



UNIVERSITE LILLE 2 DROIT ET SANTE
FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG

Année : 2017

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE

**Intérêt de la recherche de la mutation BRAF^{V600E} en tant que
marqueur moléculaire de malignité sur produit de cytoponction
thyroïdienne**

**À partir d'une série de 143 cas évalués au CHRU de Lille entre mars 2010 et
juillet 2016**

Présentée et soutenue publiquement le 28 juin 2017 à 16 heures
Au Pôle Recherche de la faculté de Médecine de Lille
Par Flora TOULLET

JURY

Président :

Madame le Professeur Marie-Christine VANTYGHM

Assesseurs :

Monsieur le Professeur Pascal PIGNY

Madame le Professeur Emmanuelle LETEURTRE

Monsieur le Professeur Jean-Louis WEMEAU

Directeur de Thèse :

Madame le Docteur Miriam LADSOUS

Avertissement

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Liste des abréviations

ALK	<i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>
ATA	<i>American Thyroid Association</i>
BRAF	sous-unité B du gène <i>RAF (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma)</i>
BRAF ^{V600E}	Forme mutée de BRAF
CA	Carcinome Anaplasique
CBP	Centre de Biologie et Pathologie
CHRU	Centre Hospitalier Régional Universitaire
CMT	Carcinome Médullaire Thyroïdien
CV	Carcinome Vésiculaire
EGF	<i>Epithelial Growth Factor</i>
ERK	<i>Extra-cellular signal-Regulated Kinase</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
MACIS	<i>presence of Metastasis, Age at diagnosis, Completeness of surgical resection, presence of Invasion, tumor Size</i>
mCPT	Microcarcinome Papillaire Thyroïdien
MEK	<i>Mitogen-activated Extracellular signal-regulated Kinase</i>
miARN	micro ARN
MT	Forme Mutée
NEM 2	Néoplasie Endocrinienne Multiple de type 2
NIFTP	<i>Non Invasive Follicular Thyroid neoplasm with Papillary-like nuclear features</i>
NIS	<i>Na/I Symporter</i>

NTRK1	<i>Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PAX8	<i>Paired box gene 8</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PPAR γ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma</i>
RAS	<i>Rat Sarcoma</i>
RET/PTC	REaranged during Transfection/Papillary Thyroïd Carcinomas
Se	Sensibilité
Sp	Spécificité
SUV	<i>Standardized Uptake Value</i>
TI-RADS	<i>Thyroid Imaging-Reporting and Database System</i>
TNM	Tumor, lymph Node, distant Metastasis
TSH	<i>Thyroid-Stimulating Hormone, Thyréostimuline</i>
VPN	Valeur Prédictive Négative
VPP	Valeur Prédictive Positive
WT	Forme Sauvage

Table des matières

Résumé.....	1
Introduction.....	3
I. Le nodule thyroïdien : généralités	5
II. Le Cancer Thyroïdien.....	7
A. Epidémiologie	7
B. Anatomopathologie.....	8
C. Physiopathologie de la tumorigénèse thyroïdienne	11
1. Voies de signalisation de la tumorigénèse thyroïdienne	11
2. Anomalies moléculaires de la voie des MAPK impliquées dans la carcinogénèse du CPT	12
a) Mutations ponctuelles activatrices de l'oncogène BRAF	13
b) Mutations ponctuelles activatrices de l'oncogène RAS.....	15
c) Réarrangements chromosomiques de type RET/PTC.....	15
d) Réarrangement chromosomique TRK	16
e) Réarrangement chromosomique ALK.....	16
3. Rôle des microARNs	19
III. Les outils du diagnostic.....	20
A. L'examen clinique	21
B. L'échographie thyroïdienne.....	22
C. L'examen cytologique du produit de cytoponction thyroïdienne.....	29
D. L'évaluation scintigraphique.....	34
IV. Place de la recherche de la mutation BRAF ^{V600E} dans la stratégie de prise en charge des nodules thyroïdiens	36
A. Intérêt diagnostique	37
B. Intérêt pronostique.....	38
C. BRAF ^{V600E} dans les microcarcinomes papillaires.....	40
V. Objectif de notre travail	41
Matériels et méthodes	43
I. Type d'étude et population initiale.....	43
II. Méthodologie et recueil des informations.....	44
A. Les données cliniques	44
B. L'échographie cervicale	44
C. La cytoponction	45
1. Analyse cytologique.....	45
2. Analyse moléculaire	46
III. Statistiques	50
Résultats	51
I. Répartitions échographique, cytologique et histologique des nodules.....	53
A. Echographiques.....	53
B. Cytologiques.....	53
C. Histologiques	55
II. Résultats de la recherche de mutation BRAF ^{V600E}	58
A. Selon TIRADS	59
B. Selon Bethesda	59
C. Selon l'histologie.....	61

III. Valeur diagnostique de la présence de la mutation BRAF ^{V600E}	64
A. Dans l'ensemble des nodules opérés	64
B. Parmi les nodules de cytologie indéterminée (Bethesda III, IV, V)	64
C. Impact diagnostique de la mutation BRAF ^{V600E}	66
IV. Mutation BRAF ^{V600E} et éléments pronostiques.....	70
Discussion	73
Conclusion	89
Références bibliographiques	91

RESUME

Contexte : La prévalence grandissante des nodules thyroïdiens, abondamment cliniquement et échographiquement diagnostiqués contraste avec la faible proportion de cancers en leur sein. L'enjeu en pathologie nodulaire thyroïdienne est de résoudre le dilemme diagnostique des nodules de cytologie indéterminée, afin de limiter le nombre de chirurgies diagnostiques. La mutation hot spot BRAF^{V600E}, spécifique des carcinomes papillaires thyroïdiens (CPT), est la plus fréquente des anomalies moléculaires identifiées sur produit de cytoponction thyroïdienne. Le but de notre travail était de mettre au point la technique de détection de la mutation BRAF^{V600E} sur produit de cytoponction et d'étudier son intérêt dans l'évaluation diagnostique des nodules thyroïdiens au CHRU de Lille.

Méthode : Nous avons rétrospectivement répertorié les données cliniques, échographiques, cytologiques, histologiques et de biologie moléculaire de 143 patients ayant bénéficié de la recherche de la mutation BRAF^{V600E} sur produit de cytoponction de nodule thyroïdien entre mars 2010 et juillet 2016.

Résultats : La mutation a été identifiée dans 17 prélèvements, soit 12 % des nodules de notre série. Plus particulièrement, seulement 4 % des nodules de cytologie indéterminée étaient porteurs de la mutation (représentant 14 % des nodules Bethesda III et 8 % des nodules Bethesda V, tandis qu'elle n'a été détectée dans aucun des nodules Bethesda IV). Les sensibilités diagnostiques de ce test, calculées au sein de l'ensemble des nodules opérés, puis des nodules de cytologie indéterminée ayant été opérés, étaient respectivement de 30 % (IC95% [18,8;44,1]) et de 12 % (IC95% [2,55; 31,2]), augmentant les performances diagnostiques de l'examen cytologique dans notre série de 5,4 % seulement. Bien qu'associée aux sous-types histologiques agressifs (53 % vs. 16 %, p=0,02), sa faible prévalence ne nous a pas permis de lui justifier un intérêt pronostique à l'échelle individuelle.

Conclusion : Les résultats de l'application de la recherche de la mutation BRAF^{V600E} dans notre centre sont décevants, sa faible sensibilité diagnostique ne permettant pas de lever de façon significative l'incertitude diagnostique des nodules de cytologie indéterminée. D'autres outils de biologie moléculaire, de développement plus récent, pourraient être utilisés.

Introduction

Jusque dans les années 1980, seule la palpation permettait la détection des nodules thyroïdiens. Depuis l'avènement de l'échographie, leur incidence ne cesse d'augmenter. Si environ 5 % de la population générale présente un nodule palpable (1), l'échographie porte ce taux à 67 % (2). Il en découle une augmentation de la prescription d'examen complémentaires permettant leur évaluation, notamment des cytoponctions, dont le nombre a doublé aux Etats-Unis entre 2006 et 2011, ainsi que de leur prise en charge chirurgicale (augmentation de 31 % aux Etats-Unis sur la même période) (3). Parmi ces nodules, 5 à 6 % sont des cancers, soit 8211 nouveaux cas de cancers thyroïdiens en France en 2012 parmi une population de 66 millions d'habitants, le positionnant au cinquième rang des cancers les plus fréquents chez la femme. Cependant son pronostic reste excellent (0.2 % de la mortalité par cancer) (4).

Ce contraste entre la fréquence grandissante de ces nodules abondamment cliniquement et échographiquement diagnostiqués, et la faible proportion de cancers, rend nécessaire le développement d'outils performants afin de différencier les nodules bénins des nodules malins, en vue d'une prise en charge adaptée. Si le contexte clinique, la sémiologie échographique, et l'examen cytologique du matériel de cytoponction permettent le plus souvent d'orienter la prise en charge, l'incertitude persiste pour 15 à 30 % des nodules (catégories III, IV et V de la classification de Bethesda) pour lesquels le cytologiste ne peut ni affirmer la bénignité, ni exclure la malignité. L'exérèse chirurgicale de principe est alors bien souvent la solution à ces situations de diagnostic incertain, conduisant à un grand nombre de chirurgies réalisées pour des nodules se révélant finalement bénins, donc inutiles.

Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis une meilleure connaissance des anomalies moléculaires présentes dans les cancers thyroïdiens, et l'objectif est actuellement de lui donner une place diagnostique, en particulier pour ces nodules indéterminés ou suspects. La mutation de l'oncogène *BRAF* est l'altération moléculaire la plus fréquente dans les cancers thyroïdiens papillaires, et la plus étudiée à visée diagnostique et pronostique à ce jour.

Nous présentons dans ce travail une étude rétrospective portant sur la valeur diagnostique de la recherche de la mutation *BRAF*^{V600E} dans l'évaluation préopératoire

de patients présentant une pathologie nodulaire thyroïdienne dans notre centre au CHRU de Lille, et en particulier en ce qui concerne les nodules de cytologie indéterminée.

I. Le nodule thyroïdien : généralités

Le nodule thyroïdien constitue une hypertrophie individualisée au sein de la glande thyroïde. Evénements communs du développement et du vieillissement de la thyroïde, les nodules thyroïdiens sont très fréquents, leur prévalence dans les pays où l'apport iodé est suffisant (Etats-Unis, Europe) étant évaluée à 5 % chez la femme et 1 % chez l'homme par la palpation cervicale (5–7). Leur prévalence échographique est beaucoup plus élevée, évaluée entre 19 et 67 %, chiffres variant en partie avec la sensibilité de la sonde utilisée (8,9). Dans l'étude SU.VI.MAX menée en France chez des adultes âgés de 35 à 60 ans, la prévalence de nodules détectés par une sonde de 7,5 MHz était de 14,5 % (10), tandis qu'elle était de 68 % avec une sonde de 13 MHz dans une population allemande d'âge moyen de 56 ans (9). Une étude prospective réalisée aux Etats-Unis et portant sur 100 sujets asymptomatiques décrivait une prévalence échographique de 67 %, et une concordance radio-clinique de 49 % (2).

Cette fréquence s'accroît avec l'âge, la prévalence échographique étant équivalente à celle de la décennie des sujets (20 % à 20 ans, 70 % à 70 ans...) (11). Il existe une prédisposition familiale à la nodulogénèse, une étude danoise portant sur des paires de jumeaux suggérait notamment qu'elle relevait pour 2/3 de facteurs génétiques et pour 1/3 de facteurs environnementaux comme le tabac (12). D'autres facteurs constitutionnels prédisposent à la survenue de nodules comme le sexe féminin (sex-ratio homme-femme variant entre 1 : 1,2 et 1 : 4,3 selon les séries) et la parité (la proportion est trois fois moindre chez les nullipares). L'acromégalie, par l'hyper-somatotropisme, et l'hyperinsulinisme, fréquente en cas d'obésité, constituent des terrains favorisant la formation de nodules (13). La carence relative en iode et le taux de TSH stimulent la croissance des cellules thyroïdiennes et a fortiori la nodulogénèse (14,15). Un antécédent d'irradiation cervicale, particulièrement durant l'enfance ou l'adolescence augmente le risque de survenue de nodules et de cancers (risque relatif multiplié par 2 ou 3). L'irradiation externe accidentelle lors de l'accident de Tchernobyl a entraîné une augmentation du risque de nodules et de cancers thyroïdiens chez les enfants exposés en Russie, en Biélorussie et en Ukraine, mais ce risque n'a pas été établi en France (4,14).

La majorité de ces formations sont bénignes (95 % des cas), correspondant à des adénomes, parfois à des kystes, et s'intègrent le plus souvent au sein de dystrophies plurinodulaires thyroïdiennes diffuses se constituant progressivement au cours du temps. Alors qu'on observe dans près de deux tiers des cas une régression ou une stabilisation des nodules apparemment bénins à 5 ans, d'autres évoluent au cours des années (20 à 56 % présentent une augmentation de volume de 15 % ou plus à 5 ans), sans que ce facteur ne soit prédictif de malignité (16,17).

L'échographie cervicale étant devenue un examen de routine, de petits nodules thyroïdiens parfois non palpables, sont diagnostiqués de plus en plus fréquemment et dénommés « incidentalomes thyroïdiens » (9,18). Lorsqu'ils sont infracentimétriques, on parle de « micronodules », et leur majorité resteront infracliniques, même en cas de nodule malin (11). En l'absence de signe péjoratif associé (adénopathie, extension extra capsulaire), le risque de malignité n'étant pas lié à la taille du nodule, ils ne requièrent pas d'investigation supplémentaire ni de prise en charge thérapeutique, et seule une surveillance échographique à intervalles réguliers (tous les 1 à 2 ans) est recommandée (7).

II. Le Cancer Thyroïdien

A. Epidémiologie

Si une faible proportion de ces nodules correspond à un cancer (5 à 10 % (19)), le cancer thyroïdien, représentant 1 à 2 % des diagnostics de cancers solides (20), est le plus fréquent des carcinomes endocrines (20).

L'incidence du cancer thyroïdien ne cesse d'augmenter dans le monde depuis les dernières décennies. En France, son incidence chez l'homme et chez la femme était respectivement de 1,1 et 2,8 cas pour 100 000 personnes en 1980, et de 5,5 et 13,8 cas pour 100 000 en 2012, soit une augmentation de 5% par an (4). Le cancer thyroïdien est désormais classé au 5^{ème} rang des cancers chez la femme en France, et au troisième aux Etats-Unis (21,22).

Cette augmentation est principalement liée à l'évolution de l'incidence des cancers papillaires, qui sont de très bon pronostic. En résulte la différence d'évolution entre l'incidence et la mortalité, cette dernière étant globalement stable sur la même période, actuellement de 0,2 % quel que soit le sexe, classant le cancer thyroïdien au 18^{ème} rang des décès parmi les 19 localisations examinées par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) en 2013 (4). Le carcinome papillaire thyroïdien (CPT) peut apparaître à tout âge, son incidence maximale se situant entre 30 et 50 ans (âge moyen : 45 ans), et le sex-ratio est de 2 femmes pour 1 homme.

L'évolution de l'incidence du cancer thyroïdien est principalement liée à la détection précoce de microcarcinomes papillaires, conséquence de l'amélioration des techniques échographiques (23). Aux Etats-Unis, leur proportion parmi les cancers thyroïdiens diagnostiqués en 1988-1889 était de 25 %, et de 39 % en 2008-2009 (24). Cette notion est confortée par le fait que l'incidence des cancers plus volumineux reste stable (25). La majorité de ces cancers de moins de 1 cm, de par leur évolution lente, seraient probablement restés asymptomatiques, comme en atteste la prévalence des microcarcinomes thyroïdiens des séries autopsiques (2,7 à 30 % en fonction des populations (26,27)). Dans une étude japonaise observationnelle, seuls 16 % des microcarcinomes non opérés ont progressé à 10 ans, sans augmentation du risque de

récidive que la chirurgie soit réalisée précocement ou lors de la progression (28). Par ailleurs, alors que l'évolution carcinologique est favorable, que le patient ait bénéficié d'une surveillance active ou d'une thyroïdectomie immédiate, les effets secondaires de cette dernière (hypoparathyroïdie, hématome) sont significatifs (29).

Leenhardt *et al.* (30), dans une étude rétrospective portant sur l'évolution des pratiques de prise en charge des pathologies thyroïdiennes en France entre 1980 et 2000, ont décrit une augmentation des découvertes fortuites de cancer lors de l'examen anatomopathologique (de 12,5 % en 1980 à 37 % en 2000), ainsi qu'une augmentation de la proportion de thyroïdectomies totales. Cette étude met également en évidence une augmentation de l'utilisation de l'échographie et le développement de la cytoponction à l'aiguille fine lors de la prise en charge diagnostique des pathologies de la thyroïde, permettant un diagnostic plus précoce des tumeurs de petite taille. Enfin, elle rapporte une évolution des pratiques anatomopathologiques, permettant la réalisation de coupes de plus en plus fines, aboutissant à la découverte de cancers de quelques millimètres.

D'autres facteurs pourraient participer à l'augmentation de l'incidence du CPT, comme la supplémentation des carences iodées, réduisant la proportion de cancers d'histologie agressive au profit des CPT, et la re-classification de certains sous types vésiculaires en papillaires.

B. Anatomopathologie

Les cancers différenciés issus des cellules folliculaires représentent 90 % des cancers thyroïdiens, le carcinome papillaire thyroïdien étant le plus fréquent (85% des cancers thyroïdiens). Son diagnostic histologique repose sur l'identification d'anomalies nucléaires caractéristiques (noyaux à bords irréguliers, se chevauchant, avec inclusion intranucléaire de cytoplasme, rainurés). Le CPT classique (CPT cl.), défini par une architecture constituée de papilles, est caractérisé par sa fréquente extension métastatique ganglionnaire cervicale. Son pronostic, globalement bon, avec en particulier une mortalité à 10 ans des CPT bien différenciés inférieure à 5 % (31),

est lié à la taille et au nombre des adénopathies loco-régionales ainsi qu'à la présence d'une extension extra-ganglionnaire.

On distingue plus d'une dizaine de sous-types histologiques de CPT. Le microcarcinome papillaire (mCPT), défini par une taille inférieure ou égale à 1 cm, est devenu l'un des variants les plus fréquents du fait de l'augmentation de sa détection échographique (10 à 40 % en fonction des populations). Il est identifié par l'examen anatomopathologique de la thyroïde dans des séries autopsiques chez près d'un tiers des patients décédés d'une pathologie non thyroïdienne (32), attestant de son excellent pronostic (mortalité inférieure à 1 %, récurrence ganglionnaire locorégionale variant entre 2 et 6 % et à distance entre 1 et 2 % (28)). Il existe des variants vésiculaires de CPT (architecture constituée de vésicules et non de papilles), dont le pronostic reste bon. Parmi ces variants vésiculaires, une nouvelle entité a été décrite récemment, le CPT d'architecture vésiculaire encapsulé sans angio-invasion (NIFTP, pour *Non Invasive Follicular Thyroid neoplasm with Papillary-like nuclear features*), défini par la présence de caractéristiques nucléaires de CPT, une architecture folliculaire, et l'absence d'invasion de la capsule lésionnelle (qui doit être échantillonnée de façon exhaustive) (33). Son pronostic est excellent, avec un risque nul de morbidité et de mortalité secondaires, si bien qu'il ne devrait plus être considéré comme un cancer dans la nouvelle classification OMS à paraître en 2017. Le variant vésiculaire infiltrant présente un risque d'extension métastatique similaire à celui du CPT classique, tandis que d'autres sous-types sont plus agressifs : le CPT à cellules hautes, à cellules cylindriques, « hobnail » (en clou de tapissier), trabéculaire (architecture solide sous forme de massifs pleins), ou sclérosant diffus (atteinte diffuse bilatérale, fibrose marquée).

Le cancer vésiculaire, moins fréquent (15 %), ne présente pas d'anomalie nucléaire, et reste de bon pronostic même s'il présente plus fréquemment des localisations à distance du fait d'une dissémination hématogène.

Il existe une forme de pronostic intermédiaire, le carcinome peu différencié, dont la survie moyenne est de 3,2 ans, et représentant approximativement 6 % des cancers thyroïdiens.

Le carcinome anaplasique (CA) (ou indifférencié), présente un pronostic effroyable, avec une survie médiane de 5 mois et une survie à 1 an de 20 % (34). Il représente moins de 2 % des cancers thyroïdiens (34).

Les cancers peu différenciés et indifférenciés peuvent survenir de novo, mais la plupart d'entre eux proviennent de la dédifférenciation progressive de cancers papillaires ou vésiculaires.

Le cancer médullaire de la thyroïde (CMT) dérive des cellules parafolliculaires sécrétant la calcitonine, et représente 3 à 5 % des cancers thyroïdiens. Sa mortalité à 10 ans est de 25%, dépendant principalement de l'âge au diagnostic et de son extension locorégionale et à distance (35).

Les autres tumeurs malignes (lymphomes, métastases intra-thyroïdiennes de cancers solides) sont beaucoup plus rares.

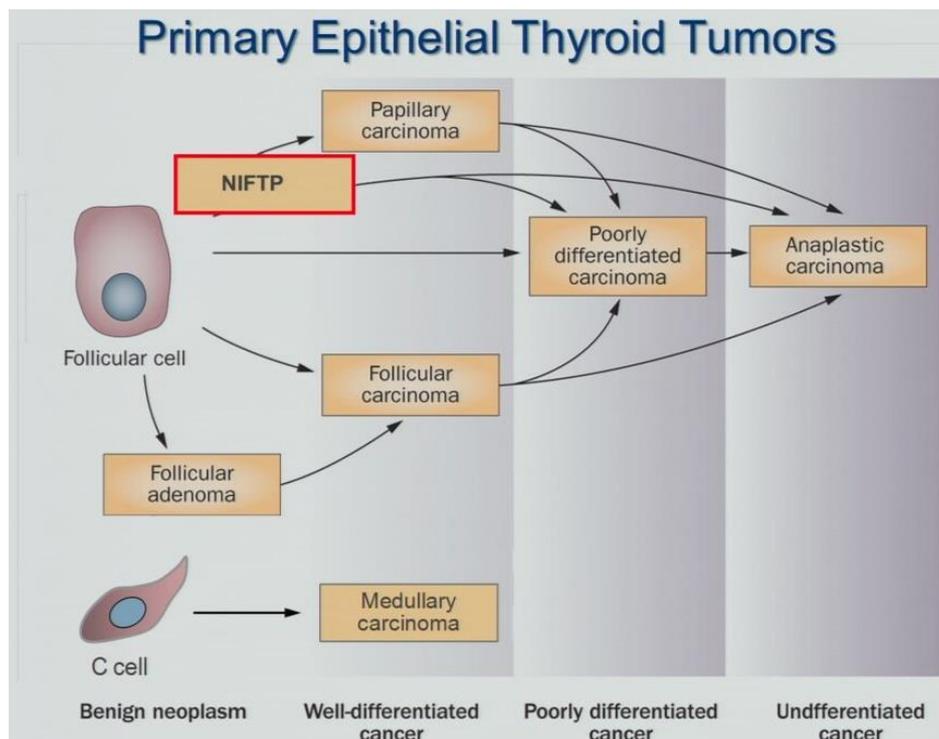


Figure 1 : Les différents types histologiques de tumeurs issues de l'épithélium thyroïdien, Nikiforov Institut Gustave Roussy 2017, d'après Nikiforova 2008 (36)

C. Physiopathologie de la tumorigénèse thyroïdienne

Les dix dernières années sont marquées par de réels progrès dans la compréhension des phénomènes physiopathologiques à l'origine des cancers thyroïdiens, en particulier grâce au développement des techniques de biologie moléculaire.

1. Voies de signalisation de la tumorigénèse thyroïdienne

Trois principales voies de signalisation sont impliquées dans la tumorigénèse thyroïdienne (Figure 2) :

- La voie de l'AMP cyclique pour les tumeurs bénignes hyper-sécrétantes (adénomes toxiques), activée par des mutations activatrices du récepteur de la TSH ou de la protéine Gs alpha (non représenté sur la figure 2) ;
- L'activation constitutive de la voie des MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*), ou voie RAS-RAF-MEK-ERK, qui est nécessaire à l'apparition des cancers papillaires,
- Enfin, il existe un rôle prépondérant de la voie des PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*) dans la formation des cancers vésiculaires.

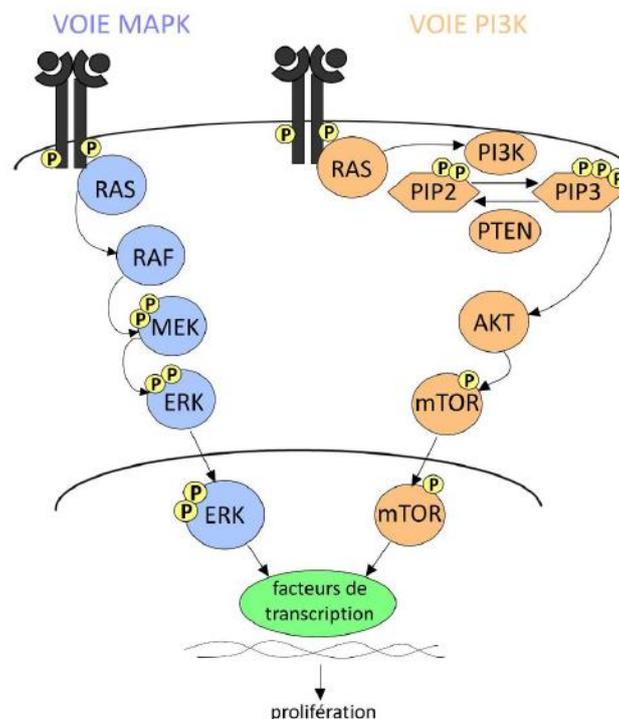


Figure 2 : Les voies de signalisation impliquées dans la tumorigénèse thyroïdienne (d'après Nikiforova, 2009 (37))

Les MAPK représentent une famille d'enzymes permettant, de façon physiologique, de transmettre un signal provenant de l'activation de récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase à différentes cibles intracellulaires. Il existe 4 groupes différents de MAPK, dont celui impliqué dans les cancers papillaires thyroïdiens : celui de la voie MEK-ERK. Cette dernière est par ailleurs suractivée dans environ un tiers des cancers chez l'Homme, différentes anomalies moléculaires pouvant conduire à une activation aberrante de cette voie (38).

La voie MAPK-ERK est activée physiologiquement suite à une stimulation cellulaire par des ligands, comme les facteurs de croissance EGF (*Epithelial Growth Factor*) et PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), responsables de la dimérisation et de l'activation de récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase, via leur autophosphorylation. Elle est ensuite constituée des protéines RAS (*Rat Sarcoma*), RAF (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*), MEK (*Mitogen-activated Extracellular signal-regulated Kinase*) et ERK (*Extra-cellular signal-Regulated Kinase*), activées de façon séquentielle via une cascade de phosphorylation, et aboutit à l'activation de différentes cibles dont des facteurs de transcription contrôlant l'expression de nombreux gènes, et notamment certains impliqués dans le contrôle de la prolifération, de la différenciation, de la survie ou de la mort cellulaire.

2. Anomalies moléculaires de la voie des MAPK impliquées dans la carcinogénèse du CPT

Le CPT est un des cancers présentant la plus faible densité de mutations mise en évidence après séquençage de son génome, preuve biologique de son caractère relativement indolent (39). La plupart des anomalies moléculaires connues à l'heure actuelle pour être impliquées dans les cancers thyroïdiens de souche vésiculaire sont somatiques, présentes uniquement dans le tissu tumoral, par opposition aux anomalies germinales (les plus fréquentes étant les mutations activatrices de l'oncogène RET, responsable des formes familiales de cancers médullaires).

La voie des MAPK joue un rôle prépondérant essentiel dans la tumorigénèse du CPT, les anomalies moléculaires les plus fréquentes étant des mutations ponctuelles activatrices d'oncogènes survenant de façon sporadique (mutation de *BRAF* dans 60% des cas, et de *RAS* dans 15% des cas), et le second représenté par les

réarrangements chromosomiques géniques (*RET/PTC*, *TRK* et *ALK*, dans 12% des cas) (40).

a) Mutations ponctuelles activatrices de l'oncogène BRAF

Le gène *BRAF* est situé sur le chromosome 7 (7q34). Il code pour une serine-thréonine kinase appartenant à la famille des protéines RAF dont il existe 3 isoformes (*ARAF*, *BRAF*, *CRAF*), toutes impliquées dans la voie MAPK. La protéine *BRAF* possède l'activité kinase la plus importante et elle est un élément clef de cette voie de signalisation (41).

La mutation du domaine kinase de *BRAF* dans la carcinogénèse de plusieurs types de cancers chez l'homme, comme le mélanome et le cancer colorectal, a été initialement mise en évidence en 2000 (42), et son implication dans la progression du CPT a été décrite par Knauf et al. en 2005 à partir d'un modèle murin (43). Inaugurant le développement tumoral, la mutation activatrice de l'oncogène *BRAF* est responsable d'un phénomène d'« addiction oncogénique », la prolifération tumorale du CPT restant sous la dépendance de cette mutation initiatrice (44).

