ELSEVIER MASSON

Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com

Médecine Nucléaire xxx (2011) xxx–xxx

Médecine Nucléaire
Imagerie Fonctionnelle et Métabolique

Mise au point

Apport de la biologie moléculaire dans la prise en charge des cancers thyroïdiens : mutation BRAF et miRNA

Contribution of molecular biology in the management of thyroid cancer: Searching for BRAF mutation and miRNA profiling

F. Savagner

Inserm UMR694, laboratoire de biochimie, CHU d'Angers, 4, rue Larrey, 49033 Angers cedex, France

Reçu le 6 novembre 2011 ; accepté le 15 novembre 2011

Résumé

La recherche de marqueurs moléculaires diagnostiques et pronostiques des tumeurs est un challenge important en oncologie thyroïdienne, en particulier dans le cadre des thérapeutiques ciblées. Son application aux produits de cytoponction dépend de la sensibilité des méthodes de détection utilisées, mais aussi du pourcentage de cellules mutées recueillies. L'approche moléculaire exhaustive consiste en la recherche des mutations de BRAF et de RAS, des réarrangements de Ret/PTC et PPARγ/Pax8 ainsi qu'en la quantification d'un nombre restreint de miRNA. En pratique, seule la recherche de la mutation V600E de BRAF est réalisée dans les produits de cytoponction. Sa détection associée à la quantification de miRNA spécifiques (notamment miR-146b) est informative pour l'identification des cancers papillaires de mauvais pronostic. Les miRNA devraient rapidement avoir un intérêt diagnostique des tumeurs folliculaires sur cytoponction, grâce aux travaux récents explorant un plus grand nombre de classes tumorales et notamment des groupes de tumeurs histologiquement atypiques.
© 2011 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Cancer papillaire de la thyroïde ; Mutation BRAF V600E ; miR-146b ; Cytoponction

Abstract

Searching for diagnostic and prognostic molecular markers of thyroid tumors is a major challenge in thyroid oncology, especially in the context of targeted therapies. Its application to fine needle aspiration biopsies depends on the sensitivity for methods used to detect mutations but also on the percentage of cells presenting mutations in the collection. The molecular approach could involve the exhaustive search for mutations in BRAF and RAS, rearrangements in Ret/PTC and PPARγ/PAX8 and expression measurement of selected miRNA. In practice, looking for the BRAF V600E mutation is easy to use on fine needle aspiration biopsies. Its detection could be associated to the measurement of target miRNA (especially miR-146b) to identify papillary carcinoma with poor prognosis. Measurement of several miRNA should have soon a diagnostic interest for follicular tumors according to recent studies exploring atypical tumors on histology.
© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Papillary thyroid cancer; BRAF V600E mutation; miR-146b; Fine needle aspiration biopsies

1. Introduction

L'initiation et la progression des tumeurs thyroïdiennes s'effectuent au travers de l'accumulation d'anomalies génétiques et épigénetiques qui impliquent des mutations somatiques dans des gènes des voies de la transduction du signal, mais aussi des miRNA ou des modifications du niveau de méthylation des gènes. Les mécanismes de tumorigenèse peuvent donc être associés à des changements qualitatifs (présence de mutation) ou quantitatifs (niveau d'expression des gènes). Les anomalies génétiques liées à la tumorigenèse thyroïdienne impliquent les deux voies de transduction du signal que sont la voie MAPkinase et la voie PI3kinase/Akt. Ces deux voies sont clairement intriquées, notamment au niveau de la kinase Ras. L'activation de la voie PI3kinase/Akt

Adresse e-mail : Frederique.savagner@univ-angers.fr.

