

One Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) pour l'analyse des ganglions sentinelles des patientes opérées d'un cancer du sein. Expérience du CRLCC Eugène Marquis

F. GODEY ^{1a} *, J. LEVÊQUE ^{1b, 2}, P. TAS ^{1b}, G. GANDON ^{1a}, P. POREE ^{1b}, H. MESBAH ^{1b}, V. LAVOUÉ ², V. QUILLIEN ^{1b}, C. BENDAVID ATHIAS ^{1b}
(Rennes)

Résumé

La technique du ganglion sentinelle (GS) est un facteur prédictif important d'atteinte ou non des ganglions non sentinelles. Elle évite le curage axillaire lorsqu'il ne présente pas de métastase et permet donc une diminution du risque de complications du membre supérieur liées au curage. La technique OSNA a été adoptée dans notre établissement comme une technique d'examen du GS, elle permet de rechercher la présence de métastases, le résultat est définitif en extemporané. Notre étude présente l'expérience au CRLCC (centre régional de lutte contre le cancer) Eugène Marquis depuis l'implémentation de la technique OSNA en 2008. L'analyse des GS a été réalisée avec OSNA pour plus de 1 000 patientes à ce jour. Le taux de positivité des GS avec OSNA

1 - Centre de lutte contre le cancer Eugène Marquis - Rue de la Bataille Flandres-Dunkerque - CS 44229 - 35042 Rennes cedex

a - Département de biologie

b - Institut rennais du sein - Département de chirurgie

2 - CHU Anne de Bretagne - Département de gynécologie - 16 boulevard de Bulgarie - BP 90347 - 35203 Rennes cedex 2

* Correspondance : f.godey@rennes.unicancer.fr

de 24,4 % dans une cohorte de 258 patientes présentant un carcinome infiltrant (< 2 cm) est non significativement différent du taux de positivité des GS de 23,4 % obtenu avant l'implémentation de la technique OSNA par une technique histologique conventionnelle dans une cohorte de 355 patientes présentant le même type de tumeur. Néanmoins il a été relevé quelques différences non validées statistiquement vraisemblablement liées à la méthode OSNA qui analyse le ganglion dans sa globalité et donc détecterait plus de petites métastases que l'analyse histologique. Les résultats OSNA sont semi-quantitatifs, cependant le nombre de copies d'ARNm CK19 amplifié considéré comme une valeur quantitative continue est corrélé significativement au risque d'envahissement des ganglions de curage. La méthode est standardisée, donne un résultat définitif en 30 minutes pour un GS à condition d'avoir mis en place une procédure de coordination pluridisciplinaire.

Mots clés : cancer du sein, ganglion sentinelle, analyse moléculaire, curage axillaire

Déclaration publique d'intérêt

Nous soussignées, Cécile Bendavid Athias et Florence Godey, déclarons ne pas avoir d'intérêt direct ou indirect avec un organisme privé industriel ou commercial en relation avec le sujet présenté.

INTRODUCTION

La technique du ganglion sentinelle (GS) est un facteur prédictif important d'atteinte ou non des ganglions non sentinelles. Elle évite le curage axillaire lorsqu'il ne présente pas de métastase et permet donc une diminution du risque de complications du membre supérieur liées au curage, améliorant ainsi la qualité de vie des patientes [1].

Les protocoles d'analyse du ganglion sentinelle varient d'un centre à l'autre : certains réalisent un examen extemporané cytologique ou histologique, d'autres non du fait de la faible sensibilité.

Pourtant l'examen extemporané présente l'avantage de pouvoir pratiquer le curage axillaire dans le même temps opératoire s'il s'avère nécessaire, et ainsi de diminuer les risques de morbidité, l'atteinte psychologique et les coûts générés par une seconde intervention.

Les analyses histologiques extemporanées reposent sur l'analyse de coupes congelées ou d'empreinte. Cette dernière n'a pas une bonne sensibilité du fait de la faible quantité de tissu analysé (50 % pour la détection des macrométastases et 10 % pour les micrométastases) [2]. L'analyse de coupes congelées présente une sensibilité légèrement meilleure au prix d'une perte de tissu ganglionnaire pour l'analyse histologique définitive en paraffine [3, 4].

La technique moléculaire OSNA permet un résultat définitif extemporané de même sensibilité et spécificité que l'examen histologique standard (coloration H&E et immunohistochimie).

Le principe repose sur la détection de l'amplification de l'ARNm de la CK19, qui normalement n'est pas retrouvé dans le ganglion axillaire sauf en cas d'atteinte métastatique [5].

Cette technique donne un résultat semi-qualitatif : absence de métastase, micrométastase, macrométastase. La concordance de la méthode OSNA avec l'histologie standard est excellente [6]. Plusieurs études de validation suite à la première publication ont confirmé que la technique OSNA présentait une bonne sensibilité et spécificité pour l'analyse GAS [7-11].

La technique OSNA a été adoptée dans notre établissement comme une technique d'examen extemporané du GS. Notre étude présente l'expérience au CRLCC Eugène Marquis depuis l'implémentation de la technique OSNA en 2008.

I. MATÉRIEL ET MÉTHODES

I.1. Analyse des GS

La détection des GS est effectuée au centre Eugène Marquis avec une méthode combinée en injectant un colloïde marqué au technétium 99 la veille de l'intervention et du bleu patenté au démarrage de la chirurgie. La recherche du GS constitue le premier temps opératoire (avant incision mammaire). Le prélèvement chirurgical de tous les ganglions dits « chauds » et/ou bleus, ou suspects cliniquement est réalisé.

Avant l'implémentation de la méthode OSNA tous les GS étaient analysés par l'examen d'empreinte cytologique en extemporané, puis par histologie définitive postopératoire.

