



Centre Jean Perrin

Centre de Lutte contre le Cancer d'Auvergne
Clermont-Ferrand - France -



Analyse du ganglion sentinelle : vers de nouvelles techniques ?

Frédérique Penault-Llorca

GS - état des lieux

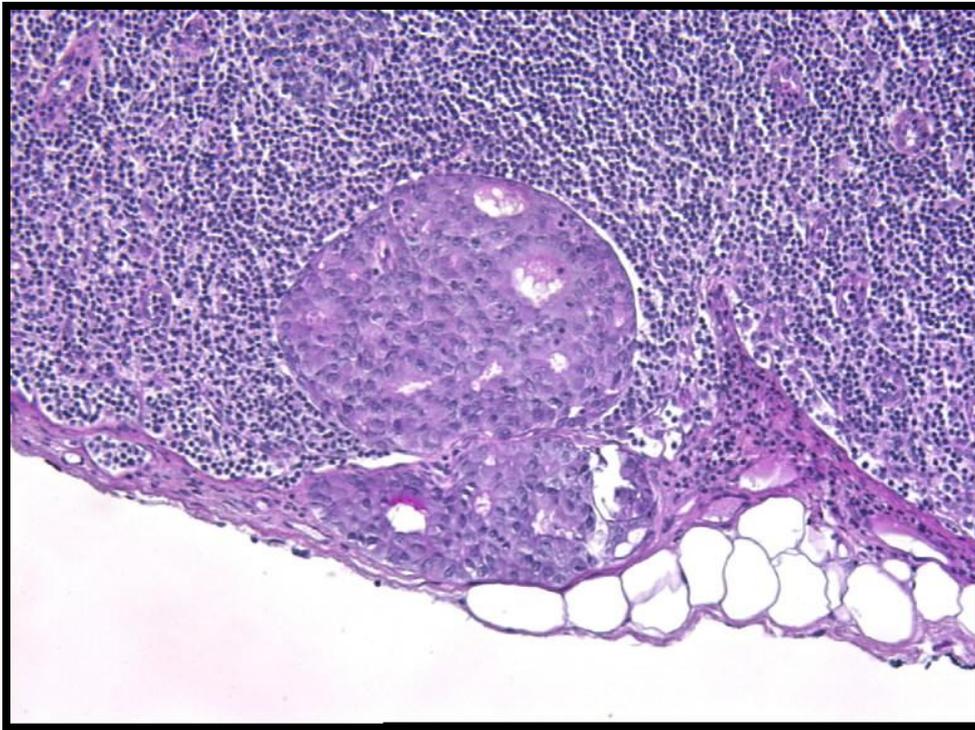
- Environ 20 000 patientes par an sont susceptibles de bénéficier d'une biopsie du GS en France.
- Taux moyen de ré-intervention chirurgicale est de 10 à 17% soit 2 500 à 3000 patientes par an en France

GS : généralités

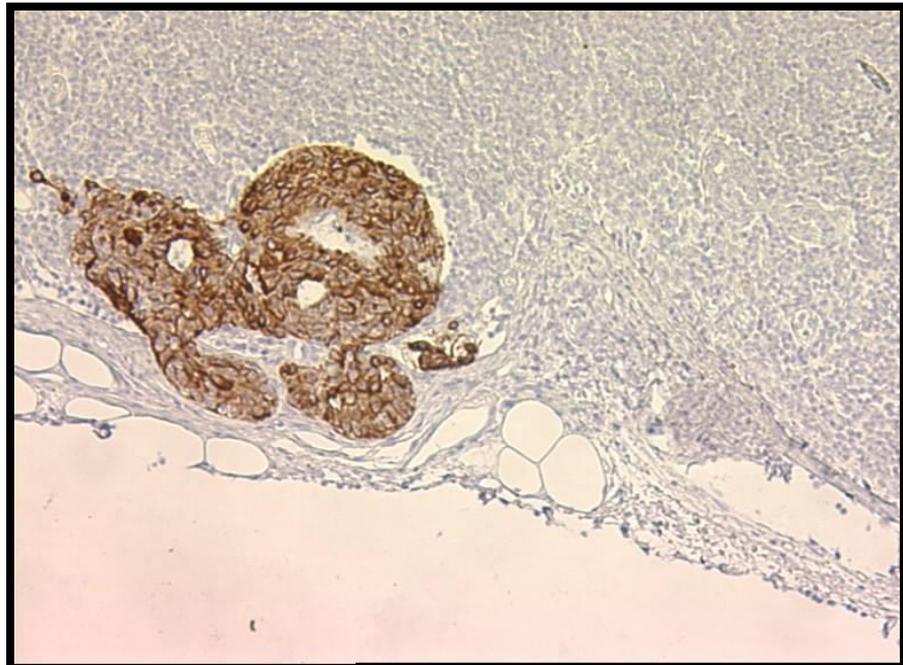
- Le degré de l'envahissement axillaire est proportionnel à la taille et au grade tumoraux.
- moins de 10% pour les tumeurs < 1cm de bas grade à plus de 50% pour les tumeurs > 5 cm
- Le GS est le premier ganglion qui draine une tumeur invasive. Lorsqu'il est indemne de métastase, le risque d'envahissement du reste du curage axillaire est très faible (de l'ordre de 1 à 6% selon les séries).