0928-1258/$ – see front matter © 2011 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.
doi:10.1016/j.mednuc.2011.11.010

Pour citer cet article : Savagner F. Apport de la biologie moléculaire dans la prise en charge des cancers thyroïdiens : mutation BRAF et miRNA. Médecine Nucléaire (2011), doi:10.1016/j.mednuc.2011.11.010

est associée au développement de tumeurs différenciées de mauvais pronostic ou aux tumeurs anaplasiques [1,2]. L'activation de la voie MAPkinase est le plus souvent associée au développement des cancers papillaires (CPT). Parmi les mutations somatiques retrouvées dans les CPT, les mutations dans les gènes BRAF sont les plus fréquentes. Elles représentent 40 à 45 % des anomalies rencontrées selon les séries alors que le réarrangement Ret/PTC et les mutations dans les gènes *RAS* sont présentes dans 10 à 20 % des CPT [3].

2. Valeur pronostique de la mutation de BRAF

Les anomalies du gène BRAF sont très majoritairement situées sur le nucléotide 1799 et résultent de la substitution d'une valine par une glutamine au niveau du résidu 600 (V600E). Cette mutation ponctuelle entraîne une activation constitutive de la kinase, associée à son pouvoir oncogénique. Cette mutation est essentiellement observée dans les CPT de type histologique classique ainsi que dans la variante à cellules hautes [4]. Elle n'est jamais retrouvée dans les carcinomes folliculaires ou dans les tumeurs bénignes de la thyroïde, ce qui est en fait un marqueur spécifique des CPT [5]. L'anomalie moléculaire de BRAF semble donc être un événement précoce du développement tumoral papillaire qui pourrait prédisposer les cellules tumorales à des facteurs génétiques additionnels, conduisant à la dédifférenciation par activation de voies plus agressives. Près de 45 % des tumeurs BRAF positives sont significativement associées à un stade tumoral avancé (stade III ou IV selon la classification TNM) avec un risque significativement plus élevé de métastases locorégionales et à distance, contrairement aux tumeurs BRAF négatives présentant le plus souvent un stade clinique de niveau I. Enfin, les tumeurs BRAF positives se développent à un âge significativement plus tardif ($49{,}3 \pm 16{,}2$ ans) que celles BRAF négatives ($35{,}0 \pm 17{,}3$ ans) [6].

La faisabilité d'une détection de routine des anomalies de type BRAF, Ret/PTC, RAS et PPARγ/Pax8, sur produits de cytoponction, a fait l'objet d'une étude rétrospective sur 1056 prélèvements [7]. Cette étude montre que la sensibilité de l'analyse moléculaire sur cytoponction est de 57 à 68 % de détection pour les groupes 2 et 3 de la classification de Bethesda [8], c'est-à-dire correspondant aux classes de signification indéterminée ou suspecte de malignité. Ce manque relatif de sensibilité est lié à la qualité des cytoponctions et aux limites des techniques usuelles de séquençage. Pour autant, la spécificité de l'approche est élevée et 100 % des tumeurs malignes présentent des anomalies de type BRAF ou PPARγ/Pax8. Enfin, cette étude aborde le problème de la représentativité des cellules folliculaires thyroïdiennes dans un prélèvement de cytoponction. La mise en place d'un test assurant l'enrichissement en cellules thyroïdiennes au dépend de cellules sanguines semble indispensable à toute recherche d'anomalie moléculaire dans ce type de prélèvement.

