

# Diagnostic moléculaire du cancer du sein pour la détection péroperatoire des métastases du ganglion sentinelle

M-A. Le Frère-Belda<sup>1</sup>, C. Bouteille<sup>2</sup>, J. Chasles<sup>3</sup>, K. B. Clough<sup>4</sup>, H. Crouet<sup>3</sup>, F. Guillemain<sup>5</sup>, H. Hofmann<sup>6</sup>, G. Houvenaeghel<sup>7</sup>, J. Jacquemier<sup>7</sup>, A. Khaddage<sup>2</sup>, G. LeBouedec<sup>8</sup>, A. Leroux<sup>5</sup>, F. Mishellany<sup>9</sup>, C. Nos<sup>1,4</sup>, F. Penault-Llorca<sup>8</sup>, M. Peoc'h<sup>2</sup>, B. Poulet<sup>9</sup>, J. Saglier<sup>6</sup>, J-L. Verhaeghe<sup>5</sup>, F. Lecuru<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Assistance Publique- Hôpitaux de Paris - Hôpital Européen Georges Pompidou, - Services de Chirurgie et Pathologie, Paris; <sup>2</sup>CHU St. Etienne, Hôpitaux Nord et Bellevue - Services de Chirurgie et Pathologie, Saint-Etienne; <sup>3</sup>Centre François Baclesse - Services de Chirurgie et de Pathologie, Caen; <sup>4</sup>L'Institut du Sein, Paris; <sup>5</sup>Centre Alexis Vautrin - Services de Chirurgie et Pathologie, Nancy; <sup>6</sup>Clinique Saint Jean de Dieu - Service de Chirurgie, <sup>7</sup>Institut Paoli Calmettes - Services de Chirurgie et Pathologie, Marseille; <sup>8</sup>Centre Jean Perrin - Services de Chirurgie et Pathologie, Clermont-Ferrand; <sup>9</sup>Institut de Pathologie de Paris, Paris

## Introduction

Pour la majorité des équipes, la biopsie du ganglion sentinelle fait maintenant partie de la prise en charge chirurgicale des cancers invasifs du sein vus à un stade précoce. Les bénéfices cosmétiques et fonctionnels sont unanimement reconnus.

La détection de métastases ganglionnaires implique un curage axillaire. La détection péroperatoire des métastases du ganglion lymphatique sentinelle permet de prendre une décision immédiate et de pratiquer la dissection des ganglions lymphatiques axillaires en un temps évitant ainsi à la patiente une seconde intervention chirurgicale.

Le diagnostic péroperatoire repose sur l'examen histologique extemporané de coupes à congélation ou d'empreintes cytologiques. Toutefois, le bénéfice de cet examen est limité par l'existence de faux négatifs, en particulier pour les micrométastases.

La technique OSNA "One Step Nucleic Acid Amplification" est une technique de biologie moléculaire innovante pour la détection péroperatoire des métastases ganglionnaires. Cette méthode permet d'amplifier les ARNm du gène de la cytokeratine 19 par une procédure isothermique spécifique et sensible appelée RT-LAMP (Reverse Transcription Loop Mediated Isothermal Amplification). Le surexpression de la cytokeratine 19 est directement corrélé à la présence d'un foyer métastatique et le nombre de copies à la taille de ce foyer.

La procédure totale d'analyse peut-être réalisée en 30 minutes ce qui rend ce test adapté à la détection péroperatoire des métastases du ganglion sentinelle.

## OSNA = One Step Nucleic Acid Amplification

- Diagnostic moléculaire
- Détection de l'ARNm de CK19
- Procédure d'amplification isothermique
- Pas d'étape d'extraction d'ARN
- Amplification de courte durée, adaptée à une analyse péroperatoire des métastases du ganglion sentinelle

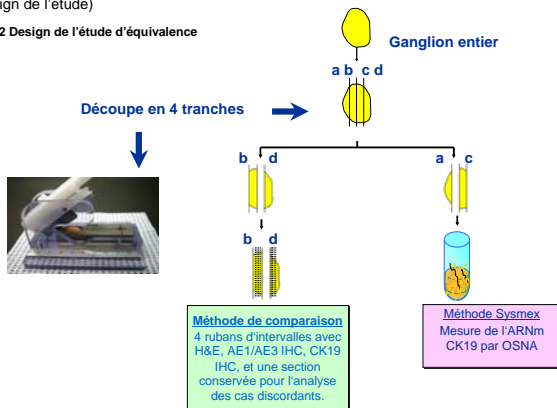
Fig. 1 Le système OSNA



## But de l'étude

L'objectif de cette étude est d'évaluer les performances de la méthode OSNA par rapport à la méthode de référence (histopathologie). Il s'agit d'une étude d'équivalence clinique. (Figure 2: Design de l'étude)

Fig. 2 Design de l'étude d'équivalence



## Résultats

164 patientes ont été analysées dans l'étude, permettant l'analyse de 269 ganglions: 194 ganglions axillaires et 75 ganglions sentinelles. La technique OSNA a toujours été effectuée lorsqu'elle était programmée (58 fois) et a duré en moyenne 33 minutes / 1 ganglion.