Avec une prévalence de 40 à 45 %, les mutations activatrices de *BRAF* sont l'anomalie génétique la plus fréquemment associée aux cancers papillaires (45). La mutation identifiée de façon quasi exclusive est située dans le domaine catalytique de la kinase, la rendant environ 500 fois plus active que *BRAF* à l'état sauvage. La fréquence de la mutation y étant beaucoup plus élevée qu'en d'autres sites de la molécule d'ADN, on parle de mutation « hot spot ». Il s'agit de la substitution d'une thymine par une adénine en position 1799 du gène, au niveau de l'exon 15, responsable d'un changement d'une Valine par un Glutamate en position 600 de la protéine (mutation nommée *BRAF*^{V600E}). Dans de rares cas (1 à 2 %), d'autres mutations comme la mutation K601E ou des réarrangements ont été mis en évidence, en particulier le réarrangement *AKAP9/BRAF* en cas d'antécédent d'irradiation, et plus de 40 mutations différentes ont été identifiées (45).

Dans les cellules sauvages, à l'état basal, RAF est maintenu dans une conformation inactive dans le cytosol. Après stimulation par un facteur de croissance,

RAF est recruté à la membrane plasmique où il interagit avec RAS. Cette interaction, par des phénomènes de phosphorylation, permet à RAF de se dimériser, à l'origine d'une activation de MEK, puis de ERK, ce dernier exerçant un rétrocontrôle négatif sur RAF, permettant une régulation de la voie. Lorsqu'il existe une mutation de l'oncogène *BRAF*, celui-ci peut agir en tant que monomère, forme insensible au rétrocontrôle négatif de ERK. Il en résulte une activation constitutive de BRAF, une stimulation chronique de la voie des MAP Kinases et par conséquent une augmentation de la prolifération et de la survie cellulaire, à l'origine de la tumorigénèse.

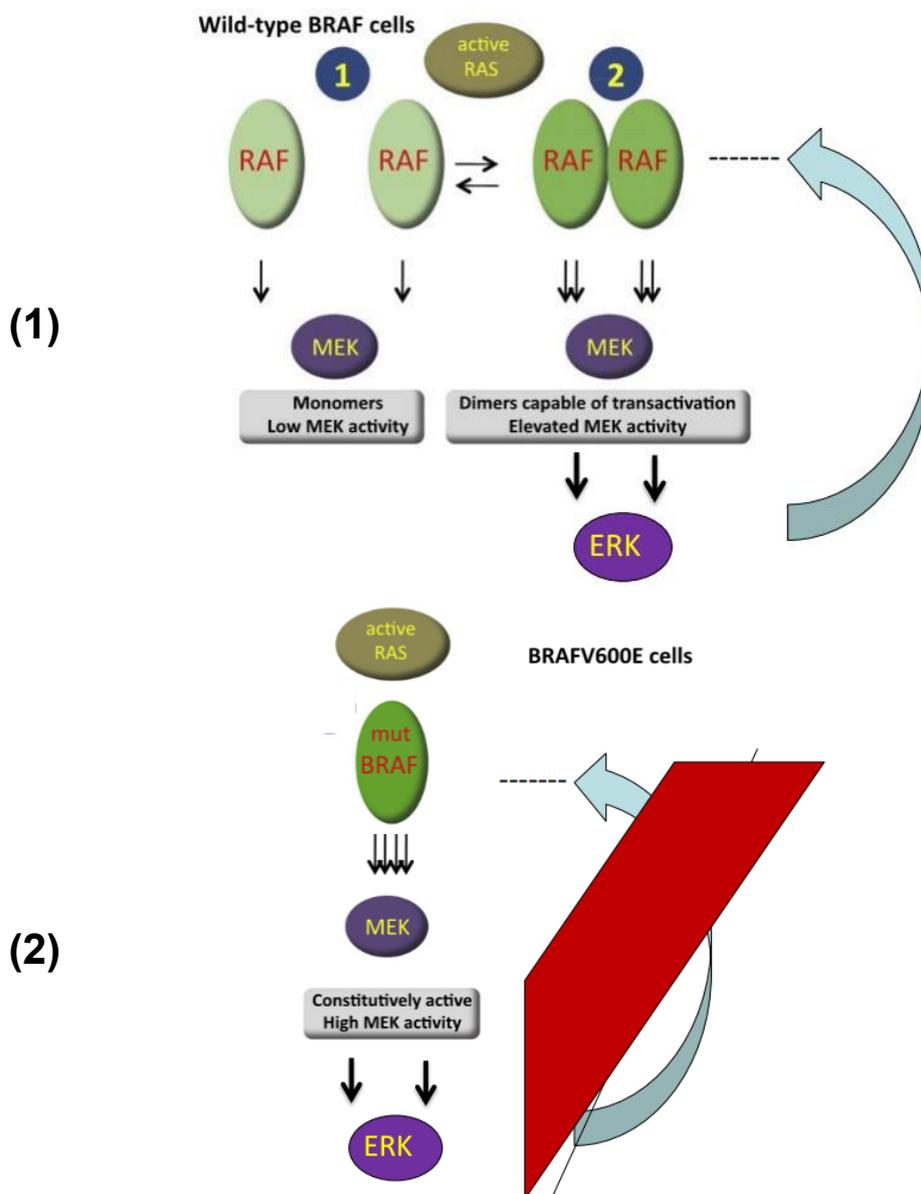


Figure 3 : Activation de la voie des MAPK par BRAF sous sa forme sauvage (1) et sous sa forme mutée BRAF^{V600E} (2), d'après Leboulleux S. Institut Gustave Roussy 2017, à partir de Poulikakos et al. (46)

La mutation « hot spot » activatrice BRAF^{V600E} est plus fréquemment identifiée au sein des carcinomes papillaires d'histologie classique (60 %) et des variants à cellules hautes (80 %), beaucoup moins au sein des variants vésiculaires de CPT (10%) (47), suggérant une dépendance de la tumorigénèse de ces derniers à d'autres anomalies moléculaires. Elle est également mise en évidence dans des microcarcinomes papillaires, suggérant son rôle initiateur précoce de la tumorigénèse. Une proportion plus faible de cancers anaplasiques et peu différenciés dérivés de carcinomes papillaires présentent cette mutation, sa présence au sein du contingent bien différencié comme du peu différencié suggérant son rôle dans la progression tumorale (48–50). Par ailleurs, la mutation BRAF^{V600E} n'a pas été rapportée dans les tumeurs folliculaires, qu'il s'agisse de cancers ou d'adénomes, ce qui en fait un marqueur spécifique de malignité pour les cancers papillaires et les cancers peu différenciés ou indifférenciés qui en dérivent (45).

b) Mutations ponctuelles activatrices de l'oncogène RAS

Les gènes *RAS* (*HRAS*, *KRAS* et *NRAS*) codent pour une protéine G localisée à la partie interne de la membrane plasmique, qui transmet en aval le signal provenant de récepteur à activité tyrosine kinase et permet ainsi l'activation de la voie MAPK, ainsi que d'autres voies de signalisation comme la voie PI3K-AKT. Dans le cancer thyroïdien, les mutations ponctuelles activatrices de *RAS* affectent les trois gènes, la plus fréquente étant celle du codon 61 de *NRAS*. Ces mutations bloquent l'activité GTPase de la protéine, la rendant constitutivement active. Les mutations du gène *RAS* ne sont pas spécifiques d'un type de tumeur thyroïdienne, ni de la malignité : mises en évidence dans les carcinomes papillaires, en particulier les variants vésiculaires, avec une fréquence de 10 à 20 %, elles le sont également dans 40 à 50 % des carcinomes vésiculaires et 20 à 40 % des adénomes vésiculaires (45).

c) Réarrangements chromosomiques de type RET/PTC

Il s'agit d'une fusion entre la portion C terminale du proto-oncogène *RET* (domaine à activité Tyrosine Kinase), exprimé dans les cellules para-folliculaires, et la partie N terminale du gène d'un partenaire de fusion exprimé dans le thyrocyte, et qui

a la capacité de s'homodimériser. Le produit de cette fusion est alors exprimé dans le thyrocyte, l'oncogène *RET* n'y étant normalement pas exprimé. La dimérisation constitutive de cette protéine de fusion permet l'activation du domaine catalytique de *RET* conduisant ainsi à l'activation constitutive de voies de signalisation, dont la voie des MAPK. Une douzaine de réarrangements RET/PTC ont été décrits dans la littérature, les plus fréquents étant RET/PTC 1 et 3 (45,51). Ils sont présents dans approximativement 20 % des carcinomes papillaires de l'adulte, avec une prévalence variable selon les régions et la sensibilité de la technique utilisée. Ils sont trouvés plus fréquemment dans les cancers papillaires post-radiques et ont notamment été décrits après l'accident de Tchernobyl (52). Les translocations à l'origine de ces gènes de fusion sont favorisées par la proximité spatiale des gènes concernés lors de l'interphase cellulaire, les prédisposant à cette recombinaison lors de la réparation des dommages à l'ADN causés par les radiations (53).

Enfin ils ont également été décrits dans quelques lésions bénignes thyroïdiennes, survenant alors dans une petite proportion des cellules de la lésion (événement non clonal), mais les réarrangements « clonaux » (impliquant la majorité des cellules néoplasiques) sont spécifiques des carcinomes papillaires thyroïdiens (54).

d) Réarrangement chromosomique TRK

Les réarrangements chromosomiques impliquant le gène *NTRK1* (*Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1*), aussi appelés réarrangements TRK, sont plus rares, mis en évidence dans 1 à 5 % des carcinomes papillaires, et plus fréquents en cas d'antécédents d'irradiation. Il s'agit de la fusion du gène *NTRK1*, codant pour un récepteur à activité tyrosine kinase, à une partie d'un autre gène situé sur le même chromosome (chromosome 1) ou un autre chromosome (55).

e) Réarrangement chromosomique ALK

Ce gène de fusion est mis en évidence dans 9 % des cancers thyroïdiens peu différenciés, 4 % des carcinomes anaplasiques et 1 % des CPT (56).

Ces événements moléculaires perturbant la voie des MAPK présentent deux caractéristiques importantes :

- Caractère, le plus souvent, mutuellement exclusif : une seule anomalie est présente au sein d'un carcinome. Ceci suggère qu'un événement moléculaire isolé de la voie suffit à l'activer de façon constitutive et à favoriser la prolifération tumorale. Il a néanmoins été décrit des CPT présentant simultanément un réarrangement RET/PTC et une mutation activatrice de l'oncogène *BRAF* (57,58),
- Ces anomalies ont pour conséquence commune l'activation constitutive de la voie des MAPK se traduisant par une activation de la protéine ERK par phosphorylation, favorisant une prolifération incontrôlée.

Cependant, si ces différentes anomalies moléculaires conduisent toutes à une augmentation en cascade de la phosphorylation des acteurs de la voie des MAPK, il existe une activation différente de cette voie selon le niveau de l'anomalie moléculaire, à l'origine de leur association avec des types histologiques et des caractéristiques cliniques différents. En particulier, l'activation de la voie des MAPK paraît plus forte dans les tumeurs présentant une mutation de *BRAF* en comparaison avec les tumeurs porteuses d'une autre anomalie moléculaire (40). Cela est lié à l'insensibilité du monomère au rétrocontrôle négatif exercé par ERK en cas de mutation *BRAF*^{V600E}, tandis que le signal induit par une mutation du gène *RAS* ou par un réarrangement chromosomique RET/PTC reste sensible à ce rétrocontrôle (Figure 4).

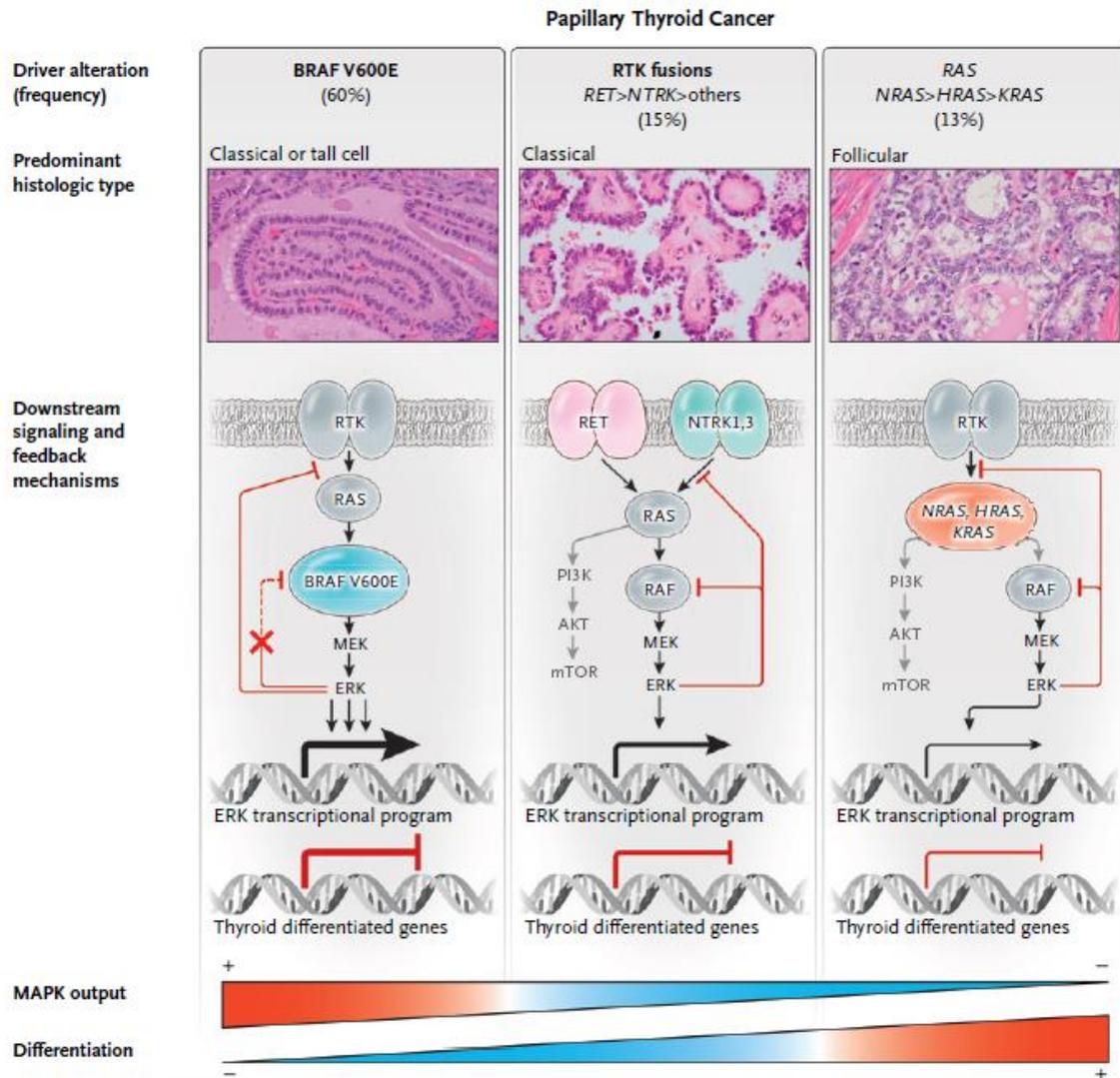


Figure 4: Conséquences fonctionnelles des principales anomalies moléculaires impliquées dans la voie des MAPK (d'après (40)).

D'autres anomalies moléculaires somatiques ont été identifiées au sein des CPT, comme le réarrangement chromosomique de type *PAX8/PPAR γ* . Il est le résultat d'une translocation (t(2;3) (q13,p25) aboutissant à la fusion entre le gène *PAX8* codant pour un facteur de transcription thyroïdien et le gène *PPAR γ* codant pour le récepteur de la prolifération et de l'activation du peroxysome, entraînant une surexpression de la protéine *PPAR γ* et ainsi l'activation de ses gènes cibles. S'ils sont présents dans 30 à 40 % des carcinomes vésiculaires, ils n'en sont néanmoins pas spécifiques puisque également mis en évidence dans les adénomes vésiculaires (2 à 10%) et quelques carcinomes papillaires de forme vésiculaire (45).

Tableau 1 : Prévalence des anomalies moléculaires mises en évidence dans les carcinomes thyroïdiens différenciés, d'après Nikiforov, *Molecular Diagnostics of Thyroid Tumors*, 2011 (45)

Anomalies moléculaires	Prévalence (%)
Carcinome papillaire	
BRAF	40-45
RET/PTC	10-20
RAS	10-20
TRK	< 5
Carcinome vésiculaire	
RAS	40-50
PAX8/PPARγ	30-35
PIK3CA	<10
PTEN	<10

3. Rôle des microARNs

Les micros ARNs (miARNs) constituent une classe de petits ARNs endogènes, non codant, régulant négativement l'expression des gènes. Des profils de miARNs ont été décrits dans plusieurs types de cancers. En particulier, dans le CPT, il a été montré que plusieurs miARNs sont surexprimés, suggérant un rôle dans la tumorigénèse thyroïdienne (59). Par ailleurs, le niveau de surexpression de certains miARNs est corrélé avec le statut mutationnel des CPT.

Le travail récent du consortium TCGA (The Cancer Genome Atlas) sur une large cohorte (environ 500 CPT) a confirmé ces variations au niveau de certains miRNA dans les CPT (60), et plusieurs études ont montré la faisabilité de leur quantification sur produit de cytoponction thyroïdienne (61–64).

III. Les outils du diagnostic

L'incidence du cancer de la thyroïde est particulièrement sensible aux pratiques médicales diagnostiques. L'enjeu en pathologie nodulaire est d'améliorer la sensibilité du diagnostic préopératoire, afin de proposer une prise en charge chirurgicale adaptée aux nodules malins la justifiant, et d'éviter les thyroïdectomies diagnostiques multiples. En effet, le sujet des thyroïdectomies revient de manière régulière dans l'actualité médicale et scientifique, tant au niveau national qu'international. Sosa JA et al. rapportait que 19,8 % des thyroïdectomies réalisées aux Etats-Unis en 2011 aboutissaient au diagnostic de cancer (3,65), tandis qu'en France, parmi plus de 35 000 thyroïdectomies réalisées en 2010, 17 % étaient des cancers et 20 % des nodules uniques bénins. Ainsi, en France, même s'il existe d'importantes disparités entre les régions, pour 4 cancers opérés on opère 5 nodules bénins (ratio de 0.8) (66). D'après Mazzaferri et al. (11) seuls 8 à 17 % des nodules réséqués devant une cytologie indéterminée s'avèrent finalement être des cancers.

Si la chirurgie permet un diagnostic certain grâce à l'examen anatomopathologique, et allège les contraintes d'une surveillance en cas de bénignité, elle n'est pas dénuée de risque (lésions récurrentielles compliquées de répercussions sur les cordes vocales, se traduisant par une dysphonie avec une voix bitonale dans 4 % des cas, lésions parathyroïdiennes à l'origine d'une supplémentation calcique au long court dans 1 % des cas, ou hématomes post opératoires). En cas de nodule finalement bénin, ces risques chirurgicaux n'étaient pas nécessaires et le patient se voit parfois pénalisé par la découverte fortuite d'un microcarcinome sur la pièce de thyroïdectomie. Par ailleurs, une chirurgie non adaptée à un risque carcinologique (lobo-isthmectomie, thyroïdectomie sans curage ganglionnaire) expose au risque de récidives.

En parallèle, la surveillance proposée en cas de diagnostic de bénignité incertain n'est pas dénuée de conséquences, qu'elles soient psychologiques liées à l'incertitude pour le patient, d'ordre médico-économique (coût des explorations et de la surveillance), ou médico-légal en cas de retard au diagnostic de nodule malin.

L'arsenal diagnostique repose actuellement sur la confrontation des informations cliniques, biologiques, échographiques et cytologiques, auxquelles s'ajoutent, dans certaines situations, les données scintigraphiques.

A. L'examen clinique

L'interrogatoire recherchera des facteurs de risques de malignité. Le seul facteur de risque démontré de carcinome thyroïdien est l'antécédent d'irradiation cervicale dans l'enfance. Cependant, des formes familiales de CPT sont décrites, et certains syndromes sont associés à la survenue de nodules et de cancers thyroïdiens (Polypose Adénomateuse Familiale, maladie de Cowden, Néoplasie Endocrinienne Multiple de type 2, complexe de Carney, syndrome de Mac Cune Albright). Devant la découverte d'un nodule thyroïdien, le sexe masculin, particulièrement après 60 ans, ou l'âge inférieur à 20 ans, sont des facteurs de risque de carcinome.

L'examen clinique évaluera la consistance, la mobilité à la déglutition, les aires ganglionnaires : la nature maligne d'un nodule est suspectée devant sa croissance rapide sur quelques semaines ou mois, sa consistance ferme et irrégulière, son adhérence aux tissus, son association à une dyspnée, une dysphagie, une toux ou une modification de la voix et a fortiori à des ganglions cervicaux (13).

Tableau 2 : Marqueurs cliniques de risque de malignité d'un nodule :

<p>Antécédents :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Personnels d'irradiation cervicale dans l'enfance - Familiaux de CPT, CMT, NEM2, maladie de Cowden, Polypose familiale, complexe de Carney, syndrome de Mc Cune Albright - Age < 20 ans ou > 60 ans - Sexe masculin
<p>Présentation clinique :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Croissance rapide en quelques semaines ou mois - Consistance ferme et irrégulière - Nodule fixé aux tissus sous-jacents
<p>Signes associés :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Adénopathie cervicale - Dysphagie, dyspnée - Paralysie récurrentielle

Devant la découverte d'un nodule, et a fortiori si sa taille est supérieure à 1 cm, un dosage de la TSH est indiqué, qui participera à guider la suite de la prise en charge. Subnormale, un examen scintigraphique sera nécessaire afin d'évaluer la fonctionnalité du nodule. Rarement malin, un nodule hyperfonctionnel ne nécessitera pas d'évaluation cytologique. À l'inverse, un taux de TSH dans les valeurs hautes de la norme est associé à une augmentation du risque de malignité et facteur de mauvais pronostic en cas de nodule thyroïdien, mais ce paramètre, vérifié à l'échelle d'une population, ne peut être utilisé comme marqueur de malignité à l'échelon individuel. Concernant la calcitonine plasmatique, dont le dosage est indispensable en cas de contexte familial ou clinique évocateur de NEM 2 ou de CMT, l'indication d'un dosage systématique lors de la découverte d'un nodule thyroïdien n'est pas consensuelle actuellement du fait de l'ambiguïté de son augmentation modérée dans certaines situations (hyperplasie des cellules C, microcarcinome médullaire) (7).

B. L'échographie thyroïdienne

L'échographie cervicale a pris une importance croissante dans l'exploration de la morphologie thyroïdienne, et en particulier des nodules, via son accessibilité et son faible coût. Pensée et effectuée en prenant en compte le contexte clinique et biologique, elle doit systématiquement être confrontée à la symptomatologie du patient.

Elle permet d'analyser de façon très fine et précise le parenchyme thyroïdien, de préciser les caractéristiques des formations nodulaires décelées, l'objectif dans cette indication étant de différencier les nodules malins des nodules bénins.

De nombreuses études ont montré que plusieurs signes échographiques pouvaient être utilisés pour définir un niveau de risque de malignité, décrits dans le tableau 3 (17,67–70). Aucun d'entre eux ne confère le même niveau de risque statistique de malignité, et aucun pris isolément n'est pathognomonique de malignité, mais l'association de plusieurs de ces signes accroît significativement le risque (71).

Tableau 3 : Signes échographiques évocateurs de la malignité d'un nodule thyroïdien (17)

Signes évocateurs de malignité
<ul style="list-style-type: none"> - Caractère solide fortement hypoéchogène - Contours flous ou festonnés - Nodule plus épais que large - Microcalcifications - Macrocalcifications - Effractions capsulaire - Envahissement des tissus adjacents - Vascularisation à prédominance intranodulaire - Index de dureté élevé en l'élastographie - Adénopathie satellite suspecte - Augmentation rapide de volume lors de la surveillance (>20 % en un an)

L'idée d'un score de stratification quantitative du risque de malignité en fonction de l'évaluation échographique est apparue pour la première fois au Chili, décrit par Horvath et al. (72) et porte le nom de TI-RADS (*Thyroid Imaging-Reporting and Database System*), par analogie avec le système BI-RADS utilisé en pathologie mammaire. Dans le but de faciliter son utilisation en routine par les radiologues et les cliniciens, il a été adapté et perfectionné par Gilles Russ au décours d'une première étude rétrospective portant sur 500 nodules, lui permettant de définir les valeurs prédictives positives et négatives de chaque signe échographique (Figures 5 et 6), et de définir un atlas lexical et un compte rendu standardisé (73). Le score TI-RADS ainsi obtenu, dont la sensibilité et la spécificité étaient respectivement de 95 % et 68 %, a ensuite été évalué par le même auteur dans une large étude prospective portant sur 4550 nodules (74,75), aboutissant au système de stratification du risque aujourd'hui utilisé en France, dans lequel 6 catégories de nodules sont décrites, associées à un niveau de risque de malignité croissant (Tableau 4).

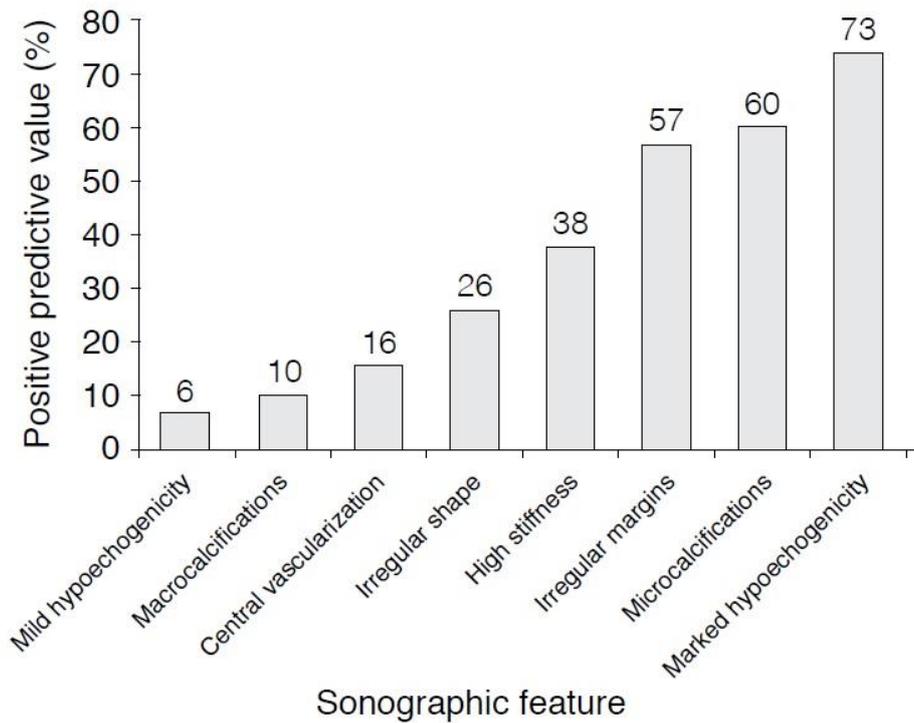


Figure 5 : Valeurs prédictives positives de malignité des signes échographiques, d'après G.Russ et al. (75)

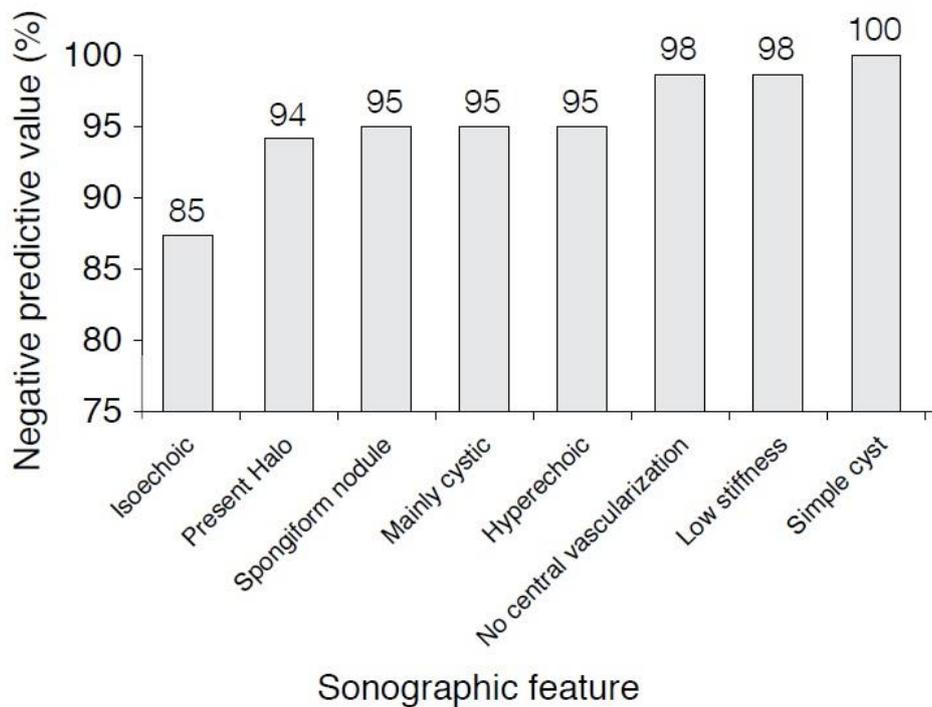


Figure 6 : Valeurs prédictives négatives de malignité des signes échographiques, d'après G.Russ et al. (75)

Tableau 4 : Score TI-RADS d'après G.Russ (74)

SCORE TI-RADS	DEFINITION ECHOGRAPHIQUE	SIGNIFICATION	RISQUE DE MALIGNITE (%)	% des nodules échographiés
1		Examen normal		
2	Kyste simple Nodule spongiforme « White knight »* Macrocalcifications isolées Thyroïdite subaigüe typique Amas isoéchogènes confluents	Bénin	≈ 0	3 %
3	Aucun des 5 signes forts** Isoéchogène ou Hyperéchogène	Très probablement bénin	0,25	60 %
4A	Aucun des 5 signes forts** Modérément hypoéchogène	Faible suspicion de malignité	6	33 %
4B	1 ou 2 signe fort(s)** Pas d'adénopathie	Forte suspicion de malignité	69	3,5 %

5	3 à 5 signes forts** ± adénopathie(s)	Pratiquement certainement malin	≈100	0,5 %
----------	--	---------------------------------------	------	-------

* Plage hyperéchogène circonscrite au sein d'une thyroïdite auto-immune

** Les 5 signes échographiques forts retenus comme suspects de malignité sont les suivants :

- Plus épais que large
- Contours irréguliers
- Microcalcifications
- Fortement hypoéchogène
- Indice de rigidité élevé en élastographie

Le signe le plus péjoratif doit être retenu pour la définition du nodule. Les figures 7, 8, 9 et 10 illustrent ce système de classification TI-RADS.