L'analyse histologique définitive du GS était effectuée sur des coupes de 2 mm analysées tous les 250 µm après coloration à l'hématoxiline éosine ; si aucune métastase n'était détectée par cette coloration, l'analyse était complétée par une analyse en immunohistochimie (AE1/AE3 clones, Dako, Trappes, France).

Depuis l'implémentation de la technique OSNA en octobre 2008 jusqu'en avril 2011, tous les GS identifiés et analysés avec OSNA ont été confiés à l'anatomopathologiste en extemporané pour réalisation d'une empreinte cytologique à la recherche de cellules tumorales, et la conservation d'une tranche centrale d'un mm d'épaisseur pour une analyse histologique selon le protocole habituel histologique, puis tout le reste des GS a été analysé après broyage avec la méthode OSNA,

Depuis mai 2011, tous les GS sont analysés en totalité avec la méthode OSNA en extemporané et seule une empreinte cytologique est conservée.

L'analyse des GS a été réalisée avec la technique moléculaire OSNA au centre Eugène Marquis pour plus de 1 000 patientes à ce jour.

1.2. La méthode OSNA

C'est une technique moléculaire consistant en l'amplification de l'ARN messager de la cytokératine 19 (CK19) par *Reverse Transcription Loop Mediated Amplification* (RT LAMP) sur lysat ganglionnaire.

L'ARNm de la CK19 a été choisi car ce marqueur moléculaire est spécifique des cellules épithéliales normalement non présentes dans les ganglions lymphatiques, son niveau d'expression est élevé dans les cellules tumorales mammaires, donc il présente des niveaux d'expression très différents dans les ganglions envahis ou non.

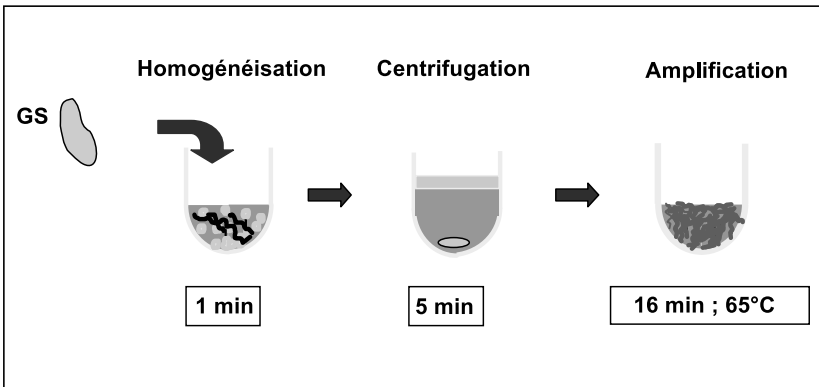
La technique d'amplification par RT LAMP est hautement spécifique et sensible (utilisation de 6 amorces, pas d'amplification d'ADN génomique), de plus cette amplification est rapide, isothermique à 65 °C et totalement automatisée (RD100i Sysmex) sans extraction d'ARNm.

La préparation du lysat ganglionnaire est standardisée, la totalité du ganglion peut être étudiée, ou bien une coupe peut être conservée pour analyse histologique. Actuellement il n'existe pas de consensus, pour les études de validation de la technique OSNA, les ganglions ont

été partagés en coupes alternées, une pour l'analyse OSNA, l'autre pour histologie technique de référence, on sait que cela peut générer des biais de localisation d'où l'impossibilité d'avoir une concordance parfaite entre les deux techniques. Dans la pratique, la technique OSNA étant validée, une analyse globale est plus simple pour la préparation des ganglions et l'interprétation des résultats, mais dans ce cas il n'existe aucune trace histologique, seulement du lysat ganglionnaire congelé. Le ganglion doit être pris en charge en extemporané ou congelé rapidement pour l'analyse OSNA.

La figure 1 résume le processus OSNA.

Figure 1 - Processus OSNA



Le résultat OSNA est disponible en 30 min (incluant la préparation du ganglion, la réalisation du lysat, l'amplification et la transmission du résultat) d'où la possibilité de réaliser l'analyse en extemporané.

Le résultat est semi-quantitatif en fonction du nombre de copies d'ARNm CK19 amplifié par μ l de lysat. Pour chaque ganglion l'analyse OSNA est réalisée en double sur lysat pur et dilué au 1/10^e. Le résultat est soit négatif (absence de métastase), soit présence d'une micrométastase, soit présence d'une macrométastase. Dans l'échantillon dilué on peut parfois détecter une amplification d'ARNm CK19 alors que rien n'est détecté dans l'échantillon pur, il s'agit dans ce cas d'une réaction dite « positive par inhibition » +(I). Cette situation complexe ne permettra pas toujours d'évaluation semi-quantitative de la métastase car cela reflète la présence d'inhibiteur de la réaction d'amplification dans le lysat ganglionnaire.

Le tableau 1 récapitule l'interprétation des résultats.

Tableau 1 - Interprétation des résultats OSNA fonction nombre de copies ARNm CK19 détectées dans le lysat pur et dilué au 1/10^e

Nombre de copies ARNm CK19 / μ l de lysat pur	Nombre de copies ARNm CK19 / μ l de lysat dilué	Résultats RD-100i Rapport Sysmex	Interprétation du résultat
< 250	< 250	(-)	Absence de métastase
> 250 et < 5000	< 5000	(+)	Micrométastase
> 5000	quel que soit le nb	(++)	Macrométastase
< 250	> 250 et < 5000	(+) i	Métastase non quantifiable
> 250 et < 5000	> 5000	(+) i	Macrométastase
< 250	> 10 000	(+) i	Macrométastase

Cellules grisées : modifications dans l'interprétation par rapport à la version initiale du fournisseur

II. RÉSULTATS

II.1. Étude de corrélation entre la méthode OSNA et la méthode histologique conventionnelle [12]

