ; Gimm *et al.*, 1997). De plus, une double mutation V804M/Y806C au niveau des codons 804 (Val/GTG → Met/ATG, exon 14) et 806 (Tyr/TAC → Cys/TGC) a été décrite chez un patient atteint de NEM 2B.

Dans le FMTC, les mutations germinales sont distribuées dans tout le gène RET. Environ 86 à 88 % des familles CMTF présentent une mutation dans l'une des 5 cystéines du domaine extracellulaire du gène RET, survenant dans l'exon 10 (codons 609, , 611, 618, 620) et l'exon 11 (codon 634) (Mulligan *et al.*, 1994 ; Hofstra *et al.*,1997). Les substitutions dans l'exon 13 (codons 768, 790, 791), l'exon 14 (codons 804 et 844) et l'exon 15 (codon 891) sont moins fréquentes dans le domaine intracellulaire de RET. Il est intéressant de noter que la mutation la plus fréquente des NEM2A, la C634 R, n'a pas été décrite dans les familles CMTF (Eng *et al.*, 1995 ; Eng *et al.*, 1996 ; Hofstra *et al.*,1997).

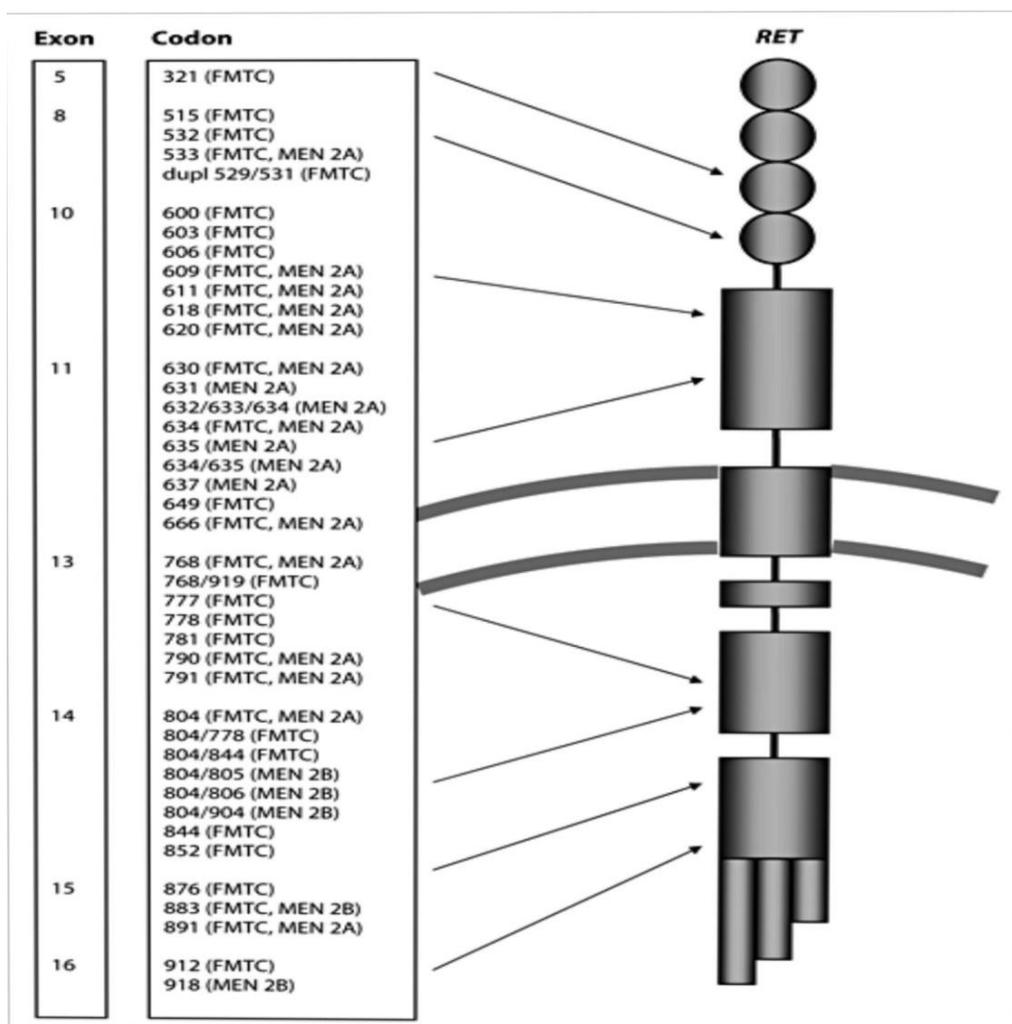


Figure 14: Overview of the known germline mutations in the RET gene and their associated human disease. (Cakir et Grossman., 2009)

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

La majorité de ces mutations du proto-oncogène RET peuvent être classées en deux catégories : avec perte de fonction ou gain de fonction, à l'exception de quelques-unes qui provoquent des phénotypes doubles.

Les mutations gain de fonction de RET sont principalement responsables des NEM2. Elles peuvent être subdivisées en deux groupes : celles qui modifient les résidus cystéine dans le domaine riche en cystéine et celles qui altèrent les résidus le domaine kinase de *RET* (RET-KD).

Les mutations avec perte de fonction du proto-oncogène RET sont à l'origine de la maladie de Hirshsprung. La plupart du temps, elles sont localisées au domaine riche en cystéine (Kouvaraki *et al.*, 2005).

En plus des mutations géniques de *RET*, des translocations chromosomiques peuvent produire des fusions oncogènes qui incluent le domaine tyrosine kinase de RET (oncogènes RET/PTC). Ces oncogènes sont responsables du développement du cancer papillaire de la thyroïde (PTC) (Buckwalter *et al.*, 2002 ; Knowles *et al.*, 2006).

V.1.2. Les mutations somatiques du proto-oncogène RET

Les mutations somatiques de *RET* sont présentes dans jusqu'à 66 % des CMT sporadiques (Romei *et al.*, 1996 ; Dvorakova *et al.*, 2008). Elles sont localisées aux codons, 611, 618, 620, 630, 631, 632, 634, 636, 639, 641, 748, 766, 768, 876, 883, 884, 901, 908, 919, 922, et 930. Des délétions des codons 592 à 607, 630, 632/633, 633 à 635, et 634 ont été également décrites (Romei *et al.*, 1996).

Cependant, la plus courante est la mutation p.Met918Thr (M918T), qui est également le variant germinale responsable d'environ 95 % des cas de NEM2B (Wells *et al.*, 2015). Cette dernière a été identifiée dans jusqu'à 68 % des CMTs (Marsh *et al.*, 1996) suivi de la mutation p.Ala883Phe (A883F) (Moura *et al.*, 2009).

Des chercheurs ont récemment découvert que 18 à 80 % des CMT sporadiques sans mutation somatique de RET présentent des mutations somatiques de HRAS, de KRAS ou, rarement, de NRAS (Moura *et al.*, 2011).

Des études ultérieures de séquençage exomique des CMT n'ont pas détecté d'autres mutations génétiques communes (Agrawal *et al.*, 2013).

Le CMT sporadique, contrairement aux formes familiales, est une maladie complexe et multifactorielle causée par de multiples variants génétiques dans différents gènes de

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

susceptibilité de faible pénétrance (*STAT1*, *AURKA*, *BCL2*, *CDKN2B*, *CDK6*, *CDKN2B* et *COMT*) (Gimm *et al.*, 1999).

Cinq de ces gènes sont directement ou indirectement impliqués dans les voies de signalisation de RET.

V.2. Les variants non pathogènes ou polymorphismes de RET

Un locus génétique est considéré comme polymorphe si la fréquence d'un ou plusieurs allèles rares est d'au moins 0,01. La plupart des polymorphismes ne modifient pas l'activité fonctionnelle de la protéine codée, mais tous les polymorphismes ne sont pas neutres. Si l'existence d'un polymorphisme ou d'un haplotype (un ensemble de marqueurs ou de polymorphismes étroitement liés hérités en tant qu'unité) est liée à un certain phénotype, il peut agir comme un modificateur génétique et prévenir la maladie. Il est également possible que les polymorphismes interagissent avec d'autres variants génétiques et mutations germinales associées à la NEM2 pour influencer le développement de caractères.

V.2.1. Les polymorphismes dans le CMTF et la NEM2A

Les variants non pathogènes de RET sont courants et ont été identifiées dans les populations générales de pays, y compris ceux atteints de CMT.

Ces variants sont classés comme bénins ou probablement bénins par des bases de données telles que NCBI Clinvar (aggregates information about genomic variation and its relationship to human health) (Landrum *et al.*, 2018) et celles des HGMD (mutations génétiques humaines (HGMD)(Stenson *et al.*, 2003). Les variants non pathogènes de *RET* n'ont en principe aucun impact fonctionnel significatif sur l'activité des gènes ou le développement du CMT

Ils ne sont généralement pas associés à un risque accru de CMT ou d'autres cancers, et leur présence ne nécessite aucune intervention clinique spécifique.

Plusieurs polymorphismes mononucléotidiques (SNP) et haplotypes de RET ont été décrits dans la population générale et en association avec la NEM 2A et le CMTF (Robledo *et al.*, 2003).

Parmi ces variants de variants non pathogènes de *RET*, les S836S (rs1800862), S904S (rs1800863) et L769L (rs1800861) pour lesquelles un effet fonctionnel n'était pas bien défini et n'était pas répertorié dans les directives de l'ATA (Eng *et al.*, 1996 ; Kloos *et al.*, 2009 ; Wells *et al.*, 2015). Des tests génétiques pour les variants germinales pathogènes du proto-oncogène *RET* sont recommandés pour tous les patients présentant un CMT, mais les variants

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

non pathogènes ne nécessitent aucune intervention clinique spécifique. Certains variants non pathogènes de *RET* peuvent jouer un rôle modulateur, affectant les paramètres cliniques, l'âge de début et l'évolution de la maladie. Mais c'est encore un domaine de recherche en cours.

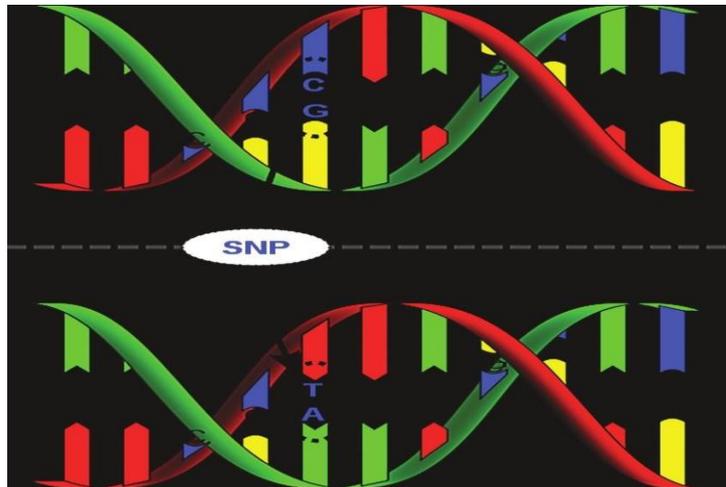


Figure 15: schémas présentant un polymorphisme de simples nucléotides (SNP)
(Hall *et al.*, 2009).

Étant donné que les individus apparentés et non apparentés présentant la même mutation germinale *RET* développent un CMT et un PHEO à des âges différents, d'autres événements génétiques ou épigénétiques peuvent déclencher une tumorigenèse, notamment la présence de polymorphismes et d'haplotypes dans *RET*.

Plusieurs SNP et haplotypes *RET* associés à la MEN2A ont été décrits dans la population générale (Feingold, 2000 ; Sifi, 2012).

Les polymorphismes les plus étudiés dans les NEM2A sont les G691S (exon 11) et S904S (exon 15). Des études (Ruiz *et al.*, 2001) ont montré que les individus homozygotes pour ces polymorphismes sont en moyenne 10 ans plus jeunes que les individus hétérozygotes ou de type sauvage lorsqu'on leur diagnostique une NEM 2A. Ceci suggère que les variantes G691S et S904S pourraient influencer l'âge d'apparition du syndrome de NEM2A.

V.2.2. Les polymorphismes dans le cancer modulaire de la thyroïde sporadique

Différents types de polymorphismes de *RET* ont été observés dans les CMT sporadiques. Il a été démontré que parmi les cas sporadiques de CMT en Allemagne et aux États-Unis, le SNP S836S était significativement plus présent et semble être lié à la mutation somatique

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

M918T de l'ADN tumoral des mêmes patients (Berard *et al.*, 2004). Ces résultats ont été indépendamment validés dans une autre étude espagnole (Berard *et al.*, 2004). Néanmoins, dans les recherches menées en France, en Pologne, en Angleterre, au Chili et en Autriche (Ruiz *et al.*, 2001 ; Robledo *et al.*, 2003 ; Wiench *et al.*, 2004), le polymorphisme S836 S n'a pas été lié à une prédisposition au CMT sporadique.

IVS1-126G-T et IVS1-1463T-C, sont des polymorphismes exprimés chez les patients espagnols souffrant de CMT sporadique, cette étude a montré une corrélation significative entre la maladie et un haplotype spécifique dans l'intron 1 de RET, IVS1-126G-T et IVS1-1463T-C (Lenders *et al.*, 2002). L'association entre ces SNP et le CMT sporadique n'a cependant pas été mise en évidence chez des patients britanniques (Gath *et al.*, 2001). La présence de l'haplotype CGGATGCCAA a été aussi constatée chez des patients britanniques présentant un CMT sporadique. L'haplotype G691S, S904S et un codon STOP à plus de 388 pb présents dans l'exon 19 (Borrego *et al.*, 2003). G691S et S904S sont liés à la mutation sporadique du CMT et aux NEM2A (Fitze *et al.*, 2003 ; Elisei *et al.*, 2007), tandis que G691S est perçu comme un polymorphisme fonctionnel.

Suite à la substitution G-S dans la protéine RET, un nouveau site de phosphorylation est créé, ce qui a un impact sur la signalisation en aval (Fitze *et al.*, 2003). On peut également observer une modification de la structure secondaire de RET, ce qui peut avoir un impact sur la flexibilité et l'accessibilité des solvants à la protéine (Borrego *et al.*, 2003). Toutefois, d'autres données expérimentales sont requises afin de vérifier ces hypothèses.

L'Impact de ce polymorphisme sur l'âge de début du CMT sporadique n'a pas été observé dans d'autres études, contrairement à ce qui a été rapporté dans la forme familiale de la maladie. Effectivement, une étude de recherche espagnole a révélé que la variante germinale de l'intron 14 (IVS14-24G-A), initialement considérée comme la mutation responsable de la maladie d'HSCR (Borrego *et al.*, 1999), a également été observée avec une fréquence significativement plus élevée chez les patients ayant un CMTs (Ruiz *et al.*, 2001). Dans d'autres études, IVS14-24G-A n'a pas été lié à la maladie de Hirshprung ou à un CMT sporadique (Gimm *et al.*, 2001).

Cependant, un haplotype qui a un effet protecteur sur le CMT sporadique a été découvert : il s'agit du SNP A45 A (Borrego *et al.*, 2002 ; Berard *et al.*, 2004 ; Wohllk *et al.*, 2005) . De plus, il a été observé une corrélation entre un polymorphisme du gène GFRa1 et le CMT sporadique dans une étude cas-témoins réduite (Quayle et Moley., 2005). Toutefois, cette association n'a pas été retrouvée dans des études plus importantes (Borrego *et al.*, 2003 ;

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Scollo *et al.*, 2003). Il est essentiel de souligner l'importance potentielle des divers polymorphismes dans le développement du CMT sporadique, et de clarifier le mécanisme moléculaire de ces polymorphismes. Le rôle potentiel des différents polymorphismes dans le développement du CMT sporadique doit être encore plus important, et le mécanisme moléculaire de ces polymorphismes doit être élucidé.

V.3. Corrélation phénotype-génotype dans les NEM2

Il est remarquable de constater qu'une corrélation étroite entre le génotype et le phénotype a été établie dans le CMT des NEM2. En effet, chaque forme clinique est principalement associée à des mutations activatrices du proto-oncogène RET, dont le potentiel de transformation et l'expression clinique varient.

V.3.1. Corrélation phénotype-génotype dans les NEM 2A

Les mutations associées au phénotype NEM2A siègent majoritairement dans l'exon 11 au codon 634 dans plus de 85% des cas. La plupart du temps, il s'agit de la substitution C634R, qui n'a jamais été retrouvée dans les FMTC,

D'autres types de mutations situées dans les exons 10 (15 à 20 %) des cas et 11 ont été rattachées à la NEM2A dans un nombre restreint de cas respectivement aux codons 624 et 630, 631, 640, 649, duplications de 9 et 12 paires de bases (codons 634-636) duplication des codons 634/640 sur Le même allèle (Tessitore *et al.*, 1999 ; Bae *et al.*, 2006) (niveau de preuve 4). Il est à noter que pour la mutation de *RET* au codon 609, le phénotype apparaît singulier puisque c'est le PHEO qui révèle la maladie ; il s'associe à une pathologie des cellules C de stade anatomo-clinique précoce (HCC et micro CMT) (Kinlaw *et al.*, 2005).

Plusieurs études ont montré que les PHEO malins secondaires à des mutations dans les codons 609, 611, 618 et 620 peuvent être classés comme agressifs par rapport à ceux observés dans l'exon 11 au codon 634 (Punales *et al.*, 2003 ; Milos *et al.*, 2008 ; Maciel *et al.*, 2021). Le PHEO est associé chez approximativement 50% des patients, aux mutations des codons 634. La mutation du gène RET au codon 533 de l'exon 8 a été rapportée dans trois Familles de NEM2A associant aussi un CMT et un PHEO (Bethanis *et al.*, 2007 ; Peppas *et al.*, 2008) et rarement avec des mutations dans les exons 13 et 15 (codons 791 et 804) (Schuffenecker *et al.*, 1998) et les duplications de 9 et 12 paires de bases (codons 634 et 636 de l'exon 11). Il est aussi présent chez les patients NEM2A présentant une substitution des acides aminés au codon 618.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

La pénétrance du phéochromocytome est variable : Elle est de 41% avec la mutation C618R, de 24% avec la C618G et de 0% avec la C618Y (Punales *et al.*, 2003)

Néanmoins, dans la plupart des cas, le plus grand nombre de mutations est apparu au codon 634, suivi de manière décroissante pour les codons 609, 618 et 620 (Lindskog *et al.*, 2004 ; Neocleous *et al.*, 2004 ; Quayle *et al.*, 2007 ; Mucha *et al.* 2017).

Les mutations du proto-oncogène RET identifiées dans la portion du gène codant pour le domaine tyrosine kinase sur les codons 768, 790, 791 (exon 13), 804 (exon 14), 891 (exon 15) ont été longtemps associées à un phénotype de CMTF. La découverte de phéochromocytome et/ou d'hyperparathyroïdie primaire dans plusieurs séries de cas ont permis de rattacher également ces mutations au phénotype de NEM2A (Bendt *et al.*, 1990 ; Aiello *et al.*, 2005 ; Vierhapper *et al.*, 2005).

Des études récentes concernant le spectre des variants pathogènes rapportés dans *RET* chez des patients NEM2 ont également mis en lumière des formes cliniquement moins agressives de la maladie résultant de mutations dans les exons 13 à 15 du gène (Romei *et al.*, 2010 ; Machens *et al.*, 2013 ; Romei *et al.*, 2015 ; Saravana-Bawan et Pasternak., 2022).

Les mutations L790F, Y791F, S891A et R844L, sont observés dans le CMT et des NEM2A de gravité modérée.

Dans la mutation du codon 634, les phéochromocytomes et sont associés à la présence d'une hyperparathyroïdie (Frank-Raue *et al.*, 1996), et rarement avec la survenue d'un lichen amyloïde (CLA) (Verga *et al.*, 2003).

Il existe une grande variété de manifestations phénotypiques dans les familles présentant la même mutation *RET* ; Punales *et al.* ont constaté que le génotype C634R (TGC/Cys → CGC/Arg, exon 11) n'a jamais été retrouvée dans les CMTF suggérant ainsi que des altérations d'acides aminés spécifiques pourraient modifier la progression naturelle de la maladie (Punales *et al.*, 2003). Une étude récente a évalué le risque néoplasique spécifique au la mutation C634W de RET et les profils de pénétrance liés à l'âge et a révélé que pour le CMT , 52 % apparaissent à l'âge de 30 ans, 83 % à l'âge de 50 ans et jusqu'à 98 % et que les pénétrance sont élevés pour le phéochromocytome (20 % avant l'âge de 50 ans, 67 % à 50 ans et 92 % à 70 ans (Milos *et al.*, 2008). L'estimation de la pénétrance d'une NEM2A secondaire à la mutation germinale de l'exon 10 de RET ont été récemment décrite par Frank-Rau *et al.* (2011) dans une vaste étude multicentrique incluant 340 sujets issus de 103 familles. Les auteurs ont constaté que les mutations affectent principalement les codons de cystéine 609, 611, 618 et 620 et qu'une pénétrance de 50% était atteinte à 36 ans pour le CMT, à 68 ans

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

pour le phéochromocytome et à 82 ans pour l'HPT (Frank-Raue *et al.*, 2011). Ces données peuvent faciliter l'évaluation des risques et le conseil génétique pour le CMT.

La Coségrégation de la maladie de Hirshprung et des NEM2A est reliée, la plupart du temps, au domaine riche en cystéine et aux codons 620, C609, C611 et C618 (Kouvaraki *et al.*, 2005), souvent à la C620R, parfois à la C620S et rarement à la C620W (Fattoruso *et al.*, 1998).

Ainsi, le phénotype est probablement expliqué par une haplo-insuffisance, c'est à dire par la perte de 50 % du produit du gène RET normal dans les cellules atteintes. De ce fait, la plupart des mutations étudiées altèrent la fonction de transduction du signal (Pelet *et al.*, 1998).

Des études récentes concernant le spectre des variants pathogènes rapportés dans *RET* chez des patients NEM2 ont également mis en lumière des formes cliniquement moins agressives de la maladie résultant de mutations dans les exons 13 à 15 du gène (Romei *et al.*, 2010 ; Machens *et al.*, 2013 ; Romei *et al.*, 2015 ; Saravana-Bawan *et al.*, 2022).

V.3.2. Corrélation phénotype-génotype dans les NEM 2B

Une altération du codon 918 (exon 16) est associée de manière quasi spécifique à la NEM2B : Près de 98 % des patients atteints de ce syndrome en sont porteurs. Quelques rares familles de NEM2B ont une mutation du codon 883 (exon 15) (DeGimm *et al.*, 1997 ; Smith *et al.*, 1997).

De rares cas de NEM2B ont été rattachés à des mutations du gène *RET* dans les codons 912 et 922 de l'exon 16, ou à de doubles mutations situées sur le même allèle : respectivement aux Codons 804/806 (exon 14) (Miyachi *et al.*, 1999) et 804/904 (exons 14 et 15). Dans ce dernier cas, il se caractérise par l'absence de morphotype Marfanoïde (Menko *et al.*, 2002).

Le phénotype MEN2B comprend un certain nombre de troubles muqueux, ophtalmiques et squelettiques. En plus de l'atteinte de la thyroïde et des glandes surrénales. (Kawamoto *et al.*, 2004). De plus, *RET* M918T cible spécifiquement de nouveaux substrats de signalisation cellulaire comme STAT3 qui peut aider à la majoration de la transformation cellulaire (Schuringa *et al.*, 2001).

Chez environ 2 à 3% des patients atteints de NEM 2B, le génotype A883F (GCT → TTT, exon 15) peut être retrouvé (Smith *et al.*, 1995 ; Gimm *et al.*, 1997). De plus, une double mutation V804M/Y806C au niveau des codons 804 (Val/GTG → Met/ATG, exon 14) et 806 (Tyr/TAC → Cys/TGC) a été décrite chez un patient atteint de NEM 2B. Des patients atteints

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

de NEM 2B « atypique » présentant des mutations germinales doubles au niveau des codons 804 et 904 (V804M et S904C) ont également été rapportés (Miyauchi *et al.*, 1999 ; Menko *et al.*, 2002). Les mutations des codons 883 et 918 sont associées à un âge plus jeune d'apparition du CMT et à un risque plus élevé de métastases et de mortalité spécifique à la maladie (Zedenius *et al.*, 1995 ; Eng *et al.*, 1996 ; Pelizzo *et al.*, 2007).