D'autres signes échographiques peuvent être utilisés pour moduler l'estimation du risque de malignité :

- Ils diminuent le risque : existence d'une composante kystique, d'un halo périphérique fin et continu,
- Ils augmentent le risque : forme ronde, macrocalcifications périphériques discontinues, vascularisation intra-nodulaire prédominante, adénopathie suspecte dans le territoire de drainage.

L'élastométrie, qui apporte des informations quantitatives sur la rigidité du nodule, mais dont la valeur diagnostique de malignité est controversée, n'est retenue que dans le modèle français comme un signe de forte suspicion de malignité lorsque l'indice de rigidité est élevé, et la vascularisation n'est plus prise en compte par la plupart des systèmes (75).

Un certain nombre de systèmes de stratification du risque échographique de malignité des nodules thyroïdiens, qualitatifs ou quantitatifs, sont utilisés dans le monde (le score britannique « U-score », le score quantitatif Coréen), sans qu'il n'y ait de consensus sur un système unique. La sensibilité des différents systèmes de stratification du risque échographique pour le diagnostic de carcinome thyroïdien varie de 81 à 97 %, leur spécificité de 29 à 71 % et leurs valeurs prédictives positive et

négative respectivement de 25 à 49 % et de 88 à 99%. Les nouvelles recommandations de 2015 de l'American Thyroid Association partagent de nombreux points avec le score français, permettant une homogénéité dans l'évaluation du risque échographique (Tableau 5).

Tableau 5 : Correspondance des systèmes de stratification du risque échographique : recommandé par l'ATA (Tableau) et le système TI-RADS français (7)

Signification échographique	Caractéristiques échographiques	Risque de malignité (%)	
Bénin	Kyste simple	< 1%	TI-RADS 2 et 3
Très probablement bénin	Nodules spongiformes ou partiellement kystiques, aucun des signes des catégories suivantes	< 3%	
Probablement bénin	Nodule isoéchogène ou hyperéchogène, aux contours réguliers, sans microcalcification, ni extension extra-thyroïdienne ni forme plus épaisse que large	5-10 %	TI-RADS 3
Intermédiaire	Nodule hypoéchogène, aux marges floues sans microcalcification, ni extension extra-thyroïdienne ni forme plus épaisse que large	10-20 %	TI-RADS 4A
Fortement suspect	Nodule hypoéchogène avec un ou plusieurs critères : <ul style="list-style-type: none"> - Plus épais que large - Contours irréguliers - Microcalcifications - Extension extra-thyroïdienne 	70-90%	TI-RADS 4B et 5

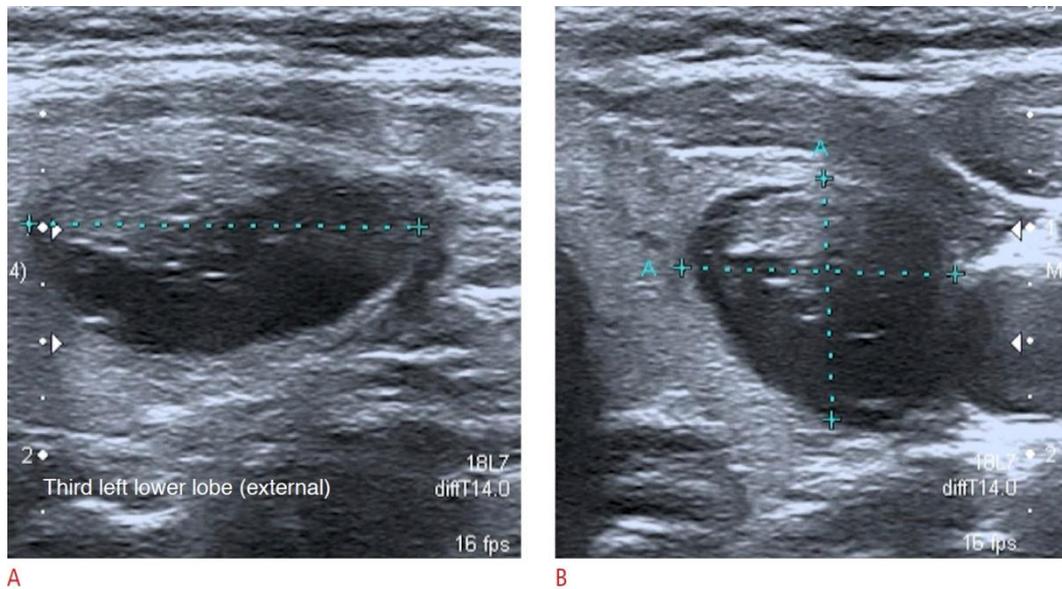


Figure 7 : Iconographie échographique Nodule TI-RADS 3 : coupes longitudinale (A) et axiale (B): mixte, isoéchogène dans sa portion solide, bords réguliers, forme allongée. D'après Russ G. (75)



Figure 8 : Iconographie échographique Nodule TI-RADS 4A : coupe longitudinale : modérément hypoéchogène, bords réguliers, forme allongée. D'après Russ G. (75)

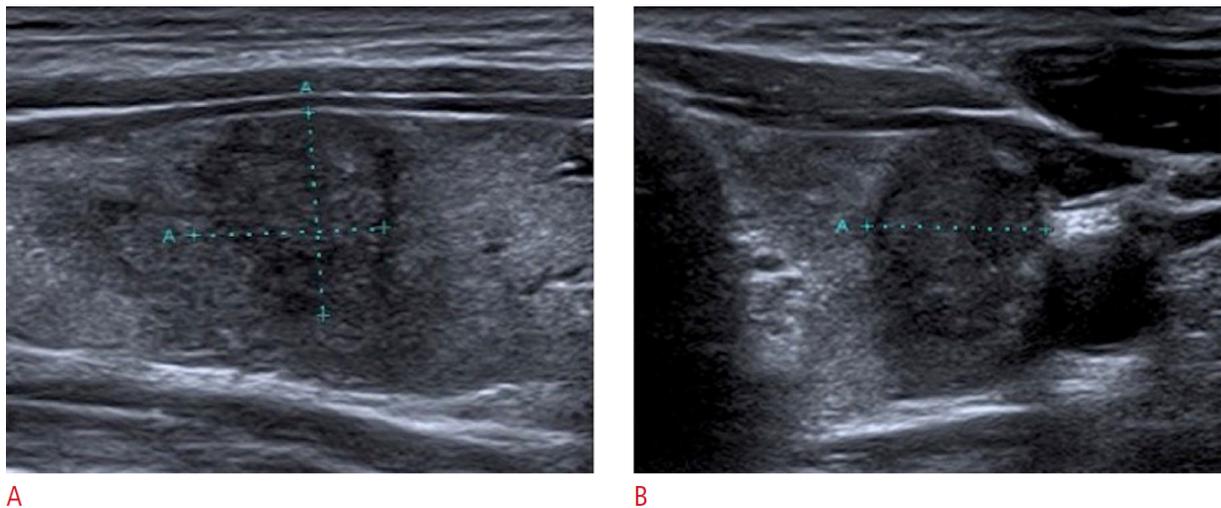


Figure 9 : Iconographie échographique Nodule TI-RADS 4B : coupes longitudinale (A) et axiale (B) : modérément hypoéchogène, bords irréguliers. D'après Russ G. (75)

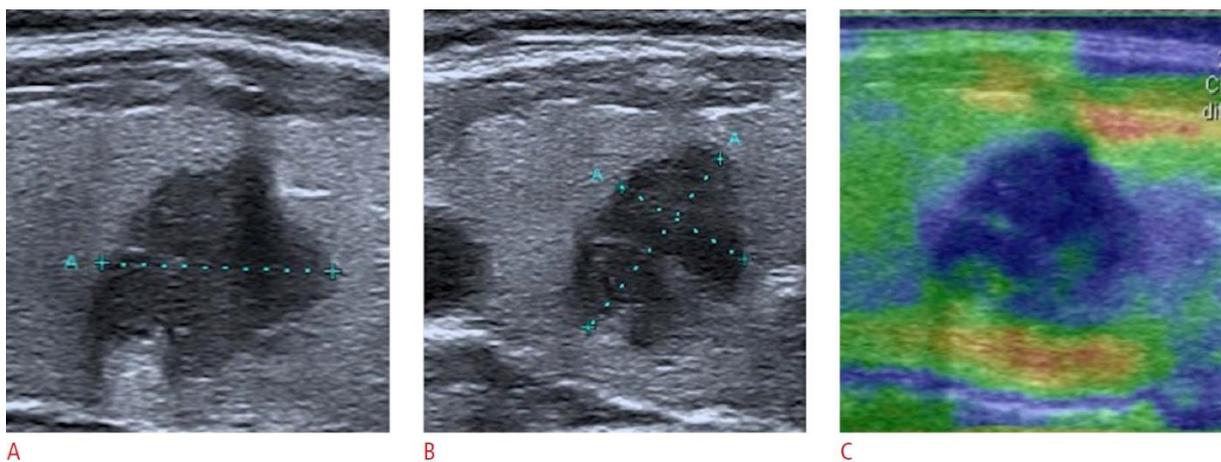


Figure 10 : Iconographie échographique : Nodule TI-RADS 5 : coupes longitudinales (A) et axiale (B) : hypoéchogène, forme irrégulière, aspect plus épais que large, bords irréguliers et lobulés. Image d'élastographie (C) : nodule presque entièrement bleu, traduisant sa rigidité élevée. D'après Russ G. (75)

C. L'examen cytologique du produit de cytoponction thyroïdienne

L'échographie permet de guider le geste de cytoponction à l'aiguille fine des formations nodulaires ou ganglionnaires suspectes. La cytoponction thyroïdienne a

démontré son intérêt dans la prise en charge des patients porteurs de nodules thyroïdiens. Ses indications découlent des caractéristiques échographiques du nodule selon sa taille, et de l'analyse de l'ensemble des facteurs de risque de malignité (Tableau 6).

Son objectif premier est d'identifier, parmi les nodules thyroïdiens, ceux correspondant à des cancers, justifiant une prise en charge thérapeutique adaptée. Par ailleurs, Le second objectif est de définir, avant l'intervention, la nature et l'étendue de la résection chirurgicale requise.

Tableau 6 : Indications de la cytoponction thyroïdienne (7,17)

<p>Echographiques (74) :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Nodule de taille ≥ 20 mm en cas de score TI-RADS 3, ainsi que les kystes simples en cas de signes compressifs - Nodule de taille ≥ 10 mm en cas de score TI-RADS 4A, 4B ou 5 - Nodules de taille < 10 mm en cas : <ul style="list-style-type: none"> • De recherche de primitif d'une métastase à distance ou en cas de ganglion suspect (la ponction du ganglion avec dosage de la thyroglobuline in situ sera systématique), • De contexte à risque (Antécédents familiaux ou personnels à risque), • De fixation en TEP-FDG, • De nodule de score TI-RADS 4B ou 5 s'il est juxta-capsulaire, polaire supérieur, suspect de multifocalité et parfois si l'âge est < 40ans
<p>Biologiques: Calcitonine basale élevée à 2 reprises</p>
<p>Autre situation : cytoponction antérieure non contributive (Bethesda I) ou « lésion vésiculaire de signification indéterminée » (Bethesda III)</p>

Les recommandations actuelles sur l'évaluation cytologique des nodules thyroïdiens s'appuient sur les mises au point de comités d'experts réunis à Bethesda (Etats-Unis) en octobre 2007, lors d'une conférence conduite sous l'égide du National Cancer Institute (76–78). La conférence de Bethesda qui en a découlé a défini une

terminologie et des critères morphologiques pour le diagnostic cytologique des lésions thyroïdiennes, aboutissant à une classification en 6 catégories diagnostiques (78) :

- Bethesda I : Prélèvement non satisfaisant. Un prélèvement est jugé non représentatif lorsqu'il comporte moins de 5 ou 6 placards cellulaires (chacun comportant plus de 10 cellules), ou lorsque les cellules étudiées sont mal préservées.
- Bethesda II : Lésions bénignes. Cette catégorie diagnostique présente un faible risque de malignité (évalué à moins de 3 %), elle comprend en particulier les lésions hyperplasiques d'un goitre nodulaire et les lésions de thyroïdite chronique.
- Bethesda III : Lésions vésiculaires de signification indéterminée, ou atypies de signification indéterminée. Les lésions comportent certaines anomalies architecturales et/ou cytologiques ne permettant pas de les classer en lésions bénignes, mais celles-ci restent insuffisantes pour porter le diagnostic de néoplasmes vésiculaires ou de suspicion de malignité. Dans cette catégorie, le risque de malignité est évalué entre 5 et 15 %.
- Bethesda IV : Tumeurs ou néoplasmes vésiculaires. Dans cette catégorie, le risque de malignité est faible ou modéré, évalué entre 15 et 30 %. La cytologie ne permet pas de distinguer formellement les tumeurs vésiculaires bénignes des tumeurs vésiculaires malignes, le diagnostic de malignité d'une tumeur vésiculaire reposant sur la présence d'un franchissement capsulaire complet et/ou d'une invasion vasculaire, éléments dont la mise en évidence nécessite une étude histopathologique conventionnelle. La mise en évidence de cellules de Hürthle est courante dans ces néoplasmes vésiculaires. Elles peuvent être réactionnelles ou en rapport avec des néoplasmes thyroïdiens à cellules oncocytaires majoritaires (adénome oncocytaire, carcinome vésiculaire à cellules oncocytaires, variantes de carcinome papillaire et de carcinome médullaire).
- Bethesda V : Lésions suspectes de malignité. Le risque de malignité est évalué entre 60 et 75 %, mais ne préjuge pas sa nature (carcinome papillaire, médullaire, peu différencié ou anaplasique, lymphome ou métastase).
- Bethesda VI : Lésions malignes : le risque de malignité est évalué entre 97 et 99 %.

L'utilisation de la classification de Bethesda, permettant une présentation analogue des résultats, est actuellement recommandée par l'American Thyroid Association (ATA), et en France par la Société Française d'Endocrinologie (SFE), par la Haute Autorité de Santé (HAS) et par la Société Française de Cytologie Clinique (SFCC) (17,79,80), et une révision de cette classification est en cours d'élaboration. Chaque catégorie est associée à un risque de malignité croissant (81), conduisant à des recommandations de prise en charge pour le clinicien, qui restent néanmoins largement discutées. Le tableau 7 résume les différentes catégories de la classification de Bethesda et le risque de malignité associé.

Tableau 7 : La classification de Bethesda : risque de malignité selon le résultat cytologique. D'après Cibas et Coll., Thyroid, 2009 (81)

Catégories diagnostiques selon Bethesda		Risque de malignité (%)	% des nodules ponctionnés
I	Non satisfaisante pour le diagnostic	Non évalué	3-20 %
II	Bénigne	0-3 %	60-70 %
III	Atypies (ou lésion folliculaire) de signification indéterminée	5-15 %	3-6 %
IV	Suspicion de néoplasme folliculaire	15-30 %	6-11 %
V	Suspecte de malignité	60-75 %	5-8 %
VI	Maligne	97-99 %	3-7 %

Les performances de la cytoponction thyroïdienne sont variables selon les études, en particulier du fait d'une variabilité de classifications et de méthodes d'analyse utilisées. La sensibilité de la cytoponction thyroïdienne pour le diagnostic de malignité a été évaluée dans les études entre 84,6 et 97,7 %, sa spécificité entre 51,1

et 87,8 %, sa valeur prédictive positive entre 37,7 et 77,4 %, et sa valeur prédictive négative entre 93,4 et 97,4 % (82,83).

Aux variabilités de performance de la cytoponction s'ajoutent des limites à la classification de Bethesda pour la prise en charge clinique du patient :

- Un certain nombre de cytologies sont ininterprétables (3-20 % des cas), lorsqu'il n'est pas observé de cellules, ou que les étalements comportent moins de 5 amas. Dans ces conditions l'examen doit être répété dans les semaines qui suivent, idéalement par un opérateur expérimenté. Pour un petit pourcentage de nodules, il sera impossible d'obtenir un matériel cellulaire identifiable, malgré les cytoponctions répétées, en particulier lors de lésions calcifiées ou fibreuses, de cytoponctions hémorragiques, de lésions nodulaires volumineuses avec hypervascularisation périphérique,
- Les cytologies dites « indéterminées » représentées par les catégories III « atypies ou lésions folliculaires de signification indéterminée », IV « suspicion de néoplasme folliculaire » et V « suspecte de malignité », représentant 15 à 30 % de l'ensemble des cytoponctions, rendent compte de la difficulté pour le cytologiste de pouvoir classer certains nodules dans les catégories II (bénin) et VI (malin).

La détection insuffisante des cancers au sein de ces catégories peut être à l'origine de chirurgie inutile, avec le risque et le coût que cela représente.

- Enfin l'existence de faux négatifs de la cytoponction, estimés à 5 % par l'American Thyroid Association en 2015 (7) (valeur recommandée de moins de 3% pour une équipe avec une bonne expertise de l'échographie et de la cytologie) dans la catégorie Bethesda II (nodules considérés comme bénins par le cytologiste), peut être à l'origine d'un délai diagnostique et de prise en charge, et donc d'un risque de progression de la maladie dans l'intervalle. Une étude récente a toutefois montré que le risque de malignité reste faible pour des nodules initialement bénins bien explorés (84).

D. L'évaluation scintigraphique

L'exploration scintigraphique constituait, avant l'avènement de l'échographie cervicale, l'évaluation initiale de toute formation nodulaire thyroïdienne, en distinguant les nodules « chauds », captant les isotopes (Iode 123 ordinairement, ou à défaut le Technétium, moins coûteux), en principe plutôt bien différenciés et bénins mais à risque de devenir hyperfonctionnels et donc responsable d'hyperthyroïdie, des nodules « froids », hypofixants, moins différenciés, et dont 3 à 15% correspondent à des cancers.

Actuellement, la scintigraphie thyroïdienne est indiquée dans l'exploration d'un nodule en cas de TSH basse. Moins discriminante pour la reconnaissance des cancers que l'évaluation échographique associée à la ponction pour étude cytologique (des foyers cancéreux peuvent exister au sein de nodules captants), et légèrement irradiante, la scintigraphie n'est plus recommandée en première intention. Elle apparaît néanmoins utile lorsque, à plusieurs reprises, l'insuffisance de cellularité dans le produit de cytoponction est à l'origine de résultats ininterprétables (cytologie de classe I de Bethesda). Elle pourrait être utile en seconde intention lorsque les nodules thyroïdiens apparaissent difficilement accessibles à l'évaluation échographique (sujets âgés ou voûtés, nodules plongeant en arrière du sternum), ou lorsque des troubles de l'hémostase contre-indiquent l'évaluation cytologique.

Dans les cas de cytologies indéterminées (Bethesda III et IV en particulier), il peut être proposé de rechercher des arguments supplémentaires en faveur de la malignité en explorant la cellularité nodulaire : le radiopharmaceutique utilisé est le Methoxy-IsoButyl-^{99m}Tc, (MIBI-^{99m}Tc), s'accumulant dans les mitochondries et en particulier celle des thyrocytes. L'examen montre globalement une très bonne sensibilité pour prédire la malignité, mais souffre d'un manque de spécificité, et les critères d'interprétation et de positivité varient selon les équipes, influençant les valeurs prédictives positive et négative, ne permettant pas de le recommander en première intention dans l'exploration des nodules thyroïdiens (85).

La tomographie par émissions de positons utilisant le 18-fluoro-glucose (TEP-18FDG), ou TEPscan, explore le métabolisme glucosé des organes. Elle n'est pas recommandée dans l'évaluation initiale d'un nodule thyroïdien, mais une fixation thyroïdienne est fréquente chez les patients adressés pour un motif autre que

thyroïdien (1-2 %), la proportion de tumeurs malignes y restant faible (environ 1/3) (86–88). En cas de fixation focale localisée au niveau d'un nodule thyroïdien, le risque de malignité atteint 14 à 68.8 % en fonction des séries (34,8 % dans une large méta-analyse (86)), avec une SUV (unité quantifiant le glucose consommé par le tissu tumoral, exprimé en mg/mn pour 100g de tumeur) moyenne supérieure en cas de nodule malin par rapport aux nodules bénins (6,9 contre 4,8, $p < 0,001$). La fixation du ^{18}F FDG par les nodules ne présume pas de leur nature, ces derniers correspondant essentiellement à des cancers papillaires, plus rarement folliculaires, à des métastases de cancers solides, ou à des lymphomes malins non hodgkiniens. Dans le travail de Vriens et al. une fixation du ^{18}F FDG suggère la malignité avec une valeur prédictive positive de 39 % et une valeur prédictive négative de 96 % en cas d'absence de fixation (89). Plus récemment, dans une étude prospective portant sur 56 nodules de cytologie indéterminée, l'analyse multivariée ne montrait pas de bénéfice apporté au diagnostic par l'association d'une TEP au ^{18}F FDG à l'échographie, et l'absence de fixation n'excluait pas la malignité pour des nodules de taille inférieure à 15 mm (90), remettant en question l'indication de la TEP au ^{18}F FDG dans l'exploration des nodules de cytologie indéterminée.

Cependant, dans leur étude coût-efficacité, Vriens et al. (91) montraient que l'utilisation de la TEP au ^{18}F FDG afin de déterminer le caractère bénin ou malin de nodules de cytologie indéterminée était plus rentable que la chirurgie et les méthodes de biologie moléculaire, et permettait de diminuer de 47 % le nombre de chirurgies inutiles.

D'après les recommandations de l'ATA, tout nodule de plus de 10 mm fixant le ^{18}F FDG doit, du fait de l'augmentation du risque de malignité de ce dernier, être soumis à une échographie couplée à une cytoponction (7).

IV. Place de la recherche de la mutation BRAF^{V600E} dans la stratégie de prise en charge des nodules thyroïdiens

L'existence de catégories cytologiques « indéterminées » et de faux-négatifs de la cytoponction entraîne des incertitudes diagnostiques qui incitent à développer d'autres techniques plus performantes, mais aussi aisément utilisables en pratique clinique et d'un coût raisonnable, afin de guider la prise en charge des patients concernés. Des techniques complémentaires immunohistochimiques ont été proposées afin de mieux classer ces lésions en bénignes ou malignes. Plusieurs marqueurs ont été testés : galectine 3, cytokératine 19, HBME1, thyroperoxydase, DAPIV, etc., dont l'utilisation est controversée en raison des difficultés de leur mise en œuvre, de leurs coûts, de leur imparfaite sensibilité et spécificité (92,93).

Beaucoup d'espoirs ont été placés dans la biologie moléculaire. En effet, les mécanismes moléculaires perturbant les voies de signalisation dans la tumorigénèse thyroïdienne, et en particulier celle des MAPK impliquée dans le CPT, sont mieux connus, cela grâce au développement des technologies de séquençage à haut débit. D'après l'ATA, la biologie moléculaire a deux principaux objectifs : le principal est diagnostique, le second pronostique (7). Actuellement, en absence d'impact significatif démontré sur la prise en charge des patients, ses recommandations se limitent à l'utilisation de la biologie moléculaire lorsqu'elle est possible, dans les centres en ayant l'expertise.

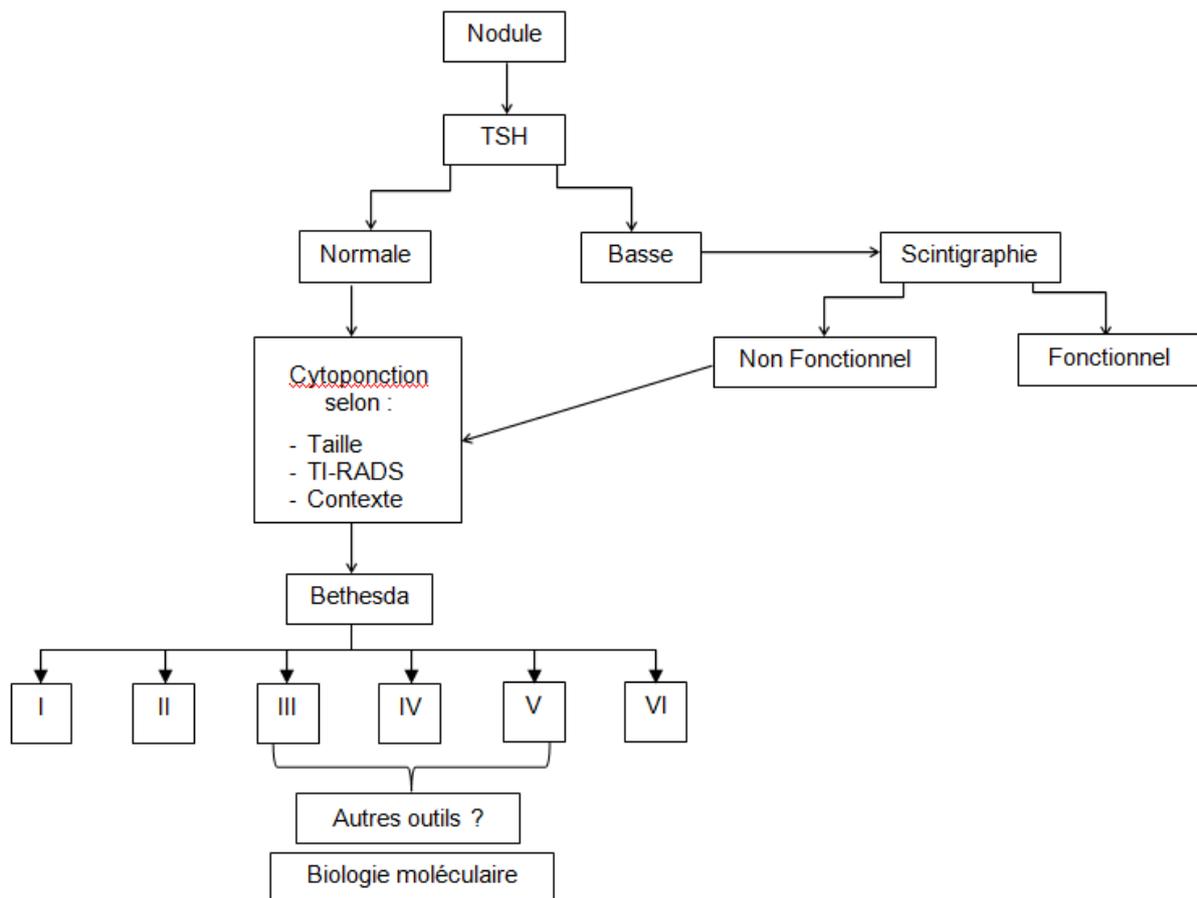


Figure 11 : Place des différents outils diagnostiques en pathologie nodulaire thyroïdienne

A. Intérêt diagnostique

Sur le plan pratique, il est actuellement possible, à partir du matériel de cytoponction thyroïdienne, en utilisant le liquide de rinçage de l'aiguille fine ou via un prélèvement dédié pour la biologie moléculaire, d'obtenir, avec un très bon taux de succès, les petites quantités d'ADN et /ou d'ARN nécessaires afin d'étudier respectivement les mutations ponctuelles de différents gènes et/ou les réarrangements chromosomiques et les anomalies d'expression de gènes ou de petits ARN (94).