Trois cent soixante-sept patientes opérées d'un cancer du sein avec biopsie du ganglion sentinelle (GS) analysé en peropératoire avec la méthode OSNA d'octobre 2008 à juin 2010 ont été incluses dans cette étude rétrospective (cohorte OSNA totale). La biopsie du GS a été réalisée pour les patientes présentant des tumeurs mammaires unifocales de moins de 2 cm, sans envahissement clinique des ganglions axillaires, et sans antécédent de chirurgie mammaire homolatérale. Quelques patientes avec des tumeurs de plus de 2 cm à l'analyse histologique définitive ont été incluses car la taille tumorale avait été sous-estimée avant la chirurgie. Tous les GS ont été analysés avec la méthode OSNA en peropératoire. Un curage axillaire complémentaire dans le même temps opératoire a été systématiquement réalisé selon les préconisations quand au moins un GS présentait une métastase détectée par l'analyse moléculaire, quelle que soit la taille de celle-ci.

Une cohorte historique de 355 patientes opérées d'un cancer du sein, avec biopsie du ganglion sentinelle (GS) avant octobre 2008 analysé en postopératoire avec une analyse histopathologique conventionnelle, a été incluse dans cette étude rétrospective afin de comparer les résultats obtenus avec la nouvelle technique OSNA en peropératoire *versus* la méthode classique histologique postopératoire auparavant utilisée dans notre institution. Les résultats de l'analyse de cette cohorte historique ont

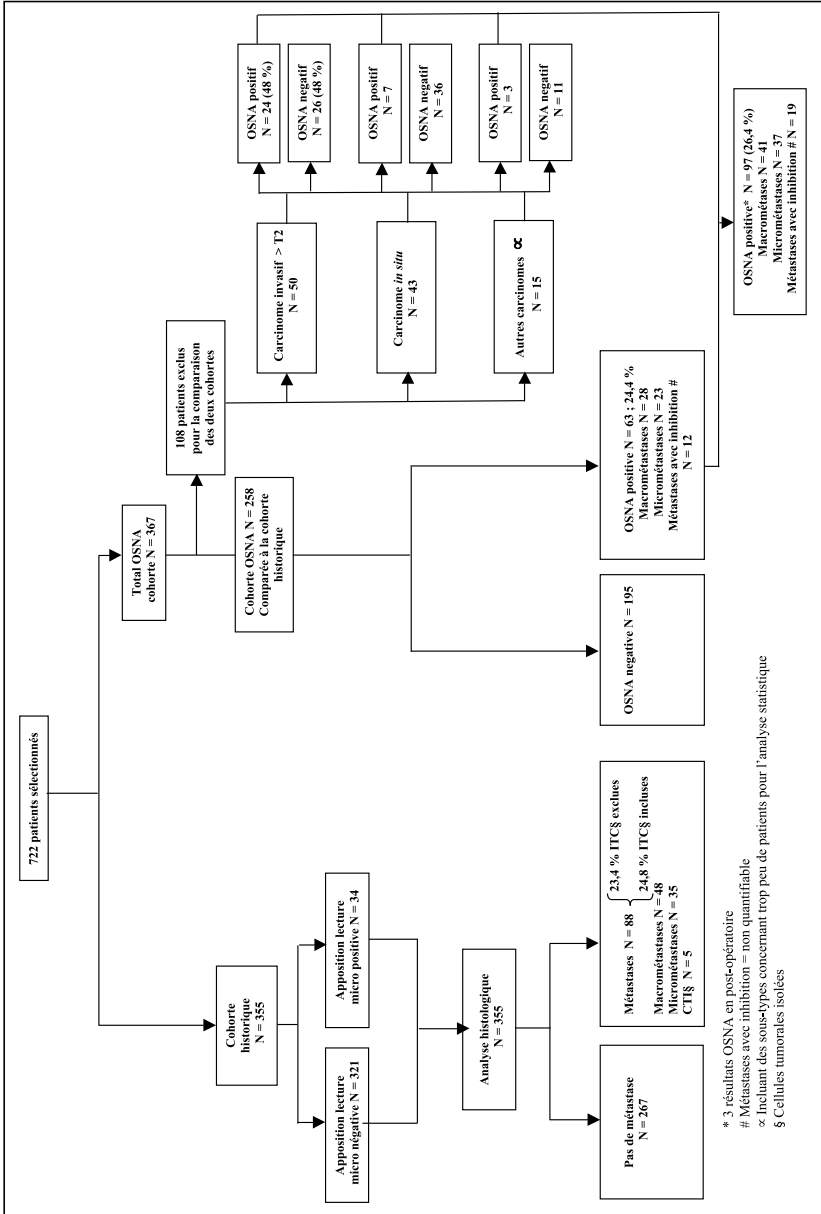
été publiés [2], cette cohorte inclut des patientes présentant des tumeurs mammaires invasives canalaire ou lobulaires de moins de 2 cm, c'est pourquoi toutes les patientes présentant des tumeurs mammaires de plus de 2 cm, et celles présentant des tumeurs *in situ* ont été exclues de la cohorte OSNA pour la comparaison. Les taux d'envahissement des GS selon les deux méthodes OSNA peropératoire (cohorte OSNA restreinte pour comparaison) ou histopathologie définitive postopératoire (cohorte historique) ont ainsi été comparés dans des populations similaires opérées dans la même institution, selon les mêmes préconisations avec la même équipe chirurgicale.

Le tableau 2 présente les caractéristiques des patientes des différentes cohortes et la figure 2 les patientes sélectionnées dans l'étude.