V.3.3. Corrélation phénotype-génotype dans les CMTF

Dans le CMTF, les mutations germinales sont distribuées dans tout le gène RET. La majorité des familles CMTF présentent des mutations dans l'une des cystéines du domaine extracellulaire du gène RET, survenant dans l'exon 10 (codons 609, 611, 618, 620), les deux derniers codons étant préférentiellement atteints (38 % des cas) (Menko *et al.*, 2002).

Des mutations dans les exons 10 aux codons 603 et 606 (Rey *et al.*, 2001 ; Ercolino *et al.*, 2008) et dans l'exon 11, aux codons 630, 631, 634 et 666 sont également décrites dans un nombre restreint de cas (Mulligan *et al.*, 1994 ; Eng *et al.*, 1996 ; Hofstra *et al.*, 1997 ; Kitamura *et al.*, 1997 ; Uyttebroeck *et al.*, 2005). Il est intéressant de noter que la mutation la plus fréquente de MEN 2 A, C634 R, n'a pas été décrite dans les familles CMTF (Eng *et al.*, 1995 ; Eng *et al.*, 1996 ; Hofstra *et al.*, 1997).

Le phénotype CMTF est rattaché aussi à des mutations localisées dans le domaine intracellulaire de RET : majoritairement dans les exons 14 (codons 804 et 844) puis 13 (codons 768, 777, 790, 791) et 15 (codon 886 et 891) (Bendt *et al.*, 1990 ; Kitamura *et al.*, 1997 ; D'Aloiso *et al.*, 2006 ; Prazeres *et al.*, 2006). Ces CMTF ont la particularité de se présenter comme des CMT sporadiques avec un âge plus tardif d'apparition (48,6 ans en moyenne), avec pour 43 % d'entre eux un diagnostic fait devant un goitre multinodulaire associé à une élévation de la calcitonine en base (Niccoli-Sire *et al.*, 2001 ; Elisel *et al.*, 2007). La pathologie des cellules C est d'apparition en général plus tardive (30-50 ans). Cependant, des cas de CMT apparus dans l'enfance sont décrits au sein des familles, et le caractère invasif et métastatique de ces CMT existe, notamment chez les cas index (Niccoli-Sire *et al.*, 2001 ; Machens *et al.*, 2001). Ces génotypes se caractérisent aussi par une expressivité variable de la maladie et une hétérogénéité clinique au sein d'une même famille avec un phénomène d'anticipation possible (maladie plus évoluée au fil des générations) (Feldman *et al.*, 2000 ; Fitze *et al.*, 2002 ; Lesueur *et al.*, 2005).

Un phénotype CMTF a également été rapporté pour deux mutations : A883T et V804M, uniquement lorsque celles-ci sont retrouvées sous la forme homozygote (Elisel *et al.*, 2004 ;

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Lesueur *et al.*, 2005), une duplication au codon 532 et une mutation ponctuelle au codon 533 dans l'exon 8 sont également associées à un phénotype CMTF (Pigny *et al.*, 1999 ; Da Silva *et al.*, 2003).

Le phénotype CMTF est exceptionnellement rattaché à une mutation ponctuelle dans le codon 912 de l'exon 16 (malgré sa localisation dans le domaine tyrosine kinase proche du locus NEM2B) (Kameyama *et al.*, 2004), ou à des doubles mutations du gène RET : exon 14 (804/844, 804/778), exon 13 (790/804) (Kasprzak *et al.*, 2001). Dans ce cas, le CMT se caractérise par une particulière agressivité, supérieure notamment au phénotype clinique rencontré pour chacune des mutations isolées (Bartsch *et al.*, 2000).

Les données obtenues par l'expression des mutations de *RET* et les études fonctionnelles *in vitro* ont permis de stratifier les mutations en fonction de leur potentiel oncogénique et de leur agressivité (Samuel *et al.*, 2015).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau II : Relation entre les mutations RET courantes et le risque de MTC agressif dans NEM2A et NEM2B, et avec l'incidence de PHEO, HPTH, CLA et HD dans NEM2A (Samuel *et al.*, 2015).

RET mutation	Exon	MTC risk level b	Incidence of PHEO c	Incidence of HPTH c	CLA d	HD d
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/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

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau III : Classification révisée de l'ATA basée sur des niveaux de risque en fonction du génotype (Samuel *et al.*, 2015).

Niveau de risque	Type de mutation
Risque le plus élevé « highst risk » (HST)	M918T
Risque élevé « high risque » (H)	634 et A883F
Risque modéré « moderate risque » (Mod)	Les autres mutations outre M918T , C634 et A883F

VI. Corrélation phénotype-génotype dans les CMTs

Il existe des preuves significatives suggérant que les mutations somatiques de *RET* sont associées à de mauvais pronostics. Cela a été démontré pour la première fois en 1996 (Romei *et al.*, 1996), puis par Alessi *et al.* en 2008 dans une étude portant sur 100 patients sur un suivi de 10 ans (Elisei *et al.*, 2008).

Ces auteurs ont retrouvé une corrélation entre les mutations somatiques de *RET* et les métastases ganglionnaires au moment du diagnostic avec de faibles taux de guérison biologique après la chirurgie et survie à long terme. D'autres auteurs ont également démontré qu'un stade tumoral plus avancé et des résultats plus défavorables sont observés chez les patients présentant des mutations somatiques de *RET* (Dvorakova *et al.*, 2008 ; Moura *et al.*, 2009) et une spécificité améliorée en combinant l'utilisation de la mutation somatique de *RET* et les niveaux d'expression tumorale de Ki-67 (Mian *et al.*, 2011). La mutation p.Met918Thr (M918T), (Marsh *et al.*, 1996) est considérée comme prédictif d'un mauvais pronostic (Schilling *et al.*, 2001), tandis que, les patients porteurs de la mutation p.Ala883Phe (A883F) sont associés à des taux plus élevés de métastases ganglionnaires, de multifocalité du CMT et de maladie persistante par rapport aux patients présentant d'autres mutations somatiques de *RET* ou aucune mutation (Moura *et al.*, 2009). Des doubles mutations *RET* sont également associées à de mauvais pronostics (Romei *et al.*, 2016). Une méta-analyse de 23 études a révélé que les mutations somatiques de *RET* sont associées à des taux plus élevés de métastases ganglionnaires locales et à distance, de stade avancé au moment du diagnostic, de

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

récidive et de mortalité (Vuong *et al.*,2018). L'ADN tumoral présentant la mutation M918T peut également être détecté dans le sang périphérique, et il existe des preuves selon lesquelles l'ADN tumoral circulant présentant la M918T reflète une faible survie globale et prédit l'évolution du CMT avec plus de précision que le temps de doublement de la calcitonine (Cote *et al.*,2017).

VII. Prise en charge du CMT

Le développement du diagnostic génétique et sa généralisation ont permis le diagnostic et la prise en charge précoce des CMT.

VII.1. Bilan préopératoire

Un bilan d'extension se justifie si la CT basale est élevée : en pratique supérieure à 100 pg/ml, dans la mesure où les explorations morphologiques restent en règle négatives en deçà de ces valeurs. Ce bilan comprend des explorations par imagerie conventionnelle : recherche d'extension ganglionnaire cervicale (échographie), médiastino-pulmonaire (TDM cervico-thoracique ou IRM), hépatique (échographie, TDM, IRM), osseuse (scintigraphie). La laparoscopie est proposée à titre systématique par certains à la recherche de métastases hépatiques et péritonéales infracliniques retrouvées dans 21 % des cas au moment de la thyroïdectomie (Quayle et Moley, 2005).

VII.2. Bilan d'une maladie résiduelle et/ou métastatique

Les métastases sont souvent de localisation multiple, avec une atteinte hépatique préférentielle suivie par les poumons et l'os. Elles sont corrélées avec les valeurs de CT et d'ACE, et sur le plan clinique, le plus souvent associées à des flush et à la diarrhée motrice. Elles représentent la cause majeure de mortalité liée au CMT avec un abaissement de la survie à moins de 20 % à dix ans après leur diagnostic (Quayle et Moley, 2005).

Le bilan d'extension à réaliser devant un CMT non guéri par une chirurgie initiale adéquate et complète a pour objectif de localiser le(s) site(s) résiduels de sécrétion de CT. Ces explorations font appel aux techniques d'imageries conventionnelles habituelles, auxquels s'ajoutent les techniques invasives comme la laparoscopie ou le cathétérisme veineux étagé pour certains (Medina-Franco, 2001 ; Quayle et Moley, 2005). Les techniques scintigraphiques comme la TEP fluoro-DOPA semblent prometteuses pour l'avenir, le TEP 18FDG

n'ayant pas démontré de supériorité par rapport aux explorations morphologiques conventionnelles, notamment le TDM (Gotthardt *et al.*, 2004).

VII.3. Traitements du CMT

VII.3.1. Traitement chirurgical de première intention

Avant d'entreprendre la chirurgie du CMT, il est nécessaire d'éliminer la possibilité d'un PHEO associé dans le cadre d'une NEM2.

Le traitement du CMT est essentiellement chirurgical : il associe à la thyroïdectomie totale un curage ganglionnaire dont les modalités peuvent varier en fonction des équipes, mais dont le principe est admis compte tenu de la particulière lymphophilie du CMT : 55 à 75 % de métastases ganglionnaires au moment du diagnostic (Moley et DeBenedetti., 1999 ; Scollo *et al.*, 2003).

Le pronostic dépend de la qualité de l'exérèse chirurgicale initiale. L'envahissement ganglionnaire est précoce, dès le stade de microcarcinome (Scollo *et al.*, 2003 ; Tamagnini *et al.*, 2005).

Si le curage ganglionnaire du compartiment central récurrentiel est admis, aucun consensus n'est retrouvé sur la nécessité et l'extension du curage ganglionnaire latéro-cervical.

Le curage ganglionnaire extensif (central et latéro-cervical bilatéral) est ainsi préconisé pour les CMT familiaux, et avec métastases ganglionnaires dans le compartiment central, ou à titre systématique. Il permettrait de réduire le risque de rechute ganglionnaire. Un curage limité au compartiment latéro-cervical ipsilatéral peut être proposé pour un CMT unilatéral, en l'absence de métastases ganglionnaires récurrentielles et latéro-cervicales ipsilatérales (Machens *et al.*, 2002 ; Scollo *et al.*, 2003 ; Tamagnini *et al.*, 2005).

Pour les CMT infra centimétriques, le curage ganglionnaire central apparaît indiqué du fait de possibles métastases ganglionnaires associées et de la surmorbidity induite par une réintervention cervicale (Scollo *et al.*, 2003 ; Yen *et al.*, 2003 ; Hamy *et al.*, 2005). En revanche, la réintervention pour curage ganglionnaire après chirurgie initiale d'un CMT microscopique doit être réservée aux CMT familiaux, bilatéraux ou devant l'absence d'une guérison biologique.

VII.3.2. Attitude thérapeutique devant une maladie résiduelle

En cas de maladie résiduelle locorégionale après chirurgie, la reprise chirurgicale est indiquée pour des valeurs de CT élevées (> 100 pg/ml) si la chirurgie initiale a été incomplète (thyroïdectomie incomplète et/ou chirurgie ganglionnaire inadéquate). Un complément de

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

curage par cervicotomie et éventuellement sternotomie est indiqué, s'il existe des adénopathies cervicales et/ou médiastinales persistantes. Néanmoins, l'opportunité de la reprise chirurgicale doit être discutée au cas par cas :

Vu des résultats médiocres des reprises chirurgicales : normalisation de la CT dans moins de 30 % des cas, réduction du taux dans 40–70 % (Pellegritti *et al.*, 2003).

S'il existe des métastases à distance, la reprise chirurgicale cervicale n'est pas indiquée et l'indication des autres traitements est à discuter de façon pluridisciplinaire. En cas d'hyper-CT résiduelle avec chirurgie carcinologiquement satisfaisante et absence de métastases localisable, l'évolutivité biologique des marqueurs (CT et ACE) doit être appréciée, leur stabilité faisant préconiser l'abstention thérapeutique.

VII.3.3 Autres traitements

La diarrhée et la douleur (en cas de maladie métastatique) doivent être traitées de manière symptomatique. Les analogues de la somatostatine et les interférons n'ont aucune indication, car peu ou pas efficaces (Modigliani *et al.*, 1992 ; Nocera *et al.*, 2000). Les traitements systémiques sont essentiellement destinés à être palliatifs et/ou adjuvants d'une maladie résiduelle disséminée avec de multiples métastases identifiables non résécables, ou d'une hypercalcitoninémie résiduelle progressive sans masse tumorale identifiable, avec ou sans élévation de l'ACE, ce qui est dans ce cas un signe de dédifférenciation tumorale.

Chimiothérapie : Son efficacité n'a pas encore été prouvée (association doxorubicine, 5-fluorouracile, streptozotocine, dacarbazine, vincristine et cyclophosphamide) ; elle a un taux de réponse objective d'environ 20% et entraîne souvent une amélioration symptomatique partielle et transitoire, sans bénéfice sur la survie (Modigliani *et al.*, 1992 ; Orlandi *et al.*, 1994 ; Nocera *et al.*, 2000 ; Stein *et al.*, 2002).

La radiothérapie : cervico-médiastinale a été proposée pour retarder la survenue d'une rechute sans preuve claire de son efficacité.

Radio-immunothérapie : Les Anti-ACE, en séries courtes, permettent une meilleure survie avec amélioration symptomatique, stabilisation des lésions (Chatel *et al.*, 2006), la toxicité hématologique est le facteur limitant.

VIII. Thérapie ciblée du CMT sporadique

Étant donné le rôle établi de RET dans le CMTh et le fait qu'environ la moitié des CMTs présentent des mutations somatiques du *RET*, la plupart des efforts de développement de nouvelles thérapies se sont concentrés sur l'inhibition de RET et de ses voies de signalisations.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Cela a abouti à l'homologation d'inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) spécifiques de RET, les vandétanib et cabozantinib.

Ces deux médicaments se sont révélés supérieurs au placebo dans des essais contrôlés randomisés en double aveugle en termes de survie sans progression dans une population composée à la fois de CMTh et de MTCs (Wells *et al.*, 2012 ; Elisei *et al.*, 2013).

Dans l'essai initial sur le vandétanib, la mutation M918T RET a été identifiée chez 142 des 298 patients atteints de CMTs, et l'analyse en sous-groupe a révélé des taux de réponse plus élevés et une meilleure survie sans progression chez ces patients (Wells *et al.*, 2012). Cependant, une méta-analyse récente d'études sur le vandétanib a trouvé peu de preuves d'un bénéfice significatif, sans aucune preuve d'amélioration de la survie globale et un risque significatif d'effets secondaires, qui peuvent avoir un impact significatif sur la qualité de vie (Trimboli *et al.*, 2018). Il est à noter que les études incluses dans cette méta-analyse incluaient des patients atteints à la fois de CMTh et de CMTs et l'analyse des sous-groupes selon le profil de mutation somatique n'a pas été possible. Il est concevable que la stratification par profil génétique ait pu modifier les résultats, étant donné la preuve d'une amélioration des taux de réponse du CMTs lié à la M918T RET.

Récemment, deux inhibiteurs sélectifs de RET ont été développés et sont encore en cours d'évaluation dans le cadre d'essais cliniques. LOXO-292 fait l'objet d'études de phase 2, bien que les résultats préliminaires aient démontré une activité préclinique contre diverses altérations de RET. De plus, son utilisation chez un patient atteint de CMT avancé avec une mutation somatique confirmée M918T de RET a entraîné une régression tumorale, une diminution de la calcitonine sérique et une amélioration des symptômes (Subbiah *et al.*, 2018). Le deuxième médicament, le BLU-667, est également un inhibiteur sélectif de RET qui est encore en phase 2 d'essais, bien qu'une fois de plus les premières données aient montré de bonnes réponses chez les patients atteints de CMT et de multiples mutations de RET (Subbiah *et al.*, 2018). Il est évidemment trop tôt pour tirer des conclusions sur l'efficacité de ces nouveaux médicaments ou sur leurs effets relatifs chez les patients présentant différentes mutations de RET, même si ces premiers résultats sont prometteurs.

IX. Dépistage génétique du cancer modulaire de la thyroïde

Le contexte familial de CMT et/ou de phéochromocytome et/ou d'hyperparathyroïdie primaire rend le diagnostic de NEM2 hautement probable. Cependant, ni la négativité des

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

proposants familiaux, ni l'absence d'association lésionnelle, ne permettent d'exclure un cas index de NEM2 porteur d'une nouvelle mutation dont la prévalence est estimée entre 5 et 16 %. Le diagnostic définitif repose sur l'analyse moléculaire du gène *RET*, avec des preuves de mutation germinale. Cette analyse, réalisée de manière systématique, fait désormais partie du support de tout CMT, y compris ceux dont les présentations sont apparemment sporadiques (Niccoli-Sire *et al.*, 2001 ; Brandi *et al.*, 2001 ; Machens et Dralle., 2008).

Le principe de réaliser systématiquement cette analyse moléculaire avant le développement du CMT repose sur la possibilité de diagnostiquer la forme familiale du CMT. Dans un travail portant sur 807 cas de CMT apparemment sporadiques rapportés sur une période de 13 ans, une fréquence de 7,3 % de variants familiaux a été retrouvée, par l'analyse systématique du gène *RET* (Elisei *et al.*, 2007) . Dans d'autres séries, lorsque le gène *RET* est systématiquement analysé avant l'apparition du CMT, la prévalence des formes familiales varie de 7 à 16 % (Niccoli-Sire *et al.*, 2001 ; Wiench *et al.*, 2001 ; Bugalho *et al.*, 2007) .

Les formes familiales de CMT diagnostiquées suite à un CMT d'apparence sporadique sont associées à une fréquence élevée de mutations du gène *RET* dans les exons 13 à 15 (30 à 66 % des cas), les mutations du codon 804 étant les plus représentées (Niccoli-Sire *et al.*, 2001 ; Elisei *et al.*, 2004). Mis à part ces cas, 43,4% des patients porteurs de CMT avec des mutations de *RET* non codon-cystéine sont observées dans le goitre multinodulaire avec augmentation concomitante de la calcitonine (Niccoli-Sire *et al.*, 2001).

Le consensus international de 2001 sur les néoplasies endocriniennes multiples recommande ainsi, une recherche systématique de mutations de *RET* devant tout CMT, y compris des formes de présentation apparemment sporadiques (Brandi *et al.*, 2001). Cette analyse a également été recommandée par le groupe de tumeur endocrines français (GTE).

Les tests génétiques sont réalisés sur l'ADN lymphocytaire, le plus souvent par séquençage direct des produits de PCR, sur de 7 des 21 exons connus du proto-oncogène *RET* comme site de mutation : exons 8, 10, 11, 13, 14, 15. Et 16. L'absence de mutation rend le diagnostic de CMT sporadique avec une fiabilité de 95%. Contrairement aux recommandations du consensus international (Brandi *et al.*, 2001) , pour des raisons de bénéfice coût-efficacité, il ne semble pas obligatoire de proposer le séquençage d'autres exons du gène si l'analyse sur les exons est négative et que le caractère sporadique est probable (absence de antécédents, CMT unifocale, hyperplasie bilatérale des cellules C thyroïdiennes associée à l'absence).

La mise en évidence d'une mutation du gène *RET*, suivie d'une confirmation sur un deuxième échantillon indépendant, permet de diagnostiquer la NEM2 dans 95 % des cas.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Dans 5% des cas, la négativité de l'analyse n'exclut pas formellement le CMTF dont la mutation est actuellement inconnue. Ainsi, pour 1,4 % des NEM2 canoniques, aucune mutation de *RET* ne sera démontrée (Elisei *et al.*, 2007).

Lorsqu' une mutation génétique germinale est détectée, le dépistage génétique des mutations de *RET* chez les apparentés est réalisé , il permettra d'identifier :

- apparentés sains qui seront définitivement exclus de la surveillance.
- sujets porteurs de mutations familiales (voir figure), qui développeront la maladie (pénétrance proche de 100%) et qui bénéficieront donc des examens biologiques nécessaires au diagnostic des autres composantes de la NEM2.

Le dosage de la calcitonine plasmatique (CT) avec le test de stimulation à la pentagastrine (PG) permet de confirmer l'existence d'une pathologie des cellules C de la thyroïde, soit dès le premier test, soit lors d'un suivi ultérieur, et en partie d'évaluer le stade anatomo-clinique qui sera souvent présent à l'état être subclinique (HCC, micro CMT).

A l'issue de cette évaluation, une thyroïdectomie est indiquée. Cette chirurgie serait considérée comme prophylactique s'il n'y a aucun signe de pathologie des cellules C, ou si la maladie est déjà présente, généralement au stade d'hyperplasie des cellules C thyroïdiennes ou micro CMT (voir ci-dessus).

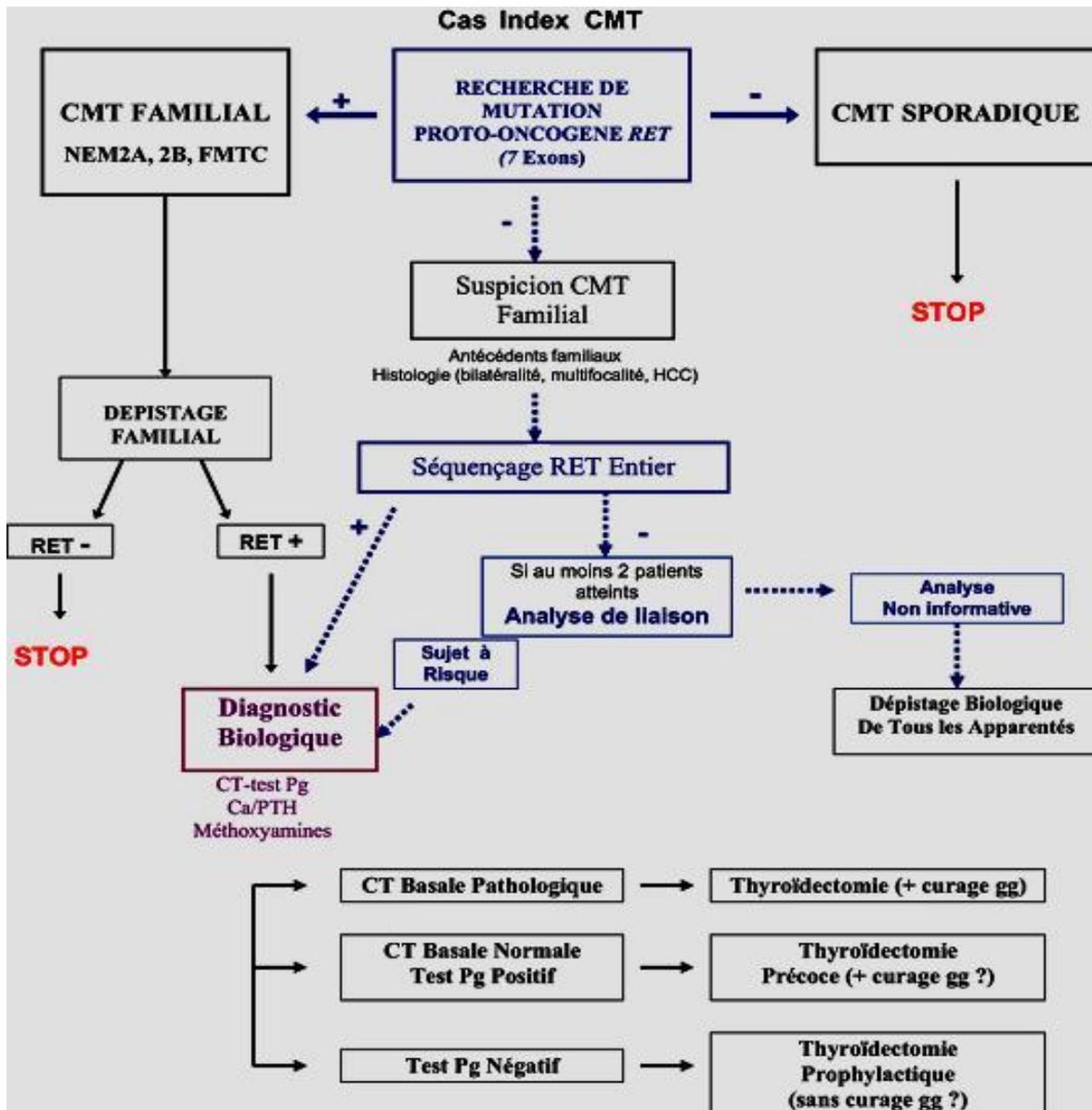


Figure 16 : Stratégie de dépistage des formes familiales de cancer médullaire de la thyroïde (CMT) et des néoplasies endocriniennes multiples de type 2 (NEM2) à partir d'un cas index porteur d'un CMT (recommandation des tumeurs endocrines) (Brandi *et al.*, 2001).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

