Apport de la biologie moléculaire en pathologie thyroïdienne

Paul Hofman[a,b,*]

Résumé

Le développement des analyses moléculaires laisse entrevoir des implications importantes pour une aide au diagnostic en pathologie thyroïdienne, en particulier à partir des produits cytoponction. Ces analyses moléculaires peuvent aussi potentiellement permettre de mieux apprécier le pronostic de certaines lésions thyroïdiennes. Enfin, ces analyses pourraient également se développer rapidement en oncologie thyroïdienne dans le cadre des thérapeutiques ciblées. Quatre types de mutation représentent la grande majorité des mutations somatiques actuellement connues, ayant le plus grand impact pour le diagnostic et le pronostic des carcinomes folliculaires et papillaires de la thyroïde : il s'agit des mutations ponctuelles de *BRAF* et de *RAS* et des réarrangements de *RET/PTC* et de *PAX8/PPAR*γ. Les mutations constitutionnelles de RET permettent de distinguer les formes familiales et les formes sporadiques des carcinomes médullaires de la thyroïde. D'autres altérations génétiques peuvent être recherchées, mais leur intérêt potentiel en pathologie thyroïdienne n'est pas encore certain à ce jour. Parmi ces altérations, celles concernant les microARN constituent probablement des biomarqueurs très prometteurs en pathologie thyroïdienne. Cette revue a pour but de faire le point sur les différents aspects de la biologie moléculaire ayant ou pouvant avoir un intérêt diagnostic et/ou pronostic en oncologie thyroïdienne.

Biologie moléculaire – *BRAF* – *RAS* – *RET/PTC* – *RET* – *PAX8/PPAR*γ – microARN – pronostic – diagnostic.

Summary

Summary: Usefulness of molecular biology in thyroid pathology

The development of molecular biology analyses in thyroid pathology is link to interesting new tools for diagnosis improvement, in particular for those performed from fine needle aspiration products. These molecular biology analyses can also potentially allow to better estimate the prognosis of certain thyroid tumours. Finally, these analyses may have new application in thyroid oncology for predicting the response to target therapy. Four types of mutation represent the main somatic mutations currently known which can have a diagnostic and a prognostic impact in vesicular and papillary thyroid carcinoma: *BRAF* and *RAS* mutations and *RET/PTC* and *PAX8/PPAR*γ rearrangements. Additionnally, RET mutations distinguish the familial and sporadic forms of medullary thyroid carcinoma. Other different genetic alterations can be search, but their potential interest in thyroid pathology have not been demonstrated to date. Among these latter alterations, those concerning the microRNA represent probably new promising biomarkers in thyroid oncology. The purpose of this review is to describe the different fields of molecular biology having a potential interest for the diagnosis and/or the prognosis in thyroid oncology.

Molecular biology – *BRAF* – *RAS* – *RET/PTC* – *RET* – *PAX8/PPAR* – microRNA – prognostic – diagnostic.

1. Introduction

L'incidence des cancers de la thyroïde est en constante augmentation [1]. Cette augmentation est due, au moins en partie, aux possibilités de dépistage des lésions thyroïdiennes par une imagerie de plus en plus précise et aux indications de plus en plus fréquentes des cytoponctions thyroïdiennes. Nos connaissances en oncogénétique thyroïdienne ont évolué très rapidement ces dernières années. Ainsi, les altérations génétiques et les différentes mutations observées en pathologie thyroïdienne sont nombreuses, variant selon le sous-type histologique *(tableau I)*. De nombreux travaux ont été réalisés afin de déterminer de nouveaux mécanismes physiopathologiques de l'oncogenèse thyroïdienne, notamment en utilisant de nouvelles approches méthodologiques [2, 3, 4]. Certaines de ces connaissances commencent à être transférées en pratique clinique, en particulier dans le but d'optimiser le diagnostic préopératoire des cancers thyroïdiens, et/ou de prévoir leur pronostic. Parmi les nouvelles analyses réalisées, nombreuses sont celles qui utilisent des techniques de biologie moléculaire (BM). En effet, même si dans certains cas l'immunohistochimie peut aider pour le diagnostic des lésions thyroïdiennes, cette dernière méthode présente de très nombreuses limites pour affirmer la bénignité ou la malignité d'une lésion thyroïdienne [5]. Ainsi, des méthodes complémentaires doivent être développées, dont celles utilisant les techniques de BM. Les résultats obtenus à partir de ces dernières techniques pourraient aussi conduire à orienter les indications de thérapeutique ciblée en oncologie thyroïdienne [6, 7, 8, 9]. Il est intéressant de souligner, que dans certains cancers, par exemple dans les carcinomes

a Laboratoire de pathologie clinique et expérimentale
Centre hospitalo-universitaire – Hôpital Pasteur
B. P. 69 – 06002 Nice cedex
b Tumorothèque/CRB – Hôpital Pasteur – Nice

* Correspondance
hofman.p@chu-nice.fr

article reçu le 16 août, accepté le 7 octobre 2010
© 2010 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

pulmonaires non à petites cellules, les mutations observées sont assez souvent exclusives. Ainsi, la présence d'une mutation sur le gène *KRAS* exclut dans l'extrême majorité des tumeurs la présence simultanée d'une mutation sur le gène du récepteur de l'*EGF*. En pathologie thyroïdienne, les mutations sont en fait très rarement exclusives et peuvent parfois se combiner. Par exemple une mutation sur le gène de *BRAF* peut s'associer à d'autres mutations (sur le gène *KRAS* ou *NRAS*) ou à des réarrangements (en particulier de *RET/PTC*) [10, 11].
Au cours de cette revue, nous aborderons successivement, après avoir brièvement exposé les principales techniques utilisées en pathologie moléculaire, les différentes altérations génétiques moléculaires observées dans les tumeurs épithéliales thyroïdiennes, puis l'impact clinique potentiel de ces marqueurs moléculaires pour améliorer le diagnostic et l'évaluation du pronostic de ces lésions.

2. Techniques de biologie moléculaire en pathologie thyroïdienne

Les deux principales techniques pour rechercher une mutation en pathologie thyroïdienne sont actuellement le séquençage direct et le pyroséquençage *(figures 1 et 2)*.

Tableau I – Principales altérations génétiques et mutations obervées en pathologie thyroïdienne.