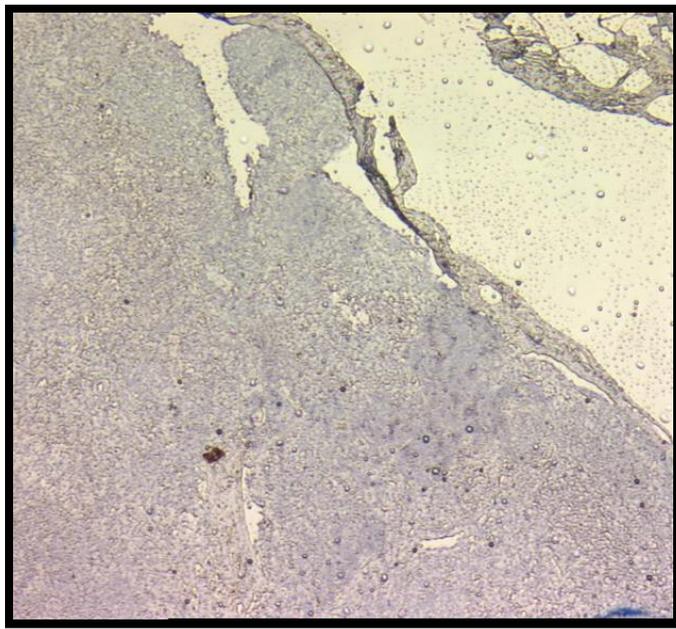
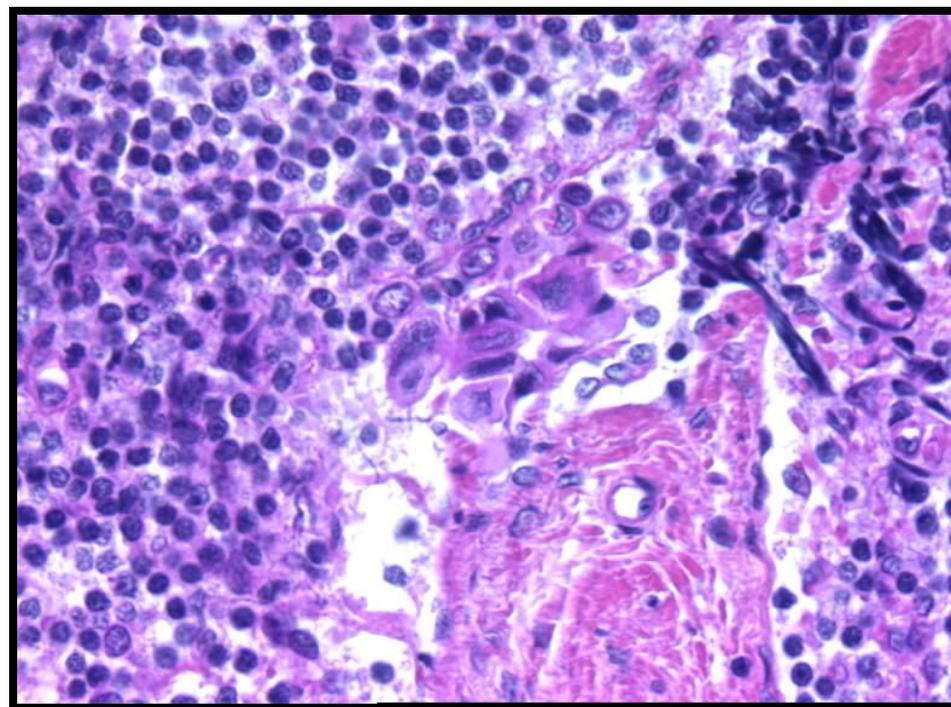
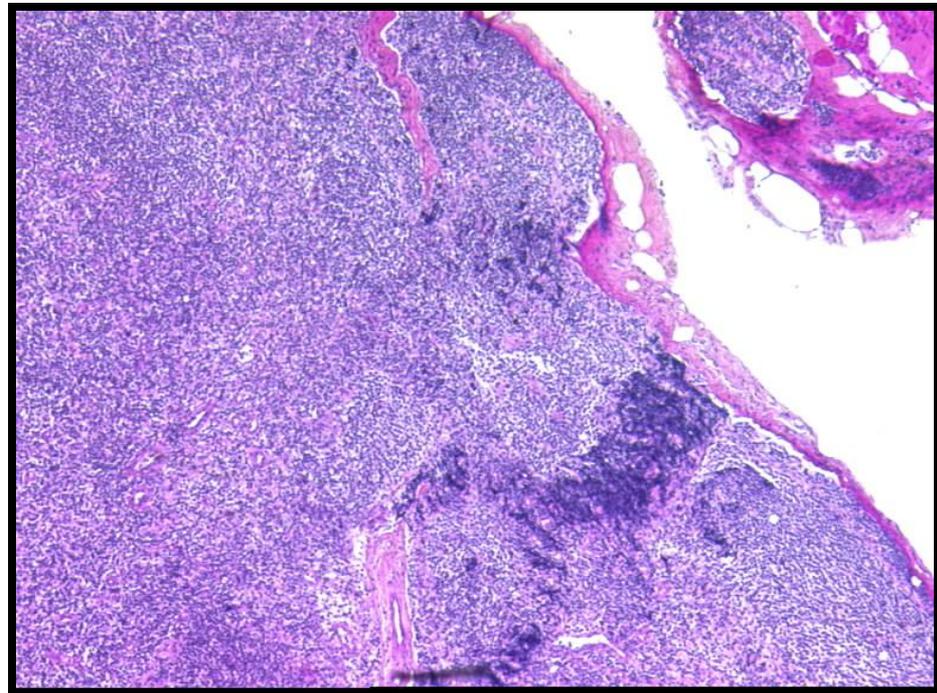
Micrométastases : classification AJCC/TNM 2003