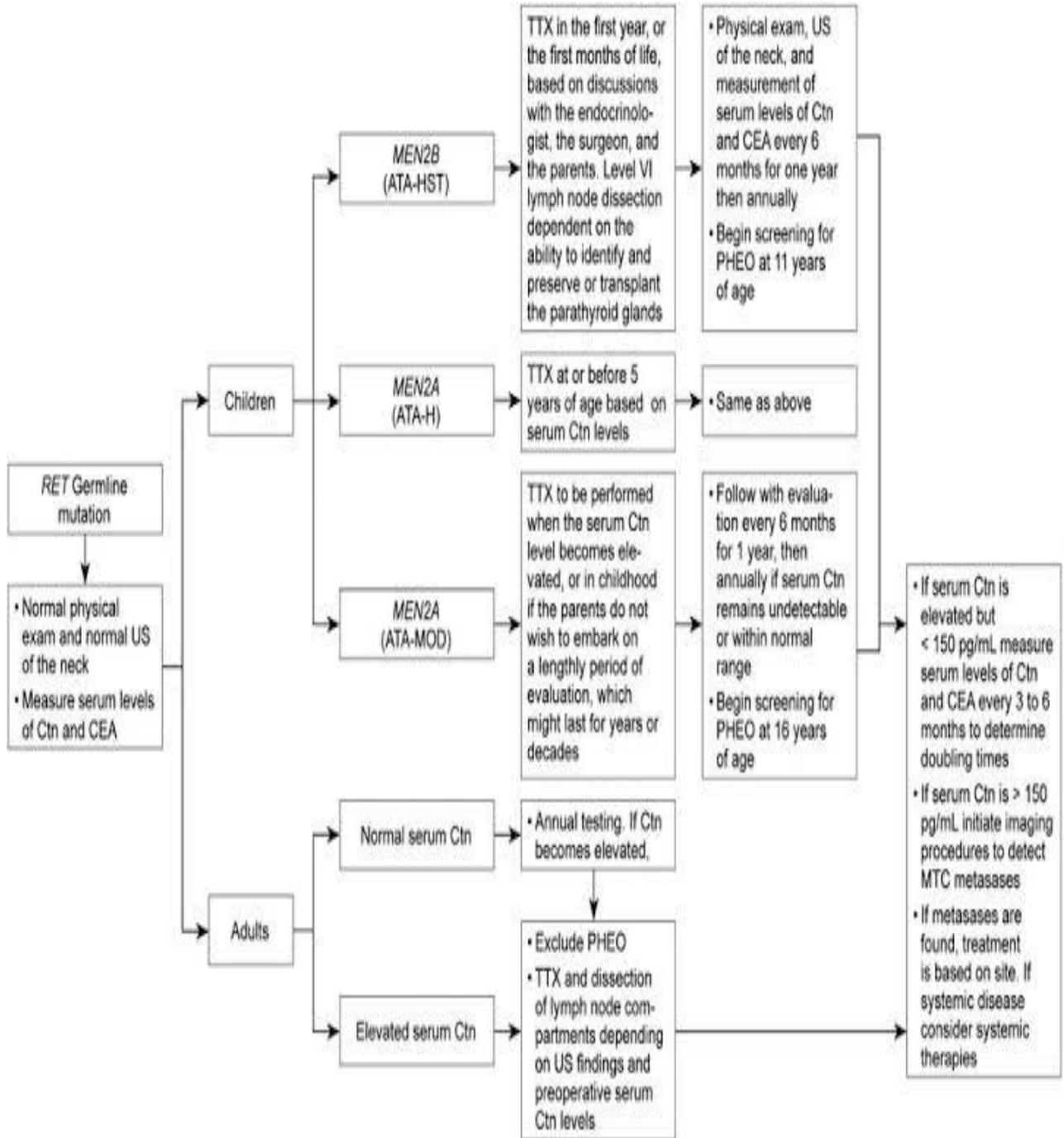


Figure 17: Gestion des patients porteurs d'une mutation germinale RET détectée par dépistage génétique (Samuel *et al.*, 2015).

PARTIE PRATIQUE

I. Patients et Méthodes

I.1. Patients

Il s'agit d'une étude descriptive prospective et rétrospective ayant comme principale visée la recherche de polymorphismes au niveau du proto-oncogène RET chez des patients présentant un CMT héréditaire ou sporadique.

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire de biologie et de génétique moléculaire de la faculté de médecine université Salah Boubnider Constantine³, laboratoire de biochimie, et du service d'endocrinologue du CHUC.

I.1.1. Recrutement des cas index et apparentés: Critères de sélection

Notre étude a duré 2 mois et a porté sur 48 patients des deux sexes dont 33 cas index de CMT et 15 apparentés du 1^a degré, adressés par les services d'endocrinologie du CHU de Constantine.

Des critères d'inclusion et d'exclusion ont été établis :

-Critères d'inclusion :

- Ont été inclus dans l'étude les sujets des deux sexes,
- Atteints de CMT, avec ou sans antécédents familiaux, prouvé par une étude anatomo-pathologique.
- Présentant une NEM2, à fortiori lorsqu'existent des antécédents familiaux évocateurs.
- Les apparentés du 1^o degré des cas index ayant présenté une mutation.

-Critères d'exclusion :

- Sont exclus de l'étude tous les patients présentant tout autre cancer de la thyroïde.

Deux types de malades ont été distingués :

PARTIE PRATIQUE

Les cas familiaux : En présence d'un contexte familial de CMT (et/ou de PHEO et/ou d'HPT).

Les cas sporadiques : Lorsque l'enquête familiale ne retrouve qu'un seul cas de CMT dans la famille.

L'ensemble des échantillons de tous ces patients a bénéficié d'une analyse moléculaire des exons 11 et 15 du proto-oncogène RET.

-Tout d'abord nous avons commencé par:

➤ Faire le prélèvement du cas index et des membres de sa famille (la mère, le père, les sœurs et les frères et les enfants) notamment lorsque le diagnostic génétique de CMT a été établi dans la famille (Conditions de l'analyse génétique).

➤ Etablir un arbre généalogique le plus complet possible pour chaque famille sélectionnée. Le consentement des patients a été obtenu de tous les adultes ou de leurs tuteurs lorsque leur âge est inférieur à 18 ans.

I.1.2. Les prélèvements biologiques

Mode de prélèvement

Les prélèvements de sang total ont été réalisés au niveau du pli du coude après pose d'un garrot.

Ils sont réalisés dans des conditions stériles dans des tubes contenant de l'EDTA comme anticoagulant qui de plus est un inhibiteur des nucléases, pour l'analyse moléculaire, le tube hépariné est proscrit (l'héparine inhibe la fonction de la Taq polymérase).

Le prélèvement a été fait dans deux tubes de 5ml bien remplis afin de pouvoir en extraire une quantité d'ADN abondante et par la suite subir le reste de l'analyse moléculaire.

I.2. Méthodes

I.2.1. Etude génétique

La recherche des polymorphismes G691S et S904S dans le proto-oncogène RET a été réalisé par PCR séquençage en suivant les étapes suivantes:

1. Extraction de l'ADN à partir du sang total par la méthode au NaCl.

PARTIE PRATIQUE

2. Quantification et dilution de l'ADN.
3. PCR ou amplification des exons 11 et 15 du proto-oncogène RET.
4. Contrôle des produits de PCR des différents exons par électrophorèse sur gel d'agarose.
5. Purification des produits de PCR.
6. Réalisation des PCR de séquences.
7. Purification des produits de PCR de séquences.
8. Séquençage et lecture de la séquence à la recherche de ces polymorphismes par le séquenceur 3130 Applied Biosystems.

I.2.1.1. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN est une technique permettant d'isoler l'ADN de cellules ou de tissus. Elle consiste à obtenir des ADN plus ou moins purs et plus ou moins concentrés adaptés aux différents tests génétiques pratiqués.

Les leucocytes sanguins représentent la source majeure d'ADN. Les autres sources cellulaires peuvent être des biopsies musculaires de malades ou des biopsies de villosités choriales ou des cultures de cellules amniotiques (amniocytes, fibroblastes...).

Au cours de l'extraction certaines précautions doivent être prises comme l'utilisation de gants, la stérilisation du matériel, l'utilisation de pipettes spécialisées, l'usage de produits consommables jetables comme des pointes à filtre stériles.

Il existe plusieurs procédés d'extraction et de purification d'ADN, dans notre étude nous avons utilisé la technique au NaCl.

Normalement l'extraction d'ADN se fait sur du sang frais. Mais dans certains cas d'impossibilité technique, l'extraction est différée puis réalisée sur du sang stocké 1 à 2 jour à 25°C ou pendant 7 jours à + 4°C.

L'extraction d'ADN peut aussi se faire sur du sang congelé, mais dans ce cas la cristallisation lors de la congélation suivie de décongélation provoque des cassures dans la molécule d'ADN.

PARTIE PRATIQUE

Nous avons été contraints à différer l'extraction de l'ADN du Patient à 3 jour après le prélèvement.

L'extraction a été réalisé par une technique au NaCl (Miller,1988).

• La lyse des globules rouges et préparation du culot de leucocytes :

Quelle que soit la méthode d'extraction des acides nucléiques utilisée à partir de sang fraîchement recueilli ou décongelé, le sang est vigoureusement mélangé à une solution hypotonique pour faire éclater les globules rouges.

La lyse est réalisée généralement à + 4°C pendant 20 à 30 mn. Le lysat est ensuite centrifugé 10 mn à 3900 tr/mn. Après élimination du surnageant, on obtient le culot de leucocytes.

10 ml de sang sont prélevés sur anticoagulant (EDTA qui permet d'inhiber l'action des enzymes de type DNase qui pourrait dégrader l'ADN) comme il a été cité précédemment. Dans un tube Falcon de 50 ml, mettre le sang et compléter à 25 ml avec du Tris EDTA (TE) 20:5.

-Laisser 10 mn dans la glace.

- Centrifuger 10 min à 3900 tours/min.

- Aspirer le surnageant avec la trompe à vide. A défaut de trompe, on s'est débarrassé prudemment du surnageant en le versant dans le un récipient afin de ne pas décoller le culot de leucocytes contenu dans le fond du tube.

- Faire un deuxième lavage qui consiste à verser le surnageant en conservant le culot formé, puis à rajouter le TE 20: 5 (compléter à 25 ml) et laisser 10 min dans la glace.

-Centrifuger dans les mêmes conditions que la première fois.

- Aspirer le surnageant avec la trompe à vide de préférence (là comme on l'a dit précédemment on le verse délicatement): Obtention d'un culot de leucocytes (si on veut s'arrêter à ce niveau et les mettre dans un tube conique de 15 ml avec du TE 10: 1 et les conserver à -20°C dans le congélateur).

Lyse des leucocytes, dénaturation du complexe nucléoprotéique et libération de l'ADN

PARTIE PRATIQUE

- Transvaser ou verser le culot de leucocytes dans un tube Falcon de 15 ml.

- Ajouter 3 ml de tampon de lyse (NaCl 400mM, EDTA 2Mm, Tris 10mM, pH 8,2) en dilacérant le culot avec une pastelle stérile.

-Ajouter 200µl de SDS (sodium dodécyl sulfate) à 10% qui est un détergent anionique utilisé pour lyser les GB et libérer l'ADN total mais, c'est aussi un activateur de la protéinase K. il inhibe les nucléases et dénature les protéines.

- Ajouter 100µl de protéinase K à 10 mg/ml.

L'ADN nucléaire libéré dans le milieu est alors le plus souvent traité par une protéinase très active, qui est la protéinase K qui a pour but de digérer les protéines qui lui étaient associées

-Agiter le tube sur une roue à 37°C pendant une nuit car la protéinase K (10mg/ml) effectue son travail pendant 3 à 18 h à température ambiante (37°C). Le traitement par la protéinase K peut également être effectué pendant 1 à 2 h à 65 °C ou 2 à 3h à 56°C.

- Le lendemain, mettre dans la glace le tube Falcon afin de refroidir son contenu.

Extraction et purification de l'ADN: méthodes utilisant des solvants non organiques: le NaCl

Traiter uniquement le lysat cellulaire (produit résultant d'une lyse) par une solution saline, dont l'objectif est d'éliminer par précipitation sélective les protéines.

Cette étape se déroule en:

- Ajoutant 1 ml de NaCl 4M et en agitant vigoureusement à la main.

- Remettant 5 min dans la glace (précipitation des protéines).

- Centrifugeant 15 min à 2500 tours/min.

Précipitation de l'ADN

La précipitation est réalisée plus souvent par de l'éthanol absolu à froid et à haute concentration. L'éthanol se trouvait à -80°C et à concentration 2.5 volumes par rapport à l'échantillon. La pelote d'ADN se forme, puis précipite sous forme de filament visible à l'œil nu.

PARTIE PRATIQUE

Le précipité est ensuite lavé et redissolu dans l'eau ou du tampon TE: 10:1. Laisser éventuellement 30 min à -20°C si la pelote ne se forme pas.

-Récupérer la pelote par enroulement sur une pipette Pasteur puis la laver dans l'éthanol à 70% 2 fois pour éliminer les sels ou les traces d'isopropanol, elle sera ensuite séchée en ouvrant les tubes Eppendorf durant 1h environ.

- Dans le cas où la concentration des acides nucléiques est faible (<50 µg/ml) le temps de précipitation devra être plus long (>10h).

Parfois la précipitation a lieu en présence de sels comme l'acétate de Na pour augmenter la force ionique.

- Mettre la pelote dans un tube nunc (Eppendorf) après lavage de la pelote, l'ADN sera réhydraté par une solution de TE (tris: EDTA) ou de l'eau bidistillée, puis conservé à 4°C ou à -20°C.

Solubilisation.

On procède comme suit:

1- Ajouter entre 300 et 1000µl d'eau stérile selon la grosseur de la pelote et la concentration souhaitée.

2- Laisser une nuit sur agitateur rotateur à 37°C, puis à +4°C jusqu'à dissolution complète (1 à 2 jours).

I.2.1.2. Quantification et dilution de l'ADN: Dosage des acides nucléiques

La concentration de l'ADN est estimée par spectrophotométrie à 260 nm. Les contaminations par les protéines et le phénol peuvent fausser la concentration de l'ADN.

Les protéines absorbent à 260 nm et à 280 nm, tandis que le phénol absorbe à 270 nm ainsi les bases puriques et pyrimidiques absorbent aussi fortement dans l'ultraviolet à 260 nm.

Pour cela ,on effectue une mesure de la densité optique ou DO ou absorbance de l'ADN dilué à 260 nm et à 280 nm.

I.2.1.3. Les critères d'évaluation du procédé d'extraction

La taille des fragments d'acides nucléiques

PARTIE PRATIQUE

Afin d'observer une éventuelle dégradation de l'ADN survenue au cours de l'extraction, un contrôle de la taille des fragments d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8% a été réalisé.

On a déposé dans chaque puits 2 μ l de solution d'ADN + un tampon de charge et le tout est soumis à une migration sous un courant de 100 volts pendant 2 h.

Le rendement de l'extraction

La mesure de l'absorbance de l'ADN à 260 nm des solutions diluées au 1/100 ou 1/50 détermine la concentration de l'ADN extrait, sachant que 1 U de DO correspond à 50 mg/ml d'ADN.

Le rendement est calculé en réalisant le rapport entre la quantité d'ADN obtenue et le volume initial de sang total utilisé.

La rapidité

Le temps nécessaire pour réaliser une extraction a été déterminé: temps réel et temps de travail.

La pureté

Avant de calculer le rapport DO 260 nm/DO 280 nm on doit suivre les étapes suivantes:

- 1- Mettre 1000 μ l d'eau distillée dans une cuve pour mesurer le zéro expérimental.
- 2- Ajouter 10 μ l d'ADN dans un tube contenant 990 μ l d'eau distillée. Bien vortexer le mélange et le transvaser dans une cuve.
- 3- Après avoir fait le zéro sur la cuve d'eau distillée, mesurer la DO à 260 nm.
- 4- Afficher le zéro une autre fois à 280 nm et mesurer ensuite la DO.

La pureté de l'ADN extrait est appréciée en mesurant la densité optique des extraits à 260 et 280 nm et en calculant le rapport DO 260 nm/DO 280 nm.

Un ADN pur doit avoir un rapport DO260/DO280 compris entre 1,6 et 2 (Si l'ADN est contaminé par les protéines le DO260/DO280 <1,6 et si la contamination est secondaire à des ARN le DO260/DO280 >2).

PARTIE PRATIQUE

Dans le cas où l'ADN est contaminé, il est donc indispensable de procéder à la réextraction de l'ADN afin d'obtenir la pureté souhaitée.

Conservation de l'ADN:

Le tableau IV suivant résume les différentes conditions de conservation de l'ADN.

Tableau IV : Les conditions de conservation de l'ADN:

Température	Durée de la stabilité de la solution d'ADN
Ambiante	Quelques jours
+4°C	6 mois
-20°C	1 an minimum
-80°C	7 ans minimum

I.2.1.4. PCR ou Réaction d'amplification enzymatique in vitro (PCR des 2 exons du proto-oncogène RET: 11 et 15)

La PCR est un outil fondamental de la biologie moléculaire. Elle permet à partir d'un fragment d'ADN, d'obtenir un grand nombre (plusieurs millions) de copies identiques de ce même fragment. Cette réaction est réalisée in vitro.

La PCR a été décrite pour la première fois par Karry Mullis en 1983 et publiée en 1985, ce qui a valu à Karry Mullis le prix Nobel de chimie en 1993.

Principe

La PCR est basée sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser le brin complémentaire, d'un ADN servant de matrice, elle nécessite de connaître la séquence des régions qui délimitent l'ADN à amplifier. Cette séquence servira à synthétiser une amorce d'oligonucléotides complémentaires, afin d'initier le processus.

Cette amorce ou primer a une longueur de 17 à 30 bases, et dont la séquence est complémentaire à celle du brin à amplifier. L'association à l'ADN cible est suivie de

PARTIE PRATIQUE

l'élongation du brin complémentaire par une polymérase, aboutissant ainsi à la synthèse d'un ADN double brin.

La PCR consiste en une succession cyclique de 3 étapes sachant que l'ADN extrait du milieu biologique à étudier baigne dans un milieu réactionnel tamponné qui comprend tous les éléments indispensables:

Les précurseurs nucléotidiques (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), le cation Mg^{++} indispensable au bon fonctionnement de l'enzyme et à l'incorporation correcte des précurseurs, de l'ADN de polymérase et des amorces.

➤ Première étape: Dénaturation thermique (par la chaleur)

Cette étape consiste à séparer par la chaleur les deux brins en rompant les liaisons hydrogènes

L'ADN double brin est chauffé à $94^{\circ}C$. Cette température est supérieure à la température de dénaturation (Temperature melting ou T_m) de l'ADN qui devient sous forme simple brin. Ces brins vont servir de matrice au cours des cycles d'amplification.

➤ Deuxième étape : Hybridation des deux amorces ou annealing (sens et anti-sens)

Le milieu réactionnel est amené à une température inférieure au T_m des amorces. Ce T_m est en fonction de la séquence des amorces et est en général compris entre 45 et $70^{\circ}C$. Les amorces en large excès, s'hybrident à tout l'ADN simple brin comportant la séquence complémentaire.

➤ Troisième étape : Elongation et extension des amorces par une ADN polymérase. Une ADN polymérase (la taq polymérase) allonge les amorces en y incorporant les désoxyribonucléotides complémentaires de la séquence de la matrice à laquelle est hybridée.

La synthèse s'effectue dans le sens $5'-3'$ à $72^{\circ}C$ (température optimale).

A la fin de chaque cycle, on aura deux copies de la séquence d'ADN cible.

Un nouveau cycle commencera par l'étape de dénaturation, suivie successivement des étapes d'hybridation et d'extension.

PARTIE PRATIQUE

L'amplification est exponentielle (2^n) où n représente le nombre de cycles, par exemple, une PCR de 30 cycles génère théoriquement 2^{30} copies de la cible initialement présente.

De manière générale 15 à 40 cycles sont effectués, générant un nombre considérable de copies de la séquence cible.

A la fin de l'amplification, on obtient pratiquement moins de copies que celles attendues par la théorie, car le rendement de la réaction n'atteint jamais 100%.

Les amorces utilisées dans l'amplification des exons 11 et 15 sont les suivantes :

Tableau V : Amorces utilisées

Exons	Amorce sens ou Forward F5-3	Amorce antisens ou Reverse R 5-3
Exon 11	5-CAG AGC ATA CGC CCT ATG GAA AT-3	5'-ACA CAG CGC CCT ATG GAA AT-3
Exon 15	5-ATG TCA CAC CCT GAC TCC AC-3	5-CTA GGC TTC CCA AGG GCA CT-3

La température de fusion ou de dénaturation des amorces doit être calculée à partir de la séquence des amorces.

Il est important de choisir des amorces à T_m élevée puisque plus cette dernière est élevée, moins le risque d'hybridation non spécifique est important.

La différence de T_m entre les deux amorces (F ou sens et R ou antisens) ne devra pas être trop importante: $T_m F - T_m R < 5^\circ C$

Pour calculer le T_m d'une amorce, on pourra s'aider de la formule suivante:

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

Cette formule est valable pour les amorces de taille inférieure à 25 nucléotides et est cependant approximative.

PARTIE PRATIQUE

La température d'hybridation est égale au T_m moins 5 °C ($T^\circ \text{ hybridation} = T_m - 5^\circ\text{C}$). Une température d'hybridation trop basse risque de donner des hybridations non spécifiques.

Concentration des chlorures de magnésium

Le chlorure de magnésium est un cofacteur essentiel pour la Taq polymérase. Il existe une relation inverse entre la quantité de dNTP utilisée et la concentration de $MgCl_2$. Les dNTP chélatent une partie des ions Mg^{2+} et par conséquent, une augmentation des dNTPs diminue la concentration disponible d'ions Mg^{2+} libres.

Nous avons utilisé une solution de $MgCl_2$ à 25 mM

Il est nécessaire d'insérer des contrôles dans des séries d'analyse par PCR, pour vérifier la qualité et les performances du test et détecter certaines anomalies risquant d'invalidier le résultat.

Validation du test

Il est indispensable d'effectuer un contrôle négatif et, éventuellement, un contrôle positif, pour chaque série de réactions de PCR.

➤ Contrôle négatif

Appelé aussi le blanc, il s'agit d'un tube contenant tous les réactifs et l'enzyme nécessaire à la PCR mais sans ADN, son rôle est de s'assurer qu'aucun réactif ou enzyme n'est contaminé.

➤ Contrôle positif

Il s'agit d'un tube contenant tous les réactifs et l'enzyme avec un ADN connu et déjà étudié (témoin). Ce contrôle a pour rôle de s'assurer que la réaction s'est bien effectuée.

➤ Marqueur de taille

Un marqueur de taille est une solution contenant différents fragments d'ADN de tailles variables et connues. Il est utilisé pour l'estimation de la taille d'un fragment d'ADN amplifié.

Il peut être remplacé par des fragments ou témoins de masse moléculaire connue qui migrent en parallèle au fragment d'ADN à estimer.

PARTIE PRATIQUE

Réalisation pratique de l'amplification par PCR

Avant de commencer notre amplification, on doit vérifier la disponibilité et la quantité de tous les réactifs pour amplifier les 2 exons du proto-oncogène RET, puis on procède à la préparation de l'échantillon d'ADN sous forme d'une solution de travail adéquate.

Les différentes solutions doivent être préparées sous une hotte.

Les amorces sont fournies sous forme lyophilisée, et les dNTP sous forme de flacons de solution mère contenant 100 mM de chaque dNTP. Ces réactifs sont préparés selon les concentrations suivantes.

Tableau VI : Concentration des réactifs de la PCR

Solution de travail	Concentration
ADN	100 ng/ μ l
Amorces	10 pmol/ μ l
dNTP	2,5 mM

Préparation des Mix PCR

Cette opération s'effectue dans une pièce appelée Pré PCR, il est conseillé de travailler sous hotte stérile. Dans des tubes eppendorff de 1.5 ml, on prépare les Mix ou mélange le total des réactifs nécessaires à notre PCR pour chaque exon (tableau VI), en tenant compte du nombre d'échantillons à traiter, plus un témoin négatif (blanc) et en ajoutant aussi un surplus afin que la quantité du Mix suffise dans le cas où les pipettes manqueraient de précision.

