

Est-il SAGE de réaliser un examen extemporané du ganglion sentinelle?

Biologie moléculaire l'examen extemporané moderne



Les analyses moléculaires du GAS

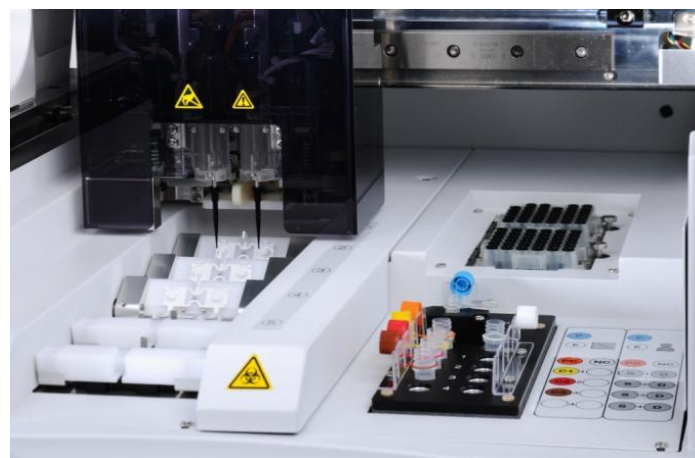
- Principe des analyses moléculaires :
 - Amplification moléculaire d'ARNm de protéines non présentes dans le ganglion lymphatique mais fortement surexprimées dans le tissu mammaire tumoral
- Genesearch Veridex → n'est plus disponible mais nouveau test Metasin développée par l'équipe belge
 - RT PCR après extraction des acides nucléiques
 - deux ARNm CK19 et Mammaglobine
- OSNA Sysmex → marquage CE
 - RT LAMP sans extraction des acides nucléiques
 - un ARNm celui de la CK19



Caractéristiques des analyses moléculaires

- Ganglion frais ou congelé rapidement à -80°C → pour éviter la dégradation des ARN
- Manipuler les échantillons proprement avec des instruments à usage unique → pour éviter les contaminations
- Les ganglions sont broyés et analysés totalement, une apposition histologique est le plus souvent réalisée, parfois une coupe pour l'analyse histologique.
- L'analyse de plusieurs ganglion est réalisée simultanément

OSNA = One Step Nucleic Acid Amplification Automate/réactifs

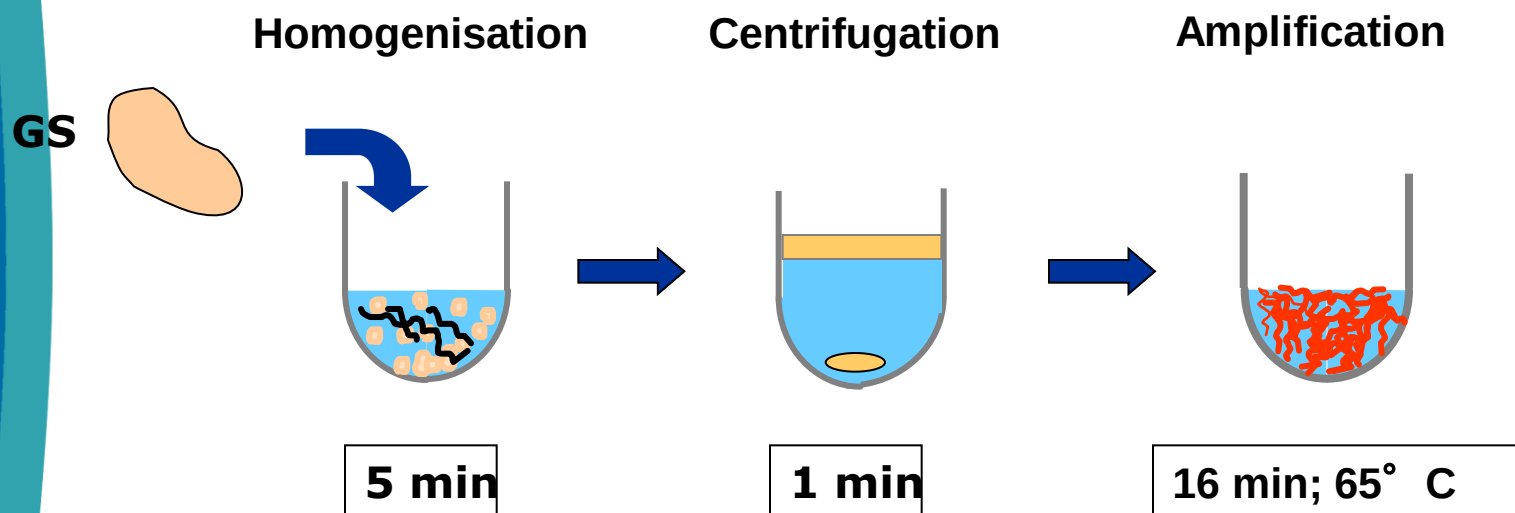


Le RD-100i : analyseur qui amplifie les ARNm CK19 selon la méthode RT-LAMP (Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification)