3. Les miRNA

Les miRNA (ou microARN) sont des petits ARN simple brin non-codant, constitués de 21 à 23 nucléotides, qui s'associent aux protéines de la famille Argonaute afin de contrôler l'expression des gènes [9]. Leur mode d'action repose sur un appariement spécifique avec un certain nombre d'ARN messagers (ARNm). Ce sont des répresseurs post-transcriptionnels qui, en s'appariant à ces ARNm, guident soit leur dégradation, soit la répression de leur traduction en protéine (régulation post-transcriptionnelle). Dans le génome humain, il existe plusieurs centaines de miRNA impliqués dans le contrôle positif ou négatif de la prolifération cellulaire [10]. Ils correspondent à une voie majeure dans le système de régulation des gènes, en contrôlant l'expression de plus de 30 % des gènes. Leur implication dans le développement tumoral est lié soit à une modification du nombre de copies de miRNA susceptibles d'agir sur des cibles ARNm, correspondant à des gènes suppresseurs de tumeurs ou des oncogènes, soit à des modifications de leur affinité pour les cibles ARNm en présence de polymorphismes (SNP ou *single nucleotide polymorphism*) dans la région d'appariement du miRNA avec les ARNm cibles. Ainsi, un appariement anormal entre le miRNA et l'ARNm peut être lié à la présence de polymorphismes dans l'ARNm du gène *c-KIT*, impliqué dans les voies de régulation du cycle cellulaire, et sont spécifiquement associés au risque de développement des cancers papillaires de la thyroïde [11]. Les polymorphismes 2607G > C et 3169G > A de l'ARNm du gène *c-KIT* correspondent aux régions de reconnaissance de miR-146 (pour 2607G > C) et de miR-221 et miR-222 (pour 3169G > A).

Plus fréquemment, le profil d'expression des miRNA va être modifié selon la classe de tumeurs et/ou l'agressivité tumorale et ainsi servir de biomarqueurs diagnostiques ou pronostiques.

4. miRNA et classification des tumeurs thyroïdiennes

Dans le cas des cancers thyroïdiens, une expression différentielle de miRNA a été décrite dans plusieurs études rassemblant près de 500 échantillons de tumeurs dont plus de 40 % sont des CPT [12–19]. Cinq de ces études ont servi de référence pour identifier les profils différentiels des cancers folliculaires, papillaires, des cancers peu différenciés et des anaplasiques [20]. Elles montrent que les marqueurs miRNA sont majoritairement surexprimés dans les tumeurs différenciées, alors qu'ils sont sous-exprimés dans les tumeurs dédifférenciées. Dans le cas des carcinomes papillaires (CPT), une forte surexpression de sept miRNA : miR-221, miR-222 et miR-146b, miR-181b, miR-21, miR-155 et miR-224 est observée, quel que soit le type de mutations identifiées dans la tumeur, réarrangements Ret/PTC ou mutations ponctuelles dans les gènes codant pour les kinases RAS ou BRAF. La valeur prédictive de l'expression de miR-146b dans le développement de CPT plus agressifs (BRAF positifs) est maintenant plus clairement établie puisque l'étude de Chou et al. et celle de Yip et al. permettent de lier non seulement une surexpression de miR-146b aux CPT porteurs d'une mutation

Pour citer cet article : Savagner F. Apport de la biologie moléculaire dans la prise en charge des cancers thyroïdiens : mutation BRAF et miRNA. Médecine Nucléaire (2011), doi:10.1016/j.mednuc.2011.11.010

de BRAF, mais aussi de corréler le niveau d'expression au stade tumoral avancé, TNM III et IV [14,21]. Dans le cas des cancers anaplasiques, la sous-expression de deux familles de miRNA (miR-30 et miR-200) paraît très corrélée au potentiel invasif de ces tumeurs [12]. Enfin, dans le cas des carcinomes folliculaires, les données sont plus limitées car peu d'échantillons ont été testés en parallèle. La signature CPT (miR-146b, -221 et -222) n'est jamais retrouvée au même niveau de surexpression dans les adénomes ou carcinomes folliculaires. Il peut cependant être observé une augmentation isolée de miR-221 ou miR-222 [16]. Les miRNA les plus surexprimés dans les cancers thyroïdiens folliculaires conventionnels sont miR-155, miR-187, miR-197 et miR-224 [19]. Dans les variants oncocytaires des tumeurs folliculaires, variants riches en mitochondries, les miRNA surexprimés semblent être totalement différents. Il peut donc exister des miRNA plus spécifiquement associés à la régulation de la prolifération cellulaire, dans un contexte de prolifération mitochondriale et d'adaptation métabolique.