La composition du Mix est la suivante:

PARTIE PRATIQUE

Tableau VII: Composition du mix de la PCR

Réactifs	Quantité Volume 50 µl
Tampons 10X	5 µl
MgCl ₂ 25 mM	6 µl
dNTP 2,5 mM	3µl
Amorce F	0,5 µl
Amorce R	0,5 µl
Taq DNA polymérase 5U/µl	0,2 µl
H ₂ O	33,8 µl

Ces mélanges (49µl) sont distribués dans des microtubes à PCR fixés sur une plaque porte-microtubes

Programme du thermocycler

Les microtubes sont placés dans un thermocycler qui sera programmé comme suit:

Pour l'exon: 11	
- 95°C pendant 10 mn	
- 95°C pendant 1mn	} 30
- 60°C pendant 1 mn	
fois	
- 1mn à 72°C	
- 7mn à 72°C	

Pour l'exon: 15	
-95°C pendant 10 mn	
-95°C suspension 1 mn	} 30
-68 °C pendant 1 mn	
fois	
- 1mn à 72°C	
-7mn à 72°C	

Avant de lancer le thermocycler, on doit ajouter aux microtubes une goutte d'huile de paraffine pour éviter l'évaporation du contenu.

➤ Après amplification des exons par PCR, les produits de PCR sont contrôlés par électrophorèse.

I.2.1.5. Contrôle par électrophorèse des produits de PCR des différents exons

Principe de la technique

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer les exons en fonction de leur taille. Elle est réalisée dans une cuve de migration horizontale (fig. 14).

Le gel d'agarose

Le contrôle de PCR est réalisé sur un gel d'agarose à 2% (Annexe).

➤ Tampon d'électrophorèse

Le tampon Tris-Borate est le plus utilisé, sous forme de mélange Tris-Borate-EDTA (TBE).

Le Tris et le borate ne portent quasiment pas de charges au PH désiré, ce qui réduit leur mobilité. Un avantage du tampon Tris c'est qu'il s'agit d'une molécule de taille suffisamment importante, ce qui freine sa migration électrophorétique.

Traitement de l'échantillon pour le dépôt

On commence par la préparation du gel d'agarose (Annexe). Il est ensuite placé avec son support ou plateau dans une cuve d'électrophorèse.

Le gel placé dans la cuve sera totalement immergé, en positionnant les puits du côté de la cathode pole noir.

Il faut remplir délicatement et très lentement la cuve avec le tampon TBE jusqu'à recouvrir le gel. Les produits de PCR préparés sont déposés, avec une pipette de précision, sur ce gel. Le produit de PCR est préalablement mélangé avec un colorant de charge 2 ul de bleu de

PARTIE PRATIQUE

bromophénol (Annexe) à chaque 10 µl de produit de PCR de chaque échantillon, afin de pouvoir suivre visuellement la migration après les dépôts. Un marqueur de taille est déposé dans un puit et utilisé pour chaque série d'échantillon.

Les différentes étapes du contrôle sont résumées ci-dessous:

La migration

La migration électrophorétique dure environ 45 mn à 100 volts.

Visualisation des produits de PCR

La visualisation des exons séparés en fonction de leur taille par transillumination du gel qui contient du Bromure d'ethidium ou BET, molécule qui a l'habitude de s'intercaler entre les bases des acides nucléiques.

Dans ces conditions, l'exposition du gel à un rayonnement UV de 312 nm permet la fluorescence du BET lié à l'ADN.

Cette technique permet de repérer et de situer les différents fragments ayant migrés par rapport au marqueur de taille moléculaire.

Le rapport vitesse distance de migration d'un fragment d'ADN est inversement proportionnel au logarithme de sa taille. La taille des différents fragments amplifiés est estimée par rapport à des fragments du marqueur de taille.

Les tailles des produits de PCR sont:

Tableau VIII : La taille des exons 11 et 15 du proto-oncogène RET

Exons	Taille (pb)
11	339
15	324

PARTIE PRATIQUE

1.2.1.6. Purification du produit de PCR pour la réalisation de la réaction de séquence

Principe

Il est nécessaire de purifier le produit de PCR, en éliminant tous les produits de la réaction de PCR (les dNTP libres non incorporés, les amorces en excès, le $MgCl_2$) qui risquent de gêner les différentes manipulations qui suivent après, et cela afin d'obtenir des produits PCR de bonne qualité.

Purification des produits de PCR sur colonnes QUIAGEN

La technique utilisée est la chromatographie d'adsorption sur colonne de silice, avec un tampon qui contient généralement un sel chaotrope (ex: chlorhydrate de guanidine) qui permet le changement de PH.

Le milieu acide $PH < 7.5$ provoque une réaction de fixation sélective par adsorption des acides nucléiques en présence de sels, tandis que les autres molécules ne sont pas retenues.

Un kit de QIAGEN contient tous les éléments nécessaires et qui sont prêt à l'emploi :

- des colonnes de spin.
- des tubes collecteurs.
- tampon PB: contient du chlorhydrate de guanidine qui permet le changement de PH pour l'adsorption des acides nucléiques.
- tampon PE: solution de lavage, concentrée, il faut ajouter 24 μl d'éthanol (96-100%) à 6 μl de PE, avant l'utilisation.
- tampon EB: tampon d'élution des acides nucléiques.
- loading DYE: 5X qui contient le bleu de bromophénol, xylène cyanol et orange. Il facilite l'estimation de la migration de l'ADN.
- un indicateur de PH.

Le kit QIAGEN est conservé à température ambiante dans son coffre (15-25 $^{\circ}C$).

Mode d'emploi

Dans un eppendorf, mettre :

PARTIE PRATIQUE

- 5 volumes soit 250 μ l de solution PB + 1 volume soit 50 μ l de produit de PCR.
- Le mélange est agité par vortex.
- Verser le contenu de l'ependorf dans une colonne QIA quick, ajouter 750 μ l de PE (déjà mélangé avec l'éthanol).
- Centrifuger la colonne 30 à 60 s à 1300 t/min
- Jeter le contenu de l'ependorf puis centrifuger encore une fois pendant une minute.
- Jeter le tube situé au-dessous de la colonne QIA quick et placer un nouveau eppendorf propre pour éluer le produit PCR en ajoutant 30 μ l ou 50 μ l de solution B.
- Laisser reposer 1 minute et puis centrifuger pendant une minute à 13000 tours/minutes.
- Le liquide obtenu sur l'ependorf est le produit PCR purifié.

I.2.1.7. Préparation de la réaction de séquence

Principe

Le séquençage de l'ADN, est la détermination de la succession des nucléotides le composant.

C'est une étape majeure dans la connaissance du génome. Il n'existe aucune méthode directe de détermination de la séquence des nucléotides, aujourd'hui de nombreuses manipulations nécessaires au séquençage sont automatisées et sont devenues des techniques de routine pour les laboratoires de biologie.

Les nucléotides au sein des acides nucléiques, sont liés par une liaison phosphodiester qui s'établit entre le groupement OH du carbone 3' du ribose du nucléotide dit en position 5' et le phosphore du groupe phosphoryle en position 5' du nucléotide dit en position 3'.

La méthode de séquençage de Sanger (dite par terminaison de chaîne) est basée sur l'interruption de la synthèse enzymatique d'un brin d'ADN complémentaire (arrêt d'élongation), et utilise des nucléotides appelés didésoxyribonucleotides (ddNTP) qui ont un atome d'hydrogène à la place du groupement OH sur le carbone 3' du ribose. Ils peuvent donc être incorporés dans un brin d'ADN en cours de synthèse à la place des dNTP, mais ils ne

PARTIE PRATIQUE

permettent pas qu'un autre nucléotide soit incorporé après eux, car l'absence de l'atome d'oxygène en 3' empêche la formation d'une nouvelle liaison phosphodiester.

Les didésoxyribonucléotides utilisés sont chacun marqués par un fluorophore spécifique.

Les fragments d'ADN synthétisés portant ce fluorophore terminal sont appelés des terminateurs d'élongation ou "BigDye Terminators" ou "Dye-labeled terminator".

L'incorporation d'un ddNTP stoppe la réaction d'élongation (formation d'un fragment plus court que le fragment d'origine). Les didésoxynucléotides ont une concentration limitée, c'est pour cela qu'ils ne s'incorporent que rarement et au hasard. Le ratio ddNTP/dNTP est de l'ordre de 1/100. Il existe donc 100 fois plus de chance d'incorporer un dNTP qu'un ddNTP.

Ces fragments seront ensuite séparés et analysés par un séquenceur à capillaire, ABI Prism 3130 de la compagnie Applied Biosystems.

Le séquençage se fait sur les deux brins d'ADN, afin de permettre la détection des mutations sur l'ADN et faire aussi la différence entre ces dernières et les erreurs effectuées lors de la réaction de séquence par l'ADN polymérase

On peut trouver parmi les brins néosynthétisés, des brins qui ne contiennent pas de ddNTP (molécule pleine Longueur), mais ceux-là ne nous posent aucun problème car tout d'abord, ils représentent un faible pourcentage par rapport à l'ensemble des brins obtenus, et ne sont pas fluorescents, donc ils ne peuvent pas être détectés.

Chaque type de ddNTP porte un fluorochrome spécifique, ce qui fait que cette technique utilise 4 fluorochromes différents qui émettent, après excitation par un faisceau laser, des fluorescences de couleurs différentes (tableau IX).

Chacune de ces couleurs physiques est convertie en une couleur informatique par un logiciel de traitement de ces différentes fluorescences (87).

Tableau IX : les différents ddNTP, les fluorochromes de marquage et les couleurs correspondantes

Didésoxynucléotide triphosphate	Fluorochrome (couleur physique)	Couleur informatique
---------------------------------	---------------------------------	----------------------

PARTIE PRATIQUE

DdGTP	R110	Noir
DdTTP	6-TAMRA	Rouge
DdATP	R6G	Vert
DdCTP	ROX	Bleu

La méthode la plus pratiquée aujourd'hui dans les laboratoires a été mise au point par Fred Sanger

L'ADN à séquencer est cloné et de nombreuses molécules d'ADN simple brin sont produites, car le fragment d'ADN à séquencer doit être disponible en grande quantité.

Ces brins sont placés chacun dans un microtube en présence d'amorces appropriées (sens ou anti-sens) qui s'hybrident avec une des extrémités et qui permettront d'initier la synthèse du brin complémentaire.

Ces conditions qui ressemblent à celles de la PCR qu'on a réalisé en premier lieu, il y a à la fin la synthèse du second brin d'ADN, l'ADN polymérase incorpore les nucléotides. Mais lorsqu'elle incorpore un nucléotide modifié, la synthèse s'arrête.

PCR DE SÉQUENCE :

Tableau X: Préparation du mix: de la PCR de séquence

Réactifs	Volume
Big Dye terminator	0.8 µl
Tampon	3,6 µl

Tableau XI: composition de la PCR de Séquence

Réactif	Volume
Produit de PCR purifié	1µl

PARTIE PRATIQUE

Mix	6 μ l
Tampon	3 μ l
Amorce F	1 μ l
Amorce R	1 μ l
H2O	10 μ l

Programme du thermocycler dans la réaction de la PCR séquence :

96°C pendant 30 S

96°C pendant 20 S

50°C pendant 05 S

60°C pendant 4mn

4°C a plus l'infinie

Sachant que dans chaque mix on ajoute soit l'amorce F (sens) ou l'amorce R (anti-sens) séparément.

I.2.1.8. Purification des réactions de séquences

Cette procédure est nécessaire pour purifier les réactions de séquences faites en Big Dye Terminator. Son rôle est d'éliminer les ddNTP fluoromarkés non incorporés dans la réaction de séquence de Sanger, des amorces en excès et les sels.

Sachant que l'accumulation des sels peut altérer la qualité des analyses (décroissance des pics de fragments), il est donc conseillé de purifier les échantillons de PCR afin d'obtenir des produits de PCR de séquences pures.

La méthode utilisée au laboratoire consiste en la préparation des colonnes de gel d'exclusion à l'aide de G50 superfine que l'on met à gonfler sur une plaque dont la membrane n'a pas de propriété physico-chimique (Plaque Millipore Multiscreen) et ne serve qu'à retenir les colonnes.

PARTIE PRATIQUE

Mode opératoire

● Préparation de la plaque

-Prendre une plaque support de G50 superfine (poudre sèche) et le chargeur de colonnes.

-Verser la G50 superfine en excès sur les puits du chargeur de colonnes.

-A l'aide de la plaque transparente, étaler la poudre pour remplir chaque puits de façon homogène en prenant garde que chaque puits soit bien rempli complètement. Les puits font 45µl soit environ 3g de G50 superfine pour 96 puits.

-Récupérer le surplus de G50.

-Disposer une plaque multiscreen HV sur le chargeur de colonnes, les puits dirigés vers le chargeur.

-Retourner le dispositif et le taper 1 ou 2 fois sur la paillasse pour transvaser la G50 superfine du chargeur vers la plaque.

-Reprendre la plaque multiscreen HV et ajouter 300 µl d'eau distillée stérile par puits.

-Laisser reposer 3 heures à température ambiante (gonflement de la G50 hydratée).

Si l'utilisation est immédiate :

-Packer la colonne de G50 superfine par centrifugation à 910 g (2700tr/mn) sur une centrifugeuse à plaques Jouan (BR4) pendant 5mn, en ayant pris soin de placer une plaque MicroAmp optical poubelle sous la plaque support pour récupérer l'eau en excès environ 100 µl.

-Placer un joint d'alignement pour centrifugation au-dessus d'une plaque de PCR de 96 puits standard à fond conique, puis placer la plaque Multiscreen MAHV N45 sur l'ensemble, scotcher, déposer sur les portoirs plats dans une centrifugeuse et centrifuger le tout à 910 g soit 2700 t/mn pendant 5 mn pour compacter le gel dans les puits (ou mini colonnes).

-Jeter le tampon (eau éliminée dans la plaque de PCR 96 puits à fond conique). Utiliser une plaque d'analyse PE 3100 (plaque Appellera ou Micoamp optical 96 Well), placer un joint d'alignement puis déposer dessus la plaque multiscreen MAHV N45 contenant le sephadex

PARTIE PRATIQUE

compacté. Déposer la totalité environ 20 µl de la réaction de séquence au centre du puits sans toucher la surface du gel sephadex.

Centrifuger le tout 3 mn à 2700 t/mn.

Les produits de séquence purifiés sont récupérés dans la plaque MicroAmp optical.

La plaque microAmp optical d'analyse est ainsi prête pour être déposée sur le séquenceur.

Si l'utilisation est différée dans le temps

Conservation possible de la plaque Multiscreen MAHV N45 à +4 degrés.

-En cas d'utilisation de la plaque Multiscreen MAHV N45, laisser la revenir à la température ambiante 5 à 10 mn avant de la packer et ensuite revenir à l'étape 1.2

Les plaques multiscreen peuvent être réutilisées une fois après lavage.

1.2.1.9. Electrophorèse capillaire

Les produits de PCR de séquences purifiés sont séparés par électrophorèse capillaire à l'aide d'un séquenceur automatique ABI Prism 3130.

Cette électrophorèse permet de séparer les fragments d'ADN synthétisés en fonction de leur taille.

Ils sont révélés par la fluorescence: On peut en effet donner une couleur de fluorescence différente à chaque nucléotide modifié. Il suffit donc d'observer la succession des couleurs sur le gel d'électrophorèse, en allant du fragment le plus petit vers le plus long, pour connaître la séquence des nucléotides du brin que l'on a séquencé.

Actuellement, cette opération est automatisée des machines sont capables de détecter les couleurs et d'afficher sur écran la séquence des nucléotides correspondante.

Chaque base a donc un signal spécifique qui permet de l'identifier lors de son passage dans le faisceau d'un photomètre situé à la sortie du capillaire.

L'analyse des signaux reçus est réalisée par un ordinateur qui permet de reconstituer la séquence avec une grande précision.

ADN Matrice +dNTP+ ddCTP fluorescents.

PARTIE PRATIQUE

Schématiquement, l'appareil est composé de 4 capillaires, d'un système d'électrophorèse. D'un laser et d'une caméra CCD (Charge-Coupled Device).

Les capillaires (diamètre environ 50 μm), sont remplis d'un polymère qui sert de tamis moléculaire.

Le support de migration est un polymère liquide (pop7-ABI) contenant le polymère de séparation, les sels nécessaires à la migration et l'urée (conditions dénaturantes).

L'utilisation de capillaires permet d'appliquer une différence de potentiel plus importante que pour un appareil à plaque classique. La migration des fragments d'ADN sera donc plus rapide.

-Les molécules d'ADN simples brins issues de la réaction de séquence chargées négativement sont introduites à une extrémité des capillaires par électro-injection sous l'effet d'un très haut voltage (8500 volts). Ces poly anions vont migrer du pôle négatif (cathode) vers le pôle positif (anode) du circuit électrique de façon à les séparer en fonction de leur longueur.

-Près de l'anode, un rayon laser traverse chaque capillaire afin d'exciter les ddNTP fluorescents incorporés à l'ADN au cours de la réaction de séquençage.

Une caméra CCD mesure l'émission de fluorescence au fur et à mesure que les copies d'ADN passent devant le laser. Les ddNTP fluorescents sont distingués les uns des autres selon la longueur d'onde émise.

Exemples: TAMRA: excitation 552 nm- émission 575 nm/FAM: excitation 490 nm- émission 520 nm.

La dernière étape est la lecture des profils bruts ou "base-calling" (détermination de la Séquence par appel des bases).

L'électrophorèse capillaire est effectuée sur les produits purifiés de la PCR de séquence.

Principe de séparation par électrophorèse capillaire et modalité de l'électrophorèse:

La séparation des différents fragments est effectuée sous application d'un champ électrique de voltage élevé.

PARTIE PRATIQUE

Les séparations sont effectuées dans un capillaire revêtu à l'intérieur de silice fondu et rempli d'un gel, ce qui favorise le contrôle de la température. La longueur des capillaires utilisés est de 36 cm.

Le gel ou polymère POP7 (Applied Biosystems) est injecté dans le capillaire préalablement au dépôt de l'échantillon à séquencer.

L'injection des échantillons se fait de manière électrocinétique, seules les molécules chargées migrent dans le capillaire et seront séparées par électrophorèse. La migration est rapide (1 à 3H).

L'unité informatique

L'unité informatique du séquenceur analyse les données de migrations de l'ensemble des fragments néosynthétisés afin d'identifier les bases ATGC, grâce au logiciel d'analyse de séquences.

On obtient un électrophorégramme avec la signalisation des bases par un code Adapté.

L'analyse et l'interprétation des résultats du séquençage se font en comparant à l'œil nu et à la main, la séquence obtenue avec la séquence de référence.

Il est également possible de s'aider d'un logiciel qui consiste à assembler et aligner des séquences par rapport à la séquence de référence.

I.2.2. L'analyse statistique des résultats :

Les données ont été recueillies sur fichier Excel. Les valeurs moyennes, les valeurs maximales et minimales, l'écart type et les valeurs de pourcentage et la variance ont été calculées sur Excel.

II. Résultats

Notre étude a porté sur 48 patients ayant présenté un CMT dont:

- 5 cas index de NEM2
- 28 cas index de CMT sporadique
- 15 apparentés du premier degré des cas index ayant présenté une mutation.

II.1. Répartition des cas index et apparentés selon le sexe

II.1.1. Répartition des cas index selon le sexe

La répartition des cas index selon le sexe montre que 54.55% sont de sexe féminin et 45.45% de sexe masculin. Une prédominance du CMT chez les femmes est notée avec un sex ratio H/F de 0.83 (83%), cela signifie que pour 100 femmes malades, il y a 83 hommes malades (**Fig .16**).

II.1.2. Répartition des apparentés des cas index mutés selon le sexe

Contrairement aux cas index, les apparentés, sont majoritairement de sexe masculin par rapport aux femmes avec une fréquence de 60%. Le sexe ratio H/F est de 1.5 (150%), cela signifie que pour 100 femmes malades, il y a 150 hommes malades.

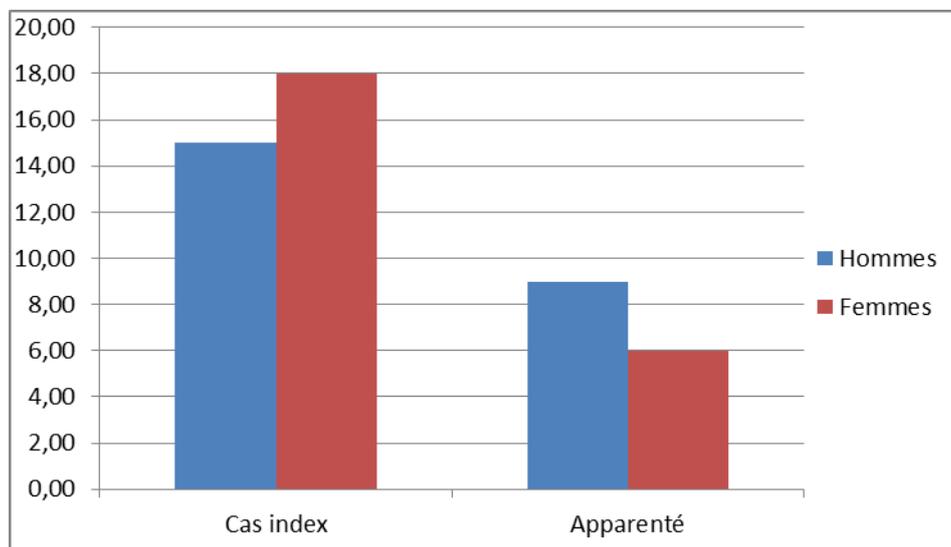


Figure 18: Histogramme montrant la répartition du CMT selon le sexe dans les deux populations de malades

PARTIE PRATIQUE

II.2. Répartition des cas index et apparentés selon l'âge

II.2.1. La répartition des cas index selon l'âge

Chez les patients cas index, l'âge moyen est de (43.21 ± 13.05) ans avec des extrêmes allant de 26 à 75 ans (Tableau XII).

-L'âge moyen des NEM2 est de 34.8 ± 5.38 ans.

-L'âge moyen des CMT sporadiques est de: 44.37 ± 13.38 ans.

II.2.2. Répartition des apparentés selon l'âge

L'âge moyen de nos apparentés est de (18.57 ± 14.87) ans avec des extrêmes allant de 4 à 40 ans.

Tableau XII : Répartition des patients en fonction de l'âge

	Cas index	Apparentés
L'âge moyen (ans)	43.21	18.57
L'écart type	13.05	14.87

II.3. Répartition du CMT dans notre population d'étude

L'analyse génétique a permis de répartir nos 33 cas index CMT comme suit:

-28 cas index de CMT sporadique soit une fréquence de 84.85 %.

-2 cas index de CMTF soit une fréquence de 6.06 %.

-3 cas index de NEM 2A (CMT+ PHEO) soit une fréquence de 9.09%.

28 (84.85 %) cas de CMT sporadiques et 5 (15.15%) CMT(NEM2) sont héréditaires.

PARTIE PRATIQUE

Tableau XIII: La fréquence des pathologies liées aux CMT

Pathologies	Nombre	Fréquence%
CMTs	28	84.85
CMTf	2	6.06
NEM2A	3	9.09
Total	33	100

II.4. Résultats de l'analyse génétique des polymorphismes des exons 11 (G691S) et 15 (S904S) chez les cas index

II.4.1. Fréquence des différents polymorphismes G691S et S904S chez les cas index -L'exon 11

Le polymorphisme G691S qui se situe sur l'exon 11 du proto-oncogène RET au codon 691 est un polymorphisme qui touche un seul nucléotide ou single nucléoside polymorphism (SNP). Il s'agit de la substitution d'une guanine par une adénine (G >A) au niveau de la séquence de l'exon 11 qui au niveau de la protéine entraîne la substitution d'une glycine par une sérine.

Ce polymorphisme à l'état hétérozygote a été retrouvé chez 80% des patients ayant présenté une NEM2 tandis que son taux est évalué à 46,43% chez les patients atteints de CMT sporadique.