Type histologique	Prévalence (%)
Carcinome folliculaire	
PAX8-PPARγ	35
RAS	45
PIK3CA	< 10
PTEN	< 10
Carcinome papillaire	
BRAF	45 – 60
RET/ PTC	20
RAS	10
TRK	< 5
Carcinome anaplasique	
TP53	70
B-caténine	50 – 70
RAS	50
BRAF	20
PTEN	>10
Carcinome peu différencié	
RAS	35
B-caténine	20
TP53	20 – 30
BRAF	20
AKT	15
Carcinome médullaire	
RET formes familiales	> 95
RET formes sporadiques	50

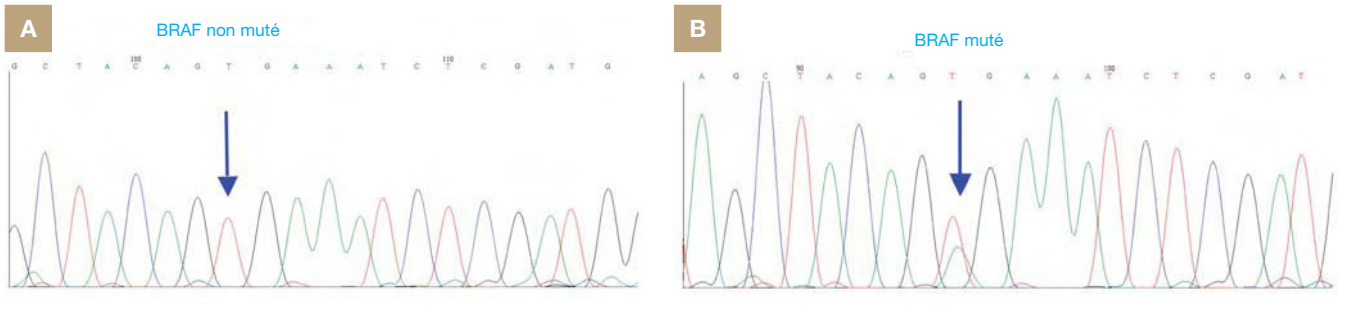
Le séquençage direct est la méthode « gold standard ». Cette méthode est en particulier largement utilisée pour la détection des mutations de *BRAF*, de *RAS*, et de *RET*. Le pyroséquençage est une méthode plus récente, mais les différentes mutations citées ci-dessus peuvent être aussi recherchées [12]. Certains réarrangements, comme les réarrangements de *PAX8/PPARγ* et de *RET/PTC*, sont à rechercher par une technique d'hybridation in situ en fluorescence. D'autres techniques de BM peuvent également être appliquées pour la recherche des mutations observée en pathologie thyroïdienne [13, 14]. Toutes ces méthodes d'analyse présentent des avantages et des inconvénients et comme dans les autres pathologies tumorales, ces différents avantages et inconvénients doivent être considérés. La spécificité et la sensibilité de ces méthodes d'analyse doivent être soigneusement évaluées et toujours prises en considération lors de l'interprétation des résultats. De façon générale, la phase pré-analytique, c'est-à-dire le conditionnement de l'échantillon, influe sur la qualité des résultats. Le type d'échantillon à analyser (en particulier produit de cytoponction ou prélèvement tissulaire) conduit à une quantité d'acide nucléique à extraire très variable. La sensibilité des méthodes d'analyse peut varier aussi selon d'autres paramètres, en particulier le type de fixateur utilisé, la durée de la fixation, le pourcentage de cellules tumorales et le pourcentage de cellules tumorales mutées [15]. Enfin, le coût de ces méthodes et la durée de l'examen avant d'obtenir le résultat sont très variables d'une technique à l'autre.

3. Les différentes altérations génétiques moléculaires en pathologie thyroïdienne

3.1. La mutation de *BRAF*

Les mutations activatrices sur le gène *BRAF* sont les altérations génétiques les plus communes des carcinomes papillaires de la thyroïde (CPT), trouvées dans environ 45 % de ces tumeurs selon les séries [16, 17, 18, 19]. Une grande majorité de ces mutations surviennent sur le nucléotide 1799 et résultent de la substitution d'une valine sur une glutamine sur le résidu 600 (V600E) *(figures 1 et 2)*. Cette mutation ponctuelle entraîne une activation constitutive de la kinase *BRAF*, une stimulation chronique de la voie MAP kinase, et apparaît tumorogénique pour les cellules thyroïdiennes [20]. D'autres mutations du gène *BRAF* sont plus exceptionnellement trouvées, en particulier dans certains CPT associés à des antécédents d'exposition à des radiations ionisantes ou dans des types histologiques rares. La mutation *BRAFV600* est essentiellement observée dans les CPT de type histologique « conventionnel ou classique » [21, 22] et dans la variante histologique à cellules hautes [23], bien plus rarement dans la variante folliculaire des CPT [24, 25]. Cette mutation peut parfois être observée dans les carcinomes anaplasiques et dans certains carcinomes peu différenciés se développant sur un CPT [19]. Finalement, cette mutation de *BRAF* n'est jamais retrouvée dans les carcinomes folliculaires et dans les tumeurs bénignes de la thyroïde, ce qui est en fait un marqueur spécifique des CPT [16, 19].

Figure 1 – Détection de la mutation *BRAFV600* par séquençage directe.