En particulier, l'application de la recherche de la mutation $BRAF^{V600E}$, anomalie moléculaire la plus fréquente au sein des CPT, au produit de cytoponction thyroïdienne, a été initialement décrite par Cohen et al. (48). Avec une concordance de 94 % entre la recherche de la mutation effectuée sur produit de cytoponction et

celle sur pièce opératoire, ils démontraient la fiabilité de la recherche de cette anomalie moléculaire sur produit de cytoponction. Plusieurs auteurs se sont ensuite intéressés à l'intérêt diagnostique et pronostique de la mutation BRAF^{V600E} dans le produit de cytoponction, utilisant des techniques de détection parfois variables mais de performances diagnostiques similaires (95).

Jo *et al.*, en 2009, ont notamment évalué de façon prospective l'impact diagnostique de la recherche de la mutation BRAF^{V600E} par pyroséquençage sur produit de cytoponction : 30 prélèvements parmi les 40 se révélant être des CPT présentaient la mutation, lui conférant une sensibilité diagnostique de 75 %, et une valeur prédictive positive de 100 % (96). Nikiforova *et al.* ont repris les résultats de la recherche de la mutation BRAF^{V600E} seule sur produit de cytoponction de 9 études prospectives et 7 études rétrospectives, et 2 études portant sur des pièces opératoires, menées entre 2004 et 2009 (37). Parmi les 2766 prélèvements analysés, les 450 recherches de mutations de BRAF^{V600E} revenues positives sur produit de cytoponction se sont révélées être des CPT, confirmant sa haute spécificité. Par ailleurs, 15 à 39 % de ces prélèvements provenaient de cytoponctions indéterminées ou non contributives, démontrant l'intérêt diagnostique de la recherche de la mutation BRAF^{V600E} dans les cytoponctions ne permettant pas de conclure sur le caractère malin ou non du nodule. De plus certains prélèvements cytologiques initialement considérés comme bénins présentaient une mutation BRAF^{V600E} et se révélaient finalement être des CPT, soulevant ainsi un intérêt dans le redressement diagnostic des faux négatifs de la cytoponction (97,98).

B. Intérêt pronostique

Au-delà de son intérêt diagnostique, la présence de la mutation du gène *BRAF* au sein d'un CPT est associée à des critères clinico-pathologiques de mauvais pronostic, tels que le sexe masculin, la taille tumorale, une histologie plus agressive (cellules hautes), l'absence de capsule tumorale, la présence d'une extension extra-thyroïdienne, un stade TNM plus avancé au diagnostic, et/ou des métastases ganglionnaires (45). Cette valeur pronostique péjorative est étayée par plusieurs méta-analyses (99–101). Dans une large série de 356 patients, Prescott *et al.* démontraient que la mutation du gène *BRAF* possédait une valeur spécifique péjorative

supplémentaire par rapport aux systèmes conventionnellement utilisé pour l'évaluation du risque de récurrence (stade TNM, évaluation selon l'ATA, score MACIS) (102). Une association entre le risque de mortalité et la présence de la mutation BRAF^{V600E} a été observée, mais celle-ci étant fréquemment dépendante des facteurs pronostiques classiques que sont l'extension extra-thyroïdienne ou les métastases ganglionnaires et à distance, et la mortalité globale des patients porteurs d'un CPT étant faible, celle-ci n'est pas démontrée (103).

La présence d'une mutation du gène *BRAF* est également associée à un plus grand risque de maladie résiduelle, à une diminution de l'affinité pour l'iode et à une plus grande fréquence de résistance au traitement par iode radioactif (99–101). Ainsi, la mutation du gène *BRAF* est observée avec une plus grande prévalence (78 à 95 %) chez les patients porteurs d'un cancer papillaire réfractaire à l'iode en comparaison à celle décrite pour l'ensemble des cancers papillaires (45 %) (99). Plusieurs études ont montré une diminution de l'expression du symporteur pour l'iode (NIS) et de son transport à la membrane plasmique chez des patients porteurs de CPT muté BRAF (104–107), pouvant expliquer cette perte de sensibilité à l'irathérapie. Il a été démontré dans des modèles murins que la mutation BRAF^{V600E} supprime l'expression de gènes de différenciation thyroïdienne comme le NIS ou la thyropéroxydase, inhibant ainsi la captation et le métabolisme de l'iode, à l'origine d'une dédifférenciation tumorale et d'une résistance à l'irathérapie, tandis qu'un traitement par inhibiteurs de MAPK restaure ces propriétés (44). L'hypothèse qui en découle est que l'avidité pour l'iode est corrélée à l'activation de la voie des MAPK : L'expression des gènes impliqués dans la captation et le métabolisme de l'iode traduit la bonne différenciation tumorale. En présence d'une mutation BRAF^{V600E}, la forte activation de la voie des MAPK est à l'origine d'une dédifférenciation tumorale, les gènes impliqués dans l'utilisation de l'iode sont réprimés, il en résulte une moindre réponse à l'irathérapie.

Bien que de nombreuses études s'accordent sur l'association de la mutation BRAF^{V600E} à de nombreux facteurs de mauvais pronostic et à un plus grand risque de récurrence (108), celles-ci sont pour la plupart rétrospectives et réalisées sur tissus tumoraux.

Son identification en préopératoire, donc sans prise en compte des autres facteurs clinicopathologiques, apparaît insuffisante, lorsqu'elle est présente isolément, pour impacter la stratification du risque (7). Elle peut cependant préciser l'évaluation

du risque lorsque d'autres facteurs pronostiques lui sont associés. La mise en évidence de mutations du promoteur du gène *TERT* (codant pour la télomérase reverse transcriptase), ayant un rôle dans l'immortalité cellulaire en maintenant la longueur des télomères à l'extrémité des chromosomes, apparaît être un élément important dans le rôle pronostic de la biologie moléculaire (109), et l'association d'une mutation de *TERT* à une mutation de *BRAF* (110), de *RAS*, voir à d'autres anomalies activant la voie des MAPK (111) aggrave le pronostic. En particulier la survie sans progression des patients présentant un CPT avec l'association de la mutation de *TERT* à celle de *BRAF* était plus courte que celle des patients ne présentant que la mutation *BRAF*^{V600E} (110). Si ces résultats proviennent de travaux réalisés sur des tissus tumoraux, les travaux récents de Nikiforov attestent de la faisabilité de la détection de la mutation de *TERT* par le séquençage de nouvelle génération sur produit de cytoponction (112).

C. *BRAF*^{V600E} dans les microcarcinomes papillaires

Dans le contexte actuel de sur-diagnostic de lésions de bon pronostic, la stratégie de prise en charge des microcarcinomes thyroïdiens est très discutée, et l'objectif est de déterminer, parmi eux, ceux à risque de progression tumorale requérant un traitement agressif. La prévalence de la mutation *BRAF*^{V600E} au sein de microcarcinomes papillaires est de 30 à 67 % selon les études (113,114), celle-ci étant fréquemment associée à des facteurs de mauvais pronostic que sont une extension extra-thyroïdienne, des métastases locorégionales et un stade TNM avancé. Cependant, la présence de la mutation n'y préjuge pas du risque de progression tumorale, ne permettant pas de dicter la prise en charge initiale. D'après Nikiforov, un score incluant 3 caractéristiques histologiques (localisation tumorale superficielle, multifocalité et présence de fibrose) et la mutation *BRAF*^{V600E} était prédictif d'une extension loco-régionale significative, comparé à la présence de la mutation ou des caractéristiques histologiques seules (115). Cependant, ce score ne peut être appliqué qu'en postopératoire, et ne permet pas de définir la prise en charge préopératoire.

V. Objectif de notre travail

Dans le contexte récent des améliorations techniques et des connaissances des anomalies moléculaires impliquées dans la tumorigénèse thyroïdienne, il existe une place à définir pour la biologie moléculaire en pathologie nodulaire, et en particulier pour guider la prise en charge des patients présentant un nodule de cytologie indéterminée. La mutation $BRAF^{V600E}$ est l'un des marqueurs diagnostiques et pronostiques de CPT le mieux connu et le plus étudié à l'heure actuelle. Sa haute prévalence et sa spécificité dans les CPT lui confèrent un rôle central dans la pathogénie des CPT, suggérant sa potentielle utilité clinique.

Au CHRU de Lille, la recherche de la mutation $BRAF$ sur les blocs inclus en paraffine issus des tissus de tumeurs colorectales initialement, puis bronchiques et de mélanomes, à visée pronostique et/ou thérapeutique, a ouvert la voie à la recherche de la mutation sur produit de cytoponction thyroïdienne en 2010. Décrite comme la plus fréquemment impliquée dans les CPT, sa spécificité pour le diagnostic de ces derniers et la faisabilité satisfaisante de sa mise en œuvre sur produit de cytoponction thyroïdienne dans la littérature, ont justifié la mise en place de la recherche de la mutation V600E du gène *BRAF* sur le produit de cytoponction issu de nodules thyroïdiens posant des difficultés de prise en charge au CHRU de Lille.

À la lumière des articles évoquant l'intérêt diagnostique de la mutation $BRAF^{V600E}$, l'objectif de notre travail était, en premier lieu, de mettre en place la recherche de cette anomalie moléculaire dans les produits de cytoponction thyroïdienne au CHRU de Lille. Dans un second temps, nous voulions étudier l'intérêt diagnostique de la recherche de la mutation $BRAF^{V600E}$ dans notre population de patients, et son rôle dans la prise en charge en pratique courante lilloise.

Matériels et méthodes

I. Type d'étude et population initiale

Notre étude a été réalisée rétrospectivement à partir des données issues du logiciel DIAMIC répertoriant les patients ayant bénéficié de la recherche de la mutation BRAF^{V600E} dans le produit de cytoponction thyroïdienne, depuis son introduction au CHRU de Lille en mars 2010 jusqu'en juillet 2016. Les critères initialement retenus pour poser l'indication d'effectuer une recherche de mutation BRAF^{V600E} dans le produit de cytoponction étaient les suivants :

- Nodules thyroïdiens pour lesquels une cytoponction était indiquée selon les critères définis par la Société Française d'Endocrinologie (Tableau 6) (17).
- Ayant bénéficié d'une première cytoponction indéterminée (Bethesda III, IV ou V).

En pratique, progressivement les indications de prélèvements pour recherche de mutation BRAF^{V600E} ont dans les faits été élargis aux nodules posant des difficultés diagnostiques et donc des difficultés de prise en charge thérapeutique, à la demande de l'endocrinologue ou du chirurgien référent, indépendamment du résultat d'une éventuelle première analyse cytologique.

Chez les patients ayant bénéficié de deux recherches de la mutation BRAF en raison d'une première recherche rendue ininterprétable, et dont le deuxième prélèvement permettait de statuer sur le statut mutationnel, seul ce deuxième prélèvement a été pris en compte.

II. Méthodologie et recueil des informations

Pour chaque patient nous avons recueilli :

- Les paramètres cliniques que sont le sexe, l'âge au moment de l'exploration moléculaire du nodule, les antécédents pertinents que sont une irradiation cervicale ou une pathologie à risque de nodule ou de cancer thyroïdien, la symptomatologie en lien avec le nodule si elle était présente,
- Les caractéristiques paracliniques : échographiques, cytologiques, de biologie moléculaire, scintigraphiques le cas échéant et enfin histologiques en cas de prise en charge chirurgicale.

A. Les données cliniques

Les données cliniques ont été recherchées sur le logiciel SILLAGE et extraites des documents de consultation médicale ou chirurgicale, des comptes rendus de concertation pluridisciplinaires et des comptes rendus opératoires en cas de prise en charge chirurgicale.

B. L'échographie cervicale

L'échographie cervicale dédiée à la pathologie nodulaire était réalisée par un médecin radiologue ou endocrinologue expérimenté, au moyen d'une sonde linéaire de haute fréquence (10-15 MHz), adaptée à l'exploration du parenchyme thyroïdien (une sonde convexe de plus basse fréquence pouvait être une aide dans l'exploration d'un goitre volumineux à extension endothoracique). Le compte rendu échographique était accessible sur le logiciel SILLAGE et les iconographies et schémas de repérage dans les documents de consultation. Le compte rendu standardisé selon les recommandations issues du score TI-RADS comportait outre le motif et la technique de l'examen :

- Le volume thyroïdien, de chaque lobe, et de l'isthme en cas d'hypertrophie

- L'échogénicité et la vascularisation du parenchyme
- La situation, taille, évolutivité le cas échéant et les caractéristiques du ou des nodule(s) ponctionnés, avec leur catégorie d'évaluation TI-RADS 1 à 5.
- L'étude des aires ganglionnaire et la caractérisation des ganglions présents

C. La cytoponction

Le geste de cytoponction, guidé par l'échographie, était réalisé par un médecin radiologue ou endocrinologue expérimenté (3 opérateurs différents) dans le service d'Endocrinologie du CHRU de Lille, au moyen d'une aiguille de 23 gauges. Le nombre de passages au sein du nodule était laissé à l'appréciation du préleveur. Deux à trois prélèvements par patient étaient réalisés, ce qui permettait une analyse cytologique conventionnelle couplée à une étude en biologie moléculaire.

Le matériel recueilli pour l'analyse cytologique était utilisé pendant les premières années de l'étude pour un étalement conventionnel, chassé puis étalé sur une lame de verre. Les cellules étaient fixées par un séchage rapide à l'air. Le recueil en milieu liquide (le produit de ponction étant préservé par le Cytolyt, méthode Thinprep), a été utilisé pour les dernières années de l'étude.

Le produit de ponction « dédiée » à l'étude en biologie moléculaire était recueilli dans une solution de conservation de l'ADN (RNA protect ou RNA later).

Associés à une fiche de renseignements cliniques dédiée à la cytoponction, les tubes et les lames étaient adressés au centre de biologie et pathologie (CBP) par un système de Transport Automatique Léger (TAL).

1. Analyse cytologique

Les prélèvements arrivant au CBP étaient adressés au laboratoire d'anatomopathologie, les lames colorées par la méthode de May-Grünwald Giemsa et les recueils en milieu liquide étalés en monocouche sur une lame et colorés par le Papanicolaou.

La lecture des lames était effectuée par un pathologiste et le compte rendu était accessible sur le logiciel SILLAGE. Il comprenait les renseignements cliniques, le type de matériel soumis (étalement conventionnel ou suspension cellulaire), la technique utilisée (coloration), et les résultats, en particulier la qualité du prélèvement, une description cyto-pathologique et une conclusion diagnostique, la cytoponction étant classée au sein des 6 catégories telles que décrites par la classification de Bethesda.

2. Analyse moléculaire

L'analyse moléculaire a initialement été réalisée à la lumière du résultat de l'examen cytologique, soit uniquement en cas de cytologie indéterminée de classe III, IV ou V de Bethesda, avant d'être élargie aux nodules posant des difficultés de prise en charge.

- Extraction des acides nucléiques

Les tubes de cytoponction ont été cryopréservés (-80°C) dès leur arrivée au laboratoire. Les acides nucléiques ont ensuite été extraits à l'aide des kits All prep DNA/RNA micro® et QIAmpDNA micro® (Qiagen) selon les instructions du fabricant. Une vérification de la qualité des matériels génétiques ainsi obtenus a été réalisée pour chaque échantillon par RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) en ciblant les transcrits des gènes *GAPDH* et *TG*, qui sont respectivement un gène domestique et un gène codant pour la thyroglobuline, marqueur des cellules thyroïdiennes folliculaires. L'ADN extrait était amplifié par PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

- Détection de la mutation dans le gène *BRAF*

La mutation *BRAF* 1799T>A (correspondant à *BRAF*^{V600E}) a été recherchée par pyroséquençage ou par SNaPshot®. Le pyroséquençage a progressivement été remplacé par le SNaPshot® courant 2016, en raison de son utilisation en routine pour les autres recherches moléculaires au CHRU et de la sensibilité accrue de cette seconde technologie.

Principe du pyroséquençage :

Il s'agit d'un séquençage direct permettant de quantifier le taux d'allèles mutés. Lors de la synthèse du brin d'ADN, l'ADN polymérase incorpore un nucléotide à la fois, selon un ordre préalablement défini, libérant un Pyrophosphate (PPi). Celui-ci est transformé en ATP par l'ATP Sulfurylase en présence d'Adénosine Phospho Sulfate. L'ATP est ensuite utilisée par la luciférase pour générer un signal lumineux, retranscrit sous la forme d'un pic sur le pyrogramme. La hauteur des pics est proportionnelle à la quantité de lumière, elle-même proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés.

Principe du SNaPshot® :

Il s'agit d'une technique d'extension d'amorces, permettant la détection d'un variant connu, et donnant un résultat semi-quantitatif. Le brin d'ADN à analyser est hybridé à une amorce située en 5' de la position de la mutation, en présence d'une ADN polymérase dépourvue d'activité 3'-5', et de didéoxynucléotides, chacun étant marqué par un fluorophore différent. Lors de son incorporation par l'ADN polymérase, le didéoxynucléotide, complémentaire de la base polymorphique à étudier, permet l'arrêt de l'extension d'amorce. Les produits d'extension sont ensuite soumis à une migration sur gel d'électrophorèse capillaire pour être analysés. Pour un locus donné, chaque allèle sera représenté sur l'électrophorégramme par un pic de couleur différente.

Dans le cadre du pyroséquençage, le gène a été considéré comme muté lorsque le signal correspondant à la mutation 1799T>A était supérieur à 10 %, et comme sauvage lorsque le signal était inférieur à 5 % (traduisant le bruit de fond de la technique) (Figure 12). Une confirmation par SNaPshot® a été réalisée pour l'ensemble des échantillons étudiés par pyroséquençage pour lesquels le signal obtenu était entre 5 et 10 %, afin de lever l'incertitude. Dans le cadre du séquençage par SNaPshot®, le gène *BRAF* a été considéré comme muté dès que le pic correspondant à la mutation pouvait être visualisé (Figure 13).

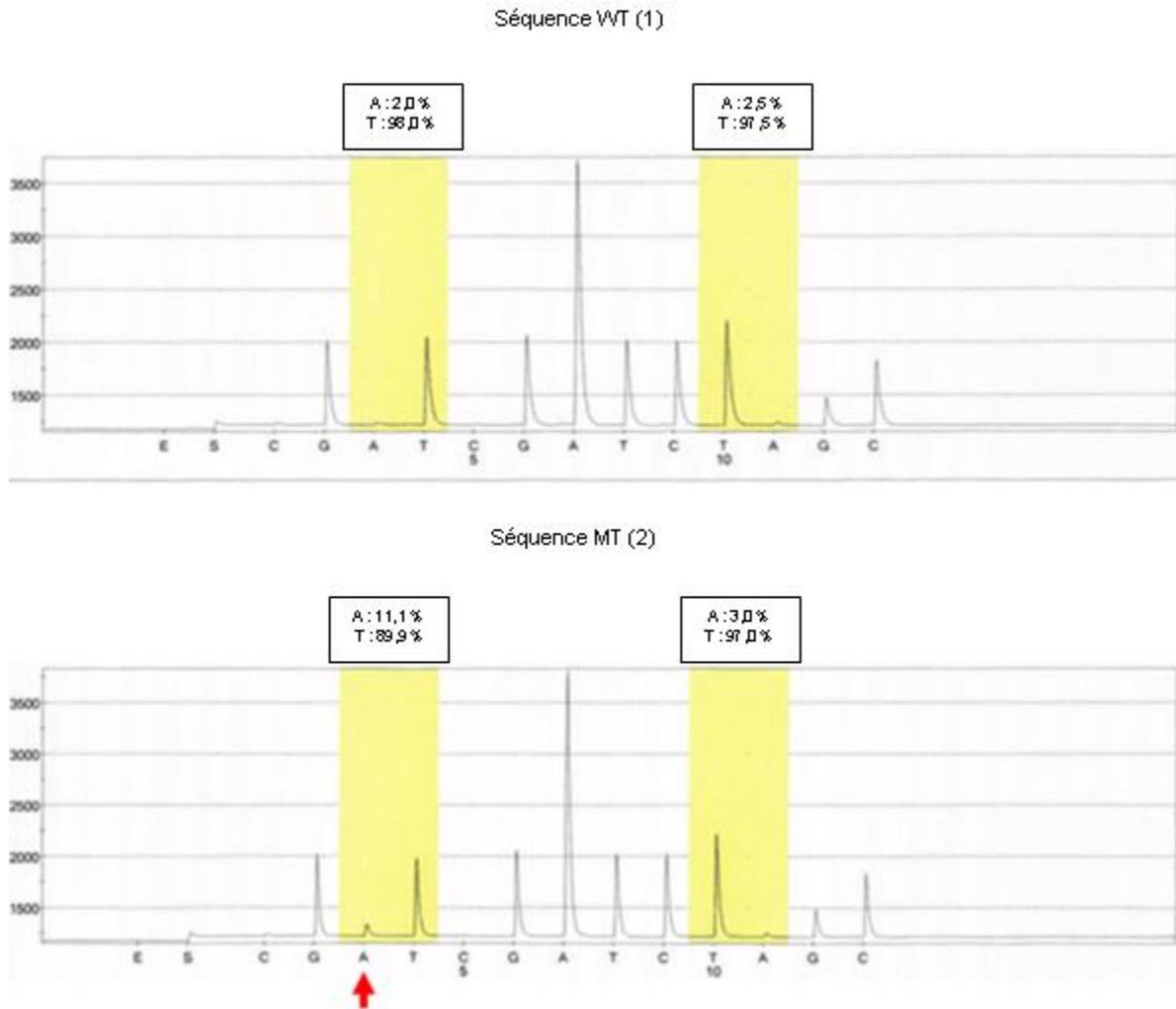


Figure 12 : Résultats du pyroséquençage du gène *BRAF* chez deux patients :
Pyrogramme de la séquence nucléotidique non mutée (1) : le signal correspondant à la mutation 1799T>A est de 2 %. Pyrogramme de la séquence nucléotidique mutée (2) : le signal correspondant à la mutation 1799T>A est de 11,1 % (fléché).

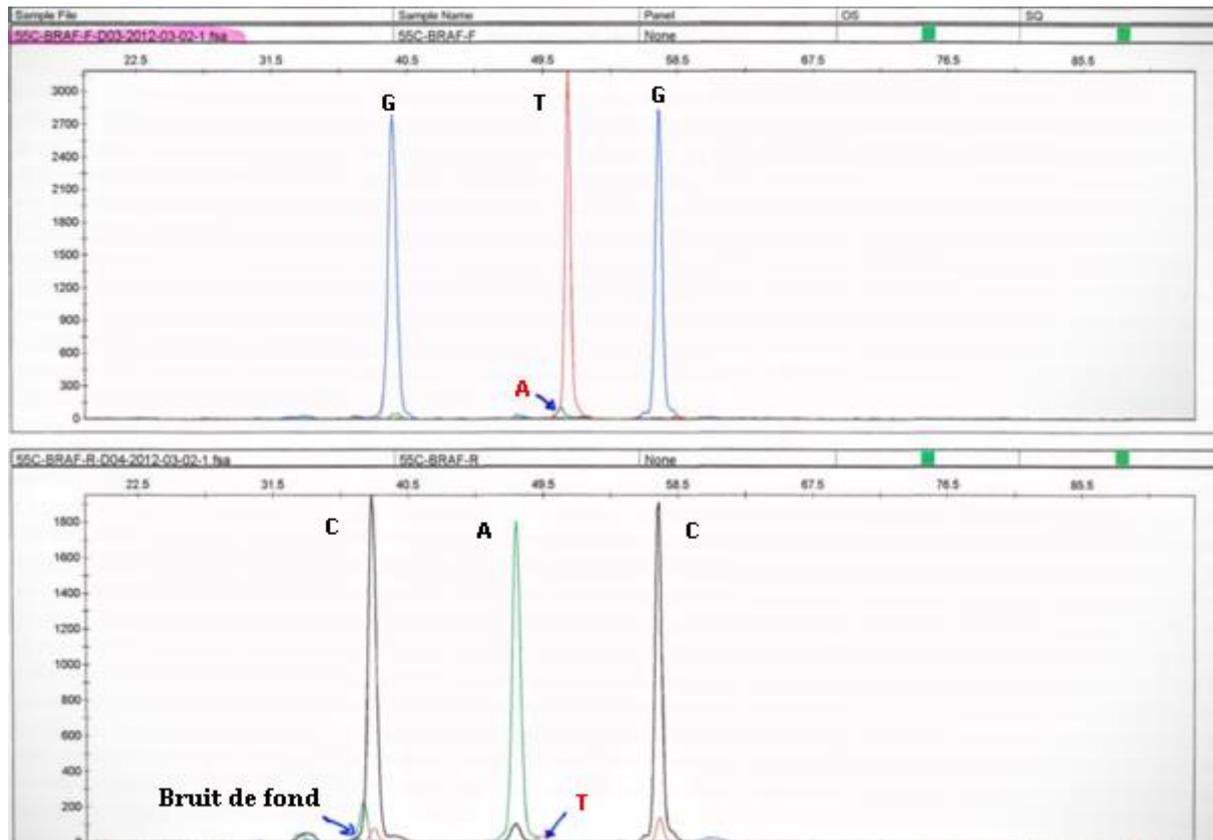


Figure 13 : Résultats du SNaPshot® chez un patient : Electrophorégramme de la séquence nucléotidique mutée : présence du pic correspondant à la mutation 1799T>A.

Pour la suite des analyses, les résultats de biologie moléculaire ont été obtenus grâce au logiciel SILLAGE pour la plupart des échantillons. Une recherche sur le logiciel DIAMIC a été nécessaire pour les prélèvements les plus anciens. Diverses informations, telles que la nature du prélèvement, le contexte clinique, le résultat du diagnostic cytologique de la cytoponction correspondante, et le résultat de la recherche de la mutation du gène *BRAF*, avec en commentaire le détail de la mutation lorsqu'elle était détectée (localisation sur la séquence nucléotidique et correspondance sur la séquence protéique), étaient incluses dans les comptes rendus.

III. Statistiques

Concernant la valeur diagnostique de la présence de la mutation BRAF^{V600E} dans les prélèvements issus des nodules : afin de calculer la sensibilité (Se), la spécificité (Sp), et les valeurs prédictives positive (VPP) et négative (VPN) de la présence de la mutation BRAF^{V600E} dans les nodules thyroïdiens, nous avons définis les vrais positifs (VP), les faux positifs (FP), les vrais négatifs (VN) et les faux négatifs (FN). La mise en évidence de la mutation dans un nodule dont l'examen anatomopathologique confirmait le diagnostic de malignité (CPT, CA, carcinome peu différencié, métastase de cancer de primitif non thyroïdien, CMT, carcinome vésiculaire) a été considérée comme VP, tandis qu'elle a été considérée comme FP lorsque l'examen anatomopathologique concluait en un nodule bénin. L'absence de mutation dans un nodule dont l'examen anatomopathologique identifiait son caractère malin (CPT, CA, carcinome peu différencié, CMT, métastase d'un cancer de primitif non thyroïdien, Carcinome vésiculaire) a été considérée comme FN, tandis que son absence au sein d'un nodule dont l'examen anatomopathologique confirmait la bénignité était considérée comme VN.

Les valeurs statistiques ont été calculées comme suit :

- Se : $\{VP / (VP+FN)\} \times 100$
- Sp : $\{VN / (VN+FP)\} \times 100$
- VPP : $\{VP / (VP+FP)\} \times 100$
- VPN : $\{VN / (VN+FN)\} \times 100$

Afin d'étudier l'association de la mutation BRAF^{V600E} aux facteurs cliniques et pronostiques, nous avons utilisé le test du Chi 2 (avec correction de Yates lorsque les effectifs le nécessitaient, soit pour le sexe et les formes d'histologie agressive).

Pour la comparaison des moyennes, nous avons utilisé un test de Student.

Résultats

Nous avons reçu 166 demandes de recherches de la mutation BRAF^{V600E} sur matériel de cytoponction thyroïdienne, répertoriées d'après le logiciel DIAMIC au CHRU de Lille entre mars 2010 et juillet 2016, 143 recherches ont effectivement été incluses, et ont été exclues 23 demandes :

- 5 patients étaient répertoriés à deux reprises dans le logiciel DIAMIC en raison d'une première recherche de mutation du gène *BRAF* non réalisable du fait d'un prélèvement a- ou pauci-cellulaire. Seule la seconde recherche mutationnelle, aboutissant à un résultat moléculaire, a donc été prise en compte.
- 4 patients n'ont finalement pas bénéficié de l'analyse moléculaire : pour 3 d'entre eux celle-ci a été refusée du fait d'une cytologie bénigne, dont 1 se révélant finalement être un CPT à l'examen anatomopathologique. Pour le dernier patient, aucun tube n'a été reçu au centre de biologie moléculaire.
- Pour 14 patients (parmi les 157 restant, soit 9 %) l'analyse moléculaire était ininterprétable en raison d'une quantité d'ADN insuffisante. Pour 2 d'entre eux l'examen cytologique était interprétable, l'un Bethesda II n'a pas été opéré, l'autre Bethesda IV, s'est révélé être un variant vésiculaire de CPT. Parmi les 12 nodules dont l'examen cytologique était ininterprétable compte tenu de la quantité insuffisante de matériel cellulaire, 6 n'ont pas été opérés, 3 étaient bénins et 3 se sont révélés être des carcinomes papillaires (1 microcarcinome papillaire et 2 variants vésiculaires de CPT).

