

Next generation sequencing : une nouvelle technologie pour améliorer le diagnostic des cancers thyroïdiens

M. Le Mercier, N. D'Haene, S. Rorive, C. Degand, N. De Nève, O. Blanchard et I. Salmon

Laboratoire d'Anatomie Pathologique, Hôpital Erasme

RESUME

La méthode diagnostique de référence pour différencier les nodules thyroïdiens bénins des nodules malins est la ponction écho-guidée à l'aiguille fine. Cependant dans 15 à 30 % des cas le diagnostic cytologique est indéterminé, menant à une intervention chirurgicale. L'intégration de nouveaux marqueurs moléculaires nous ouvrent de nouvelles perspectives pour augmenter la précision diagnostique des nodules thyroïdiens de diagnostic cytologique indéterminé.

Rev Med Brux 2016 ; 37 : 436-8

ABSTRACT

Fine needle aspiration is the gold standard method to differentiate benign thyroid nodules from malignant. However, for 15 to 30% of the cases the cytological diagnosis is indeterminate, leading to surgery. Integration of new molecular markers is opening new perspectives in order to increase the diagnostic precision of thyroid nodules with an indeterminate cytology.

Rev Med Brux 2016 ; 37 : 436-8

Key words : thyroid nodules, fine needle aspiration, molecular profile, next generation sequencing

La prise en charge d'un nodule thyroïdien est un problème fréquent, la prévalence de la détection de nodules thyroïdiens par échographie pouvant atteindre 67 % chez les adultes¹. La majorité de ces nodules sont bénins et seuls 5 % des nodules thyroïdiens sont cancéreux¹. Le but majeur du clinicien prenant en charge un patient avec un nodule thyroïdien est de pouvoir évaluer le risque de malignité dans le but d'offrir le meilleur suivi ou le meilleur traitement. Il est impératif d'opérer le patient porteur de cancer. Mais, étant donné l'agressivité peu importante de la majorité des cancers thyroïdiens, il n'est pas permis au clinicien d'opérer tous les nodules thyroïdiens. La méthode diagnostique de référence pour différencier les nodules bénins des nodules malins est la ponction écho-guidée à l'aiguille fine (FNA)¹. Cette méthode simple, peu coûteuse, non invasive et performante est utilisée depuis plus de 15 ans en Europe et aux USA. Elle consiste en l'analyse morphologique au microscope des cellules qui constituent le nodule, cellules prélevées à l'aide d'une aiguille montée sur une seringue et guidée au sein du nodule par échographie. Cependant cette méthode a ses propres limitations, essentiellement dans la prise en charge des patients pour lesquels un

diagnostic cytologique de prolifération folliculaire (PF – diagnostic indéterminé) a été posé, la prévalence de ce diagnostic variant selon les études entre 15 et 30 %². En effet, pour ces patients, le taux de cancer varie, selon les études, entre 14 et 48 %, raison pour laquelle une chirurgie est proposée². Cependant, cette attitude entraîne une intervention pour des nodules, qui *in fine*, sont bénins. Si cette attitude est compréhensible, il est évident que certains patients sont " sur-traités ". Pour ce groupe de patients, il est donc nécessaire d'affiner ce diagnostic morphologique à l'aide de nouveaux bio-marqueurs. Ces derniers permettent de mieux identifier les patients porteurs d'un cancer thyroïdien et d'éviter une chirurgie aux patients présentant un nodule bénin.

L'étude de nouveaux critères tels que l'expression de biomarqueurs ou d'altérations moléculaires permet d'améliorer le diagnostic morphologique. Nous avons assisté, ces dernières années, à des avancées majeures dans la découverte des altérations moléculaires des cancers thyroïdiens qui ont mené au développement de nouveaux marqueurs moléculaires, certains avec un rôle diagnostique et d'autres avec un

impact pronostique. De nombreuses mutations dans différents gènes appartenant à différentes voies telles que la voie des MAPK (tels que BRAF ou RAS) ou la voie PI3K-AKT (tels que PIK3CA ou PTEN) ont été décrites dans les cancers thyroïdiens³. Pour certaines altérations moléculaires telles que la mutation BRAF V600E, la spécificité diagnostique quant à la malignité est élevée et la détection de cette mutation est actuellement utilisée en pratique clinique². Pour d'autres, telles que les mutations de RAS qui peuvent être présentes dans les adénomes thyroïdiens (mais avec une fréquence plus faible que dans les cancers), leur utilité clinique est encore actuellement discutée². Quelques études ont démontré que l'intégration de différents marqueurs moléculaires permet d'augmenter la précision diagnostique des nodules thyroïdiens dont la FNA rapporte un diagnostic indéterminé^{4,5}. De plus en plus d'auteurs proposent d'intégrer la détection de ces nouveaux marqueurs moléculaires dans la prise en charge des patients atteints d'un nodule thyroïdien². Cependant, étant donné que différents gènes sont impliqués, la recherche de ces mutations se faisait de façon séquentielle, ce qui nécessite beaucoup de matériel cytologique, de temps et d'argent. Ces techniques sont donc peu applicables en routine clinique. La limitation majeure repose sur le fait que le matériel obtenu par FNA est réduit. Cette spécificité du matériel cytologique apporte un nouveau challenge pour le pathologiste, à savoir un diagnostic précis ainsi qu'une caractérisation moléculaire de la tumeur sur base de peu de matériel. L'utilisation de la technologie de *Next Generation Sequencing* (NGS) est une solution à ces inconvénients car cette nouvelle technologie permet d'analyser parallèlement plusieurs gènes impliqués dans le cancer, à partir de peu d'ADN, dans un délai et un coût raisonnables. Le service d'Anatomie Pathologique de l'Hôpital Erasme, a acquis en 2013, un appareil de NGS (Ion Torrent PGM - Life Technologies), permettant de caractériser au mieux les tumeurs solides. En effet, à partir de blocs enrobés en paraffine ou de lames cytologiques et avec peu d'ADN (10ng), nous pouvons, en un test, étudier la présence de mutations de plus de 50 gènes impliqués dans la cancérogenèse. Ceci permet une caractérisation moléculaire la plus complète possible des FNA.