5. Aspects pratiques de la prise en charge moléculaire sur ponctions à l'aiguille fine

L'analyse cytologique des prélèvements sur ponction à l'aiguille fine est une aide au diagnostic et à la prise en charge thérapeutique des nodules thyroïdiens. L'approche moléculaire augmente de façon significative la spécificité du diagnostic. Il semble que l'impact diagnostique de ces recherches est d'autant plus important qu'un panel de mutations est recherché (BRAF, RAS, Ret/PTC, PPARγ/Pax8), en particulier pour les lésions de classes indéterminées en cytologie [22]. En pratique, cette recherche est longue et coûteuse et la méthode de séquençage direct qui est actuellement la méthode « *gold standard* » présente un seuil de sensibilité limité pouvant être préjudiciable à l'analyse d'un faible pourcentage de cellules mutées [23]. La recherche de la mutation BRAF seule est plus aisée, mais la présence de cette mutation dans des prélèvements d'aspect bénin à la cytologie doit faire moduler la prise en charge chirurgicale de ces nodules. La mesure de l'expression des miRNA peut représenter une alternative plus aisée que l'étude d'un panel de mutation. L'intérêt des miRNA réside dans le fait que, comme un miRNA peut réguler plusieurs ARNm, le nombre de miRNA spécifiques d'une classe tumorale est réduit. De plus, la faible taille des miRNA présente l'avantage d'éviter la dégradation de ces ARN, au contraire des ARNm. L'amélioration récente des techniques de PCR quantitative en temps réel permet de proposer des techniques sensibles de détection et présentent un réel avantage dans la prise en charge du diagnostic différentiel des tumeurs thyroïdiennes folliculaires. Cependant, les études de susceptibilité au cancer liée à la présence de polymorphismes dans les sites de reconnaissance des miRNA montrent que la seule mesure de l'expression de miRNA n'est pas suffisante pour affirmer le diagnostic. L'association de la recherche de la mutation BRAF et du niveau d'expression de miR-146b pour le diagnostic des CPT agressifs semble être un bon compromis entre la sensibilité diagnostique et la pratique en laboratoire permettant l'accès rapide à des thérapeutiques adaptées.

6. Conclusion

Le typage moléculaire des tumeurs thyroïdiennes sur prélèvement de ponction à l'aiguille fine est très prometteur dans l'identification de facteurs diagnostiques et pronostiques. La mise en évidence des mutations ponctuelles, notamment dans le gène BRAF, sont dépendantes de la qualité du prélèvement, de la représentativité en cellules thyroïdiennes et du seuil de sensibilité de la technique de détection utilisée. Si la surexpression de certains miRNA semble pouvoir être mise en avant pour le diagnostic des cancers papillaires (mir-221 et mir-222, mir-146b), le nombre de tumeurs folliculaires bénignes ou malignes explorées jusqu'à présent est trop faible pour pouvoir conclure quant à l'intérêt diagnostique et pronostique de quelques miRNA. Il s'agit donc de poursuivre l'identification des miRNA marqueurs de chaque classe ou variant de tumeurs folliculaires thyroïdiennes. Pour l'instant, seule la recherche combinée de la mutation BRAF et la mesure du taux de miR-146b pourrait permettre de détecter les CPT de mauvais pronostic et d'identifier ceux pouvant bénéficier d'une meilleure prise en charge thérapeutique.

Déclaration d'intérêts

L'auteur déclare ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

[1] Kundra P, Burman KD. Thyroid cancer molecular signaling pathways and use of targeted therapy. Endocrinol Metab Clin North Am 2007;36:839–53. viii.
[2] Liu Z, Hou P, Ji M, Guan H, Studeman K, Jensen K, 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;93:3106–16.
[3] Lassalle S, Hofman V, Ilie M, Butori C, Bozec A, Santini J, 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;17:1839–50.
[4] Trovisco V, Vieira dC I, Soares P, Maximo V, Silva P, Magalhaes J, et al. BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. J Pathol 2004;202:247–51.
[5] Xing M, Westra WH, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Rhoden KJ, et al. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. J Clin Endocrinol Metab 2005;90:6373–9.
[6] Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88:5399–404.
[7] Nikiforov YE, Ohori NP, Hodak SP, Carty SE, Lebeau SO, Ferris RL, et al. Impact of mutational testing on the diagnosis and management of patients with cytologically indeterminate thyroid nodules: a prospective analysis of 1056 FNA samples. J Clin Endocrinol Metab 2011;96:3390–7.
[8] Baloch ZW, LiVolsi VA, Asa SL, Rosai J, Merino MJ, Randolph G, 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; 36:425–37.
[9] Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. Nat Rev Mol Cell Biol 2009;10:126–39.