Ce polymorphisme G691S a été retrouvé chez 4 des 5 patients présentant une NEM2 et 13 des 28 patients présentant un CMT sporadique.

-L'exon 15

Le polymorphisme S904S est localisé sur l'exon 15 au codon 904, qui est aussi un SNP, mais dans ce cas la substitution remplace une cytosine par une guanine (C>G) au niveau de la séquence de l'exon15 et qui au niveau de la protéine la mutation est isosémantique ou neutre, en effet, le codon est substitué en un codon synonyme codant le même acide aminé (Tableau XIV).

PARTIE PRATIQUE

Il a été détecté chez 80% des patients présentant une NEM2 (Tableau XIV).

Chez les patients atteints de CMT sporadique le polymorphisme S904S est représenté avec une fréquence de 39,29%. Ce polymorphisme a été retrouvé chez 11 des 28 patients ayant un CMT sporadique (Tableau XIV).

Tableau XIV: Les fréquences des polymorphismes G691S/S904S chez les cas index

Exons	Codon	SNP à l'état hétérozygote	Fréquences du SNP NEM2	Fréquences du SNP des CMTs
11	691	G691S (GGT-AGT)	80% (4/5)	46,43% (13/28)
15	904	S904S (TCC-TCG)	80% (4/5)	39,29% (11/28)

II.4.2. Fréquence des différents polymorphismes G691S et S904S chez les apparentés des cas index ayant présenté une mutation

L'haplotype G691S/S904S a la même fréquence de 100% chez tous les apparentés ayant présenté une mutation soit au total chez 7 apparentés mais cette fois ci à l'état homozygote.

Tableau XV : les fréquences des polymorphismes G691S/S904S chez les apparentés

Exons	Codon	SNP homozygote	Fréquence SNP NEM2A CMT
11	G691S	G → A (GGT/AGT)	100% (15/15)
15	S904S	G → A (TCC/TCG)	100% (15/15)

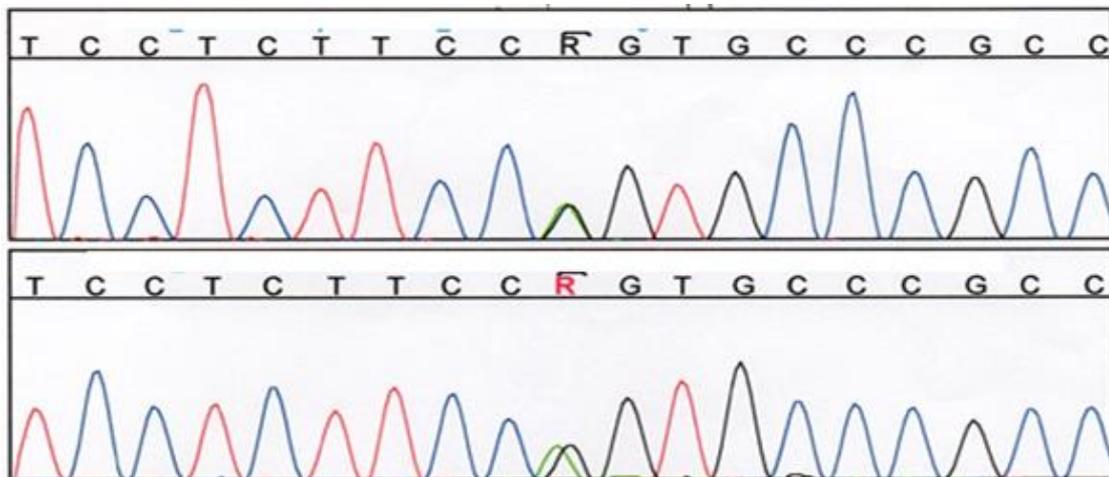


Figure 19: Électrophorégramme de l'exon 11 polymorphisme hétérozygote G691S (GGT>AGT).

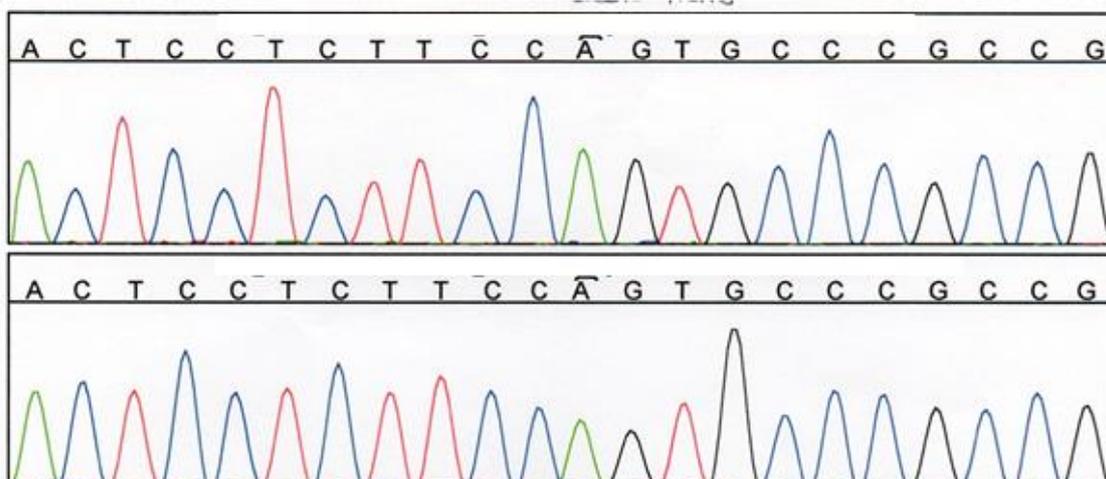


Figure 20: Électrophorégramme de l'exon 11 polymorphisme homozygote G691S (GGT>AGT).

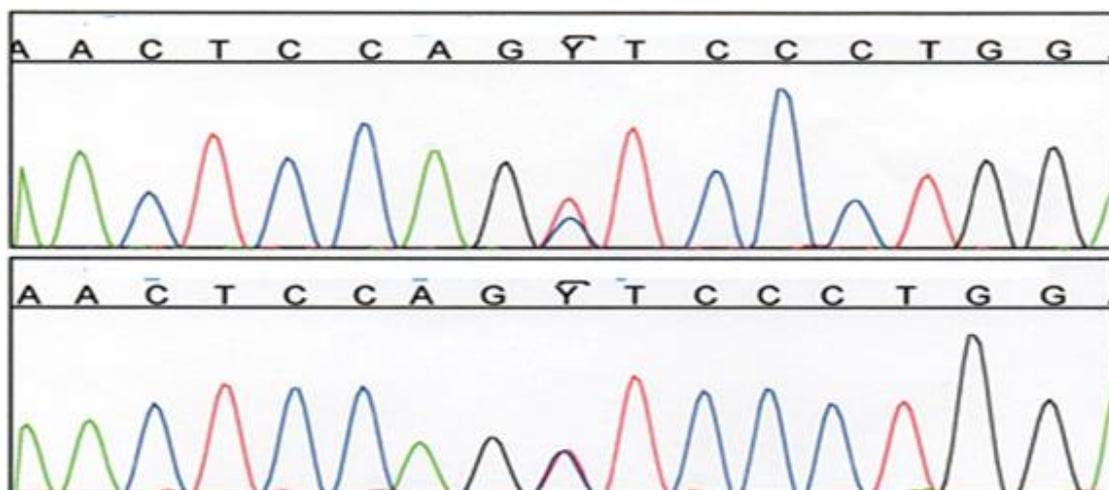


Figure 21: Eléctrophorégramme de l'exon 15 polymorphisme hétérozygote S904S (TCC>TCG).

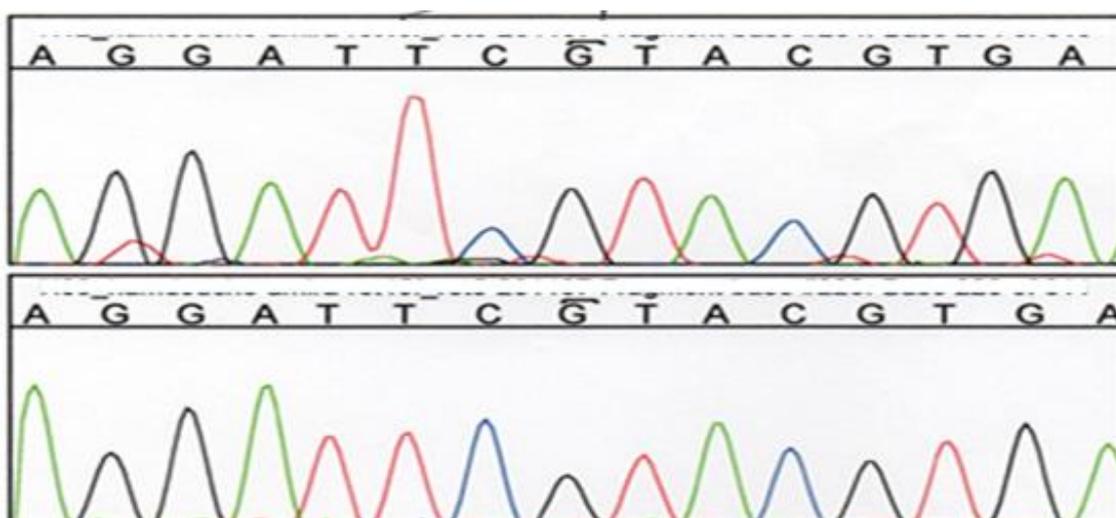


Figure 22: Eléctrophorégramme de l'exon 15 polymorphisme homozygote S904S (TCC>TCG).

PARTIE PRATIQUE

Tableau XVI : Code d'identification des bases des mélanges de bases par le séquenceur.

Code alphabétique	Code couleur	Nature du ou des nucléotides
A	Verte	Adénine
G	Noire	Guanine
C	Bleu	Cytosine
T	Rouge	Thymine
R	Verte et noire	A+G
Y	Bleu et rouge	C+T
K	Noire et rouge	G+T
M	Verte et bleu	A+C
S	Noire et blue	G+C
W	Verte et blue	G+T
N	-	Quelconque
V	Verte,blue et et noire	A+C+G
B	Bleu,noire et rouge	C+G+T
D	Verte, noir et rouge	A+G+T
H	Verte, bleu et rouge	A+C+T

III. Discussion

Au cours de ces 10 dernières années, les circonstances de découverte du CMT ont changé, surtout depuis l'utilisation des stratégies spécifiques de diagnostic: le dosage de la calcitonine sérique chez des patients présentant des nodules thyroïdiens et le criblage génétique des mutations du proto-oncogène RET chez tous les patients présentant un CMT (Bugalho *et al.*,1997 ; Hahms *et al.*, 2001).

Différents variants de RET ont été identifiés, particulièrement après l'introduction du criblage génétique du proto-oncogène RET dans la prise en charge de tous les patients présentant un CMT de type héréditaire ou apparemment sporadique.

De plus, il y a eu de nombreux nouveaux indices indiquant un lien entre les mutations connues de RET : celles classiquement associées à un CMT ou celles liées à une NEM2A ou, à l'opposé, celles montrant une grande variabilité du spectre de mutations et de l'effet modulateur possible des polymorphismes sur l'expression clinique (Bergholm *et al.*, 1989).

Dans ce travail, nous avons étudié et comparé les données suivantes :

- L'âge des patients au diagnostic.
- Le sexe.
- Les polymorphismes génétiques G691S de l'exon 11 et S904S de l'exon 15.
- L'influence des deux polymorphismes sur le CMT sporadique et le CMT des NEM2.

Notre étude a porté sur 48 patients, dont 33 cas index CMT et 15 apparentés du premier degré des patients ayant présenté une mutation.

Nous avons noté une différence dans l'âge moyen au diagnostic des CMT:

- 34.8 ± 5.38 ans pour le CMT héréditaire, 34.6 ans,
- 44.37 ± 13.38 ans pour les CMTs avec une prédominance féminine.

Les travaux de (Bergholm *et al.*,1997 ; Matias-Guiu *et al.*,2004; Raue *et al.*,2009) ont montré dans les cas sporadiques, un âge moyen de présentation qui est respectivement de 47.6 ans et 50 ans avec une prédominance féminine ce qui concorde avec nos résultats.

De plus de nombreuses études ont montré que l'incidence maximale du CMTs se produit dans la cinquième décennie de la vie tandis que le CMT héréditaire peut être diagnostiqué plus tôt, selon la disponibilité du criblage génétique et biochimique (Bergholm *et al.*,1997 ; Raue *et al.*, 1998 ; Matias-Guiu *et al.*,2004 ; Raue *et al.*,2009).

PARTIE PRATIQUE

Le CMTF peut n'apparaître qu'après l'âge de 30 voire 50 ans en fonction de la mutation de RET (Saad *et al.*, 1984).

L'analyse génétique du proto-oncogène RET est devenue indispensable dans la prise en charge des NEM2, elle permet des indications chirurgicales précoces chez les sujets génétiquement prédisposés.

L'analyse génétique a permis de répartir nos cas index CMT en différents types:

- CMT sporadiques dans 84,85% des cas, héréditaires dans 15,15% des cas.

Ce résultat est inférieur aux données de la littérature (25%) (Roman *et al.*, 2006) montrant que les mutations de RET sont variables d'une ethnie à une autre et est sous l'influence de facteurs environnementaux (Modigliani *et al.*, 1998 ; Pacini *et al.*, 2010).

Puisque les individus apparentés et non apparentés présentant les mêmes mutations germinales de RET développent des CMT et des phéochromocytomes à différents âges, d'autres événements génétiques ou épigénétiques peuvent déclencher la tumorigénèse, y compris la présence de polymorphisme de RET et d'haplotypes héréditaires ancestraux.

Par convention, un polymorphisme est un variant bénin affectant plus de 1 % d'une population. Le polymorphisme le plus fréquent étant le SNP. Il s'agit d'une variation simple et unique dans la séquence nucléotidique d'un gène, retrouvée chez plusieurs individus d'une même espèce et qui se transmet de façon mendélienne.

L'étude des deux polymorphismes G691S de l'exon 11 et S904S de l'exon 15 du proto-oncogène RET a montré des polymorphismes sont présents aussi bien dans le groupe des NEM2 que dans le groupe des CMT sporadiques.

Dans les CMT sporadiques, le polymorphisme G691S (GGT/AGT) du proto-oncogène est fortement représenté.

Dans les NEM2, les polymorphismes G691S de l'exon 11 et S904S (TCC/TCG) de l'exon 15 sont plus fréquents.

Plusieurs études (Strock *et al.*, 2003 ; Robledo *et al.*, 2003 ; Degroot *et al.*, 2006) ont prouvé que l'haplotype G691S/S904S de RET a un effet modificateur sur l'âge de début du CMTs et des NEM2. Et que les patients homozygotes pour ces SNP ont été en moyenne diagnostiqués avec CMT 10 ans plus tôt que des patients partageant l'haplotype à l'état hétérozygote ou à

PARTIE PRATIQUE

l'état sauvage. C'est ce qui a été constaté chez nos apparentés qui ont présenté le CMT à un âge plus précoce, le plus jeune patient atteint de la maladie avait 4 ans.

En effet le polymorphisme G691S est considéré comme un polymorphisme fonctionnel.

Le changement de l'acide aminé GS crée un nouvel emplacement de phosphorylation, qui affecte en aval la signalisation (Sanger *et al.*,1997). Il pourrait également entraîner un changement de la structure secondaire de RET, affectant la flexibilité et l'accessibilité des solvants de la protéine (Smith *et al.*,1986).

La fonctionnalité de ce polymorphisme non synonyme G691S (GGT/AGT) , a été testé dans un premier temps par Western blot montrant que le taux de la fraction protéique RET-G691S membranaire est fortement exprimé par rapport à la protéine RET-WT chez des patients présentant un CMT héréditaire ou sporadique suggérant l'expression membranaire plus importante du variant protéique RET-G691S, donc son activité oncogénique est élevée.

Le SNP S904S ne mène pas à un changement d'acide aminé mais semble être lié au SNP G691S, en raison d'un effet fondateur.

Cependant, d'autres données expérimentales, sont encore nécessaires pour vérifier ces hypothèses car d'autres études n'ont pas retrouvé cette liaison.

Dans le groupe des CMTs, le SNP G691S était fortement représenté suivi du polymorphisme S904S.

Le SNP G691S de RET pourrait moduler l'âge de début du CMTs. En effet, ce SNP était plus fréquent chez nos CMT sporadiques âgés de moins de 50 ans.

La découverte de ces altérations et leur caractérisation fonctionnelle peut aider à l'amélioration de la prévention, la détection plus précoce (anticipation de la maladie) et le traitement du CMT.

La fréquence des SNP peut varier de façon importante d'un groupe ethnique à un autre, Il est donc important de considérer dans chaque étude une population ethniquement homogène.

D'autres concepts sont nécessaires à l'interprétation correcte des études de polymorphismes et dans notre travail, une recherche de ces deux polymorphismes, dans la population générale est nécessaire à fin d'apprécier la fréquence de celui-ci, ce qui va permettre de ne pas conclure

PARTIE PRATIQUE

à tort à un lien causal entre le variant et la maladie et pour répondre aux exigences méthodologiques des études de polymorphismes.

CONCLUSIONS

ET

PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVE

Conclusion

Le cancer médullaire de la thyroïde (CMT) est une tumeur neuroendocrinienne rare, qui peut se présenter sous différentes formes : Sporadique vraie dans 70-75 % des cas. Et familiale, génétiquement déterminée dans environ 25-30 % des cas.

Le CMT est rare mais potentiellement mortel. Son dépistage moléculaire est devenu un outil incontournable et permet très précocement de distinguer les sujets à risque porteurs de la mutation de ceux qui sont non porteurs et qui peuvent être exclus de la surveillance.

Plusieurs haplotypes et SNPs sont associés au CMT sporadique et aux néoplasies endocriniennes multiples de type 2A (NEM2A), notamment les polymorphismes G691S et S904S.

Cette étude a révélé que dans les NEM2, l'haplotype G691S/S904S du gène RET est plus fréquent, La corrélation entre les données cliniques et le génotype de ces deux polymorphismes, nous a amené à constater un effet additif de la présence de ces 2 allèles sur l'âge d'apparition du CMT chez ces patients. Suggérant un effet modificateur de cet haplotype sur l'âge d'apparition du CMT dans les NEM2A et le CMT sporadique.

Chez les membres de la famille des cas index porteurs de mutations, des polymorphismes identiques à ceux des cas index NEM2 ont été retrouvés à l'état homozygote, avec une anticipation de la maladie.

Cependant, des données expérimentales supplémentaires sont nécessaires pour vérifier ces hypothèses et mieux comprendre l'impact de chaque variant du proto-oncogène RET.

La découverte de ces altérations et leur caractérisation fonctionnelle peuvent améliorer la prévention, la détection précoce et le traitement du CMT.

À l'avenir, il serait souhaitable de rechercher ces deux polymorphismes dans la population algérienne, car la fréquence des SNP peut varier considérablement entre les groupes ethniques et répondre aux exigences méthodologiques des études de polymorphismes.

REFERENCES

ET

BIBLIOGRAPHIQUES

Références

Agrawal, N., Jiao, Y., Sausen, M., Leary, R., Bettegowda, C., Roberts, N.J., Bhan, S., Ho, A.S., Khan, Z., Bishop, J., Westra, W.H., Wood, L.D., Hruban, R.H., et al. (2013). Exomic sequencing of medullary thyroid cancer reveals dominant and mutually exclusive oncogenic mutations in RET and RAS. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *98*, E364-E369.

Aiello, A., Cioni, K., Gobbo, M., et al. (2005). The familial medullary thyroid carcinoma associated RET E7680 mutation in a multiple endocrine neoplasia type 2A case. *Surgery*, *137*(5), 574-576.

Airaksinen, M. S., & Saarma, M. (2002). The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci*, *3*(5), 383–394.

Airaksinen, M. S., Holm, L., & Häätinen, T. (2006). Evolution of the GDNF family ligands and receptors. *Brain Behav Evol*, *68*(3), 181–190.

Albores-Saavedra, J., Monforte, H., Nadjik, M., & Morales, A. R. (1988). C-cell hyperplasia in thyroid tissue adjacent to follicular cell tumors. *Human Pathology*, *19*, 795–799.

Algeciras-Schimnich, A., Preissner, C. M., Theobald, J. P., Finseth, M. S., & Grebe, S. K. (2009). Procalcitonin: A marker for the diagnosis and follow-up of patients with medullary thyroid carcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *94*, 861–868.

Asai, N., Iwashita, T., Matsuyama, M., & Takahashi, M. (1995). Mechanisms of activation of the ret protooncogene by multiple endocrine neoplasia 2A mutation. *Mol Cell Biol*, *15*, 1613–1619.

Asai, N., Jijiwa, M., Enomoto, A., Kawai, K., Maeda, K., Ichihara, M., et al. (2006). RET receptor signaling: Dysfunction in thyroid cancer and Hirschsprung's disease. *Pathology International*, *56*, 164–172.

Bae, S. J., Kim, D. J., Kim, J. Y., et al. (2006). A rare extracellular D631Y germline mutation of the RET proto-oncogene in two Korean families with multiple endocrine neoplasia 2A. *Thyroid*, *16*(6), 609-614.

Baloh, R. H., Enomoto, H., Johnson Jr, E. M., & Milbrandt, J. (2000). The GDNF family ligands and receptors: implications for neural development. *Curr Opin Neurobiol*, *10*(1), 103–110.

REFERENCES ET BIBLIOGRAPHIQUES

Barbot, N., Calmettes, C., Schuffenecker, I., et al. (1994). Pentagastrin stimulation test and early diagnosis of medullary carcinoma using an immunoradiometric assay of calcitonin: Comparison with genetic screening in hereditary medullary thyroid carcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 78, 114–120.

Baron, R., & Vignery, A. (1981). Behavior of osteoclasts during a rapid change in their number induced by high doses of parathyroid hormone or calcitonin in intact rats. *Metabolic Bone Disease & Related Research*, 2(6), 339–346.

Bartsch, D. K., Hasse, C., Schug, C., et al. (2000). A RET double mutation in the germline of a kindred with FMTC. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 108(2), 128-132.

Becker, K. L., Nylen, E. S., Cohen, R., Silva, O. L., & Snider, R. H. (n.d.). Calcitonin gene family of peptides. In *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism* (2nd ed., pp. 474–483). J.B. Lippincott Co.

Begholm U, Adami HO, Bergstrom R, et al. (1989). Clinical characteristics in sporadic and familial medullary thyroid carcinoma: a nationwide study of 249 patients in Sweden from 1959 through 1981. *Cancer*, 63, 1196–204.

Bendt, I., Reuter, M., Saller, B., et al. (1990). A New hot spot for mutations in the ret causing familial Pratooncogene ary thyroid carcinoma medullary and multiple endocrine neoplasia type 2A. *J Clin Endocrinol Metab*, 83(3), 770-774.

Berard, I., Kraimps, J., Savagner, F., Murat, et al. (2004). Germline-sequence variants 58365 and 17691 in the RET proto-oncogene are not associated with predisposition to sporadic medullary carcinoma in the French population. *Clinical Genetics*, 65, 150-152.

Berndt, I., Reuter, M., Saller, B., et al. (1998). A new hot spot for mutations in the ret proto-oncogene causing familial medullary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia type 2A. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83, 770–774.

Besse, V., Besse, V., Marchand-Adam, S., Marchand-Adam, S., Marchal, J., & Marchal, J. (2000). Signaling complexes and protein-protein interactions involved in the activation of the Ras and phosphatidylinositol 3-kinase pathways by the c-Ret receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem*, 275, 39159–39166.

Bethanis, S., Koutsodantis, G., Palouka, T., et al. (2007). A newly detected mutation of the RET protooncogene in exon 8 as cause of multiple endocrine neoplasia type 2A. *Hormones (Athens)*, 6, 152-156.

Boichard, A., Croux, L., Al Ghuzlan, A., Broutin, S., Dupuy, C., Leboulleux, S., Schlumberger, M., Bidart, J.M., & Lacroix, L. (2012). Somatic RAS mutations occur in a large proportion of sporadic RET-negative medullary thyroid carcinomas and extend to a

REFERENCES ET BIBLIOGRAPHIQUES

previously unidentified exon. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97, E2031-E2035.

Borrego, S., Fernandez, R. M., Dziema, H., et al. (2002). Evaluation of germline sequence variants of GFRA1, GFRA2, and GFRA3 genes in a cohort of Spanish patients with sporadic medullary thyroid cancer. *Unknown Journal*, 12, 1017-1022.