Tableau 2 - Population de patients et caractéristiques tumorales

		OSNA total cohorte	OSNA cohorte pour comparaison avec cohorte historique	Cohorte historique
Nombre de patients		367	258	355
Âge moyen des patients (années)		56,8	56,8	56,9
Histologie	Carcinome canalaire	248	212	313
	Carcinome lobulaire	60	46	42
	Carcinome <i>in situ</i>	43		
	Autres carcinomes	16		
Taille de la tumeur	1a	21	19	16
	1b	104	93	125
	1c	148	146	214
	2	50		
	Valeurs manquantes	44		
Grade SBR	1	94		
	2	171		
	3	68		
	Valeurs manquantes	34		
Récepteurs hormonaux	Estrogène/progestérone +	300		
	Estrogène/progestérone -	51		
	HER2 +	21		
	Triple négative	29		
Grade SBR : grade histopronostique de Scarff Blum et Richardson en 3 grades. Taille tumorale selon la classification TNM.				

Figure 2 - Répartition des patients sélectionnés rétrospectivement dans l'étude



Les taux d'envahissement des GS avec la méthode histologique réalisée dans notre institution ou avec la méthode OSNA ne sont pas significativement différents dans une population de patientes présentant des cancers du sein infiltrants < 2 cm. Le taux d'envahissement des GS est de 24,4 % dans la cohorte OSNA *versus* 23,4 % dans la cohorte histologique en considérant les micrométastases et les macrométastases, et 24,8 % en incluant les cellules tumorales isolées.

Les taux d'envahissement des ganglions axillaires non sentinelles dans la cohorte OSNA sont comparables à ceux décrits dans la littérature en réalisant une analyse histologique des GS (Tableau 3).

Tableau 3 - Présence de métastases dans les ganglions du curage axillaire chez les patientes présentant au moins un GS+ OSNA

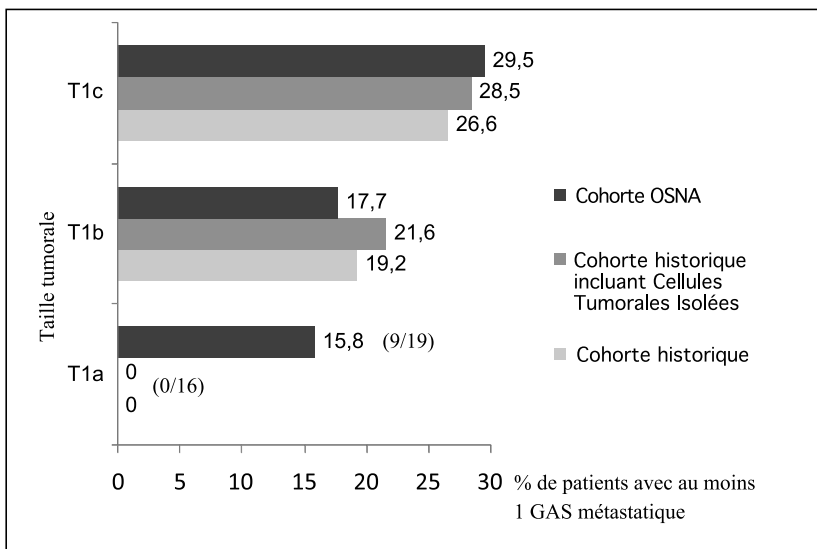
	% patientes GS+ OSNA	Résultats OSNA patientes GS+	% patientes avec métastases dans les ganglions du curage	Corrélation entre les métastases dans le GS et les métastases dans les ganglions du curage
Carcinome canalaire	27,8 % (69/248)	30 macrométastases 26 micrométastases 13 métastases avec inhibition	33,3 % (10/30) 11,5 % (3/26) 7,6 % (1/13)	P < 0,0001 P = 0,0129 NS
Carcinome lobulaire	30,0 % (18/60)	10 macrométastases 6 micrométastases 2 métastases avec inhibition	40 % (4/10) 16,6 % (1/6) (0/2) 0	P = 0,002

Toutefois dans cette première évaluation nous avons mis en évidence un taux d'envahissement des GS relativement élevé pour les petites tumeurs infiltrantes T1a (Figure 3), cependant la différence n'est pas statistiquement significative. Pour les tumeurs *in situ*, compte tenu du faible effectif un recueil de données complémentaires a été décidé.

II.2. Analyse OSNA et tumeur mammaire *in situ*

Résultats de l'analyse OSNA des GS de 61 patientes opérées d'un carcinome intracanaire étendu : un envahissement des GS pour 8 patientes (13,1 %) a été détecté, toujours des petites métastases dans un seul GAS, à l'exception d'une patiente qui a présenté des micrométastases dans les 3 GAS prélevés. Pour 2 patientes l'analyse histologique a retrouvé des cellules tumorales isolées sur la tranche centrale et l'analyse OSNA était négative. Pour 5 patientes un curage

Figure 3 - Comparaison de l'analyse OSNA (cohorte OSNA) et de l'analyse histologique conventionnelle (cohorte historique) pour la détection de métastases dans les ganglions sentinelles selon la taille tumorale



axillaire a été réalisé en même temps que la biopsie du GAS compte tenu du résultat OSNA en extemporané, aucun envahissement des ganglions de curage n'a été détecté en histologie.

II.3. Nombre de copies d'ARNm CK19 et évaluation du risque d'envahissement des ganglions axillaires non sentinelles

Trois cent cinquante-deux patientes, 266 opérées au CRLCC Eugène Marquis de Rennes et 86 au CRLCC Henri Becquerel de Rouen ayant un ganglion sentinelle (GS) positif selon la technique d'analyse OSNA ont été analysées rétrospectivement. Les différentes caractéristiques épidé-miologiques et histologiques de la population sont résumées dans le tableau 4.

Une analyse statistique a divisé la population étudiée en 4 quantiles en fonction du nombre de copies d'ARNm CK19/ μ l dans les GS métastatiques. Un quantile correspondant à 25 % des patientes pour lesquelles le nombre de copies d'ARNm CK19 dans les GS métastatiques est compris dans les valeurs ci-après :

- quantile 1 : $250 < GS < 830$,
- quantile 2 : $830 < GS < 4\ 350$,
- quantile 3 : $4\ 350 < GS < 25\ 500$,
- quantile 4 : $25\ 500 < GS < 8\ 300\ 000$.