Pour citer cet article : Savagner F. Apport de la biologie moléculaire dans la prise en charge des cancers thyroïdiens : mutation BRAF et miRNA. Médecine Nucléaire (2011), doi:10.1016/j.mednuc.2011.11.010

[10] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. Cell 2005;120:15–20.

[11] He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:19075–80.

[12] Braun J, Hoang-Vu C, Dralle H, Huttelmaier S. Downregulation of microRNAs directs the EMT and invasive potential of anaplastic thyroid carcinomas. Oncogene 2010;29:4237–44.

[13] Chen YT, Kitabayashi N, Zhou XK, Fahey III TJ, Scognamiglio T. MicroRNA analysis as a potential diagnostic tool for papillary thyroid carcinoma. Mod Pathol 2008;21:1139–46.

[14] Chou CK, Chen RF, Chou FF, Chang HW, Chen YJ, Lee YF, et al. miR-146b is highly expressed in adult papillary thyroid carcinomas with high risk features including extrathyroidal invasion and the BRAF(V600E) mutation. Thyroid 2010;20:489–94.

[15] Lassalle S, Hofman V, Ilie M, Bonnetaud C, Puissegur MP, Brest P, et al. Can the microRNA signature distinguish between thyroid tumors of uncertain malignant potential and other well-differentiated tumors of the thyroid gland? Endocr Relat Cancer 2011;18:579–94.

[16] Nikiforova MN, Tseng GC, Steward D, Diorio D, Nikiforov YE. MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. J Clin Endocrinol Metab 2008;93:1600–8.

[17] Pallante P, Visone R, Ferracin M, Ferraro A, Berlingieri MT, Troncone G, et al. MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. Endocr Relat Cancer 2006;13:497–508.

[18] Visone R, Pallante P, Vecchione A, Cirombella R, Ferracin M, Ferraro A, et al. Specific microRNAs are downregulated in human thyroid anaplastic carcinomas. Oncogene 2007;26:7590–5.

[19] Weber F, Teresi RE, Broelsch CE, Frilling A, Eng C. A limited set of human MicroRNA is deregulated in follicular thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab 2006;91:3584–91.

[20] Braun J, Huttelmaier S. Pathogenic mechanisms of deregulated microRNA expression in thyroid carcinomas of follicular origin. Thyroid Res 2001;4(Suppl. 1):S1.

[21] Yip L, Kelly L, Shuai Y, Armstrong MJ, Nikiforov YE, Carty SE, et al. MicroRNA signature distinguishes the degree of aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. Ann Surg Oncol 2011;18:2035–41;
Nikiforova MN, Nikiforov YE. Molecular diagnostics and predictors in thyroid cancer. Thyroid 2009;19:1351–61.

[22] Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. Nat Rev Endocrinol 2011;7:569–80.

[23] Lassalle S, Hofman V, Marius I, Gavric-Tanga V, Brest P, Havet K, et al. Assessment of morphology, antigenicity, and nucleic acid integrity for diagnostic thyroid pathology using formalin substitute fixatives. Thyroid 2009;19:1239–48.

Pour citer cet article : Savagner F. Apport de la biologie moléculaire dans la prise en charge des cancers thyroïdiens : mutation BRAF et miRNA. Médecine Nucléaire (2011), doi:10.1016/j.mednuc.2011.11.010