L'équipe du Professeur Isabelle Salmon, Chef du Service d'Anatomie pathologique, a publié récemment une étude dans *Histopathology* démontrant la faisabilité de l'emploi du NGS sur le matériel obtenu lors des ponctions de nodules thyroïdiens⁶.

Appliquer cette nouvelle technologie aux ponctions thyroïdiennes représente une avancée importante dans l'évaluation du risque de cancer des nodules thyroïdiens. Cette étude portant sur 34 FNA de patients pour lesquels un diagnostic de PF a été posé et suivie d'une intervention chirurgicale nous a permis de démontrer la faisabilité de l'emploi du NGS sur du matériel obtenu à partir de FNA (lame cytologique et/ou cell bloc), comme cela a déjà été décrit par d'autres auteurs⁷. Les résultats de cette étude montrent que pour 71 % des FNA pour lesquelles une

mutation dans les gènes BRAF, NRAS, KRAS et PTEN a été retrouvée, le diagnostic histologique final est celui d'un cancer thyroïdien. A l'inverse, le risque de malignité pour les patients pour lesquels aucune mutation n'a été retrouvée est de seulement 8 %⁶. Selon les guidelines du *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN-www.nccn.org), un suivi clinique peut être envisagé pour les patients présentant un nodule thyroïdien avec une FNA de diagnostic indéterminé si les résultats des tests moléculaires, intégrés aux données cliniques et échographiques, sont associés à un risque de cancer similaire au risque de cancer observé pour les FNA de diagnostic bénin ($\leq 5\%$). De plus, cette étude a permis de détecter des mutations ponctuelles, or les cancers thyroïdiens se caractérisent également par des translocations de gènes tels que RET/PTC ou PAX8/PPARG², ces translocations menant à des gènes de fusion. La recherche de ces gènes de fusion, qui peut également être réalisée par NGS, pourrait permettre d'affiner encore le risque de malignité des patients avec une FNA de diagnostic indéterminé, comme récemment décrit par une autre équipe (avec un risque de malignité pour les patients pour lesquels aucune mutation ou aucun gène de fusion n'a été retrouvé variant de 2,8 % à 4 % selon les études)^{8,9}.

L'étude de l'équipe du Professeur Salmon⁶ a, par ailleurs, reçu le Prix Cotton 2015, attribué au meilleur article publié dans *Histopathology*, article ayant le plus grand potentiel au niveau des applications cliniques. Cette étude préliminaire est suivie d'une étude de validation, en cours de réalisation au laboratoire d'anatomie pathologique, et du développement d'un panel reprenant, non seulement les mutations ponctuelles mais également les gènes de fusion, grâce au soutien d'une bourse de recherche dans un domaine innovant du Conseil médical de l'Hôpital Erasme et du Fonds Y. Boel. Le résultat attendu est un modèle de classification des patients en intégrant les données cytologiques, moléculaires et cliniques afin de mieux orienter les décisions thérapeutiques.

Conflits d'intérêt : néant.

BIBLIOGRAPHIE

1. Yeung MJ, Serpell JW : Management of the solitary thyroid nodule. *Oncologist* 2008 ; 13 : 105-12
2. Xing M, Haugen BR, Schlumberger M : Progress in molecular-based management of differentiated thyroid cancer. *Lancet* 2013 ; 381 : 1058-69
3. Xing M : Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat Rev Cancer* 2013 ; 13 : 184-99
4. Filicori F *et al.* : Risk stratification of indeterminate thyroid fine-needle aspiration biopsy specimens based on mutation analysis. *Surgery* 2011 ; 150 : 1085-91
5. Nikiforov YE *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

6. Le Mercier M *et al.* : Next-generation sequencing improves the diagnosis of thyroid FNA specimens with indeterminate cytology. *Histopathology* 2015 ; 66 : 215-24
7. Nikiforova MN *et al.* : Targeted Next-Generation Sequencing Panel (ThyroSeq) for Detection of Mutations in Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2013 ; 98 : E1852-60
8. Nikiforov YE *et al.* : Impact of the Multi-Gene ThyroSeq Next-Generation Sequencing Assay on Cancer Diagnosis in Thyroid Nodules with Atypia of Undetermined Significance/Follicular Lesion of Undetermined Significance Cytology. *Thyroid* 2015 ; 25 : 1217-23
9. Nikiforov YE *et al.* : Highly accurate diagnosis of cancer in thyroid nodules with follicular neoplasm/suspicious for a follicular neoplasm cytology by ThyroSeq v2 next-generation sequencing assay. *Cancer* 2014 ; 120 : 3627-34

Correspondance et tirés à part :

N. D'HAENE
Hôpital Erasme
Laboratoire d'Anatomie Pathologique
Route de Lennik 808
1070 Bruxelles
E-mail : Nicky.D.Haene@erasme.ulb.ac.be

Travail reçu le 3 mars 2016 ; accepté dans sa version définitive le 8 mars 2016.