A. Carcinome papillaire de la thyroïde non muté. **B.** Carcinome papillaire de la thyroïde muté.

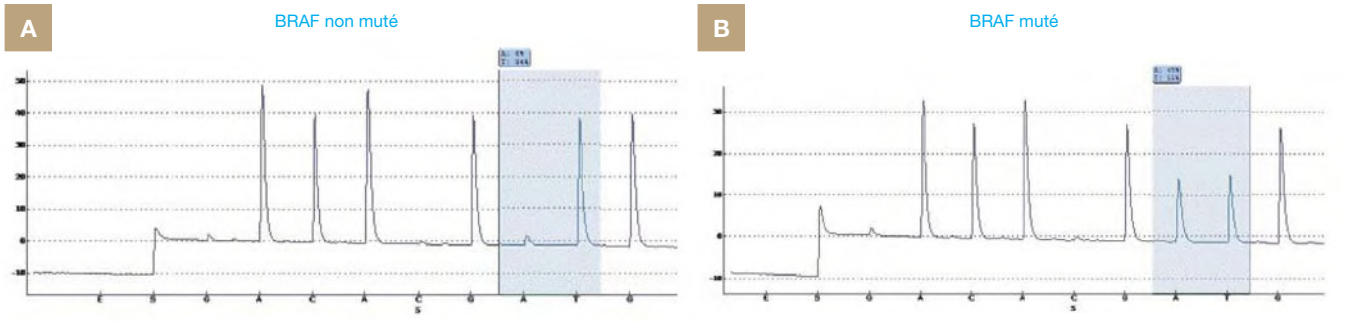
3.2. Le réarrangement de *RET/PTC*

Le réarrangement de *RET/PTC* est autre altération génétique également trouvée dans les CPT. Ce réarrangement est formé par la fusion entre la portion 3' du récepteur tyrosine kinase RET et la portion 5' de plusieurs autres gènes. Les deux réarrangements les plus communs, *RET/PTC1* et *RET/PTC3*, sont des inversions paracentriques, puisque RET et son partenaire de fusion, H4 ou NCOA4 (ELE1, RFG), résident sur le bras long du chromosome 10. *RET/PTC2* et neuf autres types identifiés de *RET/PTC* sont tous des translocations inter-chromosomiques. Toutes les fusions contiennent le domaine tyrosine kinase intact de RET et permettent à la protéine chimérique RET/PTC d'activer la cascade RAS-RAF-MAPK, initiant ainsi la tumorogenèse. Le réarrangement de *RET/PTC* est détecté dans environ 20 % des cas sporadiques de CPT de l'adulte [26]. Cependant sa prévalence est très variable selon les séries, ceci étant certainement dû aux différences de sensibilité dans les méthodes de détection, et à certaines variations géographiques. *RET/PTC* survient aussi avec une plus forte incidence en cas d'antécédent d'irradiation (50-80 %) et en cas de CPT survenant chez l'enfant et l'adulte jeune (40-70 %). Il est important de signaler que la distribution topographique du réarrangement de *RET/PTC* à l'intérieur de la même tumeur est très hétérogène allant d'une atteinte quasi complète de toutes les cellules tumorales («*RET/PTC* dit clonal») jusqu'à une détection observée dans seulement quelques cellules tumorales («*RET/PTC* dit non clonal»). Bien que *RET/PTC* soit aussi trouvé dans des études réalisées sur des adénomes et d'autres lésions bénignes de la thyroïde, il est admis qu'une distribution clonale de *RET/PTC* est quasi spécifique d'un CPT. Parmi les différents types de réarrangements, *RET/PTC1* est le plus fréquent, survenant dans 60-70 % des cas, alors que *RET/PTC3* et *RET/PTC2* surviennent respectivement dans 20-30 % et 5 % des cas. Une exception à cela concerne une étude réalisée sur une cohorte d'enfants irradiés ayant développé de façon prédominante la mutation *RET/PTC3* [27]. De façon globale, les CPT positifs pour *RET/PTC* surviennent préférentiellement chez des sujets plus jeunes, ont une architecture histologique papillaire classique et une tendance à être associés à des métastases ganglionnaires.

3.3. La mutation de *RAS*

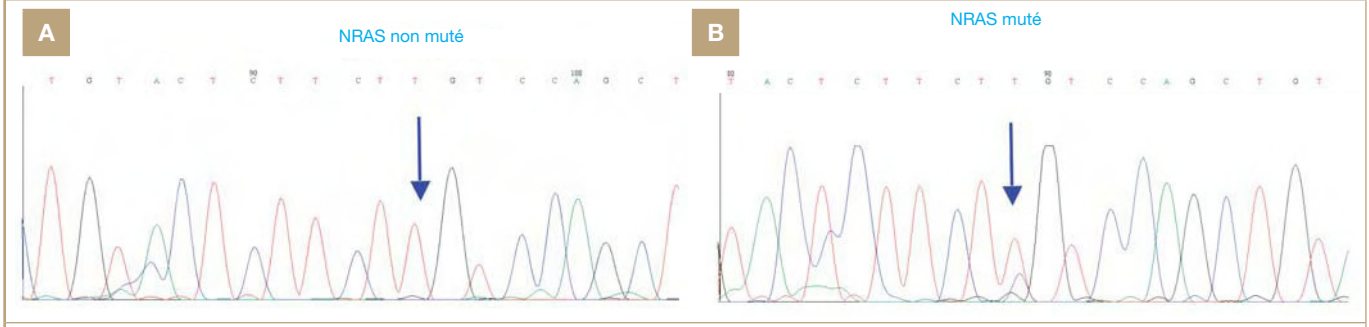
Les mutations ponctuelles du gène *RAS* ne sont pas spécifiques d'un type particulier de tumeur de la thyroïde et sont ainsi observées dans les CPT, les carcinomes et les adénomes folliculaires. Les mutations surviennent sur *HRAS, KRAS et NRAS* ***(figure 3).*** Dans sa forme inactivée, la protéine RAS est liée au guanosine diphosphate. Après activation, la protéine RAS se dissocie de la guanosine diphosphate et se lie ainsi au guanosine triphosphate (GTP), activant la voie MAPK et d'autres voies de signalisation, comme la voie PI3K/AKT. Les points de mutation dans le domaine spécifique du gène *RAS* augmentent l'affinité de la protéine RAS-GTP pour le GTP (mutation dans les codons 12 et 13) ou bien inactive sa fonction auto-catalyique GTPase (mutation dans le codon 61). La résultante de ces mutations est que la protéine mutée devient activée de façon permanente et stimule de façon chronique

Figure 2 – Détection de la mutation *BRAF V600* par pyroséquençage directe.



A. Carcinome papillaire de la thyroïde non muté. **B.** Carcinome papillaire de la thyroïde muté.

Figure 3 – Détection de la mutation de *NRAS* par séquençage directe.



A. Carcinome folliculaire de la thyroïde non muté. **B.** Carcinome folliculaire de la thyroïde muté.

les cibles situées en aval. En pathologie thyroïdienne, les mutations affectant le codon 61 de *NRAS* et *HRAS* sont les plus fréquentes. Dans les CPT, les mutations de *RAS* surviennent dans 10-20 % des tumeurs. Il est intéressant de constater que parmi les CPT présentant une mutation de *RAS*, il s'agit presque toujours de CPT à variante histologique folliculaire, encapsulés, et avec peu ou pas de métastases ganglionnaires. Finalement, les mutations de *RAS* sont trouvées dans 40-50 % des carcinomes folliculaires et dans 20-30 % des adénomes folliculaires.