La population étudiée ayant un GS+ et un curage axillaire complémentaire représente un effectif de 302 patientes dont 70 avec un envahissement métastatique d'un ganglion axillaire non sentinelle, soit 23 %.

Le taux d'envahissement des ganglions axillaires non sentinelles en fonction du nombre de copies d'ARNm CK19 dans les GS est

Tableau 4 - Description épidémiologique et histologique de la population GS+ OSNA

	GS OSNA+ Rennes-Rouen	
Nombre de patients		352
Rennes		266
Rouen		86
Histologie	Carcinome canalaire	261
	Carcinome lobulaire	52
	Carcinome in situ	17
	Autres carcinomes	6
Récepteurs Hormonaux	Oestrogène +	247
	Oestrogène -	39
	Progestérone +	257
	Progestérone -	78
Statut HER 2	HER 2+	37
	HER 2-	217
Grade SBR	1	66
	2	177
	3	79
Taille de la tumeur	1a	8
	1b	54
	1c	113
	2	68
	3	5
	4	1
Grade SBR : grade histopronostique de Scarff Blum et Richardson en 3 grades. Taille tumorale selon la classification TNM.		

présenté dans le tableau 5. Le nombre de copies d'ARNm CK19 défini en quantile est prédictif de l'envahissement ganglionnaire du curage axillaire de façon statistiquement significative ($p = 0,0002$).

Tableau 5 - Présence de métastases dans les ganglions du curage axillaire chez les patientes présentant un carcinome invasif GS+ en fonction du nombre de copies d'ARNm CK19 amplifié et défini en quantile

P = 0,0002 Significative		Nombre de copies ARNm CK 19 selon quantile				
		Q1 > 250 < 830	Q2 > 830 < 4350	Q3 > 4350 < 25500	Q4 > 25500	Total
Curage axillaire non envahi	N	57	66	57	52	232
	%	89,06	86,84	71,25	63,41	
Curage axillaire envahi	N	7	10	23	30	70
	%	10,94	13,16	28,75	36,59	
TOTAL		64	76	80	82	302

La première ligne donne le nombre (N) de patientes et la deuxième le pourcentage (%) de chaque quantile Q1, Q2, Q3, Q4 : quantiles 1, 2, 3 et 4.

La population étudiée a été restreinte aux patientes présentant un carcinome canalaire infiltrant (Tableau 6) puis à la population carcinome canalaire infiltrant avec récepteurs hormonaux positifs (Tableau 7). Le nombre de copies d'ARNm CK19 défini en quantile est prédictif de l'envahissement ganglionnaire du curage axillaire de façon statistiquement significative ($p = 0,04$) uniquement pour la population carcinome canalaire infiltrant avec récepteurs hormonaux positifs.

Dans une population restreinte aux patientes présentant un carcinome lobulaire infiltrant (Tableau 8), le nombre de copies d'ARNm CK19 définies en quantile est très similaire à celui de la population globale étudiée (seuil pour chaque quantile non significativement différent) et de plus très prédictif de l'envahissement ganglionnaire du curage axillaire, et ce de façon statistiquement significative ($p = 0,015$).

Tableau 6 - Présence de métastases dans les ganglions du curage axillaire chez les patientes présentant un carcinome canalaire GS+ en fonction du nombre de copies d'ARNm CK19 amplifié

p = 0,09 NS		Nombre de copies ARNm CK 19 selon quantile				
		Q1 > 250 < 830	Q2 > 830 < 4350	Q3 > 4350 < 25500	Q4 > 25500	Total
Curage axillaire non envahi	N	42	53	43	43	181
	%	85,71	84,13	71,67	70,49	
Curage axillaire envahi	N	7	10	17	18	52
	%	14,29	15,87	28,33	29,51	
TOTAL		49	63	60	61	233

La première ligne donne le nombre (N) de patientes et la deuxième le pourcentage (%) de chaque quantile Q1, Q2, Q3, Q4 : quantiles 1, 2, 3 et 4.

Tableau 7 - Présence de métastases dans les ganglions du curage axillaire chez les patientes présentant un carcinome canalaire GS+/récepteurs hormonaux + en fonction du nombre de copies d'ARNm CK19 amplifié et défini en quantile

P = 0,04 Significative		Nombre de copies ARNm CK 19 selon quantile				
		Q1 > 250 < 830	Q2 > 830 < 4350	Q3 > 4350 < 25500	Q4 > 25500	Total
Curage axillaire non envahi	N	36	46	35	33	150
	%	85,71	83,64	71,43	64,71	
Curage axillaire envahi	N	6	9	14	18	47
	%	14,29	16,36	28,57	35,29	
TOTAL		42	55	49	51	197

La première ligne donne le nombre (N) de patientes et la deuxième le pourcentage (%) de chaque quantile Q1, Q2, Q3, Q4 : quantiles 1, 2, 3 et 4.

Tableau 8 - Présence de métastases dans les ganglions du curage axillaire chez les patientes présentant un carcinome lobulaire et GS+ en fonction du nombre de copies d'ARNm CK19 amplifié et défini en quantile

P = 0,015 Significative		Nombre de copies ARNm CK 19 selon quantile				
		Q1 > 250 < 830	Q2 > 830 < 4350	Q3 > 4350 < 25500	Q4 > 25500	Total
Curage axillaire non envahi	N	9	8	7	5	29
	%	90	88,89	63,64	35,71	
Curage axillaire envahi	N	1	1	4	9	15
	%	10	11,11	36,36	64,29	
TOTAL		10	9	11	14	44

La première ligne donne le nombre (N) de patientes et la deuxième le pourcentage (%) de chaque quantile Q1, Q2, Q3, Q4 : quantiles 1, 2, 3 et 4.