Sur 269 échantillons analysés, 75 étaient positifs et 187 étaient négatifs par les deux méthodes, parmi lesquels 10 contenaient des cellules tumorales isolées (ITCs).

7 échantillons étaient positifs uniquement en histologie et négatifs par OSNA :

- 2 micrométastases confinées à la tranche utilisée en histologie confirmés comme étant des biais de localisation tissulaire

- 5 macrométastases dont 3 provenaient de la même patiente. L'analyse de l'expression de la CK19 a été réalisée pour cette patiente sur la tumeur primaire et à permis de confirmer qu'il n'y avait de surexpression de la CK19. Il s'agit donc d'un cas rare de sous expression de la CK19. Pour les deux autres les analyses complémentaires de discordance sont en cours.

5 échantillons étaient négatifs en histologie et positifs par la méthode OSNA :

- 1 d'entre eux a révélé des cellules tumorales isolées (considérées négatives selon notre protocole) et OSNA a révélé la présence d'une micrométastase qui confirme ainsi un biais de localisation tissulaire

- 4 étaient proches de la valeur seuil de la méthode. Les analyses de discordance ont prouvé un biais de localisation tissulaire pour l'un d'entre eux. Pour les trois autres, les analyses complémentaires de discordance sont toujours en cours.

La comparaison entre la technique OSNA et l'histologie est donnée dans le Tableau 2. La sensibilité était de 91.46%, la spécificité de 97.33%, le RVP de 33.87%, le RVN de 8.7% et le taux de concordance de 95.54%. 12 cas discordants ont été observés. Les analyses complémentaires de discordance sont en cours. Pour 4 cas d'entre eux, la discordance est clairement due à un biais de localisation tissulaire. Pour 3 d'entre eux provenant de la même patiente il s'agit d'une absence de surexpression de la CK19 dans la tumeur. Pour les 5 autres les analyses sont en cours. Après analyse des cas discordants, la sensibilité est finalement de 93.75%, la spécificité de 98.37%, le RVP de 58.77, le RVN de 0.063 et le taux de concordance de 96.98%.

Tableau 2

n=269		Histologie		
		Positif		Négatif
		Macro	Micro	
OSNA	++	65	1	0
	+	7	2	5(3)*
	-	4	3 (1)	182**

\*1 échantillon défini ITC  
\*\* 10 échantillons définis ITC  
( ) Résultats après correction de la discordance

**Spécificité : 98.37%**  
**Sensibilité : 93.75%**  
**Concordance : 96.98%**

## Conclusion

La faisabilité de la technique OSNA en péroperatoire est démontrée ( 30 Minutes). La spécificité de 98.37% est le taux de concordance de 97.02% permettent d'envisager l'utilisation de la technique OSNA en condition péroperatoire, pour la décision thérapeutique. La limite de la technique est la non recherche des cellules tumorales isolées.

## Matériel et Méthodes

Afin d'évaluer les performances de la méthodes OSNA en comparaison à la méthode histologique de référence, 212 ganglions axillaires et 113 ganglions sentinelles provenant de 164 patientes présentant un cancer du sein avec une indication de biopsie de ganglion sentinelle ont été incluses prospectivement entre le 06 Août 2007 et le 05 Novembre 2007 dans 7 centres. Les ganglions étaient analysés selon le protocole décrit Figure 2 et Figure 3.

La technique OSNA a été comparée à l'examen histologique (analyse extensive), en terme de sensibilité, spécificité, rapport de vraisemblance positif (RVP) et négatif (RVN) et analyse de concordance.

Du fait de l'analyse partielle du ganglion par l'une ou l'autre méthode, la présence de petites métastases uniquement dans les tranches "b" ou "d" ou dans les tranches "a" et "c", respectivement peut générer des résultats discordants dans une faible proportion. En cas de discordance (seule la méthode de référence était positive ou seule la méthode OSNA était positive) des analyses histologiques post-opératoires complémentaires et de biologie moléculaires (RT-spécifiques des marqueurs CK19, FOXA1 et SPDEF et western blot CK19) ont été réalisées afin de déterminer si la discordance était due à un biais de localisation tissulaire.

Fig. 3 Protocole histologique