3.4. Le réarrangement *PAX8/PPAR*γ

Le réarrangement de *PAX8/PPAR*γ résulte d'une translocation t(2 ;3)(q13 ;p25), entraînant la fusion entre le gène *PAX8* et le gène du récepteur PPARγ (« peroxisome proliferator-activated receptor ») [28]. Ce réarrangement conduit à une forte expression de la protéine *PPAR*γ, mais les mécanismes de cette transformation cellulaire consécutifs à cet événement génétique ne sont pas encore totalement élucidés. *PAX8/PPAR*γ est mis en évidence dans 30-40 % des formes histologiques « classiques » des carcinomes folliculaires, et avec une plus faible prévalence dans les carcinomes oncocytaires [19]. Les tumeurs présentant ce réarrangement ont tendance à se développer chez les sujets plus jeunes, d'être de plus petite taille, d'avoir une architecture solide et d'être angio-invasives. Plus rarement, ce réarrangement peut être observé dans les adénomes folliculaires (2-10 %) et dans des CPT de variante folliculaire [30]. Cependant, il a été décrit que les adénomes folliculaires possédant ce réarrangement avaient typiquement une capsule épaisse et montraient un profil immunohistochimique plus « en faveur » d'un carcinome, laissant ainsi suggérer pour certains auteurs que ces tumeurs représenteraient finalement des carcinomes folliculaires in situ ou pré-invasifs ou bien des tumeurs malignes pour lesquelles l'invasion avait été sous estimée lors de l'analyse histologique initiale [31].

3.5. Les mutations germinales et somatiques de RET et les carcinomes médullaires de la thyroïde

Les carcinomes médullaires de la thyroïde (CMT) sont des tumeurs rares. Ils sont plus agressifs que les carcinomes bien différenciés d'origine folliculaire, avec un taux de survie moyen de 50 % à 10 ans, responsables d'environ 13 % des décès liés aux carcinomes thyroïdiens [32]. Il n'y a pas eu d'amélioration de la survie des patients sur ces 30 dernières années [33], imposant la nécessité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'origine des CMT est la cellule C (ou cellule para-folliculaire). Ils peuvent sécréter de la calcitonine, ou d'autres hormones comme l'ACTH. On distingue les CMT sporadiques (75 % des cas environ) et les CMT familiaux (25 % des cas) héréditaires à transmission autosomique dominante. Parmi ces derniers, on distingue une forme de CMT familial isolée sans polyendocrinopathie et une forme associée à une néoplasie endocrinienne multiple (NEM) de type IIa ou IIb. Le diagnostic de formes familiales ou sporadiques des CMT passe par une détection des mutations germinales de *RET* effectuées sur un prélèvement sanguin [33, 34]. Les mutations somatiques de *RET* peuvent être recherchées sur de l'ADN extrait de tumeurs fixées ou bien congelées. Des mutations germinales spécifiques au niveau de la région codante du proto-oncogène *RET* ont été identifiées chez les patients atteints de NEM et dans les autres formes familiales de CMT. Il a été rapporté également des mutations somatiques du proto-oncogène *RET* dans les CMT sporadiques. Ces mutations somatiques ont été associées à un plus mauvais pronostic des CMT sporadiques dans plusieurs séries [26, 32, 33].

3.6. Les autres mutations

D'autres mutations peuvent être observées dans les cancers épithéliaux de la thyroïde, comme celles portant sur la voie PI3KCA/AKT, notamment dans les CPT de variante folliculaire, sur PTEN dans les cancers anaplasiques et les carcinomes folliculaires, TRK dans les CPT, la voie β caténine (CTNNB1) et la TP53 dans les carcinomes peu différenciées et les carcinomes anaplasiques [35, 36, 37]. L'impact actuel de la recherche de ces mutations en oncologie clinique thyroïdienne est limité.

3.7. Les microARN

De très courts segments d'ARN, appelés microARN, considérés pendant longtemps comme des produits de dégradation métabolique sans activité physiologique, font actuellement l'objet de nombreuses recherches et publications [38, 39, 40, 41]. Les microARN viennent en effet modifier totalement une conception d'un des dogmes fondamentaux de la biologie qui veut que les gènes soient exprimés par la voie ADN-ARN-protéines. Ces microARN permettent en effet de bloquer l'expression des ARN messagers et ainsi la synthèse protéique. Le premier microARN

(*Lin 4*) fut découvert en 1993 chez *C. elegans*. En 2000, un autre microARN, *let-7,* était découvert non seulement chez *C. elegans*, mais aussi chez des vertébrés. L'intérêt en pathologie humaine commença réellement en 2004. À ce jour, plus de 800 microARN ont été identifiés, mais l'on suppose qu'il en existerait plus de 1 000. Les mécanismes impliquant les microARN représentent certainement l'une des voies majeures dans le système de régulation des gènes, puisqu'on estime qu'ils réguleraient environ un tiers des gènes codant pour des protéines. Plusieurs microARN, incluant *mir-146b, mir-221, mir-222, mir-181b, mir-155 et mir-224*, sont surexprimés de façon très significative dans les CPT [42, 43]. De façon intéressante les niveaux de surexpression de certains de ces microARN peuvent être corrélés avec le profil mutationnel de certains CPT. Par exemple, *mir-187* est exprimé à un plus fort niveau dans les tumeurs possédant un réarrangement de RET/PTC, et les niveaux de *mir-221* et de *mir-222* sont d'autant plus élevés que les CPT sont mutés pour *BRAF* et *RAS* [42]. Expérimentalement, une diminution d'expression d'un microARN, *let-7*, peut induire la prolifération cellulaire de lignées de CPT. Plusieurs microARN sont également surexprimés dans les carcinomes folliculaires de la thyroïde [44].

4. Impact des marqueurs moléculaires en pathologie thyroïdienne pour la prise en charge des patients

La détection des différents marqueurs moléculaires décrits plus hauts peut se faire dans les produits cytologiques issus des ponctions thyroïdiennes à l'aiguille fine, ou bien à partir des pièces de résection chirurgicale [45]. Les résultats obtenus offrent des informations utiles et additionnelles pour le diagnostic, pour la prise en charge thérapeutique et pour le suivi des patients ayant un nodule thyroïdien [46, 47].