Borrego, S., Wright, F.A., Fernandez, R.M., et al. (2003). A founding locus within the RET proto-oncogene may account for a large proportion of apparently sporadic Hirschsprung disease and a subset of cases of sporadic medullary thyroid carcinoma. *American Journal of Human Genetics*, 72, 88-100.

Borrello, M. G., et al. (1995). RET activation by germline MEN2A and MEN2B mutations. *Oncogene*, 11, 2419–2427.

Boschin, I. M., Torresan, F., Toniato, A., et al. (2014). Incidental medullary thyroid microcarcinoma revealed by mild increase of preoperative serum calcitonin levels: Therapeutic implications. *Endocrine*, 45(3), 448–453.

Brandi, M.L., Gagel, R.F., Angeli, A., Bilezikian, J.P., Beck-Peccoz, P., Bordi, C., Conte-Devolx, B., Falchetti, A., Gheri, R.G., Libroia, A., et al. (2001). Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86, 5658–5671.

Buckwalter, T.L.F., Venkateswaran, A., Lavender, M., La Perle, K., Cho, J.-Y., Robinson, M.L., et al. (2002). The roles of phosphotyrosines-294,-404, and-451 in RET/PTC1-induced thyroid tumor formation. *Oncogene*, 21(53), 8166-8172.

Bugalho MJ, Frade JP, Santos JR, Limbert E, Sobrinho L (1997). Molecular analysis of the RET proto-oncogene in patients with sporadic medullary thyroid carcinoma: a novel point mutation in the extracellular cysteine-rich domain. *Eur J Endocrinol*, 136, 423–426.

Bugalho, M. J., Domingues, R., Santos, J. R., Catarino, A. L., & Sobrinho, L. (2007). Mutation analysis of the RET proto-oncogene and early thyroidectomy: results of a Portuguese cancer centre. *Surgery*, 141(1), 90-95.

Cakir, M., & Grossman, A.B. (2009). Medullary thyroid cancer: molecular biology and novel molecular therapies. *Neuroendocrinology*, 90(4), 323-348.

Carter, M. T., Yome, J. L., Marcil, M. N., Martin, C. A., Vanhorne, J. B., & Mulligan, L. M. (2001). Conservation of RET proto-oncogene splicing variants and implications for RET isoform function. *Cytogenet Cell Genet*, 95, 169–176.

Castellone, M. D., & Santoro, M. (2008). Dysregulated RET Signaling in Thyroid Cancer. *Endocrinol Metab Clin N Am*, 37, 363–374.

REFERENCES ET BIBLIOGRAPHIQUES

Chambers, T. J., & Dunn, C. J. (1983). Pharmacological control of osteoclastic motility. *Calcified Tissue International*, 35(5), 566–579.

Chatal, J. F., Campion, L., Kraeber-Bodere, F., et al. (2006). Survival improvement in patients with medullary Thyroid carcinoma who undergo pretargeted anti-carcinoembryonic-antigen radioimmunotherapy: a collaborative study with the French Endocrine Tumor Group. *J Clin Oncol*, 24(11), 1705-1711.

Chiariello, M., et al. (1998). Signaling of the Ret receptor tyrosine kinase through the c-Jun NH2-terminal protein kinases (JNKs): evidence for a divergence of the ERKs and JNKs pathways induced by Ret. *Oncogene*, 16, 2435–2445.

Cohen, R., Campos, M. J., Salaun, C., et al. (2000). Preoperative calcitonin levels are predictive of tumor size and cure in medullary thyroid carcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85, 919–922.

Correia-Deur, J. E. M., Toledo, R. A., Imazawa, A. T., Lourenço Jr, D. M., Ezabella, M. C., Tavares, M. R., & Toledo, S. P. (2009). Sporadic medullary thyroid carcinoma: Clinical data from a university hospital. *Clinics*, 64(5), 379–386.

Cote, G. J., Evers, C., Hu, M. I., et al. (2017). Prognostic significance of circulating RET M918T mutated tumor DNA in patients with advanced medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 102(9), 3591-3599.

D'Herbomez, M., Leclerc, L., Vantghem, M. G., et al. (n.d.). Clinical evaluation of a new...

Da Silva, A.M., Maciel, R.M., Da Silva, M.R., Toledo, S.R., De Carvalho, M.B., Cerutti, J.M. (2003). A novel germ-line point mutation in RET exon 8 (Gly(533)Cys) in a large kindred with familial Medullary thyroid carcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88, 5438–5443.

D'Aloiso, L., Carlomagno, F., Bisceglia, M., et al. (2006). Clinical case seminar: in vivo and in vitro characterization of a novel germline RET mutation associated with low-penetrant nonaggressive familial medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 91(3), 754-759.

Davila, A., Menias, C. O., Alhalabi, K., Lall, C., Pickhardt, P. J., Lubner, M., et al. (2020). Multiple endocrine neoplasia: Spectrum of abdominal manifestations. *AJR. American Journal of Roentgenology*, 215, 885–895.

de Groot, J. W. B., Links, T. P., Plukker, J. T. M., Lips, C. J. M., & Hofstra, R. M. W. (2006). RET as a Diagnostic and Therapeutic Target in Sporadic and Hereditary Endocrine Tumors. *Endocrine Reviews*, 27(5), 535–560.

REFERENCES ET BIBLIOGRAPHIQUES

Donis-Keller, H., Dou, S., Chi, D., Carlson, K. M., Toshima, K., Lairmore, T. C., et al. (1993). Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN2A and FMTC. *Hum Mol Genet*, 2, 851–856.

Donis-Keller, H., Dou, S., Chi, D., Carlson, K.M., Toshima, K., Lairmore, T.C., Howe, J.R., Moley, J.F., Goodfellow, P., Wells, S.A., Jr. (1993). Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Human Molecular Genetics*, 2, 851–856.

Drosten, M., et al. (2003). Antitumor capacity of a dominant-negative RET proto-oncogene mutant in a medullary thyroid carcinoma model. *Hum. Gene Ther.*, 14, 971–982.

Dvorakova, S., Vaclavikova, E., Sykorova, V., Vcelak, J., Novak, Z., Dusikova, J., Ryska, A., Laco, J., Cap, J., Kodetova, D., & Kodet, R. (2008). Somatic mutations in the RET proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinomas. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 284(1-2), 21-27.

Eisenhofer, G., Lenders, J. W. M., Linehan, W., et al. (1999). Normétanéphrine et métanéphrine plasmatiques pour la détection des phéochromocytomes dans la maladie de von Hippel-Lindau et la néoplasie endocrinienne multiple de type 2. *New England Journal of Medicine*, 340, 1872–1879.

Elisei, R., Bottici, V., Luchetti, F., et al. (2004). Impact of routine measurement of serum calcitonin on the diagnosis and outcome of medullary thyroid cancer: Experience in 10,864 patients with nodular thyroid disorders. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89, 163–168.

Elisei, R., Bottici, V., Luchetti, F., et al. (2004). Impact of routine measurement of serum calcitonin on the diagnosis and outcome of medullary thyroid cancer: experience in 10,864 patients with nodular thyroid disorders. *J Clin Endocrinol Metab*, 09(4), 163-168.

Elisei, R., Cosci, B., Romei, C., Bottici, V., Renzini, G., Molinaro, E., et al. (2008). Prognostic significance of somatic RET oncogene mutations in sporadic medullary thyroid cancer: a 10-year follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab*, 93(3), 682-687.

Elisei, R., et al. (2015). "RET proto-oncogene in medullary thyroid carcinoma." *Clinical Endocrinology*, 82(2), 156-164.

Elisei, R., Romei, C., Cosci, B., et al. (2007). RET genetic screening in patients with medullary thyroid cancer and their relatives: experience with 807 individuals at one center. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(12), 4725-4729.

REFERENCES ET BIBLIOGRAPHIQUES

Elisei, R., Schlumberger, M.J., Müller, S.P., Schöffski, P., Brose, M.S., Shah, M.H., Licitra, L., Jarzab, B., Medvedev, V., Kreissl, M.C., Niederle, B. (2013). Cabozantinib in progressive Medullary thyroid cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 31(29), 3639.

Eng, C., Clayton, D., Schuffenecker, I., et al. (1996). The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2: International RET Mutation Consortium Analysis. *Jama*, 276, 1575–1579.

Eng, C., Clayton, D., Schuffenecker, I., Lenoir, G., Cote, G., Gagel, R.F., van Amstel, H.K., Lips, C.J., Nishisho, I., Takai, S.I., et al. (1996). The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET mutation consortium analysis. *JAMA*, 276, 1575–1579.

Eng, C., Mulligan, L. M., Smith, D. P., et al. (1995). Faible fréquence de mutations germinales dans le RET proto-oncogène chez les patients atteints d'un carcinome médullaire de la thyroïde apparemment sporadique. *Clinical Endocrinology*, 43, 123-127.

Eng, C., Mulligan, L. M., Smith, D. P., Sifi, K., et al. (1994). Mutations ponctuelles dans le domaine tyrosine du proto-oncogène RET dans les néoplasies endocriniennes multiples de type 2 et les tumeurs sporadiques associées. *Human Molecular Genetics*, 3, 237-241.

Eng, C., Smith, D.P., Mulligan, L.M., Healey, C.S., Zvelebil, M.J., Stonehouse, T.J., Ponder, M.A., Jackson, C.E., Waterfield, M.D., & Ponder, B.A. (1995). A novel point mutation in the tyrosine kinase Domain of the RET proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma and in a family with FMTC. *Oncogene*, 10, 509–513.

Ercolino, T., Lombardi, A., Becherini, L., et al. (2008). The Y606C RET mutation causes a receptor gain of function. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 69(2), 253-258.

Farndon JR, Leight GS, Dilley WG et al (1986). Familial medullary thyroid carcinoma without associated endocrinopathies: a distinct clinical entity. *The British Journal of Surgery*, 73, 278–281.

Fattoruso, O., Quadro, L., Libroia, A., et al. (1998). A GTG to ATG novel point mutation at codon 804 in exon 14 of the RET proto-oncogene in two families affected by familial medullary thyroid carcinoma. *Hum Mut*, 1, 16771.

Feingold, J., & Sifi, K. (2000). La génétique prédictive en médecine. *Gynecol Obstet Erti*, 128, 391-395.

Feingold, J., & Sifi, K. (2000). La génétique prédictive en médecine. *Gynecologie Obstetrique et Fertilité*, 28(5), 391-395.

Flbáñez, C. (2013). *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(2), a009134.

REFERENCES ET BIBLIOGRAPHIQUES

Fluge, O., Haugen, D., Akslen, L., Marstad, A., Santoro, M., Varhaug, J., & Lillehaug, J. R. (2001). Expression and alternative splicing of c-ret RNA in papillary thyroid carcinomas. *Oncogene*, *20*, 885–892.

Fluge, O., Haugen, D., Akslen, L., Marstad, A., Santoro, M., Varhaug, J., & Lillehaug, J. R. (2001). Expression and alternative splicing of c-ret RNA in papillary thyroid carcinomas. *Oncogene*, *20*, 885–892.

Frank-Raue, K., Hoppner, W., Frilling, A., et al. (1996). Mutations of the RET proto-oncogene in German multiple endocrine Neoplasia families: relation between genotype and phenotype. *J Clin Endocrinol Metab*, *81*(5), 1780-1783).

Frank-Raue, K., Machens, A., Leidig-Bruckner, G., et al. (2013). Prevalence and clinical spectrum of nonsecretory medullary thyroid carcinoma in a series of 839 patients with sporadic medullary thyroid carcinoma. *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association*, *23*(3), 294–300.

Frank-Raue, K., Rybicki, L. A., Erlic, Z., et al. (2011). Risk profiles and penetrance estimations in Multiple endocrine neoplasia type 2A caused by germline RET mutations located in exon 10. *Hum Mutat*, *32*(1), 51-58).

Gath, R., Goessling, A., Keller, K.M., et al. (2001). Analysis of the RET, GDNF, EDN3, and EDNRB genes in patients with intestinal neuronal dysplasia und Hirschsprung disease. *Gut*, *48*(5), 671-675.

Gibelin, H., Esique, D., Jones, C., et al. (2005). Increased calcitonin level in thyroid nodules without medullary carcinoma. *The British Journal of Surgery*, *92*, 574–578.

Gimm, O., Marsh, D.J., Andrew, S.D., Frilling, A., Dahia, P.L., Mulligan, L.M., Zajac, J.D., Robinson, B.G., & Eng, C. (1997). Germline dinucleotide mutation in codon 883 of the RET proto-oncogene In multiple endocrine neoplasia type 2B without codon 918 mutation. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *82*, 3902–3904.

Gimm, O., Neuberg, D. S., Marsh, D. J., et al. (1999). Surreprésentation d'un variant de séquence germinale RET chez les patients atteints d'un carcinome médullaire sporadique de la thyroïde et du codon somatique RET 918 mutation. *Oncogene*, *18*, 1369-1373.

Gimm, O., Neuberg, D.S., Marsh, D.J., Dahia, P.L., Hoang-Vu, C., Raue, F., Hinze, R., Dralle, H., & Eng, C. (1999). Over-representation of a germline RET sequence variant in patients with sporadic medullary thyroid carcinoma and somatic RET codon 918 mutation. *Oncogene*, *18*, 1369-1373.

Goodfellow, P. J. (1994). Inherited cancers associated with the RET proto-oncogene. *Current Opinion in Genetics and Development*, *4*, 443–452.

REFERENCES ET BIBLIOGRAPHIQUES

Gorlin, R. J., & Vickers, R. A. (1971). Multiple mucosal neuromas, pheochromocytoma, medullary carcinoma of the thyroid and marfanoid body build with muscle wasting: Reexamination of a syndrome of neural crest malmigration. *Birth Defects Original Article Series*, 7, 69–72.

Gotthardt, M., Battmann, A., Hoffken, H., et al. (2004). 18F-FDG PET, somatostatin receptor scintigraphy, and CT in metastatic medullary thyroid carcinoma: a clinical study and an analysis of the literature. *Nucl Med Commun*, 25(5), 439-443.

Groot, J. W., Links, T. P., Plukker, J. T., Lips, C. J., & Hofstra, R. M. (2006). RET as a diagnostic and therapeutic target in sporadic and hereditary endocrine tumors. *Endocr Rev*, 27(5), 535-60.

Guyetant, S., Wion-Barbot, N., Rousselet, M. C., et al. (1994). C-cell hyperplasia associated with chronic lymphocytic thyroiditis: A quantitative autopsy study of 112 cases. *Human Pathology*, 25, 514–521.

Hahms JR, Lee MS, Min YK et al (2001). Routine measurement of serum calcitonin is useful for early detection of medullary thyroid carcinoma in patients with nodular thyroid diseases. *Thyroid*, 11, 73–80.

Hahms, J. R., Lee, M. S., Min, Y. K., et al. (2001). Routine measurement of serum calcitonin is useful for early detection of medullary thyroid carcinoma in patients with nodular thyroid diseases. *Thyroid*, 11, 73–80.

Hall, L.A., Palsboll, P.J., Beissinger, S.R., Harvey, J.T., Bérubé, M., Raphael, M.G., Nelson, S.K., Golightly, R.T., McFarlane-Tranquilla, L., Newman, S.H., & Peery, M.Z. (2009). Characterizing dispersal patterns in a threatened seabird with limited genetic structure. *Molecular Ecology*, 18, 5074-5085.

Hamy, A., Pessaux, P., Miraille, E., et al. (2005). Central neck dissection in the management of sporadic medullary microcarcinoma. *Eur J Surg Oncol*, 31(7), 774-777.

Hedayati, M., Zarif Yeganeh, M., Sheikhol Eslami, S., Rezghi Barez, S., Hoghooghi Rad, L., Azizi, F. (2011). Predominant RET germline mutations in exons 10, 11, and 16 in Iranian patients with hereditary medullary thyroid carcinoma. *Journal of Thyroid Research*, 2011.

Hofstra, R.M., Fattoruso, O., Quadro, L., Wu, Y., Libroia, A., Verga, U., Colantuoni, V., & Buys, C.H. (1997). A novel point mutation in the intracellular domain of the RET protooncogene in a family with Medullary thyroid carcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82, 4176–4178.

Holtrop, M. E., Raisz, L. G., & Simmons, H. A. (1974). The effect of parathyroid hormone, colchicine and calcitonin on the ultrastructure and the activity of osteoclasts in organ culture. *The Journal of Cell Biology*, 60(2), 346–355.

REFERENCES ET BIBLIOGRAPHIQUES

- Iacobone, M., Niccoli-Sire, P., Sebag, F., et al. (2002). Can sporadic medullary thyroid carcinoma be biochemically predicted? Prospective analysis of 66 operated patients with elevated serum calcitonin levels. *World Journal of Surgery*, 26, 886–890.
- Ibanez, C. F. (1998). Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors. *Trends Neurosci*, 21, 438–444.
- Ibáñez, C. F. (2013). Structure and physiology of the RET receptor tyrosine kinase. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(2).
- Ichihara, M., Murakumo, Y., & Takahashi, M. (2004). RET and neuroendocrine tumors RET. *Cancer Letters*, 204, 197–211.
- Ishida, O., Zeki, K., Morimoto, I., et al. (1995, juin). Mutations germinales du proto-oncogène RET associées à une néoplasie endocrinienne multiple familiale de type 2B. *Clinical Oncology*, 25(3), 104-108.
- Ishida, O., Zeki, K., Morimoto, I., Yamamoto, S., Frijihra, T., & Eto, S. (1995). Germline mutations in the RET proto-oncogene associated with familial multiple endocrine neoplasia type 2B: a case report. *Jpn .J .Clin Oncol*, 25(3), 104–108.
- Ishizaka, Y., Itoh, F., Tahira, T., Ikeda, I., Sugimura, T., Tucker, J., et al. (1989). Human ret proto-oncogene mapped to chromosome 10q11.2. *Oncogene*, 4, 1511–1521.
- Ivanchuk, S. M., Eng, C., Cavenee, W. K., & Mulligan, L. M. (1997). The expression of RET and its multiple splice forms in developing human kidney. *Oncogene*, 14, 1811–1818.
- Ivanchuk, S. M., Myers, S. M., & Mulligan, L. M. (1998). Expression of RET 3` splicing variants during human kidney development. *Oncogene*, 16, 991–996.
- Iwamoto, T., Taniguchi, M., Asai, N., Ohkusu, K., Nakashima, I., & Takahashi, M. (1993). cDNA cloning of mouse ret proto-oncogene and its sequence similarity to the cadherin superfamily. *Oncogene*, 8, 1087–1091.
- Iwashita, T., Asai, N., Murakami, H., Matsuyama, M., & Takahashi, M. (1996). Identification of tyrosine residues that are essential for transforming activity of the RET proto-oncogene with MEN2A or MEN2B mutation. *Oncogene*, 12, 481–487.
- Kallio, D. M., Garant, P. R., & Minkin, C. (1972). Ultrastructural effects of calcitonin on osteoclasts in tissue culture. *Journal of Ultrastructure Research*, 39(3), 205–216.
- Kameyama, K., Okinaga, H., Takami, H. (2004). Clinical manifestations of familial medullary thyroid carcinoma. *Biomed Pharmacother*, 58(7), 348-350.

REFERENCES ET BIBLIOGRAPHIQUES

Karanikas, G., Moameni, A., Poetzi, C., et al. (2004). Frequency and relevance of elevated calcitonin levels in patients with neoplastic and non-neoplastic thyroid disease and in healthy subjects. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89, 515–519.

Karges, W., Dralle, H., Raue, F., et al. (2004). Calcitonin measurement to detect medullary thyroid carcinoma in nodular goiter: German evidenced-based consensus recommendations. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 112, 52–58.

Kaserer, K., Scheuba, C., Neuhold, N., et al. (1998). C-cell hyperplasia and medullary thyroid carcinoma in patients routinely screened for serum calcitonin. *The American Journal of Surgical Pathology*, 22(6), 722–728.

Kasprzak, L., Nolet, S., Gaboury, L., et al. (2001). Familial medullary thyroid carcinoma and prominent corneal nerves associated with the germline V804M and V7781 mutations on the same allele of RET. *J Med Genet*, 38(5), 784-787.

Kawamoto, Y., Takeda, K., Okuno, Y., Yamakawa, Y., Ito, Y., Taguchi, R., et al. (2004). Identification of RET autophosphorylation sites by mass spectrometry. *Journal of Biological Chemistry*, 279(14), 14213-14224.

Kinlaw, W. B., Scott, S. M., Maue, R. A., et al. (2005). Multiple endocrine neoplasia 24 due to a unique C6095 RET mutation presents with pheochromocytoma and reduced penetrance of medullary thyroid Carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 63(6), 676-682.

Kitamura, Y., Goodfellow, P. J., Shimizu, K., et al. (1997). Novel germline RET proto-oncogene mutations associated with medullary thyroid carcinoma (MTC): Mutation analysis in Japanese patients with MTC. *Oncogene*, 14(25), 3103-3106.

Kloos, R.T., Eng, C., Evans, D.B., Francis, G.L., Gagel, R.F., Gharib, H., Moley, J.F., Pacini, F., Ringel, M.D., & Schlumberger, M. (2009). Medullary thyroid cancer: Management guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid*, 19, 565-612.

Knowles, P.P., Murray-Rust, J., Kjær, S., Scott, R.P., Hanrahan, S., Santoro, M., et al. (2006). Structure and chemical inhibition of the RET tyrosine kinase domain. *Journal of Biological Chemistry*, 281(44), 33577-33587.

Kommino, P. (1997). RET proto-oncogène et endocr du cancer de la thyroïde *Pathol*, 8(3), 235-239.

Komminoth, P. (1997). RET proto-oncogene and thyroid cancer. *Endocr Pathol*, 8(3), 235–239.

Kotzbauer, P. T., Lampe, P. A., Heuckeroth, R. O., Golden, J. P., Creedon, D. J., Johnson Jr., E. M., et al. (1996). Neurturin, a relative of glial cell-line-derived neurotrophic factor. *Nature*, 384, 467–470.

REFERENCES ET BIBLIOGRAPHIQUES

- Kouvaraki, M.A., Shapiro, S.E., Perrier, N.D., et al. (2005). RET protooncogene: a review and update of genotype–phenotype correlations in hereditary medullary thyroid cancer and associated endocrine tumors. *Thyroid*, *15*, 531–544.
- Landrum, M.J., Lee, J.M., Benson, M., Brown, G.R., Chao, C., Chitipiralla, S., Gu, B., Hart, J., Hoffman, D., Jang, W., et al. (2018). ClinVar: Improving Access to Variant Interpretations and Supporting Evidence. *Nucleic Acids Research*, *46*, D1062-D1067.
- Lanzi, C., Cassinelli, G., Nicolini, V., & Zunino, F. (2009). Targeting RET for thyroid cancer therapy. *Journal of Internal Medicine*, *266*, 99–113.
- Le Hir, H., Charlet-Berguerand, N., Gimenez-Roqueplo, A. P., Mannelli, M., Plouin, P. F., de Franciscis, V., & Therme, C. (2000). Relative expression of the RET9 and RET51 isoforms in human pheochromocytomas. *Oncology*, *58*, 311–318.
- Leboulleux, S., Baudin, E., Travagli, J. P., & Schlumberger, M. (2004). Medullary thyroid carcinoma. *Clinical Endocrinology*, *61*, 299–310.
- Leclère, J., Orgiazzi, J., Roussi, B., Schlienger, J. L., & Wemeau, J. L. (n.d.). La thyroïde: Des concepts à la...
- Lenders JWM, Eisenhofer G, Mannelli M, Pacak K (2005). Pheochromocytoma. *Lancet*, *366*, 665-675.
- Lenders, J.W., Pacak, K., Walther, M.M., et al. (2002). Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: which test is best. *JAMA*, *287*(11), 1427-1434.
- Lindahl, M., Poteryaev, D., Yu, L., Arumã'e, U., Timmusk, T., Bongarzone, I., et al. (2001). Human glial cell line-derived neurotrophic factor receptor alpha 4 is the receptor for persephin and is predominantly expressed in normal and malignant thyroid medullary cells. *J Biol Chem*, *276*, 9344–9351.
- Lindskog, S., Nilsson, O., Jansson, S., et al. (2004). Phenotypic expression of a family with multiple endocrine neoplasia type 2A due to a RET mutation at codon 618. *Br J Surg*, *91*(6), 713-718.
- Lissak, B., Baudin, E., Cohen, R., et al. (1998). Pentagastrin testing in patients with renal insufficiency: Normal responsivity of mature calcitonin. *Thyroid*, *8*, 265–268.
- Lorenzo, M. J., et al. (1997). RET alternate splicing influences the interaction of activated RET with the SH2 and PTB domains of Shc, and the SH2 domain of Grb2. *Oncogene*, *14*, 763–771.
- Machens A, Brauckhoff M, Holzhausen H et al (2005). Codon-specific involvement of pheochromocytoma in multiple endocrine neoplasia type 2. *J Clin Endocrinol Metab*, *90*, 3999-4003.