OSNA permet de statuer sur la présence ou l'absence de métastases dans le ganglion sentinelle en 30 minutes

Procédure OSNA



Ganglion frais ou congelé rapidement

**Pour 1 analyse deux réactions d'amplification sur échantillon pur et dilué (1/10)
4 amplifications en simultané + 1 contrôle positif + 1 contrôle négatif**



Amplification ARNm CK19 par RT LAMP

(Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification)

✧ Haute spécificité et sensibilité

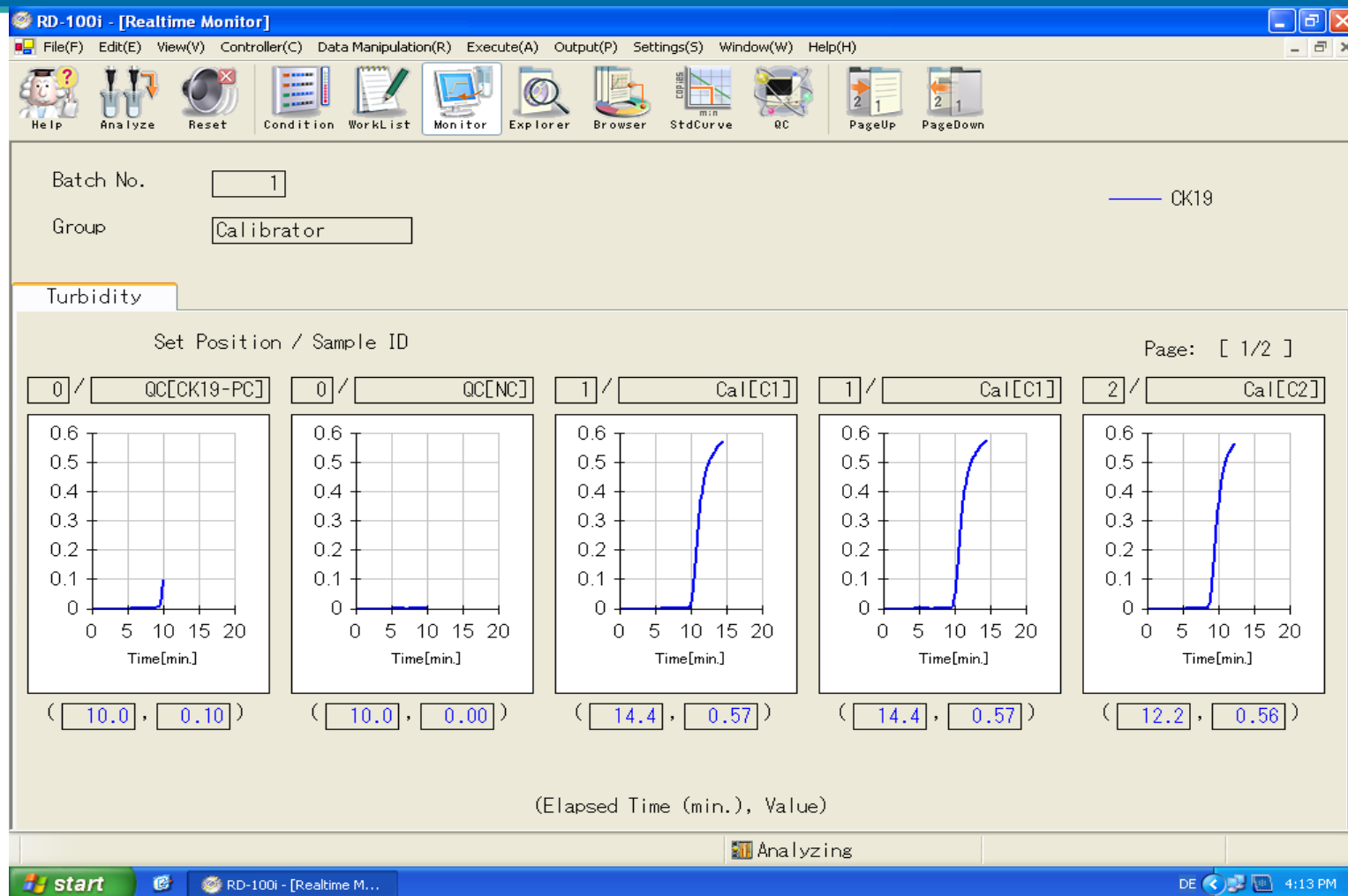
- Utilisation de 6 amorces
- Pas d'amplification d'ADN génomique

✧ Amplification rapide (16 min)

- Pas d'extraction d'ARNm
- Réaction isothermique à 65° C (pas besoin de thermocycleur)
- Amplification totalement automatisée RD100i



La concentration de l'ARNm CK19 est calculée selon la courbe d'étalonnage générée par la détermination du temps d'élévation d'un jeu de trois calibrants de concentration connue en ARNm CK19.