4.1. Intérêt des tests moléculaires développés à partir des cytoponctions thyroïdiennes à l'aiguille fine

L'analyse cytologique des ponctions à l'aiguille fine des nodules thyroïdiens est une approche quasi incontournable pour définir le diagnostic de ces lésions et pour adopter une stratégie thérapeutique. Alors qu'une majorité de ces lésions s'avèrent être cytologiquement bénignes, une faible proportion correspond à des lésions malignes (en particulier en cas de CPT ou de CMT). Toutefois, pour 10-40 % des nodules ponctionnés, le cytologiste ne peut pas affirmer avec certitude le diagnostic de bénignité ou de malignité, ce qui conduit à faire un diagnostic de lésions de nature « indéterminée ». Cette dernière catégorie englobe en fait plusieurs sous-types de lésions thyroïdiennes : les lésions folliculaires de signification indéterminée, les néoplasies folliculaires et les néoplasies à cellules de Hurthle, et les lésions suspectes de malignité, corrélées respectivement avec un risque estimée pour la malignité de 5-10 %, 20-30 % et 50-75 % [48]. Compte tenu de l'absence de diagnostic de certitude, la grande majorité de ces patients sera donc opérée, mais seulement 8-17 % des nodules correspondant se révéleront en fait comme étant des tumeurs malignes.

Un nombre croissant de publications montre que les différentes analyses moléculaires pratiquées à partir de produits de cytoponction thyroïdienne augmentent de façon significative la spécificité du diagnostic des nodules thyroïdiens ainsi ponctionnés [49, 50]. Parmi ces publications, une grande majorité explore le rôle diagnostic de la présence d'une mutation *BRAF* [51, 52, 53, 54]. Toutes les études réalisées montrent que parmi les cytoponctions qui étaient *BRAF* positives, les tumeurs enlevées chirurgicalement étaient des CPT. Il faut souligner qu'un grand nombre des analyses moléculaires, réalisées à la recherche de la mutation de *BRAF* et positive pour cette mutation, avait un diagnostic cytologique de lésions indéterminées ou bien étaient non contributives. Un certain nombre de diagnostic cytologique classant des lésions comme étant bénignes, mais muté pour *BRAF*, correspondait à un CPT à l'examen histologique. D'autres études ont exploré l'intérêt d'une détection des mutations de *RET/PTC, TRK* ou de *RAS* sur du matériel de cytoponction [55]. Il semble que l'impact diagnostique est d'autant plus important qu'un panel comportant la recherche de plusieurs de ces mutations est réalisé. Par exemple une étude effectuée sur 470 cytoponctions consécutives avec un panel de mutations recherchant les mutations de *BRAF, RAS, RET/PTC et PAX8/PPARγ,* montrait 32 mutations (18 *BRAF*, 8 *RAS,* 5 *RET/PTC* et 1 *PAX8/PPARγ)* [56]. Cette étude montre que l'analyse moléculaire utilisant un tel panel est particulièrement utile pour améliorer le diagnostic des lésions classées cytologiquement comme indéterminées [56]. Cependant il est certain que cette analyse moléculaire est coûteuse et nécessite un personnel technique hautement qualifié. Il convient certainement dans le futur de mieux affiner les indications d'une telle analyse en ciblant cette recherche moléculaire sur des critères cliniques et échographiques d'un nodule initialement classé bénin cytologiquement et pouvant ainsi être reponctionné pour faire cette analyse moléculaire. Pour certains auteurs, la présence de la mutation *BRAF* devrait même conduire à une thyroïdectomie totale, sans tenir compte de l'aspect bénin observé cytologiquement. Enfin, il s'avère possible de rechercher l'expression de certains microARN dans du matériel de cytoponction. Ainsi, une étude montre que dans 7/8 échantillons de ponction réalisée pour des nodules se révélant être secondairement des CPT, *mir-221, mir-222*, et *mir-181b* étaient augmentés de façon significative [57]. Une autre étude montre qu'en recherchant l'expression de 7 microARN (*mir-221, mir-222, mir-146b, mir-224, mir-155, mir-197, mir-187*) le diagnostic de malignité a pu être porté à partir de matériel de cytoponction [42].

4.2. Intérêt des tests moléculaires développés sur pièces opératoires

Les tumeurs portant la mutation de *BRAF* correspondent histologiquement à des CPT classiques et à des CPT à cellules hautes, ne devant pas ainsi poser de problème de diagnostic. Ainsi, la présence de cette mutation n'apporte pas d'aide supplémentaire au diagnostic de ces lésions. Les variantes folliculaires des CPT sont souvent associées à une mutation de *RAS,* mais cette mutation peut être aussi

observée dans les adénomes folliculaires, ce qui limite l'intérêt de cette analyse moléculaire. Lorsqu'une lésion folliculaire est suspecte d'être un carcinome, la détection de *PAX8/PPARγ* peut être d'une grande aide au diagnostic. Toutefois, cette mutation peut être également trouvée dans un faible pourcentage d'adénomes folliculaires, même si dans ce cas, une recherche minutieuse de l'ensemble de la capsule doit se faire pour éliminer une zone d'invasion vasculaire ou capsulaire. Une étude récente a été réalisée dans le but de voir si les analyses moléculaires pouvaient aider au diagnostic des tumeurs thyroïdiennes de potentiel de malignité incertain [58]. Cependant même si un certain nombre de mutations ponctuelles a été trouvé, notamment sur le gène *RAS*, il n'existait pas dans cette série de profil mutationnel particulier pouvant orienter le diagnostic vers l'une des entités constituant le groupe de ces tumeurs [58]. Ainsi, la recherche de ces mutations semble avoir un impact limité dans le cadre du diagnostic des lésions histologiques thyroïdiennes.

5. Pathologie moléculaire de la thyroïde et facteurs prédictifs d'agressivité tumorale

La plupart des cancers bien différenciés de la thyroïde, en particulier ceux de petite taille et bien localisés, ont un comportement peu agressif et peuvent être parfaitement traités. Cependant, certains de ces cancers ont de façon non prévisible un potentiel évolutif plus important et nécessiteraient de ce fait un traitement d'emblée plus « agressif ». Les biomarqueurs moléculaires peuvent ainsi contribuer à évaluer le pronostic de ces tumeurs [59].