Chaque recherche de mutation BRAF^{V600E} correspond donc à un patient différent. Nous avons ainsi inclus 29 hommes et 114 femmes, soit un ratio homme/femme de 1: 4 (20 % d'hommes et 80 % de femmes). L'âge moyen était de 48,5 ans (écart type : +/- 17.3 ans, âges extrêmes de 15 ans et 89 ans).

La taille moyenne du nodule ponctionné était de 30,1 mm de plus grand axe à l'échographie (+/- 14 mm, tailles extrêmes : 10 à 80 mm), pour deux patients il s'agissait de la cytoponction d'une adénopathie cervicale, dont la taille n'a pas été prise en compte dans le calcul de la taille moyenne.

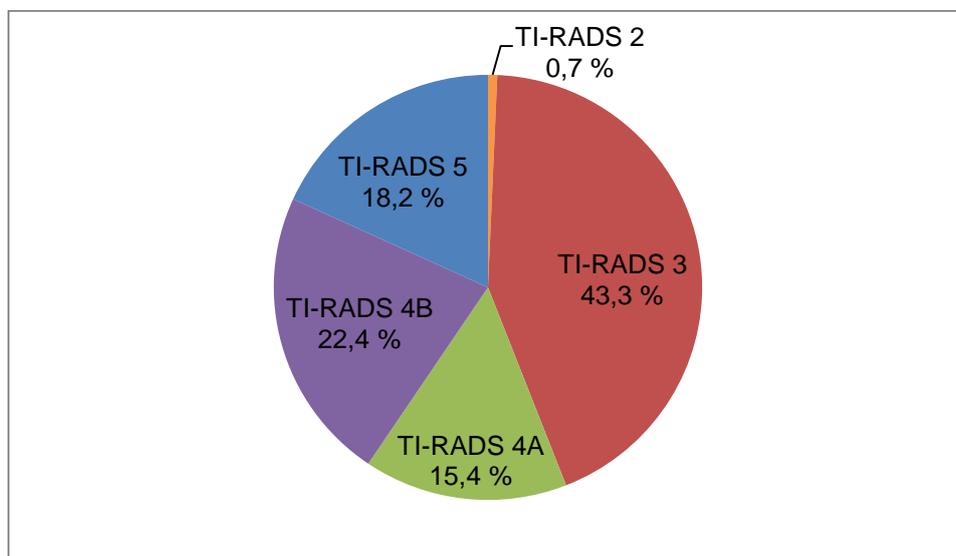
I. Répartitions échographique, cytologique et histologique des nodules

A. Echographiques

Chaque patient a bénéficié d'une échographie thyroïdienne dédiée, permettant la classification du nodule concerné par la ponction et par l'analyse moléculaire selon le score TI-RADS :

- 1 nodule (0,7 %) était TI-RADS 2,
- 62 nodules (43,3 %) étaient TI-RADS 3,
- 22 nodules (15,4 %) étaient TI-RADS 4A,
- 32 nodules (22,4 %) étaient TI-RADS 4B,
- Et 26 nodules (18,2 %) étaient TI-RADS 5.

Figure 12 : Répartition échographique des nodules ponctionnés

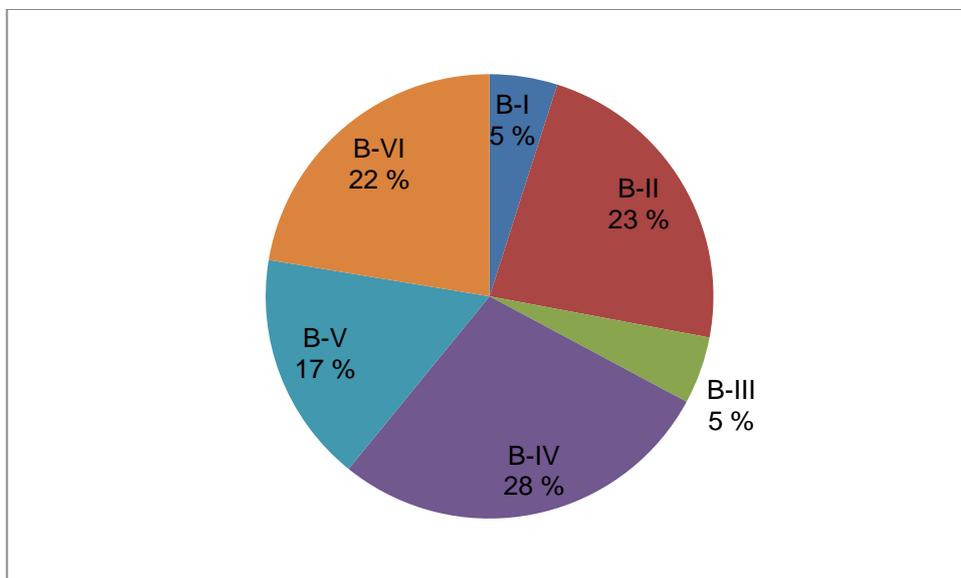


B. Cytologiques

Chaque patient a bénéficié d'une cytoponction du nodule concerné pour analyse cytologique, permettant leur classification selon les catégories Bethesda :

- 33 nodules étaient bénins (Bethesda II, B-II), soit 23 %,
- 32 nodules étaient malins (Bethesda VI, B-VI), soit 22 %,
- Et 71 nodules étaient de cytologie indéterminée (50 %), dont 7 nodules Bethesda III (B-III), 40 nodules Bethesda IV (B-IV) et 24 nodules Bethesda V (B-V),
- Enfin, pour 7 nodules (5 %) l'examen cytologique n'était pas contributif (Bethesda I, B-I).

Figure 13 : Répartition cytologique des nodules selon la Classification de Bethesda



Les 58 nodules échographiquement suspects (TI-RADS 4B ou 5) se répartissaient, selon leur cytologie, en 3 nodules Bethesda I, 5 nodules bénins (Bethesda II), 21 nodules indéterminés (Bethesda III, IV ou V) et 29 nodules malins (Bethesda VI) ; tandis que les 85 nodules de score TI-RADS non ou peu suspects (2, 3 ou 4A) se répartissaient en 4 nodules de cytologie non diagnostique (Bethesda I), 28 nodules bénins (Bethesda II), 50 nodules indéterminés (Bethesda III, IV ou V) et 3 nodules malins (Bethesda VI).

C. Histologiques

Quatre-vingt-cinq patients ont bénéficié d'une prise en charge chirurgicale (soit 59 % des patients), 56 nodules étaient malins (soit 66 % des nodules opérés) et 29 nodules étaient bénins (soit 34 % des nodules opérés).

La taille moyenne des nodules malins était de 32,5 mm (+/- 17,3 mm), celle des nodules bénins de 34,2 mm (+/- 12,1 mm), et cette différence n'était pas significative ($p=0,6$).

Parmi les 56 nodules malins, l'examen anatomopathologique a identifié 44 CPT (représentant 79 % des cancers), répartis en (Figure 14) :

- 14 CPT de forme classique (soit 32 % des CPT),
- 1 microcarcinome (mCPT) (soit 2 % des CPT),
- 19 variants vésiculaires (soit 43 % des CPT),
- 6 CPT à cellules hautes (soit 14 % des CPT),
- 2 de sous-type sclérosant diffus (soit 4,5 % des CPT),
- et 2 avec présence de nécrose (soit 4,5 % des CPT).

Trois carcinomes anaplasiques (dont un présentant un contingent peu différencié), et 1 carcinome peu différencié, présentant un contingent papillaire, leur sont associés sous la terminologie de CPT et apparentés pour la suite de ce travail.

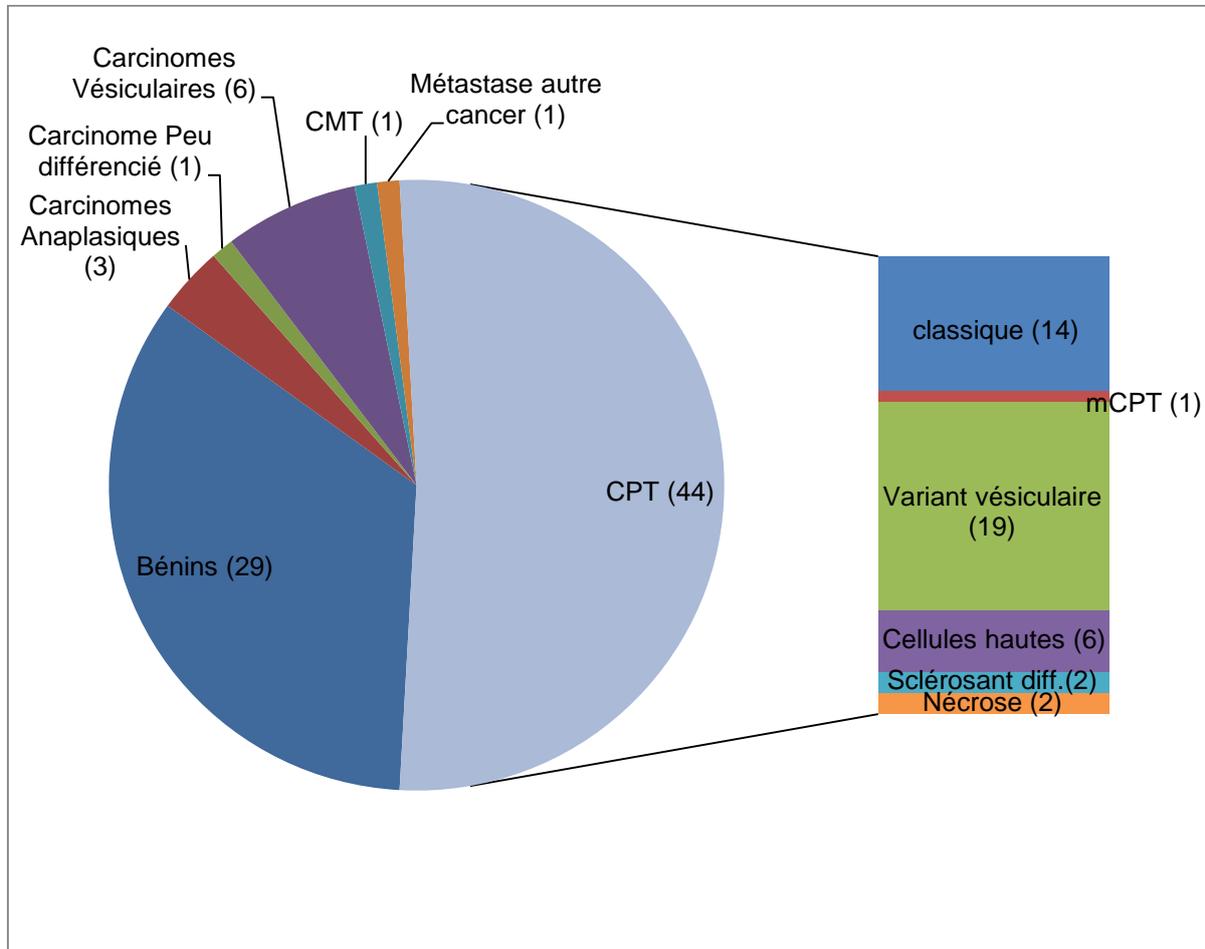
Les autres nodules malins se répartissaient en :

- 6 carcinomes vésiculaires,
- 1 carcinome médullaire thyroïdien (CMT),
- Et une métastase d'un autre cancer (broncho-pulmonaire).

Seize patients (19 % des patients opérés) se sont vu diagnostiquer un ou plusieurs foyers de microcarcinome de façon fortuite sur la pièce de thyroïdectomie (distincts du nodule ponctionné), dont 10 en plus du foyer carcinomateux principal.

Cinquante-huit patients n'ont pas bénéficié d'une prise en charge chirurgicale.

Figure 14 : Répartition histologique des 85 nodules opérés (CMT : Carcinome Médullaire Thyroïdien, CPT : Carcinome Papillaire Thyroïdien, mCPT : Microcarcinome Papillaire Thyroïdien, Sclérosant diff : sous-type sclérosant diffus).



Le tableau 8 indique les proportions de nodules malins selon le score échographique TI-RADS et la catégorie Bethesda.

Tableau 8 : Proportion des nodules d'histologie maligne parmi l'ensemble des nodules ponctionnés et parmi les nodules opérés, par score TI-RADS et par catégorie Bethesda.

		% Malins/total (Effectifs)	% Malins/opérés (Effectifs)
TI-RADS	2	0 % (0/1)	0 % (0/0)
	3	23 % (14/61)	48 % (14/29)
	4A	27 % (6/22)	55 % (6/11)
	4B	50 % (16/32)	76 % (16/21)
	5	77 % (20/26)	87 % (20/23)
Bethesda	I	14 % (1/7)	33 % (1/3)
	II	9 % (3/33)	38 % (3/8)
	III	14 % (1/7)	33 % (1/3)
	IV	23 % (9/40)	39 % (9/23)
	V	63 % (15/24)	71 % (15/21)
	VI	84 % (27/32)	100 % (27/27)

Cinq patients dont l'analyse cytologique concluait à la malignité (Bethesda VI) n'ont pas été opérés, 3 du fait de l'âge avancé et des comorbidités associées, l'un du fait de la progression d'une autre néoplasie, tandis qu'un patient a refusé la prise en charge chirurgicale.

II. Résultats de la recherche de mutation BRAF^{V600E}

La mutation BRAF^{V600E} a été mise en évidence dans 17 prélèvements sur les 143, soit une prévalence de 12% au sein de l'ensemble des nodules de notre série.

La mutation BRAF^{V600E} était significativement associée à la malignité, tout comme l'étaient un score TIRADS élevé (4B/5), et une classification Bethesda VI. Aucune association entre la malignité et le sexe, l'âge ou à la taille du nodule n'a été mise en évidence (tableau 9).

Tableau 9 : Comparaison des effectifs (et %) ou moyennes (et écart types) des facteurs démographiques et des caractéristiques (échographiques, cytologiques et moléculaire) des nodules en fonction de leur diagnostic histologique : Malin vs. Bénin (S : significatif/ NS : Non Significatif):

	Malins (56)	Bénins (29)	
Sexe H/F	17/39 (30 %/70 %)	6/23 (21 %/79 %)	NS (p=0.34)
Age moyen en années (écart type)	49.1 (+/-18.4)	48.2 (+/-15.1)	NS (p=0.81)
Taille moyenne du nodule en mm (écart type)	32.5 (+/-17.3)	34.2 (+/-12.1)	NS (p=0.6)
TIRADS 4B/5	36 (64 %)	8 (28 %)	S (p=0.001)
BETHESDA VI	27 (48 %)	0	S (p=6.10⁻⁶)
BRAF^{V600E}	17 (30 %)	0	S (p=9.10⁻⁴)

A. Selon TIRADS

La mutation BRAF^{V600E} a été mise en évidence dans 4,8 % des nodules TI-RADS 3 (3/62), 9,4 % des nodules TI-RADS 4B (3/32), et 42 % des nodules TI-RADS 5 (11/26). Elle n'a été mise en évidence dans aucun des 32 nodules TI-RADS 4A, ni dans le nodule TI-RADS 2.

Ainsi, la prévalence de la mutation était de 24 % au sein des nodules de score échographique suspect (14 nodules TI-RADS 4B ou 5 présentaient la mutation parmi les 58 nodules), significativement plus élevée que parmi les nodules non ou peu suspects au sein desquels elle était de 3,5 % (3 nodules TI-RADS 2, 3 ou 4A présentaient la mutation parmi les 85 nodules) ($p=0,0002$) (tableau 10).

Par ailleurs, 82 % des prélèvements mutés BRAF^{V600E} (14/17) étaient issus de nodules TI-RADS 4B ou 5.

Tableau 10 : Présence de la mutation BRAF^{V600E} selon le score TI-RADS

Scores TI-RADS	Effectif	BRAF ^{V600E}		
		Effectif (%)		
2	1	0 (0 %)	3 (3,5 %)	S (p=0,0002)
3	62	3 (4,8 %)		
4A	22	0 (0 %)		
4B	32	3 (9,4 %)	14 (24 %)	
5	26	11 (42 %)		

B. Selon Bethesda

La présence de la mutation BRAF^{V600E} dans chaque catégorie Bethesda est détaillée dans le tableau 11.

Elle a été détectée dans 44 % des nodules de cytologie maligne, 4 % des nodules de cytologies indéterminées (14 % des Bethesda III, 8 % des Bethesda V, non

détectée dans les Bethesda IV), et dans aucun nodule de cytologie bénigne ni de cytologie non diagnostique.

Ainsi 82 % des mutations BRAF^{V600E} (14 parmi les 17) étaient issues de nodules Bethesda VI.

Tableau 11 : Présence de la mutation BRAF^{V600E} selon la cytologie

CYTOLOGIE Bethesda	Effectif	BRAF ^{V600E} Effectif (%)
B-I	7	0 (0 %)
B-II	33	0 (0 %)
B-III	7	1 (14 %)
B-IV	40	0 (0 %)
B-V	24	2 (8 %)
B-VI	32	14 (44 %)

Ainsi concernant les 17 nodules mutés BRAF^{V600E}, 11 étaient TI-RADS 5 et parmi eux 10 étaient de cytologie maligne et 1 de cytologie indéterminée (Bethesda V). Trois étaient TIRADS 4B, tous de cytologie maligne, et 3 étaient TIRADS 3 dont 2 de cytologie indéterminée (Bethesda V et III) et 1 de cytologie maligne (Figure 15).

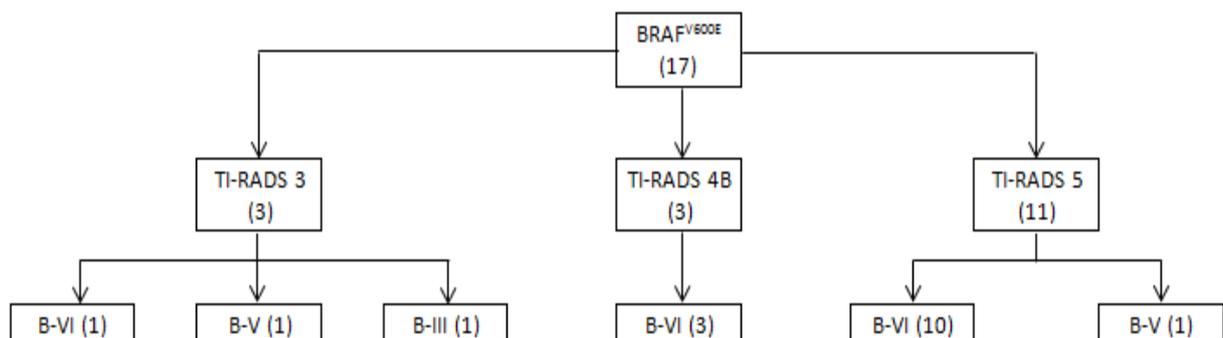


Figure 15 : Description des nodules mutés BRAF^{V600E} selon leur score TI-RADS et leur catégorie Bethesda.

C. Selon l'histologie

Parmi les 56 nodules malins à l'analyse histologique, 17 (soit 30 %) présentaient la mutation BRAF^{V600E} dans le produit de cytoponction.

Il s'agissait pour 14 d'entre eux de CPT (soit 32 % de l'ensemble des CPT) :

- 4 CPT de forme classique,
- 4 d'architecture vésiculaire,
- 5 à cellules hautes
- et 1 avec nécrose.

Les 3 autres prélèvements mutés étaient issus de carcinomes anaplasiques, dont un présentant un contingent peu différencié. La mutation était donc présente dans 35 % (17/48) des CPT et apparentés (CA et carcinomes peu différenciés) de notre série.

La prévalence de la mutation parmi les CPT et apparentés d'histologie agressive (CPT à cellules hautes, avec nécrose ou sclérosant diffus, CA et peu différenciés) était de 64 % (9 parmi les 14), tandis qu'elle était de 24 % (8 parmi les 34) au sein des CPT de bon pronostic (CPT classique, variant vésiculaire et microCPT), et cette différence de prévalence était statistiquement significative ($p=0,02$). En particulier, la mutation a été identifiée dans 100 % des CA (les 3 CA de notre série) et 83 % des CPT à cellules hautes (5 parmi les 6).

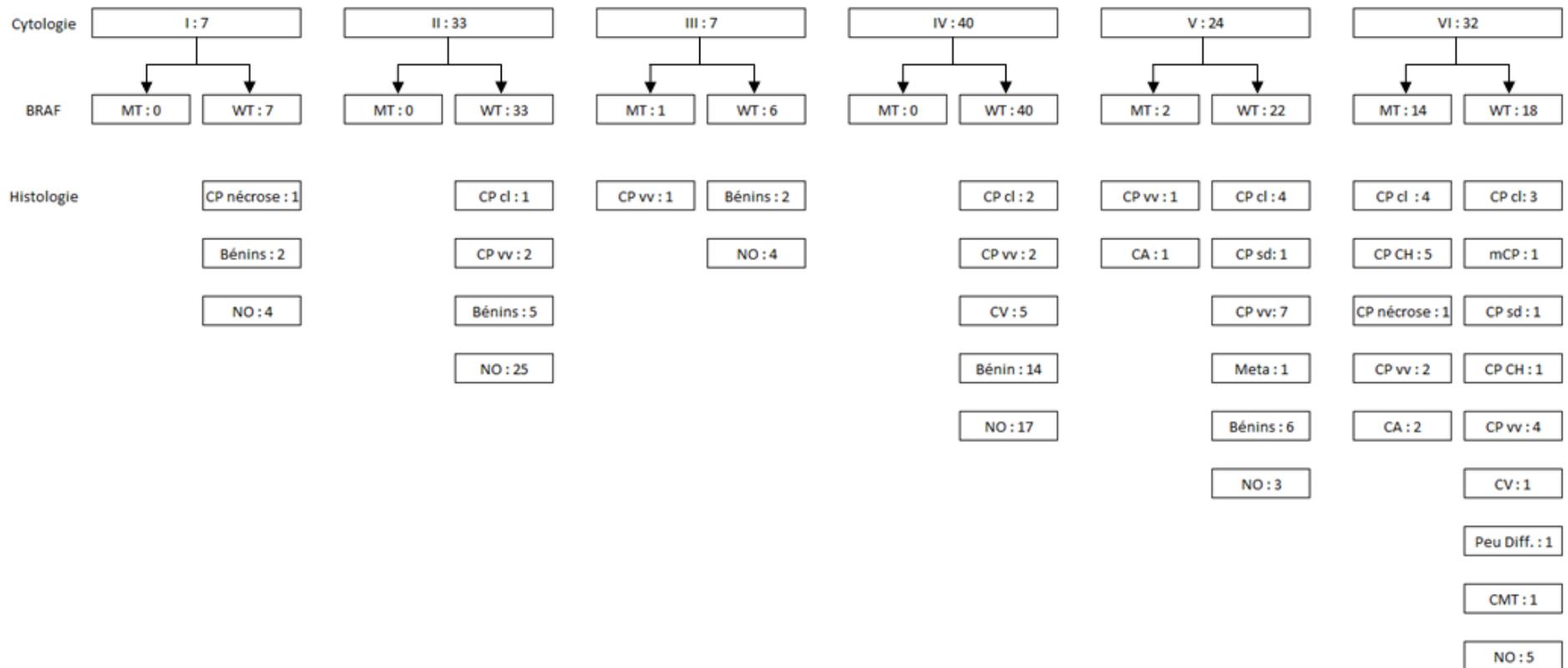
La mutation BRAF^{V600E} n'a été mise en évidence dans aucun des carcinomes d'histologie autre que papillaire, à savoir les carcinomes vésiculaires, le CMT, et la métastase de cancer broncho-pulmonaire ; et dans aucun nodule bénin. La présence de la mutation en fonction du résultat histologique est décrite dans le tableau 12.

Tableau 12 : Présence de la mutation BRAF^{V600E} selon l'histologie

Histologie		BRAF ^{V600E} Effectif/Total (%)		
CPT	CPT classique	4/14 (28.5%)	14/44 (32%)	17/48 (35%)
	CPT variant vésiculaire	4/19 (21%)		
	microCPT	0/1 (0%)		
	CPT à Cellules hautes	5/6 (83%)		
	CPT avec Nécrose	1/2 (50%)		
	CPT sclérosant diffus	0/2 (0%)		
Carcinome Anaplasique		3/3 (100%)	3/4 (75%)	
Peu différencié		0/1 (0%)		
Carcinome vésiculaire		0/6	0	
CMT		0/1		
Métastase		0/1		
Bénin		0/29		

La figure 16 représente les résultats des analyses cytologiques, moléculaires et histologiques des nodules opérés.

Figure 16 : Répartition des nodules selon leur catégorie Bethesda (Cytologie), leur statut mutationnel (BRAF MT : muté BRAF^{V600E} ou WT : non muté), et leur histologie (CA : Carcinome Anaplasique, CMT : Carcinome Médullaire Thyroïdien, CP cl: Carcinome Papillaire classique, CP CH : à cellules hautes, CP nécrose : avec nécrose, CP sd : sclérosant diffus, CP vv : variant vésiculaire, CV : Carcinome Vésiculaire, mCP : microcarcinome papillaire, Méta : métastase d'autre cancer, NO : Non Opéré, Peu Diff : Carcinome peu différencié).



III. Valeur diagnostique de la présence de la mutation BRAF^{V600E}

Pour attester de la valeur diagnostique de la mutation BRAF^{V600E} nous avons comparé la recherche de la mutation au gold standard, à savoir le diagnostic histologique. Les performances diagnostiques ont été évaluées uniquement au sein des nodules opérés.

A. Dans l'ensemble des nodules opérés

La sensibilité de la recherche de la mutation BRAF^{V600E} pour le diagnostic de malignité dans l'ensemble de notre série était de 30 %, sa spécificité et sa VPP de 100 %, sa VPN de 43 % (Tableau 16).

B. Parmi les nodules de cytologie indéterminée (Bethesda III, IV, V)

Soixante-et-onze nodules présentaient un diagnostic cytologique indéterminé : 7 nodules Bethesda III, 40 nodules Bethesda IV et 24 nodules Bethesda V. La mutation BRAF^{V600E} a été mise en évidence dans 4 % de l'ensemble de ces nodules indéterminés (3/71), et dans 6.4 % des nodules opérés de cette catégorie (3/47).

Parmi les 47 nodules indéterminés opérés, 25 se sont révélés malins au diagnostic histologique, répartis en :

- 11 variants vésiculaires de CPT, l'un Bethesda III, 2 Bethesda IV et 8 Bethesda V,
- 5 carcinomes vésiculaires, tous Bethesda IV,
- 6 formes classiques de CPT (dont 2 Bethesda IV et 4 Bethesda V),
- 1 carcinome anaplasique, 1 CP sclérosant diffus et une métastase de cancer bronchopulmonaire, tous Bethesda V.

Ainsi la proportion de variants vésiculaires de CPT et de carcinomes vésiculaires parmi les nodules malins de cytologie indéterminée (Bethesda III, IV ou V) était de

64 % (soit 16 parmi les 25), significativement plus élevée que parmi les nodules malins de cytologie Bethesda VI de 26 % (soit 7 parmi les 27) ($p=0,006$) (Figure 16). La différence n'était pas significative entre les catégories Bethesda III ou IV d'une part et la catégorie Bethesda V d'autre part (80 % soit 8/10 au sein des nodules Bethesda III ou IV vs. 53 % soit 8/15 dans les Bethesda V, $p=0,35$).

La mutation BRAF^{V600E} a été détectée chez 3 de ces 25 patients, soit une sensibilité pour le diagnostic de malignité dans cette catégorie de nodules indéterminés de 12 % (IC95% [2,55; 31,2]) (Tableau 13):

- Deux mutations BRAF^{V600E} étaient issues de patients présentant un diagnostic cytologique suspect de malignité (Bethesda V), l'examen anatomopathologique de la pièce de thyroïdectomie a confirmé un CPT d'architecture vésiculaire pour l'un (initialement TI-RADS 3 à l'échographie) et un carcinome anaplasique avec contingent papillaire pour l'autre (initialement TI-RADS 5 à l'échographie).
- Une mutation BRAF^{V600E} a été mise en évidence chez un patient présentant un diagnostic cytologique en faveur d'atypies de signification indéterminée (Bethesda III), l'examen anatomopathologique a confirmé un CPT d'architecture vésiculaire (initialement TI-RADS 3 à l'échographie).
- La mutation BRAF^{V600E} n'a été détectée dans aucun des nodules Bethesda IV.