III. DISCUSSION

III.1. La technique OSNA

OSNA donne un résultat définitif et fiable en extemporané de l'analyse des GS. La fiabilité d'un examen extemporané est bénéfique pour les patientes : il évite une seconde intervention et permet de mettre en route les traitements adjuvants rapidement quand c'est nécessaire.

Dans la première étude rétrospective comparant la pratique OSNA à l'analyse histologique des GS [12], il a été mis en évidence que l'analyse OSNA donne des résultats tout à fait comparables aux résultats qui étaient obtenus après examen histologique standard pour les patientes présentant une lésion invasive mammaire < 2 cm, avec un taux de positivité des GS avec OSNA de 24,4 % *versus* 23,4 % en histologie. Toutefois la technique OSNA semble détecter plus de métastases sur les GS pour les petites tumeurs T1a que la technique histologique standard (15,8 % *versus* 0 %, non significatif). Dans l'étude complémentaire réalisée pour des patientes opérées d'un cancer *in situ* avec une biopsie du ganglion sentinelle, on retrouve également un taux

de positivité élevé de 13,1 %. La présence de cellules mammaires non tumorales dans les GS responsables de faux positifs (OSNA+) a été évoquée mais ce phénomène est semble-t-il exceptionnel selon les études histologiques, de plus les cellules mammaires normales exprimant moins la CK19 que les cellules tumorales et étant en petit nombre, il paraît peu probable que leur présence entraîne une positivité du test OSNA. Il serait par ailleurs étonnant d'avoir des faux positifs OSNA uniquement pour les T1a et *in situ* alors que pour les tumeurs T1b, T1c les résultats sont tout à fait concordants entre les deux techniques OSNA ou histologie, or les modalités de repérage et d'analyse sont les mêmes. On peut plutôt envisager que l'analyse de tout le GS permet de quantifier des cellules tumorales isolées disséminées, ce qui est impossible avec l'analyse histologique car même avec des coupes multiples la totalité du tissu ganglionnaire ne peut pas être examinée [13]. L'analyse OSNA reflète le volume tumoral global dans tout le GS et ne distingue pas une micrométastase d'un volume de cellules tumorales disséminées dans tout le GS (équivalent au volume tumoral d'une micrométastase). Ce signal qui permettrait de détecter de toutes petites métastases a-t-il une pertinence clinique pour le traitement des petites tumeurs infiltrantes, le sujet est largement débattu puisque certains préconisent de ne plus rechercher les micrométastases, mais ce point de vue est toutefois loin de faire consensus. Dans le cas des cancers *in situ* où la présence de cellules métastatiques dans les ganglions axillaires, quelle que soit la taille de la métastase, est impossible en l'absence d'infiltrant, le signal a une autre signification et doit faire évoquer un carcinome infiltrant associé à l'*in situ*.

Dans la première étude nous avons pu vérifier que la classification semi-quantitative OSNA en micrométastase et macrométastase est bien corrélée à l'atteinte métastatique des ganglions non sentinelles, avec des résultats semblables à ceux obtenus en analysant le GS avec les techniques histologiques. Dans la dernière étude en cours nous abordons une interprétation plus précise en considérant OSNA non plus en semi-quantitatif mais comme une donnée quantitative continue basée sur le nombre de copies d'ARNm CK19, et notre analyse permet de confirmer les seuils cliniques qui avaient été établis pour OSNA autour de 5 000 copies d'ARNm CK19 quel que soit le type histologique pour séparer les micrométastases et les macrométastases. En effet pour un nombre de copies supérieur à 4 350 les taux d'envahissement des ganglions de curage axillaire sont proches de ceux connus dans la littérature d'environ 40 % [14, 15], en cas de macrométastases du GS, et pour un nombre de copies > 250 et $< 4 350$ le taux d'envahissement des ganglions de curage axillaire est proche de ceux connus dans la

littérature pour les micrométastases, avec un risque d'atteinte des ganglions non sentinelles de 14 % [16]. On note une augmentation très importante du risque d'envahissement des ganglions de curage en présence de carcinome lobulaire atteignant 65 % quand le nombre de copies dans le GS métastatique est $> 25\ 500$. La question est maintenant de savoir comment mieux exploiter l'information donnée par OSNA. Un nomogramme intégrant le nombre de copies de l'ARNm de la CK19 dans le GS, le profil histologique et moléculaire tumoral, est en cours d'élaboration au niveau européen de façon à prédire au mieux le risque d'atteinte métastatique des ganglions non sentinelles. Il subsiste actuellement un problème de quantification de la métastase avec l'analyse moléculaire dans quelques cas, lié à un phénomène d'inhibition de la réaction d'amplification. Ce phénomène est détecté en présence d'un nombre de copies d'ARNm CK19 dans l'échantillon dilué supérieur à celui retrouvé dans l'analyse de l'échantillon pur, des investigations sont en cours pour résoudre ce problème et distinguer une micrométastase d'une macrométastase.