5.1. *BRAF*

La mutation *BRAFV600E* est en général bien acceptée comme étant un biomarqueur pronostique des CPT [14, 17, 58]. Les résultats obtenus sur de larges cohortes de patients montrent que la plupart des CPT mutés pour *BRAF* ont un potentiel évolutif plus agressif [61]. Ceci est toutefois contreversé dans certaines séries [16]. La mutation de *BRAF* est corrélée avec une extension extra-thyroïdienne, une tumeur de grande taille, des métastases ganglionnaires, viscérales ou osseuses. De façon intéressante, la présence de cette mutation est aussi corrélée avec un échec thérapeutique et une récidive tumorale, même chez des patients ayant un stade tumoral initial peu évolué. Une étude réalisée à partir d'une cohorte de 102 patients avec un suivi évolutif de 15 ans montre que la présence de BRAFT V600E est un biomarqueur indépendant corrélé au décès par CPT [62]. Ce facteur pronostique est également observé lorsque la mutation est détectée sur du matériel de cytoponction. Ceci conduit donc à envisager une meilleure prise en charge préopératoire pour les CPT [63]. La mutation de *BRAF* est responsable d'une altération de la fonction du transporteur d'iode, expliquant probablement certains échecs thérapeutiques [62]. *BRAF* favorise aussi l'évolution vers une dédifférenciation tumorale et vers le développement possible d'un carcinome anaplasique, dont le pronostic est très défavorable. La valeur pronostique de cette mutation semble être aussi particulièrement importante pour les microcarcinomes papillaires. Si la plupart de ces lésions ne sont pas accompagnées de récidive, un certain nombre d'entre elles peuvent entraîner des métastases et le décès des patients. Ainsi, plusieurs études montrent que les microcarcinomes papillaires présentant une mutation de *BRAF* ont un potentiel métastatique ganglionnaire plus important et un potentiel invasif extrathyroïdien [64, 65]. Ces microcarcinomes papillaires à potentiel agressif devraient donc certainement bénéficier d'un traitement initialement plus agressif. Il paraît important d'essayer de déterminer dans le futur le groupe de CPT *BRAF* mutés à fort potentiel agressif. En effet, tous les CPT *BRAF* mutés ne sont pas agressifs et les CPT non mutés pour *BRAF* peuvent aussi évoluer d'une façon péjorative.

5.2. *RAS*

Le rôle de *RAS* comme biomarqueur pronostique des tumeurs thyroïdes n'est pas déterminé. Comme cette mutation est également trouvée dans des tumeurs folliculaires bénignes, le statut *RAS* par lui-même ne peut pas être utilisé pour évaluer le pronostic tumoral. Quelques études montrent toutefois que la présence de *RAS* détectée dans certains CPT ou dans des carcinomes folliculaires est corrélée à un pronostic plus défavorable, avec en particulier le développement de métastases osseuses [66].

5.3. *RET/PTC*

La corrélation entre la présence de *RET/PTC* et le pronostic des CPT est incertaine. Des études montrent une corrélation avec un pronostic plus favorable. Ainsi, contrairement aux CPT ayant une mutation de *BRAF* et de *NRAS,* ceux ayant la mutation de *RET/PTC*, en particulier de *RET/PTC1*, ont une plus faible probabilité de progression vers un carcinome peu différencié ou vers un carcinome anaplasique. Cependant en cas de mutations de *BRAF* et de *RET/PTC*, certains CPT auraient tendance à récidiver plus fréquemment [67].

6. Quels tests moléculaires ? Quels échantillons ? Quelles indications ?

Les études moléculaires en pathologie thyroïdienne font ainsi l'objet de très nombreuses études, ayant pour but de déterminer de nouveaux biomarqueurs diagnostiques ou pronostiques. Ces études portent sur l'analyse de mutations ponctuelles, de réarrangements, et depuis peu, sur l'expression des microARN. Les résultats obtenus dépendent largement du conditionnement pré-analytique des échantillons (fixation ou congélation) et de leur nature (matériel cytologique ou histologique). Ainsi, les techniques de PCR pour la détection des réarrangements de *RET/PTC* et *PAX8/PPARγ* ne sont pas indiquées pour les échantillons fixés, compte tenu de la dégradation fréquente de l'ARN en cas de fixation. Dans ce cas, les techniques de FISH semblent bien plus performantes. À l'inverse, la recherche des mutations ponctuelles de *BRAF* ou de *RAS*

est possible par la plupart des techniques (séquençage direct, pyroséquençage, RT-PCR) que le tissu soit congelé ou bien fixé. La recherche des microARN peut se faire en principe sur du matériel fixé ou congelé, les microARN étant stables et non dégradés par la fixation formolée. De façon intéressante, cette recherche peut également se concevoir par hybridation in situ, réalisée sur cytologie ou sur coupe tissulaire déparaffinée.

Il est encore actuellement difficile de proposer un arbre décisionnel et stratégique particulier pour les indications des examens de biologie moléculaire en pathologie thyroïdienne. Aucun test n'a de valeur pronostique évident lorsqu'il est considéré individuellement, car certaines mutations ou réarrangements (*RAS, PAX8/PPARγ)* peuvent se voir à la fois dans des pathologies malignes et bénignes. Il semble toutefois intéressant de rechercher la mutation de *BRAF* dans les produits de cytoponction dont le diagnostic morphologique a conduit à un résultat de cytologie « indéterminée ». Toutefois, seule une positivité de la mutation de *BRAF* permettra alors le diagnostic de CPT, un résultat négatif n'excluant pas ce diagnostic. La prise en charge moléculaire des CMT constitue bien sur un cas particulier. La recherche des mutations germinales de *RET* conduit en effet à distinguer les formes familiales des formes sporadiques de CMT. Il convient idéalement de rechercher ces mutations à partir de prélèvements sanguins. Les mutations somatiques de *RET* observées dans les CMT peuvent parfaitement être recherchées à partir de tissus fixés et après PCR.