- pN1mi : taille comprise entre 0,2mm et 2 mm
- pN0 : taille inférieure à 0,2 mm : cellules isolées
 - pN0(i-) : immunohisto négative
 - PN0(i+) : immunohisto positive
 - PN0(mol-) : RT-PCR négative
 - PN0(mol+) : RT-PCR positive
- si ganglion sentinelle : PN0 (i+) (sn)

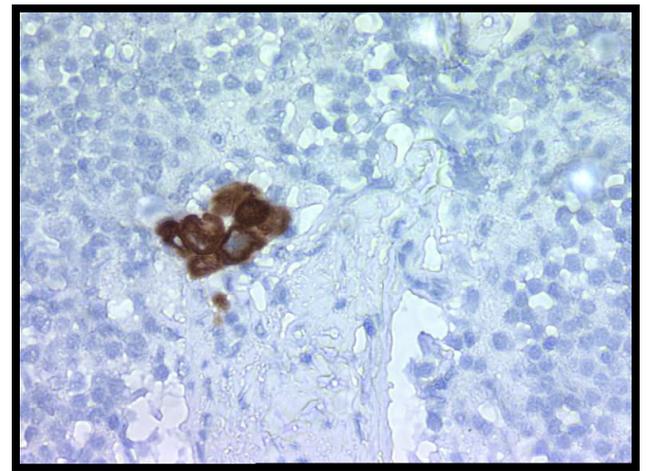


pN1mi (gs)





PN0 (mi) (i+) : immunohisto positive



Prise en charge

- Absence de consensus:
 - Modalités de repèrage
 - Analyse anatomopathologique per et post-opératoire
- Recommandations (2005):
 - Taux de faux négatifs $<$ ou $=$ 5%
 - Taux d'identification de 85%
- Gestion des résultats (micrométastases et cellules isolées)
- Information des patientes:
 - Alternative récente au curage axillaire avec un risque de faux négatif
 - Risque de réintervention
 - Persistance d'un risque de complication

Contre-indications GGS

- Taille tumorale > 3-4 cm (préopératoire)
- Adénopathies palpables
- Traitement néo-adjuvant
- Chirurgie antérieure sur le sein concerné ou le creux axillaire
- Multifocalité ou multicentricité

Réalisation du GGS

- Population sélectionnée
- Taux d'identification élevé (85%)
 - Chirurgien expérimenté (apprentissage : *50 procédures*)
 - Technique de détection (colorimétrique, isotopique, *combinée*)
 - Site d'injection (*péritumoral*, périaréolaire)
 - Lymphoscintigraphie
- Taux de faux négatifs faible (5%)
 - Expérience du chirurgien
 - Technique de détection
 - Prélèvement de plus d'un ganglion (2 à 4)
 - Analyse sur coupes multiples