REFERENCES ET BIBLIOGRAPHIQUES

Machens, A., & Dralle, H. (2008). Familial prevalence and age of RET germline mutations: implications for screening. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 69(1), 81-87.

Machens, A., & Dralle, H. (2010). Biomarker-based risk stratification for previously untreated medullary thyroid cancer. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(6), 2655–2663.

Machens, A., & Dralle, H. (2019). Biomarker-based risk stratification for previously untreated medullary thyroid cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 104(11), 4683–4695.

Machens, A., et al. (2003). Early malignant progression of hereditary medullary thyroid cancer. *N. Engl. J. Med.*, 349, 1517–1525.

Machens, A., Hinze, R., Thomusch, O., & Dralle, H. (2002). Pattern of nodal metastasis for primary and reoperative thyroid cancer. *World J Surg*, 28(1), 22-28.

Machens, A., Lorenz, K., Sekulla, C., et al. (2013). Molecular epidemiology of multiple endocrine neoplasia 2: Implications for RET screening in the new millennium. *Eur J Endocrinol*, 168(2), 307-314.

Machens, A., Niccoli-Sire, P., Hoegel, J., Frank-Raue, K., van Vroonhoven, T.J., Roehrer, H.-D., et al. (2003). Early malignant progression of hereditary medullary thyroid cancer. *New England Journal of Medicine*, 349(16), 1517-1525.

Machens, A., Ukkat, J., Hauptmann, S., & Dralle, H. (2007). Abnormal carcinoembryonic antigen levels and medullary thyroid cancer progression: A multivariate analysis. *Archives of Surgery*, 142, 289–293.

Maciel, R.M.B., Maia, A.L. (2021). Global Endocrinology: Geographical variation in the profile of RET variants in patients with medullary thyroid cancer: A comprehensive review. *European Journal of Endocrinology*, 186, R15–R30.

Marsh, D.J., Learoyd, D.L., Andrew, S.D., Krishnan, L., Pojer, R., Richardson, A.L., Delbridge, L., Eng, C., & Robinson, B.G. (1996). Somatic mutations in the RET proto-oncogene in sporadic Medullary thyroid carcinoma. *Clinical Endocrinology*, 44(3), 249-257.

Mathew, C. G. P., Chin, K. S., Easton, D. F., et al. (1987). Un marqueur génétique lié pour la néoplasie endocrinienne multiple de type 2A sur le chromosome 10. *Science*, 328, 527-528.

Mathew, C. G., Chin, K. S., Easton, D. F., Thorpe, K., Carter, C., Liou, G. I., et al. (1987). A linked genetic marker for multiple endocrine neoplasia type 2A on chromosome 10. *Nature*, 328, 527–528.

REFERENCES ET BIBLIOGRAPHIQUES

- McDonnell, J. E., Gild, M. L., Clifton-Bligh, R. J., & Robinson, B. G. (2019). Multiple endocrine neoplasia: An update. *Internal Medicine Journal*, 49(8), 954–961.
- Medina-Franco, H., Herrera, M. F., Lopez, G., et al. (2001). Persistent hypercalcitoninemia in patients with medullary thyroid cancer: a therapeutic approach based on selective venous sampling for calcitonin. *Rev Invest Clin*, 53(3), 212-217.
- Melillo, R. M., et al. (2001). Docking protein FRS2 links the protein tyrosine kinase RET and its oncogenic forms with the mitogen-activated protein kinase signaling cascade. *Mol. Cell. Biol.*, 21.
- Menko, F. H., van der Luijt, R. B., de Valk, I. A., Toorians, A. W., Sepers, J. M., van Diest, P. J., & Lips, C. J. (2002). Atypical MEN type 2B associated with two germline RET mutations on the same allele Not involving codon 918. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(1), 393-397.
- Mian, C., Pennelli, G., Barollo, S., et al. (2011). Combined RET and Ki-67 assessment in sporadic medullary thyroid carcinoma: a useful tool for patient risk stratification. *Eur J Endocrinol*, 164(6), 971-976.
- Mildbrandt, J., de Sauvage, F. J., Fahmer, T. J., Baloh, R. H., Leitner, M. L., Tansey, M. G., et al. (1998). Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin. *Neuron*, 20, 245–253.
- Miller S.A., (1988). a simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 16, 1215.
- Milos, I. N., Frank-Raue, K., Wohllk, N., et al. (2008). Age-related neoplastic risk profiles and penetrance estimations in multiple endocrine neoplasia type 2A caused by germ line RET Cys634Trp (TGC>TGG) mutation. *Endocr Relat Cancer*, 15(4), 1035-1041.
- Miyauchi, A., Futami, H., Hai, N., et al. (1999). Two germline missense mutations at codons 804 and 806 of the RET proto-oncogene in the same allele in a patient with multiple endocrine neoplasia type 2B without codon 918 Mutation. *Jpn J Cancer Res*, 90, 1-5.
- Modigliani, E., Cohen, R., Joannidis, S., et al. (1992). Results of long-term continuous subcutaneous octreotide administration of 14 patients with medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 36(2), 183-186.
- Moley, J. F. (2010). Medullary thyroid carcinoma: Management of lymph node metastases. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 8(5), 549–556.

REFERENCES ET BIBLIOGRAPHIQUES

Moley, J. F., DeBenedetti, M. K. (1999). Patterns of nodal metastases in palpable medullary thyroid carcinoma: Recommendations for extent of node dissection. *Ann Surg*, 229(6), 880-887.

Motte, P., Vauzelle, P., Gardet, P., et al. (1988). Construction and clinical validation of a sensitive and specific assay for serum mature calcitonin using monoclonal anti-peptide antibodies. *Clinical Chimica Acta*, 174, 35–54.

Moura, M. M., Cavaco, B. M., Pinto, A. E., Domingues, R., Santos, J. R., Cid, M. O., & Bugalho, M. J. (2009). Correlation of RET somatic mutations with clinicopathological features in sporadic medullary thyroid carcinomas. *British Journal of Cancer*, 100, 1777–1783.

Moura, M.M., Cavaco, B.M., Pinto, A.E., & Leite, V. (2011). High prevalence of RAS mutations in RET-negative sporadic medullary thyroid carcinomas. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96, E863-E868.

Moura, M.M., Cavaco, B.M., Pinto, A.E., Domingues, R., Santos, J.R., Cid, M.O., Bugalho, M.J., & Leite, V. (2009). Correlation of RET somatic mutations with clinicopathological features in sporadic medullary thyroid carcinomas. *British Journal of Cancer*, 100(11), 1777.

Mucha, L., Leidig-Bruckner, G., Frank-Raue, K., Bruckner, T., Kroiss, M., & Raue, F., German Study Group for Rare Thyroid Cancer. (2017). Pheochromocytoma in multiple endocrine neoplasia type 2: RET codon-specific penetrance and changes in management during the last four decades. *Clin Endocrinol*, 87(3), 320-326.

Muller, M. (2003, avril). Cancer de la thyroïde. 6ème congrès européen d'endocrinologie. Lyon. *Annales d'Endocrinologie*, 64(6), 484-485.

Mulligan, L. M., Kwok, J. B., Healey, C. S., Elsdon, M. J., Eng, C., Gardner, E., et al. (1993). Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature*, 363, 458–460.

Mulligan, L.M. (2014). RET revisited: Expanding the oncogenic portfolio. *Nature Reviews Cancer*, 14, 173–186.

Mulligan, L.M., Eng, C., Healey, C.S., Clayton, D., Kwok, J.B., Gardner, E., Ponder, M.A., Frilling, A., Jackson, C.E., Lehnert, H., et al. (1994). Specific mutations of the RET proto-oncogene are Related to disease phenotype in MEN 2A and FMTC. *Nature Genetics*, 6, 70–74.

Mulligan, L.M., Kwok, J.B., Healey, C.S., Elsdon, M.J., Eng, C., Gardner, E., Love, D.R., Mole, S.E., Moore, J.K., Papi, L., et al. (1993). Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature*, 363, 458–460.

REFERENCES ET BIBLIOGRAPHIQUES

- Murakami, H., et al. (1999). Enhanced phosphatidylinositol 3-kinase activity and high phosphorylation state of its downstream signaling molecules mediated by RET with the MEN 2B mutation. *Biochem Biophys Res Commun*, 262, 68–75.
- Myers, S. M., Eng, C., Ponder, B. A., & Mulligan, L. M. (1995). Characterization of RET proto-oncogene splicing variants and polyadenylation sites: A novel C-terminus for RET. *Oncogene*, 11, 2039–2045.
- Nehar, D., Lombard-Bohas, C., Olivieri, S., et al. (2004). Intérêt de la chromogranine A pour le diagnostic et le suivi des tumeurs endocriniennes. *Clinical Endocrinology*, 60, 644–652.
- Neocleous, V., Passalaris, T., Spanou, E., Kitsios, P., Skordis, N., & Deltas, C. C. (2004). Description of the first two seemingly unrelated Greek Cypriot families with a common C618R RET proto-oncogene mutation. *Genet Test*, 8(2), 163-168.
- Niccoli, P., Brunet, P., Roubicek, C., et al. (1995). Abnormal basal calcitonin level and pentagastrin response in patients with chronic renal failure on maintenance hemodialysis. *European Journal of Endocrinology*, 132, 75–81.
- Niccoli, P., Conte-Devolx, B., Lejeune, P. J., et al. (1996). Les hypercalcitoninémies en dehors des cancers médullaires de la thyroïde. *Annales d'Endocrinologie*, 57, 15–21.
- Niccoli, P., Conte-Devolx, B., Lejeune, P. J., et al. (1996). Les hypercalcitoninémies en dehors des cancers médullaires de la thyroïde. *Ann Endocrinol (Paris)*, 57, 15–21.
- Niccoli, P., Wion-Barbot, N., Caron, P., et al. (1997). Interest of routine measurement of serum calcitonin (CT): study in a large series of thyroidectomized patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 82, 338–341.
- Niccoli-Sire, P., & Conte-Devolx, B. (2007). Multiple endocrine neoplasia type 2. *Ann Endocrinol Paris*, 68, 317–324.
- Niccoli-Sire, P., & Conte-Devolx, B. (2007). Néoplasies endocriniennes multiples de type 2. *Encyclopédie Orphanet*. Octobre 2007.
- Niccoli-Sire, P., Conte-Devolx, B., & le Groupe d'étude des Tumeurs Endocrines (GTE). (2005). Mutations de RET et traitement préventif du cancer médullaire de la thyroïde. *Ann Endocrinol*, 66(3), 168-175.
- Nocera, M., Baudin, E., Pellegritti, G., et al. (2000). Treatment of advanced medullary thyroid cancer with an alternating combination of doxorubicin-streptozotocin and 5 FU-dacarbazine. *Br J Cancer*, 83(6), 715-718.

REFERENCES ET BIBLIOGRAPHIQUES

- Norum, R. A., Lafreniere, R. H., O'Neal, L. W., Nikolati, F., Delaney, J. P., Sisson, J. C., et al. (1990). Linkage of the Multiple Endocrine Neoplasia Type 2B Gene (MEN2E) to Chromosome 10 Markers Linked to MENi3A. *Genomics*, 8, 313–317.
- Orlandi, F., Caraci, P., Berruti, A., et al. (1994). Chemotherapy with dacarbazine and 5-Fluorouracil in advanced Medullary thyroid cancer. *Ann Oncol*, 5(8), 763-765.
- Ozgen, A. G., Hamulu, F., Bayraktar, F., et al. (1999). Evaluation of routine basal serum calcitonin measurement for early diagnosis of medullary thyroid carcinoma in seven hundred seventy-three patients with nodular goiter. *Thyroid*, 9, 579–582.
- Pacak, K., Ilias, I., Adams, K. T., & Eisenhofer, G. (2005). Diagnostic biochimique, localisation et prise en charge du phéochromocytome : focus sur les néoplasies endocriniennes multiples de type 2 en relation avec d'autres syndromes héréditaires et formes sporadiques de la tumeur. *J Int Med*, 257, 60–68.
- Pacini F, Castagna M G, Cipri C, et al. (2010). Medullary Thyroid Carcinoma. *Clinical Oncology*, 22, 475-485.
- Pacini, F., Schlumberger, M., Dralle, H., et al. (2006). European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Eur J Endocrinol*, 154(6), 787–803.
- Patricia Niccoli-Sire, P., Murat, A., Conte-Devolx, B., Groupe d'études des tumeurs à calcitonine (GETC) (2001). Formes familiales isolées de cancer médullaire de la thyroïde (FMTC): nouvelles corrélations phénotype-génotype. *Médecine Thérapeutique Endocrinologie & Reproduction*, 3(4), 314-21.
- Peix, J. L. (2000). Cancer médullaire familial: Doit-on moduler le geste chirurgical en fonction du génotype. XIIIème congrès de la SFE Brest. *Annales d'Endocrinologie*, 61(5).
- Pelet, A., Geneste, O., Edery, P., et al. (1998). Various mechanisms cause RET-mediated signaling defects in Hirschsprung disease. *J Clin Invest*, 101, 1415-1423.
- Pelizzo, M. R., Boschin, I. M., Bernante, P., Toniato, A., Piotto, A., Pagetta, C., et al. (2007). Natural history, diagnosis, treatment and outcome of Medullary thyroid cancer: 37 years experience on 157 patients. *Eur J Surg Oncol*, 33(4), 493-497.
- Pelizzo, M. R., Mazza, E. I., Mian, C., & Boschin, I. M. (2023). Medullary thyroid carcinoma. *Aging*, 943–957. <https://doi.org/10.1038/tpj.2012.43>
- Pellegritti, G., Leboulleux, M., Baudin, E., et al. (2003). Long-term outcome of medullary thyroid carcinoma in patients with normal postoperative medical imaging. *Br J Cancer*, 88(10), 1537-1542.

REFERENCES ET BIBLIOGRAPHIQUES

- Peppia, M., Boutati, E., Kamakari, S., et al. (2008). Multiple endocrine neoplasia type ZA in two families with the familial medullary thyroid carcinoma associated G5330 mutation of the RET proto-oncogene. *Eur J Endocrinol*, 159(6), 767-771.
- Pigny, P., Bauters, C., Wemeau, A., et al. (1999). A novel 9-base pair duplication in RET exon 8 and in familial medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 84(5), 1700-1704.
- Ponder, B. A. (1999). The phenotypes associated with RET mutations in the multiple endocrine neoplasia type 2 syndrome. *Cancer Res*, 59, 1736-1741.
- Prazeres, H. J., Rodrigues, F., Figueiredo, P., et al. (2006). Occurrence of the Cys611Tyr mutation and a novel Arg886Trp substitution in the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2 families and sporadic medullary thyroid carcinoma cases originating from the central region of Portugal. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 64(6), 659-666.
- Prêteurs, J. W. M., Eisenhofer, G., Mannelli, M., et al. (2005). Phéochromocytome. *Lancette*, 366, 665-675.
- Prêteurs, J. W., Pacak, K., Walther, M. M., et al. (2002). Diagnostic biochimique du phéochromocytome : quel test est le meilleur. *JAMA*, 287, 1427-1434.
- Punales, M. K., Graf, H., Gross, J. L., & Maia, A. L. (2003). RET codon 634 mutations in multiple endocrine neoplasia type 2: Variable clinical features and clinical outcome. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(6), 2644-2649.
- Putzer, B. M., & Drost, M. (2004). The RET proto-oncogene: A potential target for molecular cancer therapy. *Trends in Molecular Medicine*, 10(7).
- Quayle, F. J., & Moley, J. F. (2005). Medullary thyroid carcinoma including MEN 2A and MEN 2B syndromes. *J Surg Oncol*, 89(2), 122-129.
- Quayle, F. J., Fialkowski, E. A., Benveniste, R., & Moley, J. F. (2007). Pheochromocytoma penetrance varies by RET mutation in MEN 2A. *Surgery*, 142(6), 800-805.
- Raue, F., Bruckner, T., Frank-Raue, K. (2019). Long-Term Outcomes and Aggressiveness of Hereditary Medullary Thyroid Carcinoma: 40 Years of Experience at One Center. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 104, 4264-4272.
- Raue, F., et Frank-Raue, K. (2015). "Multiple endocrine neoplasia type 2: 2015 update." *Endocrine-Related Cancer*, 22(4), T123-T133.
- Raue, F., Frank-Raue, K. (2010). Update multiple endocrine neoplasia type 2. *Familial Cancer*, 9(3), 449-457.

REFERENCES ET BIBLIOGRAPHIQUES

- Rey, J. M., Brouillet, J. P., Fonteneau-Allaire, J., et al. (2001). Novel germline RET mutation segregating with papillary thyroid carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 32(4), 390-391.
- Robledo, M., Gil, L., Pollán, M., Cebrián, A., Ruíz, S., Azañedo, M., Benitez, J., Menárguez, J., & Rojas, J.M. (2003). Polymorphisms G691S/S904S of RET as genetic modifiers of MEN 2A. *Cancer Research*, 63, 1814-1817.
- Roman S, Lin R , Sosa J A (2006). Prognosis of medullary thyroid carcinoma: demographic, clinical, and pathological predictors of survival in 1252 cases. *Cancer*, 107, 2134–2142.
- Romei, C., Casella, F., Tacito, A., et al. (2016). New insights in the molecular signature of Advanced medullary thyroid cancer: evidence of a bad outcome of cases with Double RET mutations. *J Med Genet*, 53(11), 729-734.
- Romei, C., Mariotti, S., Fugazzola, L., et al. (2010). Multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes (MEN 2): Results from the ItaMEN network analysis on the prevalence of different genotypes and phenotypes. *Eur J Endocrinol*, 163(2), 301-308.
- Romei, C., Tacito, A., Molinaro, E., et al. (2015). Twenty years of lesson learning: How does the RET genetic screening test impact the clinical management of medullary thyroid cancer? *Clin Endocrinol*, 82(6), 892-899.
- Ruiz, A., Antinolo, G., Fernandez, R.M., et al. (2001). Germline sequence variant 58365 in the RET proto-oncogene is associated with low level predisposition to sporadic medullary thyroid carcinoma in the Spanish population. *Clinical Endocrinology*, 55, 399-402.
- Saad MF, Ordonez NG, Rashid RK, Guido JJ, Hill Jr CS, Hickey RC et al (1984). Medullary carcinoma of the thyroid: a study of the clinical features and prognostic factors in 161 patients. *Medicine*, 65, 319–42.
- Santoro, M., & lui, R. M., Carlomagno, F., et al. (1998, juin). Biologie moléculaire des hommes 2 gènes. *Journal of Internal Medicine*, 243(6), 505-508.
- Saravana-Bawan, B., & Pasternak, J. D. (2022). Multiple endocrine neoplasia 2: An overview. *Ther Adv Chronic Dis*, 13(20406223221079246).
- Scheuba, C., Kaserer, K., Moritz, A., et al. (2009). Hypercalcitoninémie sporadique: Conséquences cliniques et thérapeutiques. *Endocrine-Related Cancer*, 16, 243-253.
- Schilling, T., Bürck, J., Sinn, H. P., et al. (2001). Prognostic value of codon 918 (ATG→ACG) RET proto-oncogene mutations in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Int J Cancer*, 95(1), 62-66.

REFERENCES ET BIBLIOGRAPHIQUES

Schimke, R. N., & Hartmann, W. H. (1965). Familial amyloid-producing medullary thyroid carcinoma and pheochromocytoma: A distinct genetic entity. *Ann Intern Med*, 63, 1027–1039.

Schuffenecker, I., Virally-Monod, M., Brohet, R., et al. (1998). Risk and penetrance of primary hyperparathyroidism in multiple endocrine neoplasia type 2A families with mutations at codon 634 of the RET proto-oncogene. *J Clin Endocrinol Metab*, 83(2), 487-491.

Schuringa, J. J., Wojtachnio, K., Hagens, W., Vellenga, E., Buys, C. H., Hofstra, R., et al. (2001). MEN2A-RET-induced cellular transformation by activation of STAT3. *Oncogene*, 20, 5350–5358.

Schuringa, J. J., Wojtachnio, K., Hagens, W., Vellenga, E., Buys, C. H. C. M., Hofstra, R., et al. (2001). MEN2A-RET-induced cellular transformation by activation of STAT3. *Oncogene*, 20(38), 5350-5358.

Scollo, C., Baudin, E., Travagli, J. P., et al. (2003). Rationale for central and bilateral lymph node dissection in sporadic and hereditary medullary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(5), 2070-2075.

Scott, R. P., Eketjall, S., Aineskog, H., & Ibanez, C. F. (2005). Distinct turnover of alternatively-spliced isoforms of the RET kinase receptor mediated by differential recruitment of the Cbl ubiquitin ligase. *J Biol Chem*, 280, 13442–13449.

Segouffin-Cariou, C., Billaud, M. (2000). Transforming ability of MEN2A-RET requires activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 275(5), 3568-3576

Sifi, K. Dépistage génétique du cancer médullaire de lathyroïde : diagnostic prédictif en vue d'un traitement préventif. Faculté de médecine UC3, thèse de DESM, 2012.

Simpson, N. E., Kidd, K. K., Goodfellow, P. J., McDermid, H., Myers, S., Kidd, J. R., et al. (1987). Assignment of multiple endocrine neoplasia type 2A to chromosome 10 by linkage. *Nature*, 328, 528–530.

Smith, D.P., Houghton, C., & Ponder, B.A. (1997). Germline mutation of RET codon 883 in two cases of de novo MEN 2B. *Oncogene*, 15, 1213–1217.

Stehelin, D., Varmus, H. E., Bishop, J. M., & Vogt, P. K. (1976). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma virus is present in normal avian DNA. *Nature*, 260, 170–173.

Stein, R., Chen, S., Reed, L., et al. (2002). Combining radioimmunotherapy and chemotherapy for treatment of Medullary thyroid carcinoma. *Cancer*, 94(1), 51-61.

REFERENCES ET BIBLIOGRAPHIQUES

- Stenson, P.D., Ball, E.V., Mort, M., Phillips, A.D., Shiel, J.A., Thomas, N.S.T., Abeyasinghe, S., Krawczak, M., & Cooper, D.N. (2003). Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 Update. *Human Mutation*, 21, 577-581.
- Subbiah, V., Gainor, J. F., Rahal, R., et al. (2018). Precision targeted therapy with BLU-667 for RET-driven cancers. *Cancer discovery*, 8(7), 836-849.
- Subbiah, V., Velcheti, V., Tuch, B. B., et al. (2018). Selective RET kinase inhibition for patients with RET-altered cancers. *Annals of Oncology*, 29(8), 1869-1876.
- Takahashi, M., & Cooper, G. M. (1987). ret transforming gene encodes a fusion protein homologous to tyrosine kinases. *Mol Cell Biol*, 7, 1378-1385.
- Takahashi, M., Ritz, J., & Cooper, J. M. (1985). Activation of a novel human transforming gene, RET, by DNA rearrangement. *Cell*, 42(2), 581-588.
- Tamagnini, P., Iacobone, M., Sebag, F., et al. (2005). Lymph node involvement in macroscopic medullary thyroid carcinoma. *Br J Surg*, 92(4), 449-453.
- Tansey, M. G., Baloh, R. H., Milbrandt, J., & Johnson Jr, E. M. (2000). GFR-mediated localization of RET to lipid rafts is required for effective downstream signaling, differentiation, and neuronal survival. *Neuron*, 25, 611-623.
- Tessitore, A., Sinisi, A. A., Pasquali, D., et al. (1999). A novel case of multiple endocrine Neoplasia type 2A associated with two de novo mutations of the RET protooncogene. *J Clin Endocrinol Metab*, 84(10), 3522-3527.
- Toh, F., Ishizaka, Y., Tahira, T., Yamamoto, M., Miya, A., Imai, K., et al. (1992). Identification and analysis of the ret proto-oncogene promoter region in neuroblastoma cell lines and medullary thyroid carcinomas from MEN2 A patients. *Oncogene*, 7, 1201-1206.
- Trimboli, P., Castellana, M., Virili, C., Giorgino, F., & Giovanella, L. (2018). Efficacy of Vandetanib in treating locally advanced or metastatic medullary thyroid carcinoma according to RECIST criteria: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in endocrinology*, 9(9), 219.
- Tsui-Pierchala, B. A., Ahrens, R. C., Crowder, R. J., Milbrandt, J. E., & Johnson Jr. (2002). The long and short isoforms of Ret function as independent signaling complexes. *J Biol Chem*, 277, 34618-34625.
- Uyttebroeck, A., Sciot, R., Matthijs, G., & Legius, E. (2005). Medullary thyroid carcinoma in a child with a new RET mutation and a RET polymorphism. *Genet Couns*, 16(1), 95-100.