La technique OSNA est bien standardisée, de cette façon les résultats sont tout à fait comparables d'une institution à une autre. La seule différence qui persiste c'est l'intégration de la totalité du GS pour l'analyse OSNA pour certains et la préservation pour d'autres d'une tranche centrale pour une analyse histologique. À l'issue de l'analyse et de la publication de nos premiers résultats retrouvant une parfaite concordance entre les deux techniques moléculaire ou histologique, nous avons décidé d'analyser tout le GS avec OSNA et de ne garder qu'une empreinte histologique. Cette option présente l'avantage de donner le résultat définitif en extemporané, sans analyse histologique secondaire sur une partie du GS, l'interprétation du résultat, notamment la quantification en cas de métastases, est plus simple qu'un résultat obtenu en compilant les résultats de deux analyses, de plus cela réduit le coût en évitant l'analyse histologique. Par contre en broyant tout le GS pour l'analyse moléculaire, il n'est pas préservé de tissu pour des analyses histologiques complémentaires mais juste une image cytologique par empreinte, mais le lysat est conservé et des techniques moléculaires complémentaires sont réalisables. Le problème d'une sous-expression dans certains cas de la CK19 et donc de faux négatifs avec la technique OSNA a justifié pour certains la conservation d'une tranche centrale, pour d'autres la réalisation d'une étude systématique de l'expression de la CK19 par immunohistochimie sur la biopsie tumorale avant la réalisation d'un test OSNA. Actuellement les études retrouvent en immunohistochimie un niveau d'expression de la

protéine CK19 dans 98 %, voire 100 % des tumeurs mammaires [17, 18], et on sait que même en l'absence d'expression de la protéine il existe une expression de l'ARNm de la CK19 détectable. Finalement le risque de non-expression de l'ARNm CK19 étant inférieur à 0,5 % dans les tumeurs mammaires, la recherche de la CK19 par immunohistochimie sur biopsie tumorale n'est pas préconisée en systématique.

III.2. L'organisation chirurgicale autour d'OSNA

Dans notre pratique, tous les résultats OSNA sont communiqués en peropératoire directement aux chirurgiens sauf dans 3 cas pour des problèmes techniques OSNA.

Le résultat pour l'étude d'un ganglion par OSNA peut être obtenu en 30 minutes, et 5 minutes supplémentaires pour chaque ganglion en plus. Ces délais doivent être pris en considération pour l'organisation du bloc opératoire. Si parfois la gestion du bloc opératoire ne permet pas d'attendre les résultats, nous proposons de rendre les résultats OSNA en différé, comme pour l'histologie définitive ; le bénéfice de l'extemporané est perdu mais les avantages de la technique OSNA (sa reproductibilité, et l'étude du ganglion en entier) sont maintenus.

III.3. Intérêt de l'examen extemporané et l'essai ACSO Z0011 [19, 20]

L'essai ACSO Z0011 est une étude randomisée montrant qu'il n'y avait pas de différence significative en termes de survie globale et de survie sans récurrence après curage complémentaire *versus* pas de curage lorsque le GS était métastatique (micrométastase ou macrométastase), et ce quel que soit le profil histologique tumoral, à partir du moment où ces patientes bénéficiaient d'un traitement systémique (chimiothérapie, hormonothérapie) et d'une radiothérapie locale.

Cette étude s'est arrêtée après inclusion de 1 900 patientes alors que 6 000 inclusions étaient prévues, faute d'incident. Par ailleurs, les champs d'irradiation ne sont pas clairement détaillés.

Quoi qu'il en soit, cette étude, comme le Z0010, le NSABP 12 et l'IBCSG, provoque discussions et réflexions sur l'attitude à adopter devant une micrométastase voire une macrométastase du GS. Le PHRC SERC randomisant CA *versus* pas de curage pour toutes les micro- et macrométastases détectées dans le GS va, nous l'espérons, nous éclaircir sur cette prise en charge.

Aujourd'hui, la place de l'extemporané est justifiée pour la détection au moins des macrométastases et pour les micrométastases lorsque le traitement systémique n'est pas validé. Dans notre équipe, nous poursuivons l'utilisation d'OSNA en extemporané pour ces raisons mais la décision de curage axillaire dans le même temps pour certains cas est plus tempérée, préférant l'attente de tous les résultats histologiques et de la discussion en comité pluridisciplinaire à la réalisation d'un curage finalement non justifié. Dans ce cas la technique OSNA est utilisée en différé, mais reste pour nous la technique de référence, du fait de sa reproductibilité et de l'analyse du ganglion en entier.

III.4. Coût de l'analyse

Nous n'avons pas réalisé d'étude du coût dans notre étude mais 2 études, la première avec Genesearch BLN (Veridex, LLC Warren, NJ) [21], la seconde avec OSNA montrent une économie pour l'établissement hospitalier utilisant la technique moléculaire extemporanée grâce à un gain d'hospitalisation [22].

Là encore, le STIC SAGE va nous aider à répondre à cette question.

CONCLUSION

La technique OSNA est une méthode d'analyse des ganglions sentinelles, les résultats sont concordants avec l'analyse histologique, mais il existe quelques différences subtiles vraisemblablement liées à la méthode qui analyse le ganglion dans sa globalité et donc détecte plus de petites métastases. La méthode est standardisée et le résultat est disponible en 30 minutes pour l'analyse d'un GS à condition d'avoir mis en place une procédure de coordination pluridisciplinaire. La technique OSNA n'est pas uniquement une analyse extemporanée, c'est également un résultat définitif qui peut être traité en différé. Le STIC SAGE va nous aider à évaluer son coût.

Un nomogramme intégrant le nombre de copies de l'ARNm de la CK19 dans le GS, le profil histologique et moléculaire tumoral, devrait permettre de prédire au mieux le risque d'atteinte métastatique des ganglions non sentinelles. Le PHRC SERC devrait répondre à la question curage *versus* non curage en présence de métastases du GS.