Réalisation du GGS: au CJP

- 1998
- Depuis 2004 : 350 patientes/an
- Au total: près de 3200 patients
- Technique de détection isotopique
- Injection périaréolaire supéro-externe intradermique

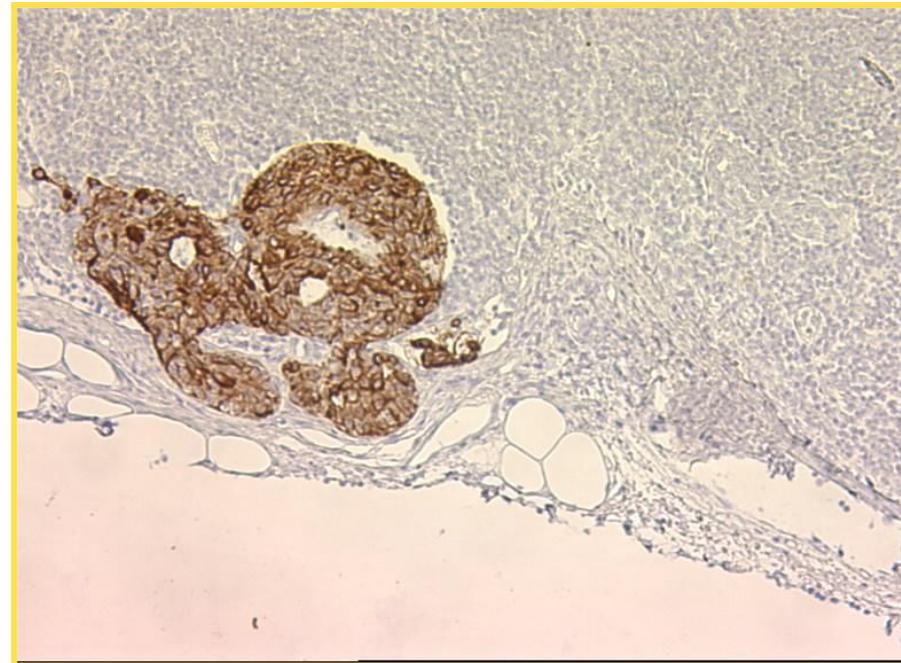
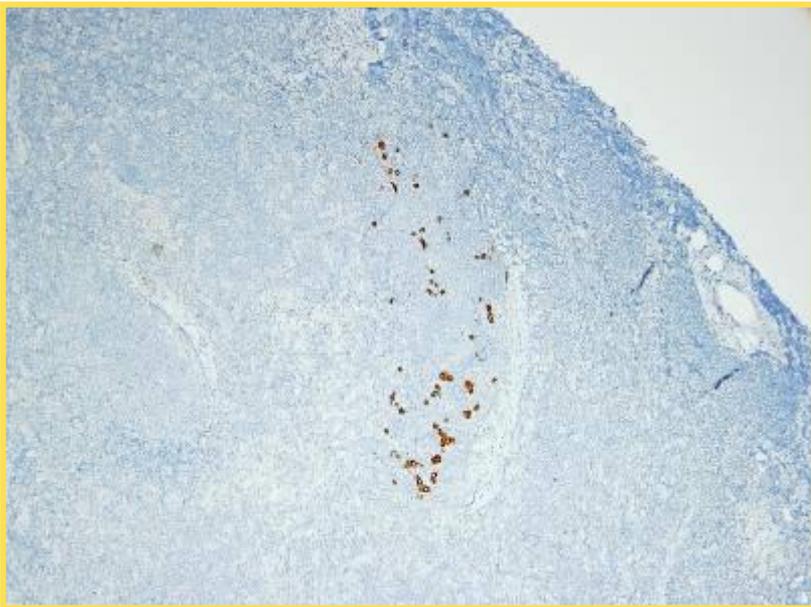
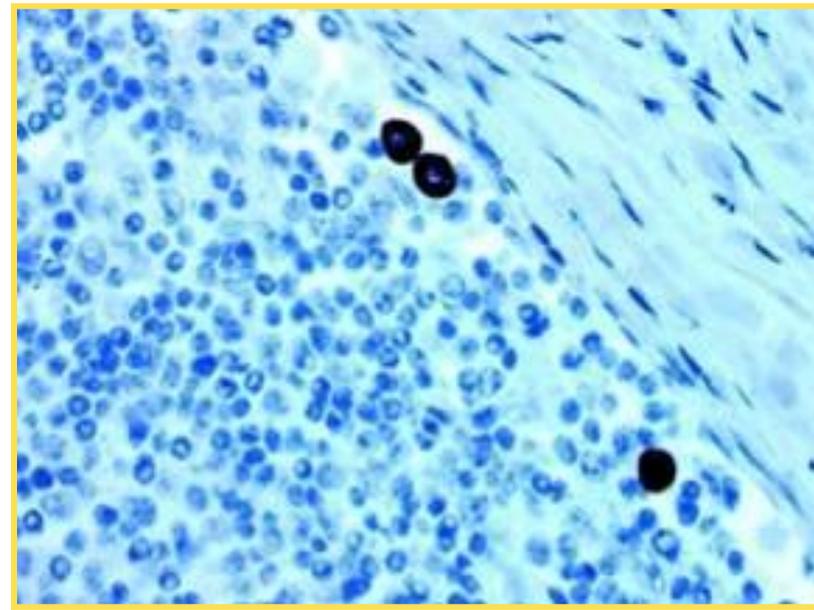
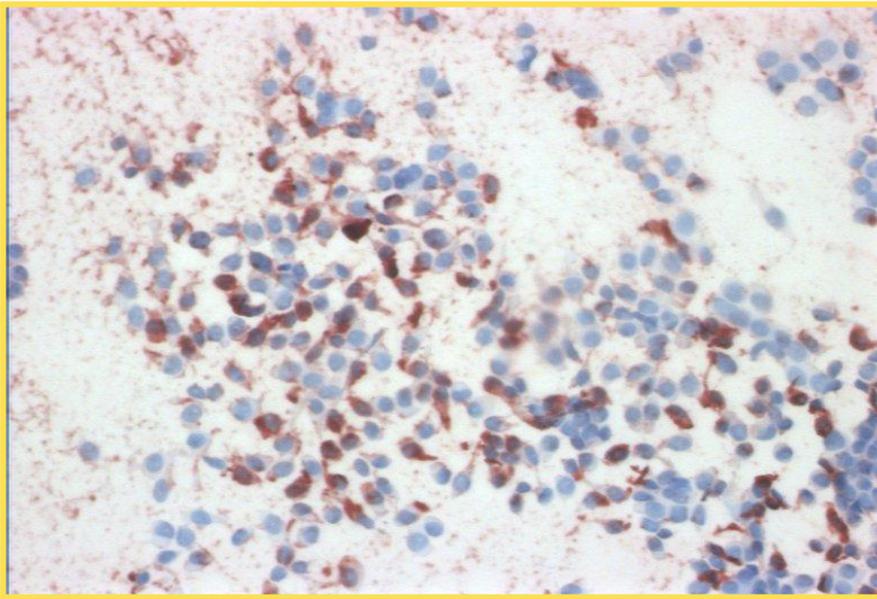
Prise en charge macroscopique