7. Conclusion

Les examens de biologie moléculaire doivent permettre dans le futur d'améliorer le diagnostic des lésions thyroïdiennes, en particulier celui porté à partir des produits de cytoponctions et de certaines lésions folliculaires bien différenciées. Ces examens doivent aussi optimiser l'évaluation du pronostic des tumeurs thyroïdiennes, notamment de certains microcarcinomes papillaires à potentiel agressif. Enfin ces examens de biologie moléculaire vont certainement servir dans un avenir proche à une prise en charge thérapeutique personnalisée des tumeurs thyroïdiennes.

Conflit d'intérêt : aucun

Références

[1] Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. JAMA 2006;295(18):2164-7.

[2] Arora N, Scognamiglio T, Lubitz CC, et al. Identification of borderline thyroid tumors by gene expression array analysis. Cancer 2009;115(23):5421-31.

[3] Kundel A, Zarnegar R, Kato M, et al. Comparison of microarray analysis of fine needle aspirates and tissue specimen in thyroid nodule diagnosis. Diagn Mol Pathol 2010;19(1):9-14.

[4] Pagedar NA, Chen DH, Wasman JK, et al., Molecular classification of thyroid nodules by cytology. Laryngoscope 2008;118(4):692-6.

[5] Fischer S, Asa SL. Application of immunohistochemistry to thyroid neoplasms. Arch Pathol Lab Med 2008;132(3):359-72.

[6] Kundra P, Burman KD. Thyroid cancer molecular signaling pathways and use of targeted therapy. Endocrinol Metab Clin North Am 2007;36(3):839-53.

[7] Liu ZM, Wu TT, van Hasselt CA, et al. Carcinogenesis and therapeutic strategies in thyroid cancer. Curr Drug Targets 2010;11(6):716-32.

[8] Malouf G, Baudin E, Soria JC, et al. Advances in the treatment of thyroid cancer in the era of molecularly targeted therapies Bull Cancer 2009;96(1):95-101.

[9] Mechanick JI, Carpi A. Thyroid cancer: the impact of emerging technologies on clinical practice guidelines. Biomed Pharmacother 2008;62(8):554-8.

[10] Costa AM, Herrero A, Fresno MF, et al. BRAF mutation associated with other genetic events identifies a subset of aggressive papillary thyroid carcinoma. Clin Endocrinol 2008;68: 618-34.

[11] Liu Z, Hou P, Ji M, et al. Highly prevalent genetic alterations in receptor tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/akt and mitogen-activated protein kinase pathways in anaplastic and follicular thyroid cancers. J Clin Endocrinol Metab 2008;93(8):3106-16.

[12] Kim SK, Kim DL, Han HS, et al. Pyrosequencing analysis for detection of a BRAFV600E mutation in an FNAB specimen of thyroid nodules. Diagn Mol Pathol 2008;17(2):118-25.

[13] Lee HJ, Choi J, Hwang TS, et al. Detection of BRAF mutations in thyroid nodules by allele-specific PCR using a dual priming oligonucleotide system. Am J Clin Pathol 2010;133(5):802-8.

[14] Orru G, Coghe F, Faa G, et al. Rapid multiplex real-time PCR by molecular beacons for different BRAF allele detection in papillary thyroid carcinoma. Diagn Mol Pathol 2010;19(1):1-8

[15] Lassalle S, Hofman V, Marius I, et al. Assessment of morphology, antigenicity, and nucleic acid integrity for diagnostic thyroid pathology using formalin substitute fixatives. Thyroid 2009;19(11):1239-48.

[16] Lassalle S, Hofman V, Ilie M, et al. Clinical impact of the detection of BRAF mutations in thyroid pathology: potential usefulness as diagnostic, prognostic and theragnostic applications. Curr Med Chem 2010;17(17):1839-50.

[17] Cohen Y, Xing M, Mambo E, et al. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. J Natl Cancer Inst 2003;95(8):625-7.

[18] Kebebew E, Weng J, Bauer J, et al. The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. Ann Surg 2007;246(3):466-70.

[19] Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. Endocr Relat Cancer 2005;12(2):245-62.

[20] Fukushima T, Suzuki S, Mashiko M, et al. BRAF mutations in papillary carcinomas of the thyroid. Oncogene 2003;22(41):6455-7.

[21] Trovisco V, Vieira de Castro I, Soares P et al., BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. J Pathol 2004;202(2):247-51.

[22] Trovisco V, Soares P, Sobrinho-Simões M. B-RAF mutations in the etiopathogenesis, diagnosis, and prognosis of thyroid carcinomas. Hum Pathol 2006;37(7):781-6.

[23] LiVolsi VA. Papillary carcinoma tall cell variant (TCV): a review. Endocr Pathol 2010;21(1):12-5.

[24] Jakubowski M, Hunt JL. BRAF mutational analysis in papillary carcinomas with mixed follicular and papillary growth patterns. Am J Surg Pathol 2009;33(11):1590-3.

[25] Rivera M, Ricarte-Filho J, Knauf J, et al. Molecular genotyping of papillary thyroid carcinoma follicular variant according to its histological subtypes (encapsulated vs infiltrative) reveals distinct BRAF and RAS mutation patterns. Mod Pathol 2010;------.

[26] De Groot JW, Links TP, Plukker JT, et al. RET as a diagnostic and therapeutic target in sporadic and hereditary endocrine tumors. Endocr Rev 2006;27(3):535-60.

[27] Nikiforov YE, Rowland JM, Bove KE, et al. Istinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children. Cancer Res 1997;57(9):1690-4.

[28] Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, et al. PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. Science 2000;289(5483):1357-60.

[29] Dwight T, Thoppe SR, Foukakis T, et al. Involvement of the PAX8/peroxisome proliferator-activated receptor gamma rearrangement in follicular thyroid tumors. J Clin Endocrinol Metab 2003;88(9):4440-5.

[30] Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, et al. PAX8-PPARgamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab 2006;91(1):213-20.

[31] Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, et al. RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. J Clin Endocrinol Metab 2003;88(5):2318-26.

[32] Kebebew E, Clark OH. Medullary thyroid cancer. Curr Treat Options Oncol 2000;1(4):359-67.

[33] Roman S, Mehta P, Sosa JA. Medullary thyroid cancer: early detection and novel treatments. Curr Opin Oncol 2009;21(1):5-10.

[34] Cakir M, Grossman AB. Medullary thyroid cancer: molecular biology and novel molecular therapies.Neuroendocrinology 2009;90(4):323-48.