Tableau 13 : Sensibilité de la mutation BRAF^{V600E} pour le diagnostic de malignité par catégorie de nodules indéterminés

	Bethesda III-IV-V	Bethesda III	Bethesda IV	Bethesda V
Se BRAF ^{V600E}	12 % (3/25)	100 % (1/1)	Nulle	13 % (2/15)
IC95%	[2,55;31,2]	(faible effectif)	(0/9)	[1,66;40,46]

La mutation BRAF^{V600E} n'a pas été détectée dans les 16 autres nodules de cytologie indéterminée (Bethesda III, IV et V) se révélant être des CPT. Elle n'a pas non plus été détectée au sein des 22 nodules bénins, des 24 nodules non opérés, de la métastase de cancer broncho-pulmonaire, ni au sein des 5 carcinomes vésiculaires (Tableau 14).

Tableau 14 : Mutation BRAF^{V600E} dans les nodules de cytologie indéterminée (III-IV-V) selon leur diagnostic histologique

Histologie	Effectifs	BRAF ^{V600E} Effectif (%)
MALINS	25	3 (12%)
CPT	18	2
CA	1	1
Peu différencié	0	0
Carcinome vésiculaire	5	0
CMT	0	0
Métastase autre cancer	1	0
BENINS	22	0
NON OPERES	24	0

C. Impact diagnostique de la mutation BRAF^{V600E}

Les sensibilités de la mutation BRAF^{V600E} seule pour le diagnostic de malignité au sein de l'ensemble des nodules opérés, des nodules de cytologie maligne (Bethesda VI), et des nodules de cytologie indéterminée (Bethesda III, IV ou V) étaient respectivement de 30 % (IC95% [18,8;44,1]), 52 % (IC95% [33,0; 70,7]), et 12 % (IC95% [2,55;31,2]). La proportion de variants vésiculaires de CPT ou de carcinomes vésiculaires parmi les nodules malins de ces catégories est plus importante au sein des nodules de cytologie indéterminée (Bethesda III, IV, V), catégorie où la sensibilité de la mutation BRAF^{V600E} pour le diagnostic de malignité est la plus faible (Tableau 15).

Tableau 15 : Sensibilité de la recherche de la mutation BRAF^{V600E} seule pour le diagnostic de malignité, et proportion de variants vésiculaires de CPT (CPT vv) et de carcinomes vésiculaires (CV) par catégorie.

	Ensemble des nodules	Nodules Bethesda VI	Nodules Bethesda III-IV-V
Se BRAF^{V600E}	30 % (17/56)	52 % (14/27)	12 % (3/25)
IC95%	[18.8;44.1]	[33,0;70,7]	[2,55;31,2]
% de CPT vv et de CV	45 % (19/56)	26 % (7/27)	64 % (16/25)

Parmi les 56 cancers de notre série, 27 étaient issus de nodules identifiés Bethesda VI à la cytoponction, soit une sensibilité de l'examen cytologique pour le diagnostic de malignité de 48,2% (IC95% [34.7;62.0]) (Tableau 16).

Parmi les 17 prélèvements mutés BRAF^{V600E}, 82 % étaient issus de nodules préalablement identifiés Bethesda VI par l'analyse cytologique, dont la valeur prédictive positive de malignité était de 100 % (IC95% [87.2;100]) (Tableau 16).

En combinant analyse cytologique et moléculaire, 30 patients ont bénéficié d'un diagnostic de malignité préopératoire :

- 27 nodules Bethesda VI
- Et 3 nodules de cytologie indéterminée (Bethesda III-IV-V) présentant la mutation BRAF^{V600E}.

Soit une sensibilité globale pour le diagnostic de malignité de 53,6% (IC95% [39.7;67.0]). L'analyse moléculaire a donc augmenté la sensibilité diagnostique de malignité de l'analyse cytologique de 5,4% (Tableau 16).

Par ailleurs, la mutation BRAF^{V600E} n'a été détectée dans aucun des 4 nodules de diagnostic cytologique initial bénin (Bethesda II) ou non diagnostique (Bethesda I) se révélant être des CPT à l'examen histologique.

L'échographie permettait d'identifier comme suspects (TI-RADS 4B ou 5) 36 des 56 nodules se révélant être des cancers à l'examen histologique, lui conférant une sensibilité pour le diagnostic de malignité de 64.3% (IC95% [50.4;76.6]) (Tableau 16).

Prendre en compte les critères échographiques (TI-RADS 4B ou 5) ou cytologiques (Bethesda VI) permettait d'obtenir une sensibilité de 67.9% (IC95% [54; 79.7]) (Tableau 16). Y associer la détection de la mutation BRAF^{V600E} n'a que peu amélioré cette sensibilité diagnostique (71,4 %, IC95%, soit une augmentation de 3,5 %) en permettant l'identification de 2 CPT de score échographique TI-RADS 3, l'un classé Bethesda III et l'autre Bethesda V en cytologie (Figure 15, Tableau 16). En effet, 88 % des prélèvements positifs pour BRAF^{V600E} proviennent de nodules préalablement identifiés comme malins par l'analyse cytologique (Bethesda VI) ou comme suspects par l'évaluation échographique (TI-RADS 4B ou 5) (Figure 15).

À noter que l'utilisation de l'association des critères échographiques (TI-RADS 4B ou 5), cytologiques (Bethesda VI) et de biologie moléculaire diminue la spécificité et la valeur prédictive de malignité en comparaison à l'analyse cytologique seule (Tableau 16).

Tableau 16: Comparaison des performances diagnostiques échographiques, cytologiques et de biologie moléculaire

	Se IC95%	Sp IC95%	VPP IC95%	VPN IC95%	Précision IC95%
TIRADS 4B/5	64.3% [50.4;76.6]	72.4 [52.8;87.3]	81.8 [67.3;91.8]	51.2 [35.1;67.1]	67.1% [56.0;76.9]
Bethesda B-VI	48,2% [34.7;62.0]	100% [88.1;100]	100% [87.2;100]	50% [36.6;63.4]	65,9% [54.8;75.8]
BRAF^{V600E}	30% [18.8;44.1]	100% [88.1;100]	100% [80.5;100]	43% [30.7;55.2]	54,1% [43.0;65.0]
B-VI et/ou BRAF^{V600E}	53,6% [39.7;67.0]	100% [88.1;100]	100% [88.4;100]	52,7 [38.8;66.4]	69,4% [58.5;79.0]
B-VI et/ou TIRADS 4B/5	67.9% [54;79.7]	72.4% [52.8;87.3]	82.6% [68.6;92.2]	53.9% [37.2;67.9]	69.4% [58,5;79.0]
TIRADS 4B/5 et/ou B-VI et/ou BRAF^{V600E}	71,4% [57,8;82,7]	72.4% [52.8;87.3]	83, 3% [69,8;92,5]	56,8% [39,5;72,9]	71,8% [60,96;81,00]

IV. Mutation BRAF^{V600E} et éléments pronostiques

La mutation BRAF^{V600E} a été détectée dans 17 prélèvements provenant de CPT et apparentés confirmés par l'histologie, parmi les 48 de notre série, soit 35 %.

Il y avait significativement plus de formes histologiques agressives (Cellules hautes, sclérosant diffus, avec nécrose, CA et carcinomes peu différenciés) parmi les CPT présentant la mutation BRAF^{V600E} que parmi ceux ne présentant pas la mutation (53 % vs. 16 %, p=0,02) (Tableau 17).

Concernant les facteurs influençant le pronostic des CPT, la mutation n'a pas été associée au genre, à l'âge supérieur à 45 ans, ni au statut ganglionnaire (N0/1 : absence/ présence d'un envahissement ganglionnaire) (Tableau 17).

Si l'effectif restreint ne nous permettait pas une comparaison entre chaque stade tumoral, nous avons pu noter, après regroupement des stades I et II d'une part, et III et IV d'autre part, une tendance à une proportion plus importante de stades III et IV dans le groupe de patients présentant la mutation, sans que cette différence ne soit significative (Tableau 17).

La mutation BRAF^{V600E} n'a pas été mise en évidence au sein du microcarcinome papillaire ponctionné de notre série.

Tableau 17 : Eléments pronostiques des CPT et apparentés selon le statut BRAF^{V600E} (muté) vs. BRAF WT (non muté).

		BRAF ^{V600E}	BRAF WT	Significativité
Effectif		17	31	
Genre	Masculin	3 (18%)	8 (26%)	NS
	Féminin	14 (82%)	23 (74%)	
Age	<45	6 (35%)	18 (58%)	NS
	≥ 45 ans	11 (75%)	13 (42%)	
N	N0*	6 (35%)	18 (58%)	NS
	N1*	11 (65%)	13 (42%)	
Stade TNM	I-II	9 (53%)	24 (77%)	NS 0,05<p<0,10
	III-IV	8 (47%)	7 (23%)	
Histologie	Non agressive (CPT classique, mCPT, variant vésiculaire)	8(47%)	26 (84%)	S p=0.02
	Agressive (Cellules hautes, nécrose, sclérose diffuse, CA, peu différencié)	9 (53%)	5 (16%)	

*N0/1 : absence/ présence d'un envahissement ganglionnaire cervical

Discussion

L'objectif principal de la mise en place de la recherche de mutation BRAF^{V600E} sur produit de cytoponction thyroïdienne était d'améliorer les performances diagnostiques de la cytoponction, notamment lorsque l'analyse cytologique était indéterminée. L'analyse rétrospective systématique des résultats provenant des 143 nodules prélevés au CHRU de Lille entre mars 2010 et juillet 2016 pour la recherche de la mutation BRAF^{V600E} se sont révélés décevants. En effet, malgré sa haute valeur prédictive positive de CPT, la mutation a été identifiée dans seulement 17 prélèvements, soit 12 % des nodules de notre série. Plus particulièrement, seulement 4 % (3/71) des nodules de cytologie indéterminée étaient porteurs de la mutation (représentant 14 % des nodules Bethesda III et 8 % des nodules Bethesda V, tandis qu'elle n'a pas été détectée dans les nodules Bethesda IV). La sensibilité diagnostique de ce test de biologie moléculaire, calculée au sein des nodules de cytologie indéterminée ayant été opérés, était de 12 % (IC95% [2,55;31,2], 3 parmi les 25). Ainsi, la détection de la mutation BRAF^{V600E} dans notre série a permis d'augmenter la sensibilité du diagnostic de malignité de 5,4 % seulement par rapport à l'analyse cytologique seule (Bethesda VI), passant de 48,2 % (IC95% [34.7;62.0]) à 53.6 % (IC95% [37.9;67.0]) au sein des nodules opérés. La majorité des nodules mutés BRAF^{V600E} (88 %) présentaient préalablement un score échographique suspect ou un résultat cytologique malin. Ces résultats ne nous permettent pas de définir une catégorie de nodules au sein de laquelle la mutation BRAF serait pertinente sur le plan diagnostique, qu'il s'agisse de leur classification Bethesda ou leur score TI-RADS. Enfin la faible proportion de nodules présentant la mutation BRAF ne nous a pas permis de lui justifier un intérêt pronostique à l'échelle individuelle.

Faible impact de la mutation BRAF^{V600E} dans la stratégie de prise en charge diagnostique

Exclusivement mise en évidence au sein de nodules correspondant à des CPT et des carcinomes apparentés (CA et carcinomes peu différenciés) dans notre série, la prévalence de la mutation BRAF^{V600E} y était de 35 %. Aucun des nodules bénins, ou malins d'autre histologie, ne présentait la mutation BRAF^{V600E}, le diagnostic de CPT ou apparenté était donc certain en sa présence. Rapportée en moyenne de 45 % dans la littérature (116), la prévalence de cette anomalie moléculaire au sein des CPT est variable selon les études, en lien notamment avec la distribution histologique des CPT, la mutation étant plus fréquente au sein de certains sous-types que sont les CPT à cellules hautes et les CPT classiques, et beaucoup plus rare parmi les variants vésiculaires. La prévalence de la mutation en Corée, où plus de 95 % des nouveaux diagnostics de cancer sont des CPT, et dont la majeure partie sont des sous-types classiques (117), est plus élevée (52 à 87 %) (117,118) qu'aux Etats-Unis ou en Europe (décrite entre 36 et 65 %) (48,98,119–121) (Annexe 1). La proportion élevée de variants vésiculaires au sein des CPT de notre série (39 % des 48 CPT et apparentés) y explique probablement la prévalence relativement faible de la mutation. Elle est proche de celle rapportée par Salvatore et al. en 2004 (38 % des 69 CPT présentaient la mutation), où la proportion de variants vésiculaires était également élevée (32 % des CPT) (119).

Les sensibilités de la mutation BRAF^{V600E} seule pour le diagnostic de malignité au sein de l'ensemble des nodules opérés, des nodules de cytologie maligne (Bethesda VI), et des nodules de cytologie indéterminée (Bethesda III, IV ou V) étaient respectivement de 30 % (IC95% [18,8;44,1]), 52 % (IC95% [33,0; 70,7]), et 12 % (IC95% [2,55;31,2]). Au sein des nodules indéterminés, elle était de 100 % parmi les Bethesda III (mais sur un très faible effectif, la mutation ayant été identifiée dans le seul nodule se révélant être un CPT parmi les 3 nodules opérés), de 13 % parmi les Bethesda V (mutation identifiée dans 2 des 15 nodules malins), et nulle pour les Bethesda IV (absente des 9 nodules malins dont 4 CPT).

Mise en évidence dans 82 % des cas dans des nodules préalablement identifiés malins par le diagnostic cytologique (Bethesda VI), sa présence a augmenté la

sensibilité diagnostique de l'examen cytologique de seulement 5,4 % en permettant la détection de 3 carcinomes papillaires issus de nodules de cytologie indéterminée, dont 2 Bethesda V qui auraient probablement été opérés en l'absence d'analyse moléculaire. En effet, les performances de l'analyse cytologique seule pour le diagnostic de malignité étaient déjà très bonnes dans notre centre : permettant d'identifier les nodules malins dans près de la moitié des cas de notre série (27/56 soit 48 %), le pourcentage de malignité au sein de la catégorie de nodules Bethesda VI opérés était de 100 %, et de 71 % au sein de la catégorie de nodules Bethesda V. Les patients concernés par cette dernière catégorie bénéficient ainsi la plupart du temps de la même prise en charge qu'en cas de cytologie Bethesda VI, à savoir une thyroïdectomie totale pour analyse histologique associée à un geste ganglionnaire ; la présence de la mutation n'a donc que peu d'impact pour ces derniers.

L'identification de la mutation BRAF^{V600E} a ainsi modifié la prise en charge pour un seul patient de notre série présentant un nodule de 38 mm, Bethesda III au diagnostic cytologique et de score échographique TI-RADS 3, se révélant être un variant vésiculaire de CPT à l'analyse histologique. L'analyse de biologie moléculaire a permis de poser l'indication de prise en charge chirurgicale chez ce patient initialement réticent, et de la lui faire accepter.

Une des explications possibles à cette faible proportion de la mutation BRAF^{V600E} parmi les nodules de cytologie indéterminée de notre travail, est la prépondérance de nodules se révélant être des carcinomes vésiculaires ou des variants vésiculaires de CPT parmi les cancers de cette catégorie (16 parmi les 25 cancers, soit 64 %), significativement plus importante que parmi les nodules malins Bethesda VI (7 parmi les 27 cancers, soit 26 %). En effet, dans la littérature, la mutation BRAF^{V600E}, spécifique des CPT, est rapportée absente des carcinomes vésiculaires et de prévalence plus faible au sein des variants vésiculaires de CPT (près de 12 %) en comparaison aux autres sous types de CPT (116), leur tumorigénèse étant dépendante d'autres anomalies moléculaires.

Par ailleurs, la mutation BRAF^{V600E} n'a été détectée dans aucun des 4 CPT de diagnostic cytologique initial bénin (Bethesda II) ou non diagnostique (Bethesda I), ne permettant donc pas de corriger le diagnostic cytologique.

En 2005, en combinant les résultats de 5 études, Xing rapportait une sensibilité diagnostique de malignité de la mutation parmi 69 nodules de cytologie indéterminée de 17 % (116). Dans le travail monocentrique de Nikiforov en 2011, elle était de 14 % parmi 121 nodules de cytologie indéterminée se révélant malins au diagnostic histologique (36 % pour les nodules Bethesda V, 3 % pour les nodules Bethesda IV et 14 % pour les nodules Bethesda III) (122). Ces résultats suggéraient la sensibilité insuffisante de la mutation afin de résoudre le dilemme diagnostique des cytologies indéterminées. Deux larges méta-analyses récentes (123,124) ont confirmé ces résultats avec pour la dernière, réalisée en 2015 et portant sur un ensemble d'environ 16 170 patients, une sensibilité diagnostique de la mutation sur produit de cytoponction de 69 % dans les cytologies malignes et de 30 % dans les cytologies indéterminées, soit quelque peu supérieure à celle rapportée dans notre série.

Plusieurs auteurs ont corrélé la présence de la mutation BRAF^{V600E} à la catégorie Bethesda du nodule afin d'étudier spécifiquement son apport diagnostique dans les nodules cytologiquement indéterminés. Otori et *al.* ont repris les résultats d'une grande partie d'entre elles entre 2009 et 2012 (125), montrant que la majorité des nodules présentant la mutation étaient Bethesda VI (entre 43,5 et 87,5 %). De plus, il existait une grande variabilité de distribution de la mutation parmi les différentes catégories de nodules indéterminés (Bethesda III, IV et V), avec, dans certaines études, un taux de mutation BRAF^{V600E} au sein des nodules Bethesda III et IV très faible en comparaison aux nodules Bethesda V et VI, à l'origine d'un moindre impact diagnostique. C'est notamment le cas dans le travail de Zatelli et *al.* (98), où parmi les 111 nodules de cytologie indéterminée, 11 présentaient la mutation, dont 10 Bethesda V. Par ailleurs sa présence permettait de corriger le diagnostic dans 6 nodules Bethesda II, augmentant ainsi globalement la sensibilité diagnostique de l'analyse cytologique de 22 %, mais de 9 % seulement en ne comptant comme indéterminés que les nodules Bethesda III et IV. Pour Marchetti et *al.* en 2009 (98,120,121), parmi les 52 nodules de cytologie indéterminée, seuls des nodules Bethesda V présentaient la mutation. De même, dans une large étude prospective menée par Kim et *al.* en 2010 portant sur 961 patients dont 279 ont été opérés (126), la mutation BRAF^{V600E} n'était détectée qu'au sein de nodules Bethesda V parmi ceux de cytologie indéterminée. Cependant elle permettait la correction du diagnostic pour 2 nodules de cytologie bénigne et 7 d'analyse cytologique non diagnostique. Pour d'autres auteurs, la mutation BRAF étant présente dans plus de 10 % des cas dans des nodules Bethesda

III ou IV, son apport diagnostique était alors jugé plus pertinent (47,125). Si la prépondérance de carcinomes vésiculaires et de variants vésiculaires de CPT au sein des catégories Bethesda III et IV participe à la faible prévalence de la mutation dans ces catégories, une variabilité dans l'application des critères cytologiques du système de Bethesda peut être à l'origine des différences de distribution de la mutation selon les catégories indéterminées entre les études. En particulier, la frontière entre les catégories III et V d'une part et IV et V d'autre part peut varier d'un cytologiste à l'autre et d'un centre à l'autre. D'où la nécessité d'interpréter la présence de la mutation en fonction du risque de malignité associé à la catégorie cytologique, celle-ci étant d'autant plus informative que la sensibilité diagnostique de l'analyse cytologique est faible.

Parmi les 3 nodules de cytologie indéterminée présentant la mutation l'un présentait un score échographique suspect (TI-RADS 5), tandis que 2 étaient TI-RADS 3, ne permettant donc pas de proposer une recherche de la mutation BRAF^{V600E} chez les seuls nodules cytologiquement indéterminés mais échographiquement suspects. Concernant l'ensemble des nodules mutés BRAF^{V600E}, leur majorité présentait un score échographique suspect (14 nodules TI-RADS 4B ou 5, soit 82 % des 17 nodules mutés), voire associé à une malignité quasi-certaine (11 nodules TI-RADS 5 soit 65 % des 17 nodules mutés), la présence de la mutation n'y avait donc pas de réel intérêt diagnostique. Par ailleurs, **la mutation n'a été détectée dans aucun nodule TI-RADS 4A, qui sont les plus ambigus sur le plan échographique.** Ces résultats ne nous permettent donc pas de définir une catégorie TI-RADS dans laquelle la mutation BRAF^{V600E} serait particulièrement pertinente sur le plan diagnostique.

Intérêt pronostique de la mutation BRAF^{V600E} limité

Nous rapportons une répartition différente de la mutation BRAF^{V600E} selon le sous-type histologique. En particulier, sa prévalence était la plus élevée au sein des CPT à cellules hautes (83 % soit 5 parmi les 6), comme décrit dans la littérature (116), traduisant le potentiel d'agressivité associé à la mutation BRAF^{V600E}.

Ce facteur pronostique est étayé par la présence en plus grand nombre, et de façon significative (53 % vs. 16 %, $p=0,02$), de formes histologiques agressives (Cellules hautes, sclérosant diffus, avec nécrose, CA et carcinomes peu différenciés) parmi les CPT de notre série présentant la mutation BRAF^{V600E}, ainsi que par la tendance à une association de sa présence avec un stade tumoral de moins bon pronostic (stades III et IV), sans que celle-ci ne soit significative (47 % vs. 23 %, $0,05 < p < 0,10$). Cependant, nous n'avons pas mis en évidence d'association de la mutation BRAF^{V600E} à d'autres facteurs pronostiques tels que le sexe, l'âge supérieur à 45 ans ou le statut ganglionnaire dans notre série, sa faible sensibilité diagnostique y limitant l'exploration de son rôle pronostique.

La prévalence plus élevée de la mutation au sein des CPT d'histologie plus agressive et en particulier des CPT à cellules hautes est décrite par de nombreux auteurs et appuyée par plusieurs méta-analyses (100,127). Par ailleurs, si de nombreux travaux ont rapporté l'association de la mutation aux principaux facteurs de mauvais pronostic des CPT que sont l'extension extra-thyroïdienne, le statut métastatique ganglionnaire, et le stade tumoral avancé (Stades III et IV) (100,127,128), son association avec d'autres facteurs de mauvais pronostic comme le sexe masculin décrite par Xu et al. (129), ou l'âge avancé rapportée par Nikiforova et al.(49), est plus controversée. La mutation BRAF^{V600E} a été mise en évidence dans 75 % des carcinomes anaplasiques ou peu différenciés avec contingent différencié papillaire dans notre série (3 parmi les 4). Dans la série de Nikiforova, la mutation était présente dans 42 % des cancers anaplasiques et peu différenciés avec contingent papillaire, à la fois au sein du contingent bien différencié et au sein du contingent peu différencié, signant son rôle probable dans la progression tumorale vers ces carcinomes de mauvais pronostic.

Ainsi, malgré sa grande spécificité, et si sa valeur prédictive positive permet d'établir un diagnostic certain de CPT, l'absence de mutation ne permet pas de l'exclure. De plus, la proportion de patients présentant un CPT correctement identifié par la présence de la mutation BRAF^{V600E} seule est faible, notamment au sein des nodules de cytologie indéterminée. Cette faible prévalence la rend insuffisante à visée diagnostique.

Par ailleurs, elle ne peut pas être utilisée comme marqueur pronostique à l'échelle individuelle de façon générale. En effet, bien que sa présence soit associée à certains facteurs de pronostic péjoratif (histologie agressive, tendance à son association avec un stade tumoral avancé), tous les carcinomes porteurs d'une mutation BRAF^{V600E} n'ont pas systématiquement un plus mauvais pronostic. À l'inverse, l'absence de détection de la mutation n'exclut pas le risque d'une évolution péjorative.

Enfin, son caractère spécifique des CPT et apparentés et sa plus faible prévalence au sein du sous-type de variant vésiculaires de CPT (130) sont un facteur limitant le diagnostic de malignité des cancers thyroïdiens non papillaires, notamment des carcinomes vésiculaires, ainsi que des variants vésiculaires de CPT. Or, ce sont justement souvent ces sous-types histologiques qui posent le plus de difficultés d'évaluation échographique et cytologique. Dans notre travail, cela concernait 8 cancers non papillaires (soit 14% des cancers) dont 6 étaient de cytologie indéterminée (Bethesda IV), et 15 variants vésiculaires de CPT.

Ces résultats plaident pour la nécessité d'utiliser un autre outil diagnostique permettant de mieux définir la prise en charge, en particulier pour les nodules dont la cytoponction donne un risque intermédiaire de malignité (entre 5 et 30%) : pour les lésions de significations indéterminées et les tumeurs folliculaires ou oncocytaires, voire pour les nodules suspects de malignité (notamment dans les centres où le risque de malignité est inférieur à 70 % dans la catégorie Bethesda V) en établissant non seulement un diagnostic certain de malignité pour les cancers, mais également en affirmant la bénignité des autres nodules.

Limites de notre travail

Nous rapportons les résultats de la première utilisation de la biologie moléculaire sur produit de cytoponction de nodule thyroïdien au CHRU de Lille. L'objectif de ce travail était premièrement de mettre au point la technique de recherche de la mutation BRAF^{V600E} et de s'assurer de sa faisabilité, et deuxièmement d'évaluer son intérêt, en deuxième intention, au sein des nodules de cytologie indéterminée. En pratique, la recherche de mutation a finalement souvent été élargie, à la demande du praticien

(endocrinologue, radiologue ou chirurgien), à d'autres nodules présentant des caractéristiques problématiques, cliniques (en atteste la taille moyenne des nodules élevée), échographiques ou pronostiques, et non de façon systématique après cytologie indéterminée. Ce mode d'inclusion est à l'origine d'un important biais de sélection initial des nodules dans notre travail. Il est à l'origine de la proportion plus importante de cancers parmi l'ensemble des nodules de notre série (39 %), en comparaison au taux de 5 à 15 % habituellement rapporté dans la littérature, notamment dans les catégories TI-RADS et Bethesda les moins suspectes. Cependant, cette sélection initiale constitue également une force puisqu'elle nous a permis d'évaluer l'intérêt en pratique courante de la recherche de mutation $BRAF^{V600E}$, c'est-à-dire ce qu'elle apporte réellement au clinicien en difficulté afin de définir une conduite à tenir au terme d'une évaluation clinique, échographique et cytologique bien menée. À noter que nous n'avons pas pu évaluer l'apport de la recherche de la mutation par rapport aux données scintigraphiques, un seul des patients de notre série ayant bénéficié d'une scintigraphie au MIBI. L'intérêt de la scintigraphie dans l'évaluation des nodules thyroïdiens normofonctionnels devrait faire l'objet prochainement d'un travail spécifique.

À ce biais initial s'ajoute le caractère rétrospectif de notre travail, impliquant que la décision chirurgicale ait été prise devant un faisceau d'arguments, en tenant compte du statut mutationnel du gène *BRAF* d'une part, mais également des facteurs que sont le score échographique TI-RADS, la catégorie Bethesda, et le contexte clinique. Il existe donc un biais de sélection des nodules opérés, plus à risque de malignité, d'où une proportion de cancers importante parmi les nodules opérés (66 % de cancers et 34 % de nodules bénins, soit près de deux fois plus de cancers), en comparaison à celle rapportée en France à grande échelle, de 4 cancers opérés pour 5 nodules bénins en 2010 (66) (Figure 17). Nos résultats traduisent une prise en charge adaptée des nodules thyroïdiens dans notre centre, résultant d'une évaluation préopératoire minutieuse et permettant d'aboutir à une faible proportion de thyroïdectomies diagnostiques (Figure 17).