- Pas de risque lié au traceur
- Pathologiste entraîné
- Palpation
- Coupé dans son grand axe vertical
 - +/- sections sériées (2mm)
- Analyse peropératoire: (3 premiers GGS)
 - Appositions
 - Coupe congelée
 - Biologie moléculaire



Prise en charge en histologie

- Inclus en totalité
- Coupes multiples en coloration standard
- Immunohistochimie (AE1/AE3, CK19)
- Au CJP:
 - 3 niveaux en coloration HES distants de 150 à 200 μm
 - Immunohistochimie par AE1/AE3 sur les 3 niveaux



Prise en charge « classique » du GS

- De nombreuses équipes pratiquent un **examen extemporané** sous la forme d'appositions ou de coupes à congélation.
- Le taux de faux négatifs de ces examens nécessitant une **ré-intervention chirurgicale dans un deuxième temps varie de 9 à plus de 20%** (13% dans le STIC GAS, 17% dans l'expérience des grosses équipes françaises) selon
 - les indications du GS
 - la technique utilisée lors de l'examen extemporané (apposition ou coupes à congélation)
 - l'examen définitif : coloration HES simple ou niveaux de coupes avec immunodétections (IHC)
- La **sensibilité des coupes à congélation est meilleure que celle des appositions** (88.2% contre 47.1%) pour la détection des métastases vues en HES (et non en IHC)

Techniques moléculaires

- Le principe repose sur un diagnostic per opératoire de la présence ou de l'absence de métastases au niveau du ganglion sentinelle, par une technique moléculaire rapide, quantitative, exhaustive et fiable.
- Un kit disponible en France
 - OSNA® Sysmex (*One Step Nucleic Acid Amplification*)

GeneSearch™ Veridex

- Dispositif médical de diagnostic moléculaire basé sur une méthode d'amplification d'acide nucléique qui détecte de façon précise le statut cancéreux des ganglions sentinelles.
- Le test utilise le mRNA de la **mammaglobine** et la **cytokératine 19**. Un marqueur présent dans toutes les cellules est également inclus dans ce test multiplexe comme RNA de contrôle ("*housekeeping gene*").