REFERENCES ET BIBLIOGRAPHIQUES

Vargas-Leal, V. (2003). Expression and function of GDNF family ligands and their receptors by human immune cells. [Thèse, Université de Munich].

Vega, Q. C., Worby, C. A., Lechner, M. S., Dixon, J. E., & Dressler, G. R. (1996). Glial cell line-derived neurotrophic factor activates the receptor tyrosine kinase RET and promotes kidney morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, *93*, 10657–10662.

Verga, U., Fugazzola, L., Cambiaghi, S., et al. (2003). Frequent association between MEN 2A and cutaneous lichen amyloidosis. *Clin Endocrinol (Oxf)*, *59*(2), 156-161).

Vierhapper, H., Niederle, B., Biegimayer, C., Kaserer, K., & Baumgartner Parzer, S. (2005). Early diagnosis and curative therapy of medullary thyroid carcinoma by routine measurement of serum calcitonin in patients with thyroid disorders. *Thyroid*, *15*(11), 1267-1272.

Viola, D., & Elisei, R. (2019). Management of medullary thyroid cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am*, *48*, 285–301.

Vuong, H. G., Odate, T., Ngo, H. T., et al. (2018). Clinical significance of RET and RAS mutations in sporadic medullary thyroid cancer-a meta-analysis. *Endocr Relat Cancer*, *25*(6), 633-641.

Wagenmann, A. (1922). Multiple Neurome des Auges und der Zunge : Bericht über die zusammenkunft. *Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft*, 282–285.

Walter, M. A., Meier, C., Radimerski, T., Iten, F., Kränzlin, M., Müller-Brand, J., et al. (2010). Procalcitonin levels predict clinical course and progression-free survival in patients with medullary thyroid cancer. *Cancer*, *116*, 31–40.

Watanabe, T., et al. (2002). Characterization of gene expression induced by RET with MEN2A and MEN2B mutation. *Am. J. Pathol.*, *161*, 249–256.

Weise, M., Merke, D. P., Pacak, K., et al. (2002). Utilité des méthanéphrines libres plasmatiques pour détecter le phéochromocytome infantile. *J Clin Endocrinol Métab*, *87*, 1955–1960.

Wells Jr, S. A., Asa, S. L., Dralle, H., et al. (2015). Revised American Thyroid Association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma. *Thyroid*, *25*(6), 567–610.

Wells Jr, S. A., Robinson, B. G., Gagel, R. F., et al. (2012). Vandetanib in patients with locally advanced or metastatic medullary thyroid cancer: a randomized, double-blind phase III trial. *Journal of Clinical Oncology*, *30*(2), 134.

REFERENCES ET BIBLIOGRAPHIQUES

Wells, S. A., Asa, S. L., Dralle, H., et al. (2015). Revised American Thyroid Association Guidelines for the Management of Medullary Thyroid Carcinoma. *Thyroid*, 25(6), 567-610.

Wells, S.A., Jr., Asa, S.L., Dralle, H., Elisei, R., Evans, D.B., Gagel, R.F., Lee, N., Machens, A., Moley, J.F., Pacini, F., et al. (2015). Revised American Thyroid Association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma. *Thyroid*, 25, 567–610.

Wiench, M., Wloch, J., Wygoda, Z., Gubala, et al. (2004). RET polymorphisms in codons 769 and 836 are not associated with predisposition to medullary thyroid carcinoma. *Cancer Detection and Prevention*, 28, 231-236.

Wiench, M., Wygoda, Z., Gubala, E., et al. (2001). Estimation of risk of inherited medullary thyroid carcinoma in apparent sporadic patients. *J Clin Oncol*, 19(5), 1374-1380.

Wion-Barbot, N., Schuffenecker, I., Niccoli, P., et al. (1997). Results of the calcitonin stimulation test in normal volunteers compared with genetically unaffected members of MEN 2A and familial medullary thyroid carcinoma families. *Ann Endocrinol (Paris)*, 58, 302–308.

Wohlk, G. N., Soto, C. E., Bravo, A. M., et al. (2005). G691S, L769L and S836S RET proto-oncogene polymorphisms are not associated with higher risk to sporadic medullary thyroid carcinoma in Chilean patients. *Rev Med Chil*, 133(4), 397-402.

Wohlk, N., Schweizer, H., Erlic, Z., Schmid, K. W., Walz, M. K., Raue, F., et al. (2010). Multiple endocrine neoplasia type 2. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 24(3), 371–387.

Worley, D. S., Pisano, J. M., Choi, E. D., Walus, L., Hession, C. A., Cate, R. L., et al. (2000). Developmental regulation of GDNF response and receptor expression in the enteric nervous system. *Development*, 127, 4383–4393.

Yeganeh, M.Z., Sheikholeslami, S., & Hedayati, M. (2015). RET proto-oncogene mutation detection and medullary thyroid carcinoma prevention. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(6), 2107-2117.

Yen, T. W., Shapiro, S. E., Gagel, R. F., et al. (2003). Medullary thyroid carcinoma: results of a standardized surgical approach in a contemporary series of 80 consecutive patients. *Surgery*, 134(6), 890-901.

Zedenius, J., Larsson, C., Bergholm, U., Bovee, J., Svensson, A., Hallengren, B., et al. (1995). Mutations of codon 918 in the RET proto-oncogene correlate to poor prognosis in sporadic medullary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 80(10), 3088-3090.

REFERENCES ET BIBLIOGRAPHIQUES

Zordan, P., Tavella, S., Brizzolara, A., et al. (2006). The immediate upstream sequence of the mouse *ret* gene controls tissue-specific expression in transgenic mice. *Int J Mol Med*, *18*, 601–608.

ANNEXES

Annexe I : Le questionnaire

Questionnaire CMTs/ NEM2

CAS INDEX

1-Etat civil :

Nom :

Prénom :.....

Sexe : M F

Nom de jeune

filles :.....

.....

Date et lieu de

naissance :.....

..

Situation familiale :

M

C

D

Nom et prénom du

conjoint :.....

Date et lieu de naissance du

conjoint :.....

Consanguinité familiale avec le conjoint :

oui

non

Nombre

d'enfants :.....

.....

Adresse et

tel :

.....

Noms et prénoms	Lien de parenté avec le cas index	Dates et lieux de naissance	Pathologies	Causes de décès

CMT

1- Circonstances de découverte :

Anapath TCT Goitre Métastase

PHEO HPT

Autres

2- Thyroïde :

Non palpable	<input type="checkbox"/>	Nodule	<input type="checkbox"/>	Goitre	<input type="checkbox"/>	Métastases	<input type="checkbox"/>
ADP cervicale	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>		
Signes de compression		Oui	<input type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>		

3-Echographie thyroïdienne :

.....

.....

.....

3- Bilan biologique

TCT de base	<input type="checkbox"/>	TCT pentagastrine	<input type="checkbox"/>	
ACE	<input type="checkbox"/>			
5-Métastases	Oui	<input type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>
Poumon	Foie	<input type="checkbox"/>	Os	<input type="checkbox"/>
ADP	<input type="checkbox"/>	Autres	

6- Anapath

Immunohistochimie

7 – Biomol.....

Phéochromocytome

PHEO	Oui	<input type="checkbox"/>	Nom	<input type="checkbox"/>
Si oui	Unilatéral	<input type="checkbox"/>	Bilatéral	<input type="checkbox"/>
HTA	Oui	<input type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>
Triade de Menart	Oui	<input type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>
VMA des 24 H		<input type="checkbox"/>		

Hyperparathyroïdie

Hperpara I	Oui	<input type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>	Adénome	<input type="checkbox"/>
Hyperplasie nodulaire		<input type="checkbox"/>	Autres	<input type="checkbox"/>		
Fractures fréquentes		<input type="checkbox"/>	Calcul rénal	<input type="checkbox"/>		
Calcémie		<input type="checkbox"/>	PTH	<input type="checkbox"/>		

Troubles digestifs

-Diarrhée motrice	Oui	<input type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>
-Constipation	Oui	<input type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>

-

Autres.....

.....

Bouffées vaso-motrices

Syndromes :

Syndrome de cushing

Enquête provoquée par un cancer médullaire

Enquête provoquée par un phéochromocytome

Enquête provoquée par une hyperparathyroïdie

Enquête provoquée par une ganglioneuromatose

Fortuite

Autre (en clair)

Microcarcinome de rencontre (anapath)

DIAGNOSTIC

NEM 2A :

NEM 2B :

FMTC :

CMT apparemment sporadique :

CMT sporadique vrai :

Indéterminé :

Dépistage génétique

Anomalies morphologiques

- Lésion prurigineuse scapulaire liquénoïde
- Névromes au niveau des lèvres, langue
- Aspect marfanoïde

Recherche de métastases

- Oui Non

Sujet à dépister

-Arbre généalogique :

-Dresser l'arbre généalogique et préciser pour tous les apparentés :

Non, prénom, date et lieu de naissance, pathologies, dates et causes de décès.

-L'enquête portera sur tous les apparentés de premier degré , parents, enfants et collatéraux.

3-Les sujets dépistés génétiquement et porteurs de la mutation familiale de

RET :

- CT
- Test à la pentagastrine
- Rechercher les autres atteintes de NEM2
- . Phéochromocytome

. HPT

. Autres

5-Indication de thyroïdectomie

6-Bilan d'extension :

TCT

ACE

Extension gg

Médiastino-pulmonaire

Hépatiques

Osseuses

Annexe II

Centre hospitalier universitaire BenBadis de Constantine
Laboratoire de biologie et génétique moléculaire
Laboratoire de biochimie

Identification du patient

Nom : Prénom :

Date de naissance

N du prélèvement :

Adresse :

Tel :

CONSENTEMENT

Je soussigné(e), sus nomm., reconnais avoir été informé(e) par le..... sur les examens des caractéristiques génétiques qui seront réalisées, dans un but diagnostic et/ou de recherche, à partir :

Du prélèvement qui m'a été effectué

A visée diagnostique

A visée de recherche

Pour :.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Je donne mon consentement pour ce prélèvement et je reconnais avoir reçu l'ensemble des informations, permettant la compr.hension de cet acte biologique et sa finalit..

Fait à....., le.....Signature

ATTESTATION

Je certifie avoir inform. le (ou la) patient(e) sus nommé(e) sur les caract.ristiques de la maladie recherchée, les moyens de la détecter, les possibilités de prévention et de traitement, et avoir recueilli le consentement du (ou de la) patient(e) ;

Signature et cachet

Un document de ce type doit accompagner la prescription – et les documents cliniques indispensables- pour chacune des analyses demand.es.

Le m.decain prescripteur doit conserver le consentement .crit, les doubles de la prescription et de l'attestation, et les comptes rendus d'analyses de biologie médicale commentés et signés.

Annexe 3

Préparation des réactifs

-Tampon de lyse (Tampon TE)

Tris Hcl 2M, PH 7.5=10ml

EDTA 0.25M ,PH 8.0=20ml

H₂O QSP 1000 ml

-Tampon Nacl EDTA (tampon NE)

NaCL 5M = 20ml

EDTA 0.25 M ;PH 8.0=100ml

H₂O=QSP 1000ml

EDTA 0.25M , PH 8.0

EDTA = 93.06g

NaOH = pour ajuster le PH 8.0

H₂O=QSP 1000ml

Protéinase K

Protéinase K =100ml

Tampon Tris-Hcl 2M-PH 7.5=50µl

H₂O=10ml

Tampon Tris-HCL 2M-PH 7.5

Tris= 242.2 g + acide chlorhydrique pur pour ajuster le PH à 7.5

H₂O =QSP 1000 ml

TBE 5 X:

Tris 54g

Acide borique 27.5g

EDTA 3.72g

Ajuster le PH 8.3 QSP 1000ml

Résumé

Le cancer médullaire de la thyroïde (CMT) est une tumeur neuroendocrine rare qui se développe à partir des cellules C parafolliculaires de la thyroïde, responsables de la sécrétion de la calcitonine (CT), un marqueur biologique utilisé pour le diagnostic et le suivi.

Le CMT représente 5 à 10 % des cancers thyroïdiens. Il se présente sous deux formes : sporadique vrai, la forme plus courante, et familiale dans environ 30 % des cas s'intégrant alors dans les néoplasies endocriniennes multiples de type 2 (NEM2), maladie héréditaire monogénique liée à des mutations germinales hétérozygotes du gène RET.

Le CMT est rare mais potentiellement mortel. Son dépistage moléculaire est devenu un outil incontournable et permet très précocement de distinguer les sujets à risque porteurs de la mutation de ceux qui sont non porteurs et qui peuvent être exclus de la surveillance.

Plusieurs haplotypes et SNPs sont associés au CMT sporadique et aux néoplasies endocriniennes multiples de type 2A (NEM2A), notamment les polymorphismes G691S et S904S. La présence de certains polymorphismes peut prédisposer à la forme sporadique et favoriser l'anticipation de la maladie dans les formes familiales. Pour ce les bjectifs de notre étude étaient de :

- Rechercher les polymorphismes G691S et S904S chez les patients ayant un CMT par PCR séquençage.

- Démontrer l'impact de ces polymorphismes sur le cancer médullaire de la thyroïde.

Notre étude a porté sur sur 48 patients des deux sexes dont 33 cas index de CMT et 15 apparentés du 1^a degré, adressés par les services d'endocrinologie du CHU de Constantine et a été réalisée au laboratoire de biologie et de génétique moléculaire de la faculté de médecine université Salah Boubnider Constantine3.

Plusieurs SNPs sont associés au CMT, avec l'haplotype G691S/S904S étant le plus étudié.

Nos résultats ont montré que dans les NEM2, l'haplotype G691S/S904S de RET est plus fréquent, suggérant un effet modificateur sur l'âge de début du CMT dans les NEM2A et les formes sporadiques du CMT.

Chez les apparentés des cas index mutés ayant présenté une mutation, ces polymorphismes sont identiques à ceux des cas index NEM2 mais à l'état homozygote, et ont développés la maladie beaucoup plus jeunes que leurs parents suggérant que l'haplotype G691S/S904S de RET influence l'âge de début du CMT héréditaire, et entraîne une anticipation de la maladie.

Cependant, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour vérifier ces hypothèses et mieux comprendre l'impact de chaque variante du proto-oncogène RET.

La découverte et la caractérisation fonctionnelle de ces altérations peuvent améliorer la prévention, la détection précoce et le traitement du CMT.

Mots clés : CMTs, NEM2, Polymorphismes SNP, Haplotype G691S/S904S, âge de début de la maladie.

Abstract

Medullary thyroid cancer (MTC) is a rare neuroendocrine tumor that develops from the parafollicular C cells of the thyroid gland, responsible for secreting calcitonin (CT), a biological marker used for diagnosis and monitoring. MTC accounts for 5 to 10% of thyroid cancers. It occurs in two forms: true sporadic, the more common form, and familial in about 30% of cases, fitting into multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN2), a monogenic hereditary disease linked to heterozygous germline mutations of the RET gene.

MTC is rare but potentially lethal. Molecular screening has become an essential tool, allowing for early identification of mutation carriers at risk compared to non-carriers, who can be excluded from surveillance. Several haplotypes and single nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with sporadic MTC and multiple endocrine neoplasia type 2A (MEN2A), notably the G691S and S904S polymorphisms. The presence of certain polymorphisms may predispose to the sporadic form and facilitate anticipation of the disease in familial cases.

The objectives of our study were to:

- Investigate the G691S and S904S polymorphisms in patients with MTC using PCR sequencing.
- Demonstrate the impact of these polymorphisms on medullary thyroid cancer

Our study included 48 patients of both sexes, comprising 33 index cases of MTC and 15 first-degree relatives, referred by the endocrinology services of Constantine University Hospital. It was conducted at the Laboratory of Molecular Biology and Genetics of the Faculty of Medicine, Salah Boubnider University, Constantine.

Several SNPs are associated with MTC, with the G691S/S904S haplotype of RET being the most studied. Our results showed that in MEN2, the G691S/S904S haplotype of RET is more frequent, suggesting a modifying effect on the age of onset of MTC in MEN2A and sporadic forms of MTC.

In relatives of mutated index cases who presented with a mutation, these polymorphisms are identical to those of MEN2 index cases but in a homozygous state, and they developed the disease much younger than their parents, suggesting that the G691S/S904S haplotype of RET influences the age of onset of hereditary MTC, leading to disease anticipation.

However, further research is needed to verify these hypotheses and better understand the impact of each variant of the RET proto-oncogene. The discovery and functional characterization of these alterations can improve the prevention, early detection, and treatment of MTC.

Keywords: MTCs, MEN2, SNP Polymorphisms, G691S/S904S Haplotype, age of disease onset.

ملخص

سرطان الغدة الدرقية النخاعي (MTC) هو ورم غدد صماء عصبي نادر يتطور من خلايا C المجاورة للجريب في الغدة الدرقية، المسؤولة عن إفراز الكالسيتونين (CT) ، وهو علامة بيولوجية تستخدم للتشخيص والمراقبة.

يمثل CMT ما بين 5 إلى 10% من حالات سرطان الغدة الدرقية. يظهر في شكلين: متقطع حقيقي، وهو الشكل الأكثر شيوعًا، وعائلي في حوالي 30% من الحالات، ثم يندمج في أورام الغدد الصماء المتعددة من النوع 2 (MEN2) ، وهو مرض وراثي أحادي المنشأ مرتبط بطفرات سلالة جراثومية متغايرة الزيجوت في الجين RET.

CMT نادر ولكنه قد يكون مميّزًا. لقد أصبح فحصها الجزيئي أداة أساسية ويجعل من الممكن في وقت مبكر جدًا التمييز بين الأشخاص المعرضين لخطر الإصابة بالطفرة وبين أولئك الذين لا يحملون الطفرة والذين يمكن استبعادهم من المراقبة.

ترتبط العديد من الأنماط الفردية و SNPs بـ MTC متفرقة وأورام الغدد الصماء المتعددة من النوع 2 (MEN2A) ، بما في ذلك تعدد الأشكال G691S و S904S. إن وجود بعض الأشكال المتعددة يمكن أن يؤدي للشكل المتقطع ويعزز توقع المرض في الأشكال العائلية. ولهذا كانت أهداف دراستنا هي:

-البحث عن تعدد الأشكال G691S و S904S في المرضى الذين يعانون من CMT عن طريق تسلسل PCR.

-توضيح تأثير هذه الأشكال المتعددة على سرطان الغدة الدرقية النخاعي.

ركزت دراستنا على 48 مريضا من كلا الجنسين، بما في ذلك 33 حالة مؤشرة لـ CMT و 15 من أقارب الدرجة الأولى، تمت إحالتهم من قبل خدمات الغدد الصماء بالمستشفى الجامعي قسنطينة وتم إجراؤها في مختبر الأحياء والوراثة الجزيئية بكلية الطب بجامعة قسنطينة صلاح بوبندر قسنطينة3.

ترتبط العديد من تعدد الأشكال (SNPs) بـ CMT ، مع كون النمط الفردي G691S/S904S هو الأكثر دراسة.

أظهرت نتائجنا أنه في MEN2 ، يكون النمط الفردي G691S/S904S لـ RET أكثر تكرارًا، مما يشير إلى وجود تأثير معدل على عمر ظهور CMT في MEN2A وأشكال متفرقة من CMT.

في أقارب حالات المؤشر المتحورة التي قدمت طفرة، تكون هذه الأشكال المتعددة مماثلة لتلك الموجودة في حالات مؤشر NEM2 ولكن في حالة تماثلة اللواقح، وتطور المرض في سن أصغر بكثير من آبائهم مما يشير إلى أن النمط الفردي G691S/S904S لـ RET يؤثر على عمر ظهور مرض CMT الوراثي، ويؤدي إلى توقع المرض.

ومع ذلك، هناك حاجة إلى مزيد من البحث للتحقق من هذه الفرضيات وفهم تأثير كل متغير من الجين الورمي البروتيني RET بشكل أفضل.

قد يؤدي اكتشاف هذه التغييرات وتوصيفها الوظيفي إلى تحسين الوقاية والكشف المبكر والعلاج لمرض MTC.

الكلمات المفتاحية : CMTs ، MEN2 ، تعدد الأشكال SNP ، النمط الفردي G691S/S904S ، عمر بداية المرض.

Année universitaire : 2023-2024

Présenté par : BOUSSIF Mohammed
BRIHMOUCH Nour El Imen
METLAS Nawel

Les polymorphismes du proto-oncogène RET dans le cancer médullaire de la thyroïde

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Génétique Moléculaire

Le cancer médullaire de la thyroïde (CMT) est une tumeur neuroendocrine rare qui se développe à partir des cellules C parafolliculaires de la thyroïde, responsables de la sécrétion de la calcitonine (CT), un marqueur biologique utilisé pour le diagnostic et le suivi.

Le CMT représente 5 à 10 % des cancers thyroïdiens. Il se présente sous deux formes : sporadique vrai, la forme plus courante, et familiale dans environ 30 % des cas s'intégrant alors dans les néoplasies endocriniennes multiples de type 2 (NEM2), maladie héréditaire monogénique liée à des mutations germinales hétérozygotes du gène RET.

Le CMT est rare mais potentiellement mortel. Son dépistage moléculaire est devenu un outil incontournable et permet très précocement de distinguer les sujets à risque porteurs de la mutation de ceux qui sont non porteurs et qui peuvent être exclus de la surveillance.

Plusieurs haplotypes et SNPs sont associés au CMT sporadique et aux néoplasies endocriniennes multiples de type 2A (NEM2A), notamment les polymorphismes G691S et S904S. La présence de certains polymorphismes peut prédisposer à la forme sporadique et favoriser l'anticipation de la maladie dans les formes familiales. Pour ce les objectifs de notre étude étaient de :

- Rechercher les polymorphismes G691S et S904S chez les patients ayant un CMT par PCR séquençage.
- Démontrer l'impact de ces polymorphismes sur le cancer médullaire de la thyroïde.

Notre étude a porté sur 48 patients des deux sexes dont 33 cas index de CMT et 15 apparentés du 1^{er} degré, adressés par les services d'endocrinologie du CHU de Constantine et a été réalisée au laboratoire de biologie et de génétique moléculaire de la faculté de médecine université Salah Boubnider Constantine³.

Plusieurs SNPs sont associés au CMT, avec l'haplotype G691S/S904S étant le plus étudié.

Nos résultats ont montré que dans les NEM2, l'haplotype G691S/S904S de RET est plus fréquent, suggérant un effet modificateur sur l'âge de début du CMT dans les NEM2A et les formes sporadiques du CMT.

Chez les apparentés des cas index mutés ayant présenté une mutation, ces polymorphismes sont identiques à ceux des cas index NEM2 mais à l'état homozygote, et ont développé la maladie beaucoup plus jeunes que leurs parents suggérant que l'haplotype G691S/S904S de RET influence l'âge de début du CMT héréditaire, et entraîne une anticipation de la maladie.

Cependant, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour vérifier ces hypothèses et mieux comprendre l'impact de chaque variante du proto-oncogène RET.

La découverte et la caractérisation fonctionnelle de ces altérations peuvent améliorer la prévention, la détection précoce et le traitement du CMT.

Mots-clés : CMT, Polymorphismes SNP, Haplotype G691S/S904S, âge de début de la maladie.

Laboratoire de recherche de biologie et génétique moléculaire Université Salah Boubnider Constantine³

Président du jury : SEDRATI Khadidja (MCA - UFMC 1).

Encadrante : SIFI Karima (PROF - USBC3).

Examineur : LATRECHE Fethi (MAA - UFMC 1).