[35] Greco A, Miranda C, Pierotti MA. Rearrangements of NTRK1 gene in papillary thyroid carcinoma. Mol Cell Endocrinol 2010;321(1):44-9.

[36] Santarpia L, Myers JN, Sherman SI, et al. Genetic alterations in the RAS/RAF/mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. Cancer 2010;116(12):2974-83.

[37] Xing M. Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer. Thyroid 2010;20(7):697-706

[38] Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. Nat Rev Genet 2009;10(10):704-14.

[39] Garzon R, Calin GA, Croce CM. .MicroRNAs in Cancer. Annu Rev Med 2009;60:167-79.

[40] Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. J Clin Oncol 2009;27(34):5848-56.

[41] Ortholan C, Puissegur MP, Ilie M, et al. MicroRNAs and lung cancer: new oncogenes and tumor suppressors, new prognostic factors and potential therapeutic targets. Curr Med Chem 2009;16(9):1047-61.

[42] Nikiforova MN, Tseng GC, Steward D, et al. MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. J Clin Endocrinol Metab 2008;93(5):1600-8.

[43] Nikiforova MN, Chiosea SI, Nikiforov YE. MicroRNA expression profiles in thyroid tumors. Endocr Pathol 2009;20(2):85-91.

[44] Weber F, Teresi RE, Broelsch CE, et al. A limited set of human MicroRNA is deregulated in follicular thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab 2006;91(9):3584-91.

[45] Cohen Y, Rosenbaum E, Clark DP, et al. Mutational analysis of BRAF in fine needle aspiration biopsies of the thyroid: a potential application for the preoperative assessment of thyroid nodules. Clin Cancer Res 2004;10(8):2761-5.

[46] Pinto AE, Leite V, Soares J. Clinical implications of molecular markers in follicular cell-derived thyroid cancer. Expert Rev Mol Diagn 2009;9(7):679-94.

[47] Wreesmann VB, Singh B. Clinical impact of molecular analysis on thyroid cancer management. Surg Oncol Clin N Am 2008;17(1):1-35.

[48] Baloch ZW, LiVolsi VA, Asa SL, et al. Diagnostic terminology and morphologic criteria for cytologic diagnosis of thyroid lesions: a synopsis of the National Cancer Institute Thyroid Fine-Needle Aspiration State of the Science Conference. Diagn Cytopathol 2008;36(6):425-37.

[49] French CA, Fletcher JA, Cibas ES, et al. Molecular detection of PPAR gamma rearrangements and thyroid carcinoma in preoperative fine-needle aspiration biopsies. Endocr Pathol 2008;19(3):166-74.

[50] Gómez Saez JM. Diagnostic usefulness of tumor markers in the thyroid cytological samples extracted by fine-needle aspiration biopsy. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets 2010;10(1):47-56.

[51] Guo F, Hou P, Shi B. Detection of BRAF mutation on fine needle aspiration biopsy specimens: diagnostic and clinical implications for papillary thyroid cancer. Acta Cytol 2010;54(3):291-5.

[52] Jin L, Sebo TJ, Nakamura N, et al. BRAF mutation analysis in fine needle aspiration (FNA) cytology of the thyroid. Diagn Mol Pathol 2006;15(3):136-43.

[53] Marchetti I, Lessi F, Mazzanti CM, et al. A morpho-molecular diagnosis of papillary thyroid carcinoma: BRAF V600E detection as an important tool in preoperative evaluation of fine-needle aspirates. Thyroid 2009;19(8):837-42.

[54] Nam SY, Han BK, Ko EY, et al. BRAF V600E mutation analysis of thyroid nodules needle aspirates in relation to their ultrasongraphic classification: a potential guide for selection of samples for molecular analysis. Thyroid 2010;20(3):273-9.

[55] Cheung CC, Carydis B, Ezzat S, et al. Analysis of ret/PTC gene rearrangements refines the fine needle aspiration diagnosis of thyroid cancer. J Clin Endocrinol Metab 2001;86(5):2187-90.

[56] Nikiforov YE, Steward DL, Robinson-Smith TM, et al. Molecular testing for mutations in improving the fine-needle aspiration diagnosis of thyroid nodules. J Clin Endocrinol Metab 2009;94(6):2092-8.

[57] Pallante P, Visone R, Ferracin M, et al. MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. Endocr Relat Cancer 2006;13(2):497-508.

[58] Hofman V, Lassalle S, Bonnetaud C, et al. Thyroid tumours of uncertain malignant potential: frequency and diagnostic reproducibility. Virchows Arch 2009;455(1):21-33.

[59] Handkiewicz-Junak D, Czarniecka A, Jarzab B. Molecular prognostic markers in papillary and follicular thyroid cancer: Current status and future directions. Mol Cell Endocrinol 2010;322(1-2):8-28.

[60] Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. Endocr Rev 2007;28(7):742-62.

[61] Basolo F, Torregrossa L, Giannini R, et al. Correlation between the BRAF V600E Mutation and Tumor Invasiveness in Papillary Thyroid Carcinomas Smaller than 20 Millimeters: Analysis of 1060 Cases. J Clin Endocrinol Metab 2010 [Epub ahead of print]

[62] Elisei R, Ugolini C, Viola D, et al. BRAF(V600E) mutation and outcome of patients with papillary thyroid carcinoma: a 15-year median follow-up study. J Clin Endocrinol Metab 2008;93(10):3943-9.

[63] Xing M, Clark D, Guan H, et al. BRAF mutation testing of thyroid fine-needle aspiration biopsy specimens for preoperative risk stratification in papillary thyroid cancer. J Clin Oncol 2009;27(18):2977-82.

[64] Lee X, Gao M, Ji Y, Yu Y, et al. Analysis of differential BRAF(V600E) mutational status in high aggressive papillary thyroid microcarcinoma. Ann Surg Oncol 2009;16(2):240-5.

[65] Lupi C, Giannini R, Ugolini C, et al. Association of BRAF V600E mutation with poor clinicopathological outcomes in 500 consecutive cases of papillary thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab 2007;92(11):4085-90.

[66] Garcia-Rostan G, Zhao H, Camp RL, et al. ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. J Clin Oncol 2003;21(17):3226-35.

[67] Henderson YC, Shellenberger TD, Williams MD, et al. High rate of BRAF and RET/PTC dual mutations associated with recurrent papillary thyroid carcinoma. Clin Cancer Res 2009;15(2):485-91