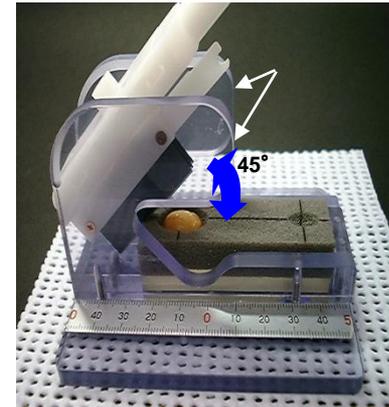
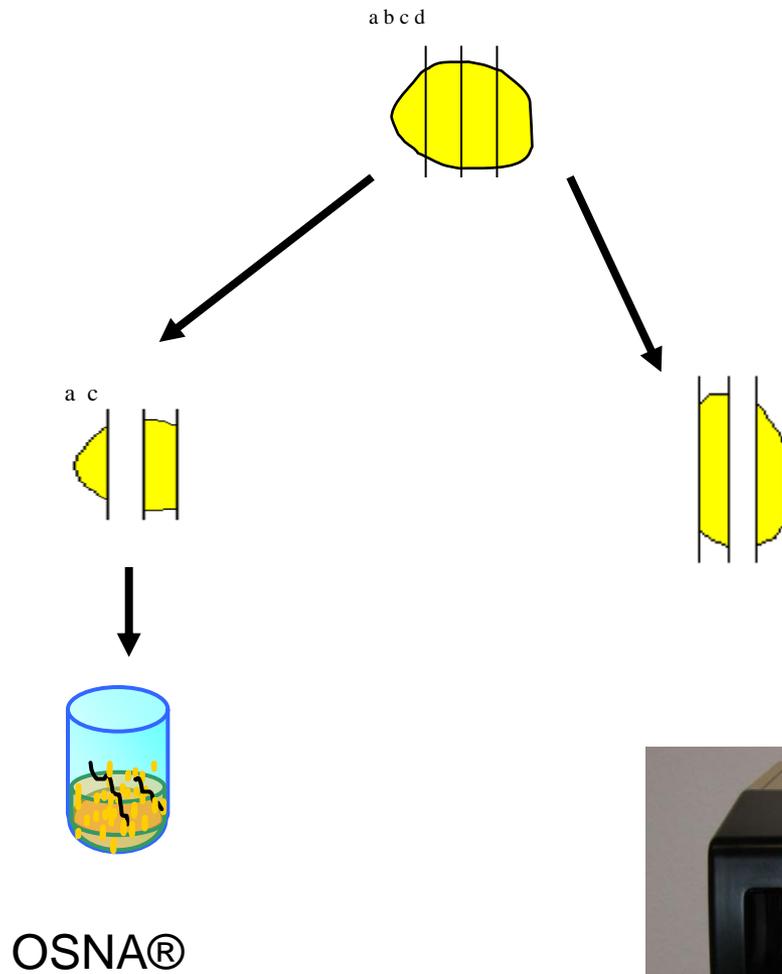
GeneSearch™ Veridex (« FDA approved » juillet 2007)

- Détection rapide de métastases de plus de 0,2mm dans un GS (avec une moitié du GS soumise à une analyse histopathologique différée)
- Le résultat est donc rendu comme
 - positif (pour macro ou micro métastase)
 - négatif (pour macro ou micro métastase)
 - ou invalide
- Il peut maintenant être rendu avec une valeur numérique
- Il faut environ 2000 cellules tumorales pour un résultat +

Retiré du marché en 2009

OSNA® *Sysmex (One Step Nucleic Acid Amplification)*

- Dispositif médical d'amplification en une étape d'acides nucléiques.
- Cette technique consiste à amplifier directement l'ARNm à partir des lysats tissulaires selon une méthode isothermique.
- Elle a été mise au point pour automatiser le processus et indiquer quantitativement l'expression de l'ARNm spécifique de la Cytokératine 19 (CK 19) en 30 minutes.