Bibliographie

- [1] Fleissig A, Fallowfield LJ, Langridge CI, Johnson L, Newcombe RG, Dixon JM, Kissin M, Mansel RE. Post-operative arm morbidity and quality of life. Results of the ALMANAC randomised trial comparing sentinel node biopsy with standard axillary treatment in the management of patients with early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2006;95:279-93.
- [2] Lorand S, Lavoué V, Tas P, Foucher F, Mesbah H, Rouquette S, Bendavid C, Coue O, Poree P, Levêque J. Intraoperative touch imprint cytology of axillary sentinel nodes for breast cancer: a series of 355 procedures. *Breast* 2011; 20:119-23.
- [3] Fritzsche FR, Reineke T, Morawietz L, Kristiansen G, Dietel M, Fink D, Rageth C, Honegger C, Caduff R, Moch H, Varga Z. Pathological processing techniques and final diagnosis of breast cancer sentinel lymph nodes. *Ann Surg Oncol* 2010;17:2892-98.
- [4] Varga Z, Rageth C, Saurenmann E, Honegger C, von Orelli S, Fehr M, Fink D, Seifert B, Moch H, Caduff R. Use of intraoperative stereomicroscopy for preventing loss of metastases during frozen sectioning of sentinel lymph nodes in breast cancer. *Histopathology* 2008;52:597-604.
- [5] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekama T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000;28(12):E63.
- [6] Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, Kaneko T, Iwase T, Akiyama F, Kato Y, Tsuda H, Ueda S, Sato K *et al.* One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007;13:4807-16.
- [7] Schem C, Maass N, Bauerschlag DO, Carstensen MH, Loning T, Roder C, Batic O, Jonat W, Tiemann K. One-step nucleic acid amplification - A molecular method for the detection of lymph node metastases in breast cancer patients; results of the German study group. *Virchows Arch* 2009;454:203-10.
- [8] Snook KL, Layer GT, Jackson PA, de Vries CS, Shousha S, Sington HD, Nigar E, Singhal H, Chia Y, Cunnick G *et al.* Multicentre evaluation of intraoperative molecular analysis of sentinel lymph nodes in breast carcinoma. *Br J Surg* 2011;98:527-34.
- [9] Tamaki Y, Akiyama F, Iwase T, Kaneko T, Tsuda H, Sato K, Ueda S, Mano M, Masuda N, Takeda M *et al.* Molecular detection of lymph node metastases in breast cancer patients: results of a multicenter trial using the one-step nucleic acid amplification assay. *Clin Cancer Res* 2009; 15:2879-84.
- [10] Visser M, Jiwa M, Horstman A, Brink AA, Pol RP, van DP, Snijders PJ, Meijer CJ. Intra-operative rapid diagnostic method based on CK19 mRNA expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer. *Int J Cancer* 2008;122:2562-7.
- [11] Le Frère-Belda MA, Bats AS, Gillaizeau F, Poulet B, Clough KB, Nos C, Peoc'h M, Seffert P, Bouteille C, Leroux A, Guillemin F, Blanc-Fournier C, Crouet H, Arnould L, Cuisenier J, Penault-Llorca F, Gimbergues P, Jacquemier J, Houvenaeghel G, Chatellier G, Lécure F. Diagnostic performance of one-step nucleic acid amplification for intraoperative sentinel node metastasis detection in breast cancer patients. *Int J Cancer* 2012 May 15;130(10):2377-86. doi: 10.1002/ijc.26291.
- [12] Godey F, Levêque J, Tas P, Gandon G, Poree P, Mesbah H, Lavoué V, Quillien V, Bendavid Athias C. Sentinel lymph node analysis in breast cancer: contribution of one step nucleic acid amplification (OSNA). *Breast Cancer Res Treat* 2012;131:509-16.
- [13] Weaver DL. Pathology evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer: protocol recommendations and rationale. *Mod Pathol* 2010;23(2):S26-S32.
- [14] Schwartz GF, Giuliano AE, Veronesi U. Proceedings of the consensus conference on the role of sentinel lymph node biopsy in carcinoma of the breast, April 19-22, 2001, Philadelphia, Pennsylvania. *Cancer* 2002;94:2542-51.
- [15] Viale G, Maiorano E, Pruneri G, Mastropasqua MG, Valentini S, Galimberti V, Zurrada S, Maisonneuve P, Paganelli G, Mazzarol G. Predicting the risk for additional axillary metastases in patients with breast carcinoma and positive sentinel lymph node biopsy. *Ann Surg* 2005;241:319-25.

[16] Houvenaeghel G, Nos C, Mignotte H, Classe JM, Giard S, Rouanet P, Lorca FP, Jacquemier J, Bardou VJ. Micrometastases in sentinel lymph node in a multicentric study: predictive factors of nonsentinel lymph node involvement--Groupe des Chirurgiens de la Fédération des Centres de Lutte Contre le Cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:1814-22.

[17] Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* 2002;40:403-39.

[18] Alvarenga CA, Paravidino PI, Alvarenga M, Dufloth R, Gomes M, Zeferino LC, Schmitt F. Expression of CK19 in invasive breast carcinomas of special histological types: implications for the use of one-step nucleic acid amplification. *J Clin Pathol* 2011;64:493-7.

[19] Giuliano AE, McCall L, Beitsch P, Whitworth PW, Blumencranz P, Leitch AM, Saha S, Hunt KK, Morrow M, Ballman K. Locoregional recurrence after sentinel lymph node dissection with or without axillary dissection in patients with sentinel lymph node

metastases: the American College of Surgeons Oncology Group Z0011 randomized trial. *Ann Surg* 2010;252:426-32.

[20] Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW, Leitch AM, Saha S, McCall LM, Morrow M. Axillary dissection *versus* no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. *JAMA* 2011;305:569-75.

[21] Cutress RI, McDowell A, Gabriel FG, Gill J, Jeffrey MJ, Agrawal A, Wise M, Raftery J, Cree IA, Yiangou C. Observational and cost analysis of the implementation of breast cancer sentinel node intraoperative molecular diagnosis. *J Clin Pathol* 2010;63:522-9.

[22] Guillen-Parédes MP, Carrasco-González L, Châves-Benito A, Campillo-Soto A, Carrillo A, Aguayo-Albasini JL. One-step nucleic acid amplification (OSNA) assay for sentinel lymph node metastases as an alternative to conventional postoperative histology in breast cancer: a cost-benefit analysis. *Cir Esp* 2011;89(7)456-462.