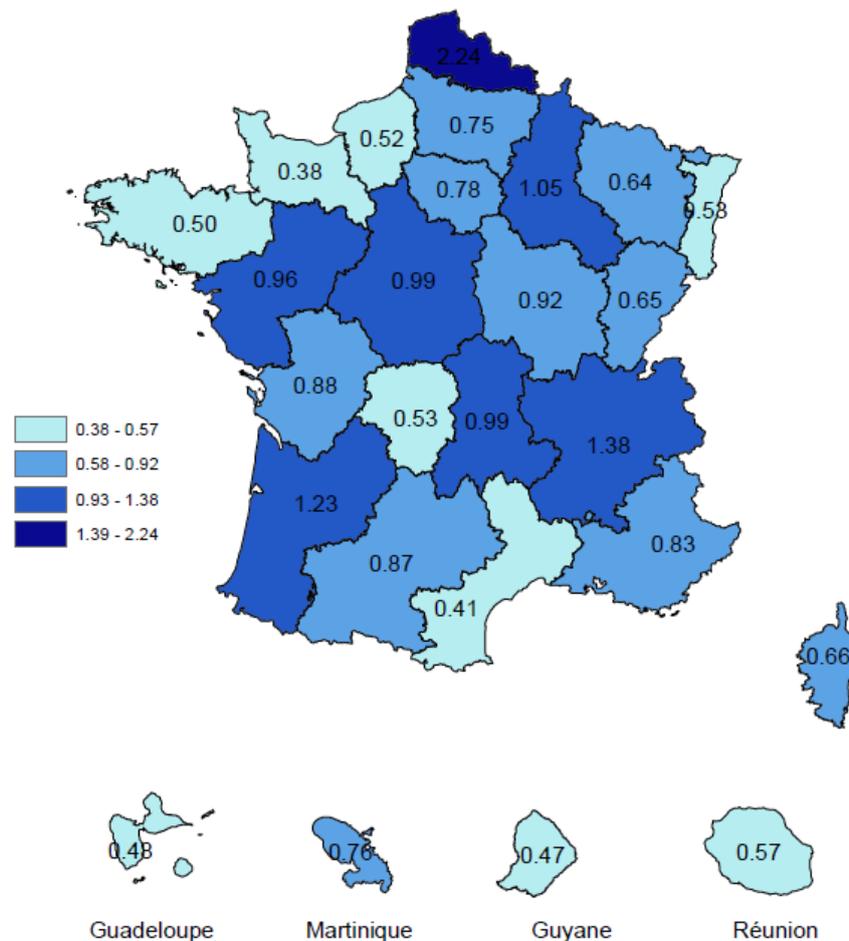


Figure 17 : Ratios de thyroïdectomies pour cancer/nodule bénin en France en 2010 : variant de 0,4 à 2,2, plus le ratio est faible, plus les opérations pour nodules bénins sont surreprésentées par rapport aux opérations de cancers. (Source : Cnamts 2010) (66).

On trouve par ailleurs une bonne concordance des caractéristiques démographiques des cancers de notre série avec celles rapportées en France (66) : dans 70% des cas ce sont les femmes qui étaient concernées, à un âge moyen de 49 ans, et les CPT représentaient 79 % de ces cancers.

Ce biais dans la sélection des nodules opérés explique également des taux de cancer par catégorie Bethesda, calculés par rapport aux nodules opérés, élevés, et en particulier supérieurs à ceux prédits par l'OMS dans les catégories à faible risque de malignité (Bethesda II et III), tandis qu'ils y sont concordants dans les catégories à risque plus élevé (Bethesda IV, V et VI). Ce phénomène est également observé au sein des scores TI-RADS : les taux de cancers observés dans notre travail au sein des scores TI-RADS non suspects (3 et 4A) sont bien supérieurs à ceux définis par le

travail de G. Russ : 48 % parmi les nodules TI-RADS 3, et 55 % parmi les nodules TI-RADS 4A, tandis que G. Russ évalue les risques de malignité dans ces catégories à respectivement 0,25 % et 6 %. Par ailleurs la proportion de nodules opérés au sein de ces catégories est plus faible qu'au sein des scores échographiques suspects (48 % des nodules TI-RADS 3 et 4A et 76 % des nodules TI-RADS 4B et 5 ont été opérés). En revanche, les taux de cancers parmi les nodules de scores échographiques suspects (TI-RADS 4B et 5) sont concordants avec ceux rapportés par G. Russ (75) : 76% des nodules TI-RADS 4B opérés et 87% des nodules TI-RADS 5 opérés étaient malins (3 nodules TI-RADS 5 n'ont pas été opérés), les risques de malignité définis par G. Russ dans ces 2 catégories étant respectivement de 69 et 100 %, attestant de la bonne valeur prédictive positive du score TI-RADS.

Par ailleurs, le caractère relativement récent de la mise en place de la recherche de la mutation BRAF^{V600E} au CHRU n'a pas permis le recul nécessaire au suivi des patients afin d'évaluer la valeur pronostique de la mutation et ses conséquences à moyen et long terme. C'est notamment le cas concernant le caractère iodo-réfractaire des CPT présentant la mutation décrit dans la littérature, ou le risque de récurrence.

Enfin, 9 % des recherches de la mutation BRAF^{V600E} se sont révélées ininterprétables, concordant pour la plupart (86 %) avec une cytologie ininterprétable en raison d'une quantité de matériel cellulaire et génétique insuffisante. Par ailleurs parmi l'ensemble des recherches de mutation BRAF^{V600E} possibles, 5 % des cytologies étaient ininterprétables. Dans le travail de Kim et al. en 2010, mené sur une large cohorte de 1074 patients, 4,5 % des recherches de la mutation étaient ininterprétables, et 6,1 % des cytologies restaient ininterprétables malgré une quantité d'acide nucléique suffisante pour la recherche de la mutation (126).

Vers un test diagnostique idéal

Plusieurs études ont exploré l'intérêt de la recherche simultanée de plusieurs événements moléculaires afin d'affirmer la malignité d'un nodule (modèle du « rule-in » pour les anglo-saxons). Un panel initial des 7 altérations les plus fréquentes (mutations somatiques des oncogènes *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* et *HRAS* et gènes de

fusion *RET/PTC1*, *RET/PTC3* et *PAX8/PPAR γ*), sous le nom de ThyGenX, a notamment été évalué sur une large population de 513 nodules (122). Les fortes VPP de malignité dans les nodules de cytologie indéterminée Bethesda III, IV et V, respectivement de 88%, 87% et 95%, permettaient d'orienter raisonnablement les patients concernés vers une prise en charge chirurgicale adaptée en cas de présence d'anomalie moléculaire. Leur absence diminuait le risque de malignité à 6 % dans la catégorie Bethesda III, proche d'une cytologie bénigne, permettant une simple surveillance échographique. Cependant ce risque de malignité restait significatif dans les catégories Bethesda IV et V, à respectivement 14 % et 28 %, en l'absence de mutation, ne permettant pas de rassurer le patient.

À l'opposé de cette stratégie visant à affirmer le caractère malin d'un nodule, une autre utilisation de la biologie moléculaire est à l'étude et consiste à éliminer la malignité (modèle du « rule out »), grâce à une valeur prédictive négative élevée. Celle-ci repose sur l'étude du profil d'expression d'un ensemble de gènes d'intérêt. Il peut alors s'agir de gènes codant pour des protéines, analysés par des techniques de puces à ADN (« microarray ») à partir de l'ARN extrait du matériel de cytoponction. Une des premières études basées sur le transcriptome a été publiée en 2012 aux Etats Unis, définissant un profil d'expression de 167 gènes classant les nodules en « probablement bénin » ou « suspect » (131). Pour des nodules de risque initial de malignité inférieur à 25%, soit Bethesda III et IV, un résultat du test en faveur de la bénignité permettait de réduire ce risque à moins de 6%, proche de celui d'une cytologie bénigne, permettant un suivi échographique de ces nodules et de surseoir à la chirurgie. Mais en cas de nodule Bethesda V, catégorie au sein de laquelle le risque de malignité initial était de 62 %, la VPN était sous optimale pour être décisionnelle (15 % de risque de malignité), soulignant la dépendance de ce paramètre au pourcentage de cas malins au sein de la catégorie. Par ailleurs les faibles VPP de malignité (38 % pour les nodules Bethesda III, et 37 % pour les Bethesda IV) de ce test en cas de résultat « suspect » ne le rendaient pas informatif. Ce travail a conduit, aux Etats Unis, au développement d'une solution commerciale, Afirma®, pour laquelle d'autres études ont confirmé ces performances diagnostiques en cas de résultat en faveur de la bénignité chez des patients présentant des nodules classés Bethesda III ou IV, bien que la plupart de ces patients classés « bénins » n'étaient donc pas opérés, à l'origine d'une incertitude sur la VPN (132,133). Cependant ces performances diagnostiques étaient moins bonnes dans l'étude réalisée à la Mayo Clinic (VPP et

spécificités plus faibles), dans laquelle le pourcentage de nodules prédits « bénins » par le test moléculaire, parmi les 60 Bethesda III et IV sélectionnés, était plus faible (27 % vs. 41 % dans le travail initial d'Alexander et *al.* (131) (134). Cette étude suggérait par ses résultats que la performance diagnostique du test dépendait de l'expertise en amont de l'analyse cytologique, celui-ci étant moins intéressant en cas de cytologie de meilleure qualité comme c'est le cas dans cette équipe très spécialisée. Afin d'améliorer les performances de cette solution, deux autres tests ont été développés : Afirma MTC, analysant l'expression de gènes du CMT, et Afirma BRAF, détectant la mutation BRAF^{V600E}. Présentant tous deux une haute spécificité (135,136) ils permettent d'affirmer le diagnostic de malignité, notamment en cas de résultat du test Afirma simple « suspect », et pourraient être utiles en cas de nodule Bethesda V, dans lesquels le test Afirma simple n'est pas recommandé.

Ces premiers tests, limités par une faible VPP (Afirma), ou une faible VPN (ThyGenX), illustrent la nécessité d'élaborer un test comportant à la fois une VPN suffisante pour éliminer la malignité et une VPP élevée afin de décider raisonnablement d'une prise en charge chirurgicale adaptée.

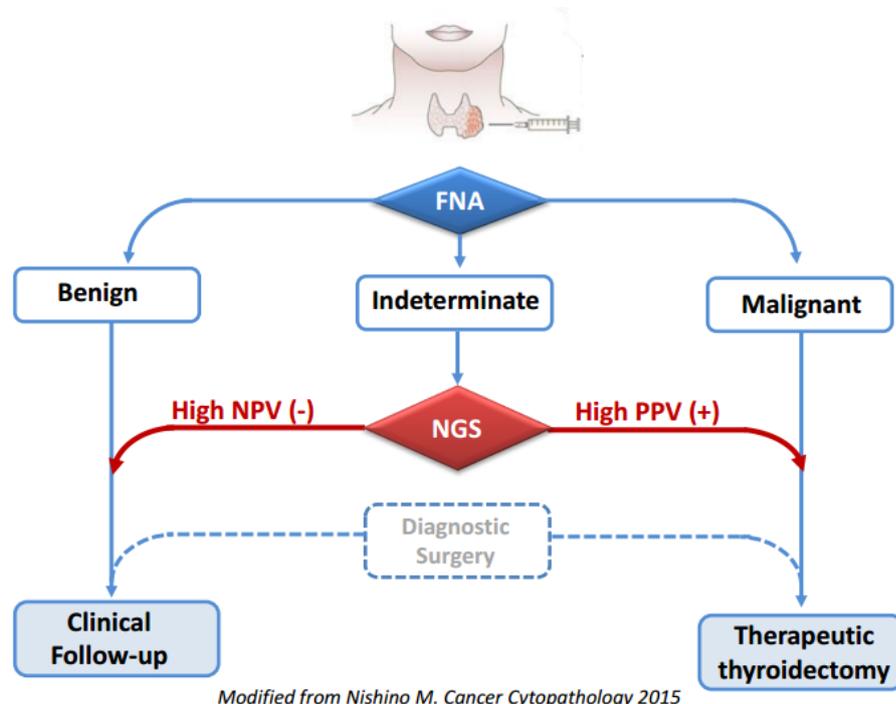


Figure 18 : Le test moléculaire idéal pour les patients présentant des nodules de cytologies indéterminées : hautes VPN et VPP. D'après Pr Nikiforova, IGR 2017, issu de Nishino M. *Cancer Cytopathology* 2015 (136)

Ce test moléculaire idéal semble être accessible grâce à la technique du séquençage à haut débit de nouvelle génération (NGS, *Next Generation Sequencing*) permettant depuis quelques années de rechercher de manière simultanée et rentable un large panel des anomalies moléculaires connues dans un type de cancer, cela par l'analyse du génome entier, de l'exome (régions codantes du génome) ou du transcriptome (ensemble des ARN issus de la transcription du génome). Sa supériorité en termes de sensibilité, coût et rapidité de rendu de résultat par rapport aux méthodes antérieures d'analyse moléculaire sont aujourd'hui reconnues (137–139). Le travail récent du consortium TCGA (The Cancer Genome Atlas) (60), appliquant le NGS à 402 CPT, a permis d'étendre le champ des anomalies moléculaires connues dans les CPT, diminuant ainsi la proportion de CPT sans anomalie moléculaire mise en évidence de 25% à 3,5%.

L'intérêt de son application au produit de cytoponction thyroïdienne a également été approuvé par plusieurs études, plus sensible que l'analyse séquentielle de plusieurs anomalies moléculaires, nécessitant une quantité moindre d'acide nucléiques, et permettant de réduire l'incertitude diagnostique des nodules de cytologie indéterminée (140–143).

À terme, les bénéfices attendus du NGS combiné aux marqueurs moléculaires sont d'ordre

- Diagnostique, en particulier dans les nodules de cytologie indéterminée, afin d'éviter les thyroïdectomies diagnostiques,
- Pronostique, en identifiant les anomalies moléculaires associées à un pronostic défavorable,
- Et prédictif de la réponse thérapeutique, en permettant la sélection des agents thérapeutiques en fonction du profil moléculaire, en particulier pour les patients présentant des formes réfractaires à l'iode radioactif et pour lesquels les chimiothérapies sont peu efficaces, les thérapies ciblées inhibant certains acteurs de la tumorigénèse semblant prometteuses.

C'est notamment en utilisant le NGS que le Pr Nikiforov a développé une puce à ADN évolutive, lui permettant d'ajouter, au fil de leur découverte, les dernières anomalies moléculaires identifiées dans les cancers thyroïdiens. La performance d'une des dernières versions de cette puce permettant le séquençage à haut débit (ThyroSeq v2®), étudiant 13 gènes (*H-Ras*, *N-Ras*, *K-Ras*, *BRAF*, *AKT1*, *CTNNB1*,

GNAS, *PIK3CA*, *PTEN*, *RET*, *TP53*, *TSHR*, *TERT*) et 42 types différentes de gènes de fusion (issu des réarrangements chromosomiques de *RET*, *PPAR γ* , *NTRK1*, *NTRK3*, *BRAF* et *ALK*), a été évalué sur produit de cytoponction de 143 nodules classés Bethesda IV, avant prise en charge chirurgicale, et pour lesquels la prévalence de la malignité était au final de 27% (112). La sensibilité de détection des cancers était de 90% et la valeur prédictive négative de 96%. Le fait d'avoir augmenté de façon significative le nombre d'anomalie moléculaires recherchées par rapport à la version précédente ne modifiait que peu la VPP (83% contre 86% (112)). Suite aux travaux du TCGA, le même type d'approche a été réalisée sur 465 nodules classés Bethesda III par l'examen cytologique, en utilisant une version évolutive de la puce décrite précédemment (ThyroSeq v2.1®). La sensibilité de la biologie moléculaire était de 90,9%, la spécificité de 91,8%, la VPN de 96,9% et la VPP de 76,9% (144).

Grace aux VPN et VPP élevées de cette puce à ADN, l'absence d'anomalie moléculaire mise en évidence permet de conseiller raisonnablement une surveillance échographique, tandis que la présence d'une anomalie moléculaire, particulièrement celles présentant une forte spécificité, conduit vers une prise en charge chirurgicale orientée.

Une autre stratégie à l'étude est celle de l'analyse de l'expression des microRNA (ARN non traduits), développée via la solution commerciale ThyraMIR™ (étude de l'expression de 10 miRNA). Des travaux récents ont notamment montré que l'expression différentielle des microARN permettait de prédire dans 92% des cas la nature bénigne ou maligne d'un nodule thyroïdien, et le fait de combiner ces données au statut mutationnel permettait d'augmenter la performance diagnostique de chacun (145).

Obstacles à l'application de la biologie moléculaire

En parallèle de ces bénéfiques diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques attendus de la biologie moléculaire, il ne faut pas omettre les facteurs limitants que sont la mise en place de ces nouvelles technologies, leur coût, et le délai de rendu de leur résultat pour le patient. En effet, si plusieurs solutions commerciales de tests moléculaires ont été développées, celles-ci n'ont pas été utilisées dans la pratique quotidienne en Europe, et a fortiori en France, malgré leurs performances diagnostiques, en partie parce que l'analyse séquentielle de différents marqueurs moléculaires s'avère consommatrice en termes de coût financier et de temps.

À titre d'exemple, concernant la recherche de la mutation BRAF^{V600E} seule sur produit de cytoponction au CHRU de Lille, son coût était identique à celui concernant les coupes histologiques de mélanome, cancer broncho-pulmonaire et colorectal (116,30 euros par patient, coût global prenant en compte les réactifs, le personnel, les frais de structure, l'extraction, etc.). Cependant elle nécessitait une voie de traitement différente de celle empruntée par les coupes histologiques, en particulier du fait d'une technique d'extraction d'ADN spécifique nécessitant un temps supplémentaire au personnel. À cet obstacle matériel s'ajoutait l'impact thérapeutique certain dans ces pathologies, contrairement aux cancers thyroïdiens, justifiant la nécessité d'axer la recherche de la mutation à leur profit : elle a concerné environ 2800 coupes paraffinées en 2016 (1500 issues de cancers broncho-pulmonaires, 1100 issues de cancer colorectal et 200 issues de mélanomes), nombre bien plus élevé que notre effectif de 143 analyses sur produit de cytoponction thyroïdienne testées en 6 ans. La recherche de la mutation BRAF^{V600E} sur produit de cytoponction de nodule thyroïdien a donc été pour le moment interrompue au CHRU de Lille.

Deux études sont en cours en France, avec pour objectif de généraliser l'utilisation de la biologie moléculaire : l'étude SWEETMAC visant à préciser son intérêt couplé à l'élastométrie pour des nodules de cytologie indéterminée avec indication chirurgicale. La seconde étude, CITHY, européenne, à laquelle a participé le CHRU de Lille, cherche à définir le profil d'expression génique permettant de classer les nodules.

Les avantages en termes de sensibilité, de temps et de coût du NGS permettent d'anticiper une meilleure prise en charge des nodules thyroïdiens basée sur la biologie moléculaire.

Conclusion

La pathologie nodulaire thyroïdienne constitue un véritable enjeu de santé publique par sa fréquence de plus en plus élevée contrastant avec un risque de malignité faible mais qui doit être identifié.

La mise au point de la détection de la mutation BRAF^{V600E} sur produit de cytoponction a permis d'évaluer l'intérêt de l'analyse moléculaire dans la stratégie diagnostique en pathologie nodulaire thyroïdienne au CHRU de Lille.

Cependant, son application en tant que marqueur moléculaire de malignité, en particulier dans les nodules de diagnostic cytologique indéterminé, principale source de difficultés diagnostiques, est décevante. L'intérêt de la détection de la mutation BRAF^{V600E}, bien que très spécifique de CPT, est limitée par sa faible sensibilité diagnostique, ne permettant pas de diminuer significativement l'incertitude diagnostique des nodules de cytologie indéterminée. Par ailleurs, bien qu'associée aux types histologiques les plus agressifs, l'intérêt pronostique de la mutation BRAF^{V600E} est insuffisant pour être proposé à chaque patient, étant présente chez moins d'un patient sur deux présentant un CPT et son absence n'ayant aucune valeur diagnostique ni pronostique.

La proportion élevée de nodules malins parmi les nodules opérés dans notre centre atteste de la bonne qualité de la stratégie diagnostique, reposant sur l'évaluation de la combinaison des caractéristiques cliniques, échographiques, cytologique et de biologie moléculaire, sans que cette dernière n'ait fondamentalement modifié la prise en charge.

Cependant le dilemme diagnostique des nodules de cytologie indéterminée persiste, principal obstacle à la prise en charge adaptée des patients concernés. Dans l'optique de diminuer cette incertitude diagnostique, d'autres tests moléculaires sont en cours d'étude afin de sélectionner la méthode idéale qui permettra de proposer d'une part une simple surveillance en cas de risque de malignité faible, et d'autre part une prise en charge chirurgicale lorsque la valeur prédictive de malignité le justifiera. En particulier, le NGS, en permettant l'analyse simultanée d'un grand nombre de gènes, est aujourd'hui l'outil diagnostique le plus prometteur. Il s'y ajoute un intérêt pronostique et thérapeutique, avec l'idée d'adapter la stratégie thérapeutique à l'analyse moléculaire de la cytoponction. Les résultats de son application clinique,

attestant de façon rétrospective de son intérêt diagnostique dans les nodules thyroïdiens de cytologie indéterminée, pourraient justifier sa mise en place dans la stratégie diagnostique au CHRU de Lille.

Références bibliographiques

1. Hegedüs L, Bonnema SJ, Bennedbaek FN. Management of simple nodular goiter: current status and future perspectives. *Endocr Rev.* févr 2003;24(1):102-132.
2. Ezzat S, Sarti DA, Cain DR, Braunstein GD. Thyroid incidentalomas. Prevalence by palpation and ultrasonography. *Arch Intern Med.* 22 août 1994;154(16):1838-40.
3. Sosa JA, Hanna JW, Robinson KA, Lanman RB. Increases in thyroid nodule fine-needle aspirations, operations, and diagnoses of thyroid cancer in the United States. *Surgery.* déc 2013;154(6):1420-1426; discussion 1426-1427.
4. Binder-Foucard F, Belot A, Delafosse P, Remontet L, Woronoff AS, Bossard N. Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012-Tumeurs solides [Internet]. 2013. Disponible sur: <http://invs.santepubliquefrance.fr>
5. Vander JB, Gaston EA, Dawber TR. The significance of nontoxic thyroid nodules. Final report of a 15-year study of the incidence of thyroid malignancy. *Ann Intern Med.* sept 1968;69(3):537-40.
6. Tunbridge WMG, Evered DC, Hall R, Appleton D, Brewis M, Clark F, et al. The Spectrum of Thyroid Disease in a Community: The Wickham Survey. *Clin Endocrinol (Oxf).* décembre 1977;7(6):481-93.
7. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc.* janv 2016;26(1):1-133.
8. Tan GH, Gharib H. Thyroid incidentalomas: management approaches to nonpalpable nodules discovered incidentally on thyroid imaging. *Ann Intern Med.* 1 févr 1997;126(3):226-31.
9. Guth S, Theune U, Aberle J, Galach A, Bamberger CM. Very high prevalence of thyroid nodules detected by high frequency (13 MHz) ultrasound examination. *Eur J Clin Invest.* août 2009;39(8):699-706.
10. Valeix P, Zarebska M, Bensimon M, Cousty C, Bertrais S, Galan P, et al. [Ultrasonic assessment of thyroid nodules, and iodine status of French adults participating in the SU.VI.MAX study]. *Ann Endocrinol.* déc 2001;62(6):499-506.
11. Mazzaferri EL. Management of a Solitary Thyroid Nodule. *N Engl J Med.* février 1993;328(8):553-9.
12. Hansen PS, Brix TH, Bennedbaek FN, Bonnema SJ, Iachine I, Kyvik KO, et al. The relative importance of genetic and environmental factors in the aetiology of thyroid nodularity: a study of healthy Danish twins. *Clin Endocrinol (Oxf).* mars 2005;62(3):380-6.

13. C. Do Cao, M. Ladsous, E. Leteurtre, S. Espiard, M. d'Herbomez, J.-L. Wémeau. Nodules du corps thyroïde - EM Premium. avril 2015;12(2):1 □ 20.
14. Gharib H, Papini E, Paschke R. Thyroid nodules: a review of current guidelines, practices, and prospects. Eur J Endocrinol. 11 janv 2008;159(5):493 □ 505.
15. Boelaert K, Horacek J, Holder RL, Watkinson JC, Sheppard MC, Franklyn JA. Serum thyrotropin concentration as a novel predictor of malignancy in thyroid nodules investigated by fine-needle aspiration. J Clin Endocrinol Metab. nov 2006;91(11):4295 □ 301.
16. Alexander EK, Hurwitz S, Heering JP, Benson CB, Frates MC, Doubilet PM, et al. Natural history of benign solid and cystic thyroid nodules. Ann Intern Med. 18 févr 2003;138(4):315 □ 8.
17. Wémeau JL, Sadoul JL, d'Herbomez M, Monpeyssen H, Tramalloni J, Leteurtre E et al. Recommandations de la Société française d'endocrinologie pour la prise en charge des nodules thyroïdiens. Presse Médicale. sept 2011;40(9):793 □ 826.
18. Brander A, Viikinkoski P, Nickels J, Kivisaari L. Thyroid gland: US screening in a random adult population. Radiology. déc 1991;181(3):683 □ 7.
19. Choi KU, Kim JY, Park DY, Lee CH, Sol MY, Han KT, et al. Recommendations for the management of cystic thyroid nodules. ANZ J Surg. juillet 2005;75(7):537 □ 41.
20. Agate L, Lorusso L, Elisei R. New and old knowledge on differentiated thyroid cancer epidemiology and risk factors. J Endocrinol Invest. 2012;35(6 Suppl):3 □ 9.
21. Aschebrook-Kilfoy B, Schechter RB, Shih Y-CT, Kaplan EL, Chiu BC-H, Angelos P, et al. The Clinical and Economic Burden of a Sustained Increase in Thyroid Cancer Incidence. Cancer Epidemiol Prev Biomark. 1 juill 2013;22(7):1252 □ 9.
22. Leenhardt L, Grosclaude P. [Epidemiology of thyroid carcinoma over the world]. Ann Endocrinol. avr 2011;72(2):136 □ 48.
23. Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. JAMA. 10 mai 2006;295(18):2164 □ 7.
24. Davies L, Welch HG. Current thyroid cancer trends in the United States. JAMA Otolaryngol-- Head Neck Surg. avr 2014;140(4):317 □ 22.
25. Pazaitou-Panayiotou K, Capezzone M, Pacini F. Clinical features and therapeutic implication of papillary thyroid microcarcinoma. Thyroid Off J Am Thyroid Assoc. nov 2007;17(11):1085 □ 92.
26. Sampson RJ, Woolner LB, Bahn RC, Kurland LT. Occult thyroid carcinoma in olmsted county, minnesota: Prevalence at autopsy compared with that in hiroshima and nagasaki. Japan. Cancer. décembre 1974;34(6):2072 □ 6.
27. Silverberg SG, Vidone RA. Carcinoma of the thyroid in surgical and postmortem material. Analysis of 300 cases at autopsy and literature review. Ann Surg. août 1966;164(2):291.

28. Ito Y, Miyauchi A, Inoue H, Fukushima M, Kihara M, Higashiyama T, et al. An observational trial for papillary thyroid microcarcinoma in Japanese patients. *World J Surg.* janv 2010;34(1):28-35.
29. Oda H, Miyauchi A, Ito Y, Yoshioka K, Nakayama A, Sasai H, et al. Incidences of Unfavorable Events in the Management of Low-Risk Papillary Microcarcinoma of the Thyroid by Active Surveillance Versus Immediate Surgery. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc.* janv 2016;26(1):150-5.
30. Leenhardt L, Bernier MO, Boin-Pineau MH, Devolx BC, Marechaud R, Niccoli-Sire P, et al. Advances in diagnostic practices affect thyroid cancer incidence in France. *Eur J Endocrinol.* 2 janv 2004;150(2):133-9.
31. Hay ID, Thompson GB, Grant CS, Bergstralh EJ, Dvorak CE, Gorman CA, et al. Papillary thyroid carcinoma managed at the Mayo Clinic during six decades (1940-1999): temporal trends in initial therapy and long-term outcome in 2444 consecutively treated patients. *World J Surg.* août 2002;26(8):879-85.
32. Ross DS, Tuttle RM. Observing micropapillary thyroid cancers. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc.* janv 2014;24(1):3-6.
33. Nikiforov YE, Seethala RR, Tallini G, Baloch ZW, Basolo F, Thompson LDR, et al. Nomenclature Revision for Encapsulated Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: A Paradigm Shift to Reduce Overtreatment of Indolent Tumors. *JAMA Oncol.* 1 août 2016;2(8):1023-9.
34. Smallridge RC, Copland JA. Anaplastic Thyroid Carcinoma: Pathogenesis and Emerging Therapies. *Clin Oncol R Coll Radiol G B.* août 2010;22(6):486.
35. Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995 [see comments]. *Cancer.* 15 déc 1998;83(12):2638-48.
36. Nikiforova MN, Nikiforov YE. Molecular genetics of thyroid cancer: implications for diagnosis, treatment and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn.* janv 2008;8(1):83-95.
37. Nikiforova MN, Nikiforov YE. Molecular diagnostics and predictors in thyroid cancer. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc.* déc 2009;19(12):1351-61.
38. Roskoski R. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res.* août 2012;66(2):105-43.
39. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer genes. *Nature.* 11 juill 2013;499(7457):214.
40. Fagin JA, Wells SAJ. Biologic and Clinical Perspectives on Thyroid Cancer. *N Engl J Med.* 15 sept 2016;375(11):1054-67.
41. Wan PTC, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, et al. Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF. *Cell.* 19 mars 2004;116(6):855-67.

42. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 27 juin 2002;417(6892):949-54.
43. Knauf JA, Ma X, Smith EP, Zhang L, Mitsutake N, Liao X-H, et al. Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. *Cancer Res*. 15 mai 2005;65(10):4238-45.
44. Chakravarty D, Santos E, Ryder M, Knauf JA, Liao X-H, West BL, et al. Small-molecule MAPK inhibitors restore radioiodine incorporation in mouse thyroid cancers with conditional BRAF activation. *J Clin Invest*. déc 2011;121(12):4700-11.
45. Nikiforov YE. Molecular diagnostics of thyroid tumors. *Arch Pathol Lab Med*. mai 2011;135(5):569-77.
46. Poulidakos PI, Rosen N. Mutant BRAF Melanomas—Dependence and Resistance. *Cancer Cell*. 18 janv 2011;19(1):11-5.
47. Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, Steward DL, Fidler JP, Giordano TJ, et al. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am J Surg Pathol*. févr 2006;30(2):216-22.
48. Cohen Y, Rosenbaum E, Clark DP, Zeiger MA, Umbricht CB, Tufano RP, 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 Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 avr 2004;10(8):2761-5.
49. 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*. nov 2003;88(11):5399-404.
50. Begum S, Rosenbaum E, Henrique R, Cohen Y, Sidransky D, Westra WH. BRAF mutations in anaplastic thyroid carcinoma: implications for tumor origin, diagnosis and treatment. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. nov 2004;17(11):1359-63.
51. Ciampi R, Giordano TJ, Wikenheiser-Brokamp K, Koenig RJ, Nikiforov YE. HOOK3-RET: a novel type of RET/PTC rearrangement in papillary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer*. 6 janv 2007;14(2):445-52.
52. Yoshimoto Y. Cancer risk among children of atomic bomb survivors. A review of RERF epidemiologic studies. *Radiation Effects Research Foundation. JAMA*. 1 août 1990;264(5):596-600.
53. Nikiforova MN, Stringer JR, Blough R, Medvedovic M, Fagin JA, Nikiforov YE. Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells. *Science*. 6 oct 2000;290(5489):138-41.
54. Nikiforov YE. RET/PTC rearrangement in thyroid tumors. *Endocr Pathol*. 2002;13(1):3-16.

55. Greco A, Miranda C, Pierotti MA. Rearrangements of NTRK1 gene in papillary thyroid carcinoma. *Mol Cell Endocrinol.* mai 2010;321(1):44-9.
56. Kelly LM, Barila G, Liu P, Evdokimova VN, Trivedi S, Panebianco F, et al. Identification of the transforming STRN-ALK fusion as a potential therapeutic target in the aggressive forms of thyroid cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18 mars 2014;111(11):4233-8.
57. Wang Y-L, Wang J-C, Wu Y, Zhang L, Huang C-P, Shen Q, et al. Incidentally simultaneous occurrence of RET/PTC, H4-PTEN and BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Lett.* mai 2008;263(1):44-52.
58. Guerra A, Zeppa P, Bifulco M, Vitale M. Concomitant BRAF(V600E) mutation and RET/PTC rearrangement is a frequent occurrence in papillary thyroid carcinoma. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc.* févr 2014;24(2):254-9.
59. Nikiforova MN, Chiosea SI, Nikiforov YE. MicroRNA expression profiles in thyroid tumors. *Endocr Pathol.* 2009;20(2):85-91.
60. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell.* 23 oct 2014;159(3):676-90.
61. Keutgen XM, Filicori F, Crowley MJ, Wang Y, Scognamiglio T, Hoda R, et al. A panel of four miRNAs accurately differentiates malignant from benign indeterminate thyroid lesions on fine needle aspiration. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 avr 2012;18(7):2032-8.
62. Kitano M, Rahbari R, Patterson EE, Steinberg SM, Prasad NB, Wang Y, et al. Evaluation of candidate diagnostic microRNAs in thyroid fine-needle aspiration biopsy samples. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc.* mars 2012;22(3):285-91.
63. 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.* mai 2008;93(5):1600-8.
64. Agretti P, Ferrarini E, Rago T, Candelieri A, De Marco G, Dimida A, et al. MicroRNA expression profile helps to distinguish benign nodules from papillary thyroid carcinomas starting from cells of fine-needle aspiration. *Eur J Endocrinol.* sept 2012;167(3):393-400.
65. Koenig RJ, Sosa JA, American Thyroid Association 2013 Annual Meeting Program Committee. Welcome to the 83rd Annual Meeting of the American Thyroid Association. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc.* oct 2013;23(10):1185-7.
66. Caisse Nationale de l'Assurance Maladie-Pertinence des soins: une analyse de la pratique des thyroïdectomies chez l'adulte. 2013. Caisse Nationale de l'Assurance Maladie; 2013 oct.
67. Moon W-J, Jung SL, Lee JH, Na DG, Baek J-H, Lee YH, et al. Benign and malignant thyroid nodules: US differentiation--multicenter retrospective study. *Radiology.* juin 2008;247(3):762-70.

68. Tae HJ, Lim DJ, Baek KH, Park WC, Lee YS, Choi JE, et al. Diagnostic value of ultrasonography to distinguish between benign and malignant lesions in the management of thyroid nodules. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc.* mai 2007;17(5):461-6.
69. Kim E-K, Park CS, Chung WY, Oh KK, Kim DI, Lee JT, et al. New sonographic criteria for recommending fine-needle aspiration biopsy of nonpalpable solid nodules of the thyroid. *AJR Am J Roentgenol.* mars 2002;178(3):687-91.
70. Lyschchik A, Higashi T, Asato R, Tanaka S, Ito J, Mai JJ, et al. Thyroid gland tumor diagnosis at US elastography. *Radiology.* oct 2005;237(1):202-11.
71. Nam-Goong IS, Kim HY, Gong G, Lee HK, Hong SJ, Kim WB, et al. Ultrasonography-guided fine-needle aspiration of thyroid incidentaloma: correlation with pathological findings. *Clin Endocrinol (Oxf).* janv 2004;60(1):21-8.
72. Horvath E, Majlis S, Rossi R, Franco C, Niedmann JP, Castro A, et al. An ultrasonogram reporting system for thyroid nodules stratifying cancer risk for clinical management. *J Clin Endocrinol Metab.* mai 2009;94(5):1748-51.
73. Russ G, Bigorgne C, Royer B, Rouxel A, Bienvenu-Perrard M. [The Thyroid Imaging Reporting and Data System (TIRADS) for ultrasound of the thyroid]. *J Radiol.* août 2011;92(7-8):701-13.
74. Russ G, Royer B, Bigorgne C, Rouxel A, Bienvenu-Perrard M, Leenhardt L. Prospective evaluation of thyroid imaging reporting and data system on 4550 nodules with and without elastography. *Eur J Endocrinol.* mai 2013;168(5):649-55.
75. Russ G. Risk stratification of thyroid nodules on ultrasonography with the French TIRADS: description and reflections. *Ultrason Seoul Korea.* janv 2016;35(1):25-38.
76. Pitman MB, Abele J, Ali SZ, Duick D, Elsheikh TM, Jeffrey RB, et al. Techniques for thyroid FNA: a synopsis of the National Cancer Institute Thyroid Fine-Needle Aspiration State of the Science Conference. *Diagn Cytopathol.* juin 2008;36(6):407-24.
77. Filie AC, Asa SL, Geisinger KR, Logani S, Merino M, Nikiforov YE, et al. Utilization of ancillary studies in thyroid fine needle aspirates: a synopsis of the National Cancer Institute Thyroid Fine Needle Aspiration State of the Science Conference. *Diagn Cytopathol.* juin 2008;36(6):438-41.
78. 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.* juin 2008;36(6):425-37.
79. Cochand-Priollet B, Vielh P, Royer B, Belleannée G, Collet J-F, Goubin-Versini I, et al. [Thyroid cytopathology: Bethesda System 2010]. *Ann Pathol.* juin 2012;32(3):177-83.
80. ALD30 GM-CANCER THYROIDE [Internet]. Disponible sur: http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/201007/ald_30_gm_cancer__thyroide_web.pdf

81. Cibas ES, Ali SZ. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Am J Clin Pathol.* 1 nov 2009;132(5):658-65.
82. de Micco C. [Thyroid cytology: evaluation and perspectives]. *Ann Endocrinol.* 1993;54(4):258-63.
83. Leenhardt L, Hejblum G, Franc B, Fediaevsky LD, Delbot T, Le Guillouzic D, et al. Indications and limits of ultrasound-guided cytology in the management of nonpalpable thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab.* janv 1999;84(1):24-8.
84. Durante C, Costante G, Lucisano G, Bruno R, Meringolo D, Paciaroni A, et al. The natural history of benign thyroid nodules. *JAMA.* 3 mars 2015;313(9):926-35.
85. Wale A, Miles KA, Young B, Zammit C, Williams A, Quin J, et al. Combined ^{99m}Tc-methoxyisobutylisonitrile scintigraphy and fine-needle aspiration cytology offers an accurate and potentially cost-effective investigative strategy for the assessment of solitary or dominant thyroid nodules. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 1 janv 2014;41(1):105-15.
86. Soelberg KK, Bonnema SJ, Brix TH, Hegedüs L. Risk of Malignancy in Thyroid Incidentalomas Detected by ¹⁸F-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography: A Systematic Review. *Thyroid.* juillet 2012;22(9):918-25.
87. Chen W, Parsons M, Torigian DA, Zhuang H, Alavi A. Evaluation of thyroid FDG uptake incidentally identified on FDG-PET/CT imaging. *Nucl Med Commun.* mars 2009;30(3):240-4.
88. Nishimori H, Tabah R, Hickeson M, How J. Incidental thyroid "PETomas": clinical significance and novel description of the self-resolving variant of focal FDG-PET thyroid uptake. *Can J Surg.* avr 2011;54(2):83.
89. Vriens D, de Wilt JHW, van der Wilt GJ, Netea-Maier RT, Oyen WJG, de Geus-Oei LF. The role of [¹⁸F]-2-fluoro-2-deoxy-d-glucose-positron emission tomography in thyroid nodules with indeterminate fine-needle aspiration biopsy: systematic review and meta-analysis of the literature. *Cancer.* 15 oct 2011;117(20):4582-94.
90. Deandreis D, Al Ghuzlan A, Auperin A, Vielh P, Caillou B, Chami L, et al. Is (18)F-fluorodeoxyglucose-PET/CT useful for the presurgical characterization of thyroid nodules with indeterminate fine needle aspiration cytology? *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc.* févr 2012;22(2):165-72.
91. Vriens D, Adang EMM, Netea-Maier RT, Smit JWA, de Wilt JHW, Oyen WJG, et al. Cost-effectiveness of FDG-PET/CT for cytologically indeterminate thyroid nodules: a decision analytic approach. *J Clin Endocrinol Metab.* sept 2014;99(9):3263-74.
92. Bartolazzi A, Orlandi F, Saggiorato E, Volante M, Arecco F, Rossetto R, et al. Galectin-3-expression analysis in the surgical selection of follicular thyroid nodules with indeterminate fine-needle aspiration cytology: a prospective multicentre study. *Lancet Oncol.* juin 2008;9(6):543-9.

93. Fadda G, Rossi ED, Raffaelli M, Pontecorvi A, Sioletic S, Morassi F, et al. Follicular thyroid neoplasms can be classified as low- and high-risk according to HBME-1 and Galectin-3 expression on liquid-based fine-needle cytology. *Eur J Endocrinol.* sept 2011;165(3):447-53.
94. Baloch ZW, LiVolsi VA. Fine-needle aspiration of the thyroid: today and tomorrow. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* décembre 2008;22(6):929-39.
95. Lee HJ, Choi J, Hwang TS, Shong YK, Hong SJ, Gong G. Detection of BRAF mutations in thyroid nodules by allele-specific PCR using a dual priming oligonucleotide system. *Am J Clin Pathol.* mai 2010;133(5):802-8.
96. Jo YS, Huang S, Kim Y-J, Lee I-S, Kim S-S, Kim J-R, et al. Diagnostic value of pyrosequencing for the BRAF V600E mutation in ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy samples of thyroid incidentalomas. *Clin Endocrinol (Oxf).* janv 2009;70(1):139-44.
97. Nikiforov YE, Steward DL, Robinson-Smith TM, Haugen BR, Klopper JP, Zhu Z, et al. Molecular testing for mutations in improving the fine-needle aspiration diagnosis of thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab.* juin 2009;94(6):2092-8.
98. Zatelli MC, Trasforini G, Leoni S, Frigato G, Buratto M, Tagliati F, et al. BRAF V600E mutation analysis increases diagnostic accuracy for papillary thyroid carcinoma in fine-needle aspiration biopsies. *Eur J Endocrinol.* sept 2009;161(3):467-73.
99. Xing M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat Rev Cancer.* mars 2013;13(3):184-99.
100. Li C, Lee KC, Schneider EB, Zeiger MA. BRAF V600E mutation and Its Association with Clinicopathological Features of Papillary Thyroid Cancer: A Meta-Analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* déc 2012;97(12):4559-70.
101. Kim TH, Park YJ, Lim JA, Ahn HY, Lee EK, Lee YJ, et al. The association of the BRAFV600E mutation with prognostic factors and poor clinical outcome in papillary thyroid cancer. *Cancer.* avril 2012;118(7):1764-73.
102. Prescott JD, Sadow PM, Hodin RA, Le LP, Gaz RD, Randolph GW, et al. BRAFV600E status adds incremental value to current risk classification systems in predicting papillary thyroid carcinoma recurrence. *Surgery.* déc 2012;152(6):984-90.
103. Xing DM, Alzahrani DAS, Carson MKA, Viola DD, Elisei DR, Bendlova DB, et al. Association Between BRAF V600E Mutation and Mortality in Patients With Papillary Thyroid Cancer. *JAMA J Am Med Assoc.* 10 avr 2013;309(14):1493.
104. Romei C, Ciampi R, Faviana P, Agate L, Molinaro E, Bottici V, et al. BRAFV600E mutation, but not RET/PTC rearrangements, is correlated with a lower expression of both thyroperoxidase and sodium iodide symporter genes in papillary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* juin 2008;15(2):511-20.
105. Durante C, Puxeddu E, Ferretti E, Morisi R, Moretti S, Bruno R, et al. BRAF mutations in papillary thyroid carcinomas inhibit genes involved in iodine metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* juill 2007;92(7):2840-3.

106. Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev.* déc 2007;28(7):742-62.
107. Riesco-Eizaguirre G, Gutiérrez-Martínez P, García-Cabezas MA, Nistal M, Santisteban P. The oncogene BRAF V600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na⁺/I⁻ targeting to the membrane. *Endocr Relat Cancer.* mars 2006;13(1):257-69.
108. Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Shong YK, Kim TY, Viola D, et al. Association between BRAF V600E mutation and recurrence of papillary thyroid cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 janv 2015;33(1):42-50.
109. Liu R, Xing M. TERT promoter mutations in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 3 janv 2016;23(3):R143-55.
110. Xing M, Liu R, Liu X, Murugan AK, Zhu G, Zeiger MA, et al. BRAF V600E and TERT Promoter Mutations Cooperatively Identify the Most Aggressive Papillary Thyroid Cancer With Highest Recurrence. *J Clin Oncol.* 1 sept 2014;32(25):2718.
111. Landa I, Ibrahimasic T, Boucai L, Sinha R, Knauf JA, Shah RH, et al. Genomic and transcriptomic hallmarks of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancers. *J Clin Invest.* 1 mars 2016;126(3):1052.
112. Nikiforov YE, Carty SE, Chiosea SI, Coyne C, Duvvuri U, Ferris RL, 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.* décembre 2014;120(23):3627-34.
113. Kwak JY, Kim E-K, Chung WY, Moon HJ, Kim MJ, Choi JR. Association of BRAFV600E mutation with poor clinical prognostic factors and US features in Korean patients with papillary thyroid microcarcinoma. *Radiology.* déc 2009;253(3):854-60.
114. Zheng X, Wei S, Han Y, Li Y, Yu Y, Yun X, et al. Papillary microcarcinoma of the thyroid: clinical characteristics and BRAF(V600E) mutational status of 977 cases. *Ann Surg Oncol.* juill 2013;20(7):2266-73.
115. Niemeier LA, Kuffner Akatsu H, Song C, Carty SE, Hodak SP, Yip L, et al. A combined molecular-pathologic score improves risk stratification of thyroid papillary microcarcinoma. *Cancer.* 15 avr 2012;118(8):2069-77.
116. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* juin 2005;12(2):245-62.
117. Kim KH, Kang DW, Kim SH, Seong IO, Kang DY. Mutations of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma in a Korean population. *Yonsei Med J.* 31 oct 2004;45(5):818-21.
118. Chung K, Yang SK, Lee GK, Kim EY, Kwon S, Lee SH, et al. Detection of BRAFV600E mutation on fine needle aspiration specimens of thyroid nodule refines cyto-pathology diagnosis, especially in BRAF600E mutation-prevalent area. *Clin Endocrinol (Oxf).* nov 2006;65(5):660-6.

119. Salvatore G, Giannini R, Faviana P, Caleo A, Migliaccio I, Fagin JA, et al. Analysis of BRAF point mutation and RET/PTC rearrangement refines the fine-needle aspiration diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* oct 2004;89(10):5175-80.
120. Girlando S, Cuorvo LV, Bonzanini M, Morelli L, Amadori P, Dalla Palma P, et al. High prevalence of B-RAF mutation in papillary carcinoma of the thyroid in north-east Italy. *Int J Surg Pathol.* juin 2010;18(3):173-6.
121. Marchetti I, Lessi F, Mazzanti CM, Bertacca G, Elisei R, Coscio GD, 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 Off J Am Thyroid Assoc.* août 2009;19(8):837-42.
122. 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.* nov 2011;96(11):3390-7.
123. Jia Y, Yu Y, Li X, Wei S, Zheng X, Yang X, et al. Diagnostic value of B-RAF(V600E) in difficult-to-diagnose thyroid nodules using fine-needle aspiration: systematic review and meta-analysis. *Diagn Cytopathol.* janv 2014;42(1):94-101.
124. Fnais N, Soobiah C, AL-Qahtani K, Hamid JS, Perrier L, Straus SE, et al. Diagnostic value of fine needle aspiration BRAFV600E mutation analysis in papillary thyroid cancer: a systematic review and meta-analysis. *Hum Pathol.* oct 2015;46(10):1443-54.
125. Ohori NP, Singhal R, Nikiforova MN, Yip L, Schoedel KE, Coyne C, et al. BRAF mutation detection in indeterminate thyroid cytology specimens: underlying cytologic, molecular, and pathologic characteristics of papillary thyroid carcinoma. *Cancer Cytopathol.* avr 2013;121(4):197-205.
126. Kim SW, Lee JI, Kim J-W, Ki C-S, Oh YL, Choi Y-L, et al. BRAFV600E mutation analysis in fine-needle aspiration cytology specimens for evaluation of thyroid nodule: a large series in a BRAFV600E-prevalent population. *J Clin Endocrinol Metab.* août 2010;95(8):3693-700.
127. Lee J-H, Lee E-S, Kim Y-S. Clinicopathologic significance of BRAF V600E mutation in papillary carcinomas of the thyroid: a meta-analysis. *Cancer.* 1 juill 2007;110(1):38-46.
128. Lupi C, Giannini R, Ugolini C, Proietti A, Berti P, Minuto M, et al. Association of BRAF V600E mutation with poor clinicopathological outcomes in 500 consecutive cases of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* nov 2007;92(11):4085-90.
129. Xu X, Quiros RM, Gattuso P, Ain KB, Prinz RA. High prevalence of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumor cell lines. *Cancer Res.* 1 août 2003;63(15):4561-7.
130. 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.* décembre 2005;90(12):6373-9.

131. Alexander EK, Kennedy GC, Baloch ZW, Cibas ES, Chudova D, Diggans J, et al. Preoperative Diagnosis of Benign Thyroid Nodules with Indeterminate Cytology. *N Engl J Med.* août 2012;367(8):705-715.
132. Alexander EK, Schorr M, Klopper J, Kim C, Sipos J, Nabhan F, et al. Multicenter Clinical Experience With the Afirma Gene Expression Classifier. *J Clin Endocrinol Metab.* 23 oct 2013;99(1):119-125.
133. Marti JL, Avadhani V, Donatelli LA, Niyogi S, Wang B, Wong RJ, et al. Wide Inter-institutional Variation in Performance of a Molecular Classifier for Indeterminate Thyroid Nodules. *Ann Surg Oncol.* nov 2015;22(12):3996.
134. McIver B, Castro MR, Morris JC, Bernet V, Smallridge R, Henry M, et al. An Independent Study of a Gene Expression Classifier (Afirma) in the Evaluation of Cytologically Indeterminate Thyroid Nodules. *J Clin Endocrinol Metab.* avril 2014;99(11):4069-4077.
135. Kloos RT, Monroe RJ, Traweek ST, Lanman RB, Kennedy GC. A Genomic Alternative to Identify Medullary Thyroid Cancer Preoperatively in Thyroid Nodules with Indeterminate Cytology. *Thyroid.* 1 juin 2016;26(6):785-793.
136. Nishino M. Molecular cytopathology for thyroid nodules: A review of methodology and test performance. *Cancer Cytopathol.* janv 2016;124(1):14-27.
137. McCourt CM, McArt DG, Mills K, Catherwood MA, Maxwell P, Waugh DJ, et al. Validation of Next Generation Sequencing Technologies in Comparison to Current Diagnostic Gold Standards for BRAF, EGFR and KRAS Mutational Analysis. *PLoS ONE.* 2013;8(7).
138. Tuononen K, Mäki-Nevala S, Sarhadi VK, Wirtanen A, Rönty M, Salmenkivi K, et al. Comparison of targeted next-generation sequencing (NGS) and real-time PCR in the detection of EGFR, KRAS, and BRAF mutations on formalin-fixed, paraffin-embedded tumor material of non-small cell lung carcinoma—superiority of NGS. *Genes Chromosomes Cancer.* mai 2013;52(5):503-511.
139. Scarpa A, Sikora K, Fassan M, Rachiglio AM, Cappellesso R, Antonello D, et al. Molecular typing of lung adenocarcinoma on cytological samples using a multigene next generation sequencing panel. *PloS One.* 2013;8(11):e80478.
140. Hadd AG, Houghton J, Choudhary A, Sah S, Chen L, Marko AC, et al. Targeted, high-depth, next-generation sequencing of cancer genes in formalin-fixed, paraffin-embedded and fine-needle aspiration tumor specimens. *J Mol Diagn JMD.* mars 2013;15(2):234-247.
141. Nikiforova MN, Wald AI, Roy S, Durso MB, Nikiforov YE. Targeted next-generation sequencing panel (ThyroSeq) for detection of mutations in thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* nov 2013;98(11):E1852-1860.
142. Kanagal-Shamanna R, Portier BP, Singh RR, Routbort MJ, Aldape KD, Handal BA, et al. Next-generation sequencing-based multi-gene mutation profiling of solid tumors using fine needle aspiration samples: promises and challenges for routine clinical diagnostics. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* févr 2014;27(2):314-327.

143. Le Mercier M, D'Haene N, De Nève N, Blanchard O, Degand C, Rorive S, et al. Next-generation sequencing improves the diagnosis of thyroid FNA specimens with indeterminate cytology. *Histopathology*. janv 2015;66(2):215-24.
144. Nikiforov YE, Carty SE, Chiosea SI, Coyne C, Duvvuri U, Ferris RL, 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*. 1 nov 2015;25(11):1217.
145. Wylie D, Beaudenon H, Huibregtse S, Haynes BC, Giordano TJ, Labourier E. Molecular classification of thyroid lesions by combined testing for miRNA gene expression and somatic gene alterations. *J Pathol Clin Res*. avr 2016;2(2):93.
146. Xing M, Tufano RP, Tufaro AP, Basaria S, Ewertz M, Rosenbaum E, et al. Detection of BRAF mutation on fine needle aspiration biopsy specimens: a new diagnostic tool for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. juin 2004;89(6):2867-72.
147. Yeo M-K, Liang ZL, Oh T, Moon Y, An S, Kim MK, et al. Pyrosequencing cut-off value identifying BRAFV600E mutation in fine needle aspiration samples of thyroid nodules. *Clin Endocrinol (Oxf)*. oct 2011;75(4):555-60.
148. Lee EJ, Song K-H, Kim D-L, Jang Y-M, Hwang TS, Kim SK. The BRAF(V600E) mutation is associated with malignant ultrasonographic features in thyroid nodules. *Clin Endocrinol (Oxf)*. déc 2011;75(6):844-50.
149. Kang G, Cho EY, Shin JH, Chung J-H, Kim JW, Oh YL. Role of BRAFV600E mutation analysis and second cytologic review of fine-needle aspiration for evaluating thyroid nodule. *Cancer Cytopathol*. 25 févr 2012;120(1):44-51.

Annexe 1 : Revue de la littérature : Sensibilités de la mutation BRAF^{V600E} pour le diagnostic de CPT et de malignité, dans l'ensemble des nodules et dans les nodules Bethesda III, IV et V, à partir de 11 études parues entre 2004 et 2012.

Etude	Se BRAF ^{V600E} Globale		Se BRAF ^{V600E} Bethesda III-IV-V	
	CPT (effectif total)	Malignité (effectif total)	CPT (effectif total)	Malignité (effectif total)
Cohen 2004 (48)	40% (55)	37% (59)	17% (29)	16% (32)
Xing 2004 (146)	50 % (17)	30 % (27)	29 % (7)	13 % (15)
Chung 2006 (118)	84 % (109)	82 % (122)	60 % (5)	38 % (8)
Marchetti 2009 (121)	66% (90)	66% (90)	56 % (32)	56 % (32)
Zatelli 2009 (98)	64% (75)	53% (90)	55 % (20)	31% (35)
Joe 2009 (154)	75 % (40)	73 % (41)	80 % (10)	73 % (11)
Kim 2010 (126)	83 % (263)	83% (264)	71 % (70)	68 % (74)
Girlando 2010 (120)	68 % (60)	68 % (60)	56 % (18)	56 % (18)
Yeo 2011 (147)	54 % (182)	54 % (184)	29 % (49)	26 % (53)
Lee 2011 (148)	90 % (194)	88 % (198)	85 % (66)	80 % (70)
Kang 2012 (149)	76 % (299)	75 % (304)	63 % (90)	60 % (95)

AUTEUR : Nom : Toullet

Prénom : Flora

Date de Soutenance : Mercredi 28 juin 2017

Titre de la Thèse : Intérêt de la recherche de la mutation BRAF^{V600E} en tant que marqueur moléculaire de malignité sur produit de cytoponction thyroïdienne

Thèse - Médecine - Lille 2017

Cadre de classement : Médecine

DES + spécialité : Endocrinologie, Diabétologie et Maladies du métabolisme

Mots-clés : Nodule thyroïdien, échographie thyroïdienne, cytologie thyroïdienne, mutation BRAF^{V600E}, carcinome papillaire thyroïdien

Résumé :

Contexte : La prévalence grandissante des nodules thyroïdiens, abondamment cliniquement et échographiquement diagnostiqués contraste avec la faible proportion de cancers en leur sein. L'enjeu en pathologie nodulaire thyroïdienne est de résoudre le dilemme diagnostique des nodules de cytologie indéterminée, afin de limiter le nombre de chirurgies diagnostiques. La mutation hot spot BRAF^{V600E}, spécifique des carcinomes papillaires thyroïdiens (CPT), est la plus fréquente des anomalies moléculaires identifiées sur produit de cytoponction thyroïdienne. Le but de notre travail était de mettre au point la technique de détection de la mutation BRAF^{V600E} sur produit de cytoponction et d'étudier son intérêt dans l'évaluation diagnostique des nodules thyroïdiens au CHRU de Lille.

Méthode : Nous avons rétrospectivement répertorié les données cliniques, échographiques, cytologiques, histologiques et de biologie moléculaire de 143 patients ayant bénéficié de la recherche de la mutation BRAF^{V600E} sur produit de cytoponction de nodule thyroïdien entre mars 2010 et juillet 2016.

Résultats : La mutation a été identifiée dans 17 prélèvements, soit 12 % des nodules de notre série. Plus particulièrement, seulement 4 % des nodules de cytologie indéterminée étaient porteurs de la mutation (représentant 14 % des nodules Bethesda III et 8 % des nodules Bethesda V, tandis qu'elle n'a été détectée dans aucun des nodules Bethesda IV). Les sensibilités diagnostiques de ce test, calculées au sein de l'ensemble des nodules opérés, puis des nodules de cytologie indéterminée ayant été opérés, étaient respectivement de 30 % (IC95% [18,8;44,1]) et de 12 % (IC95% [2,55; 31,2]), augmentant les performances diagnostiques de l'examen cytologique dans notre série de 5,4 % seulement. Bien qu'associée aux sous-types histologiques agressifs (53 % vs. 16 %, p=0,02), sa faible prévalence ne nous a pas permis de lui justifier un intérêt pronostique à l'échelle individuelle.

Conclusion : Les résultats de l'application de la recherche de la mutation BRAF^{V600E} dans notre centre sont décevants, sa faible sensibilité diagnostique ne permettant pas de lever de façon significative l'incertitude diagnostique des nodules de cytologie indéterminée. D'autres outils de biologie moléculaire, de développement plus récent, pourraient être utilisés.

Composition du Jury :

Président : Professeur Vantyghem

Assesseurs : Professeur Pigny, Professeur Leteurtre, Professeur Wémeau, Dr Ladsous