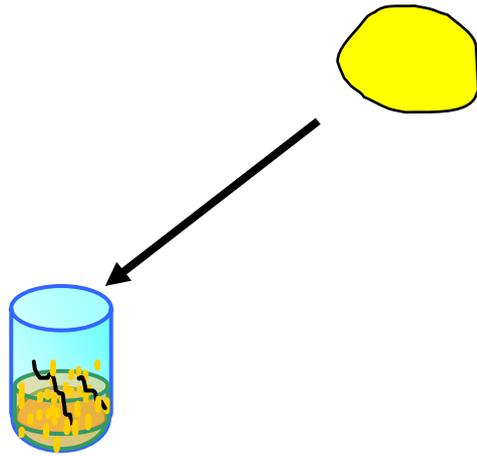
Méthode de référence per opératoire

Appositions ou coupes à congélation

Puis niveaux HES et IHC

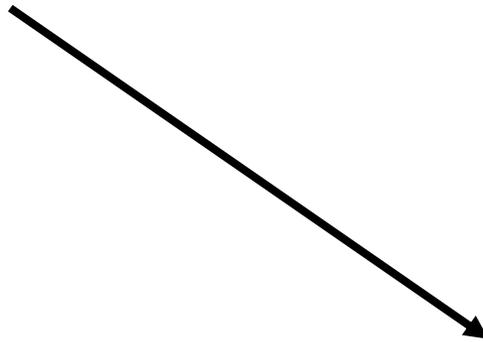


Ou



Pas de contrôle histopathologique

OSNA®



Rendu des résultats

Résultat OSNA	Nb de copies par microL	Correspondance
•		
Négatif	De 0 à 250	Négatif ou CTI
+	250-5000	micrométastase
++	> 5000	Macrométastase
I+ positif inhibition	Non quantifiable	Micro ou Macrométastases

Positif inhibition

- A considérer comme positif mais ne peut discriminer une micrométastase d'une macrométastase.
- Lié à la présence dans l'échantillon (non purifié) étudié d'un inhibiteur de l'amplification qui négative faussement la réaction dans l'échantillon pur.
- La dilution par un facteur 10, permet de contrer la présence de cet inhibiteur mais ne reflète pas réellement la quantité d'ARNm CK19 présent.

Expérience du centre Jean Perrin

- en présence d'un GS : 36 minutes
- 2 GS : 44 minutes
- départ du bloc opératoire, rendu du résultat : dont 20 à 25 minutes de temps machine.

Limites de la méthode OSNA®

- l'expression de la CK 19 limitée à 98% des tumeurs mammaires
- la conservation tissulaire : doit on ou non conserver une tranche de ganglion pour analyse histopathologique ? **Le débat reste entier**
- les cas positifs par levée d'inhibition (5% des cas)

Performances de la méthode OSNA®

- très satisfaisante dans les études publiées
- taux de concordances après correction des biais d'allocation tissulaire de 91,8 à 98,5% (moyenne de 96,1%) avec la technique de référence.
- Les cas discordants restent rares, le plus souvent expliqués par les biais d'allocation tissulaire

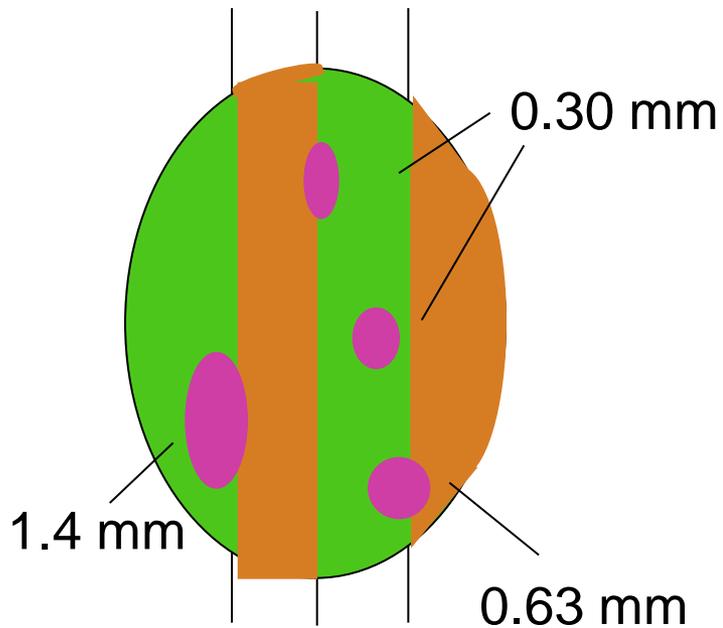
Etude	Type	Nb cas	Taux concordance %	Sensibilité %	Spécificité %	VPP %	VPN %
Snook 2011	Multicentrique	412 gg	92	84,6	93 ,7	—	—
		204 ptes	*95.9	*91.7	*96.9		
Visser 2008		346 gg	94,8	95,3	94,7	—	—
			*96.8	*97.1	*95.3		
Tsuji moto 2007	Uni centrique	325 gg				—	—
		101 ptes	*98.8	*99.3	*95.6		
Schem 2007	Multicentrique	93 ptes	91,8	98,1	90,8	—	—
		343 gg	*95.5	*100	*93.4		
Tamaki 2009 Trial 1	Multicentrique	149 gg	-	95	97,1	—	—
		36 ptes					
Tamaki Trial 2	Multicentrique	551 ganglions	92,9	87,5	94,1	—	—
		185 ptes					
Le frère- Belda 2011	Multicentrique	503 gg	—	80,9	93,9	65,4	97,2
		233 ptes	*96.5	*91.1	*97.2		
Bernet 2011	Multicentrique	174 gg					
		Np ptes	*98,3	*97,1	*98,6		

Causes de discordance

- **Biais d 'allocation tissulaire**
- faible nombre de copies / faible expression de la cytokératine 19
- gros volume d 'ITC
- La cut off d'OSNA CK19 est de 5000 cellules tumorales
- Pas de risque de détecter des déplacement tissulaires ou des transcrits illégitime en General 500 ou 1000 cellules.
- Tissu mammaire ectopique très rare dans la littérature 7 cas sur 3500 GG

4 faux négatifs : biais de localisation tissulaire ? étude Lefrère-Belda 2011

Histologie



OSNA

OSNA	Histologie
- (CK19 amplification: 12,3)	Micro (0.3 mm)
- (CK19 amplification: 11.6)	Micro (0.3 mm)
- (CK19 amplification: 11.1)	Micro (1.44 mm)
- (CK19 amplification: ND)	Micro (0.63 mm) 2 niveaux / 5

Causes de discordance

- Biais d' allocation tissulaire
- faible nombre de copies / faible expression de la cytokératine 19
- gros volume d'ITC
- La cut off d'OSNA CK19 est de 5000 cellules tumorales
- Pas de risque de détecter des déplacement tissulaires ou des transcrits illégitime en General 500 ou 1000 cellules.
- Tissu mammaire ectopique très rare dans la littérature 7 cas sur 3500 GG

Au total

Limites

- Non détection des CTI
 - Rarement détectées en extemporané par les techniques classiques
 - potentiellement « rattrapées » par le contrôle de la moitié du GS en techniques « poussées »
 - Certaines équipes ou pays n'utilisent pas cette information
- Tumeurs CK19 négatives et Osna (2%)

Bénéfices potentiels

- Il est attendu une diminution **d'au moins 7%** du nombre d'interventions chirurgicales différées sur le creux axillaires
 - Diminution de la morbidité du curage
 - Diminution du stress lié à une ré-intervention
 - Gain en terme de temps d'occupation des blocs
 - Impact économique

Alors ?

- Utilisation de la machine dans le bloc opératoire ????
- Personnel entraîné à la manipulation des échantillons biologiques (techniciens de laboratoire, pathologistes)
- Mais plus de trace histo ou cyto du GGS dans ce cas est ce correct sur le plan médico légal? Garder au moins des appositions

Mais

Factors Predicting OS – SLN H&E Neg Pts

	univariable		multivariable	
Variable	HR (95% CI)	p value	HR (95% CI)	p value
Adjuvant chemotherapy				
No	1.00 (ref)	0.83	1.00 (ref)	0.32
Yes	1.03 (0.83, 1.27)		0.79 (0.50, 1.26)	
Adj hormonal rx				
No	1.00 (ref)	<0.0001	1.00 (ref)	0.28
Yes	0.58 (0.47, 0.72)		0.75 (0.44, 1.27)	
Number of nodes removed	1.03 (1.02, 1.04)	<0.0001	1.08 (0.97, 1.19)	0.16
SLN IHC status				
Negative	1.00 (ref)	0.65	1.00 (ref)	0.66
Positive	1.92 (0.63, 1.33)		0.86 (0.44, 1.68)	
BM IHC Status				
Negative	1.00 (ref)	0.016	1.00 (ref)	0.16
Positive	1.90 (1.13, 3.20)		1.82 (0.78, 4.23)	

GS est il encore d'actualité ?

- La pratique du GS reste un élément important de l'acte chirurgical et du « staging », MAIS:
- La réintervention en cas de GS positif, quelque soit la nature de l'atteinte, n'est pas justifiée par les essais publiés
- Beaucoup d'auteurs ne font plus d'examen extemporané voire d'étude IHC du GS!

Prise en charge macroscopique: CJP depuis janvier 2012

- Mesure
- Coupé en 2 dans son grand axe vertical et examen macroscopique seulement
- Si doute → coupe congelée