Compte rendu OSNA

- Temps d'amplification court= 16mn, les métastases sont détectées en 9mn pour les plus grosses, 12mn pour les plus petites.
- 4 GS peuvent être analysés
- Résultat de l'analyse des GS en 30mn pour 1 GS et 5mn par GS supplémentaire

Etablissement	: Centre Eugene Marquis		
Département	: Laboratoire de Biologie médicale		
Responsable du département	: Dr Florence Godey		
Echantillons analysés par	:		

Résultat			
ID échantillon	1505060003-1A	ID échantillon	1505060003-1B
Date	06/05/2015	Date	06/05/2015
Heure	11:56:54	Heure	11:58:54
Commentaire		Commentaire	

CK19 Q.	(-)	0.6	CK19	0.6	CK19-D	0.6	CK19 Q.	(+)	0.6	CK19	0.6	CK19-D	0.6
CK19 C.	<2. 5E+02	0.5		0.5			CK19 C.	2. 7E+03	0.5		0.5		
CK19	ND	0.4		0.4			CK19	11. 2	0.4		0.4		
CK19-D C.	<2. 5E+02	0.3		0.3			CK19-D C.	<2. 5E+02	0.3		0.3		
CK19-D	ND	0.2		0.2			CK19-D	ND	0.2		0.2		
		0.1		0.1					0.1		0.1		

Contrôle			
ID échantillon	QC[NC]	ID échantillon	QC[CK19-PC]
Date	06/05/2015	Date	06/05/2015
Heure	12:01:08	Heure	12:01:08
Commentaire		Commentaire	

CK19 Q.	(-)	0.6	CK19	0.6	CK19-D	0.6	CK19 Q.	(++)	0.6	CK19	0.6	CK19-D	0.6
CK19 C.	<2. 5E+02	0.5		0.5			CK19 C.	1. 0E+04	0.5		0.5		
CK19	ND	0.4		0.4			CK19	10. 8	0.4		0.4		
CK19-D C.		0.3		0.3			CK19-D C.		0.3		0.3		
CK19-D		0.2		0.2			CK19-D		0.2		0.2		
		0.1		0.1					0.1		0.1		

Courbe d'étalonnage			
logC[copies/μL]	Mise à jour	06/05/2015	Ctl.
	N° de lot	ZS4009	Time
	C1	11. 3	Conc.
	C2	9. 7	Qualitative
	C3	8. 6	Ctl.
	r	-0. 99	Time
	logC	-1. 481xT+20. 015	Conc.
			Qualitative



Interprétation des résultats OSNA

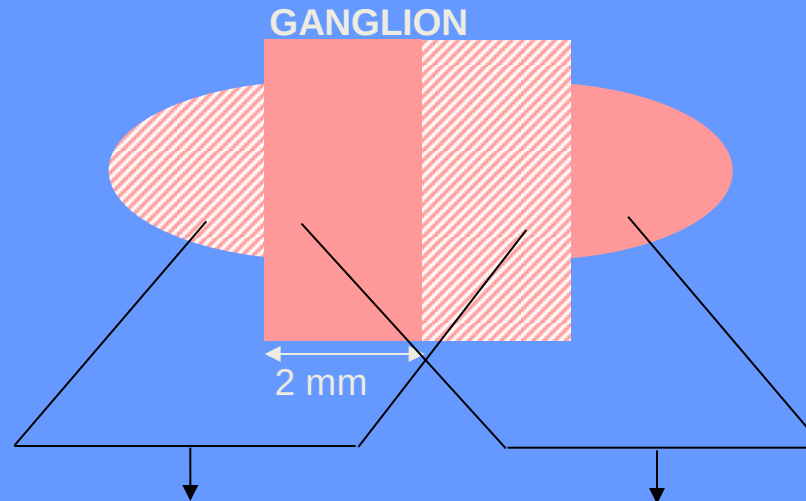
Nombre de copies ARNm CK19	Résultats RD-100i Sysmex	Interprétation du résultat
≥ 250 et < 5000	(+)	Micrométastase
≥ 5000	(++)	Macrométastase
≥ 100 et < 250	(-) L	Absence de métastase
< 100	(-)	Absence de métastase

Etudes de validation OSNA

- Première validation de cette technique sur les ganglions lymphatiques axillaires non sentinelles dans différentes universités du Japon publiée (Taniyama Pathobiology 2006, Tsujimoto Clin Cancer Res 2007)
 - coupes de ganglions lymphatiques de 2 mm, taux de détection des macrométastases 100%, **concordance avec l'IHC dans ces publications 98,2%**.
- Etude multicentrique française réalisée en 2007
 - 233 patientes et 503 GS : **sensibilité 91,7% , concordance globale 93,4% et spécificité 93.8%**
- Résultats poolés des études de concordance japonaises, allemandes, hollandaises, anglaises et française sur plus de 2000 GS
 - **concordance à 96,5%** après analyse de discordance, **sensibilité 95,6% et spécificité 96,%**

OSNA est une alternative à l'analyse histologique sur coupes sériées tous les 200µm avec HES et IHC, avec une concordance aussi bonne que si l'on compare deux analyses histologiques.

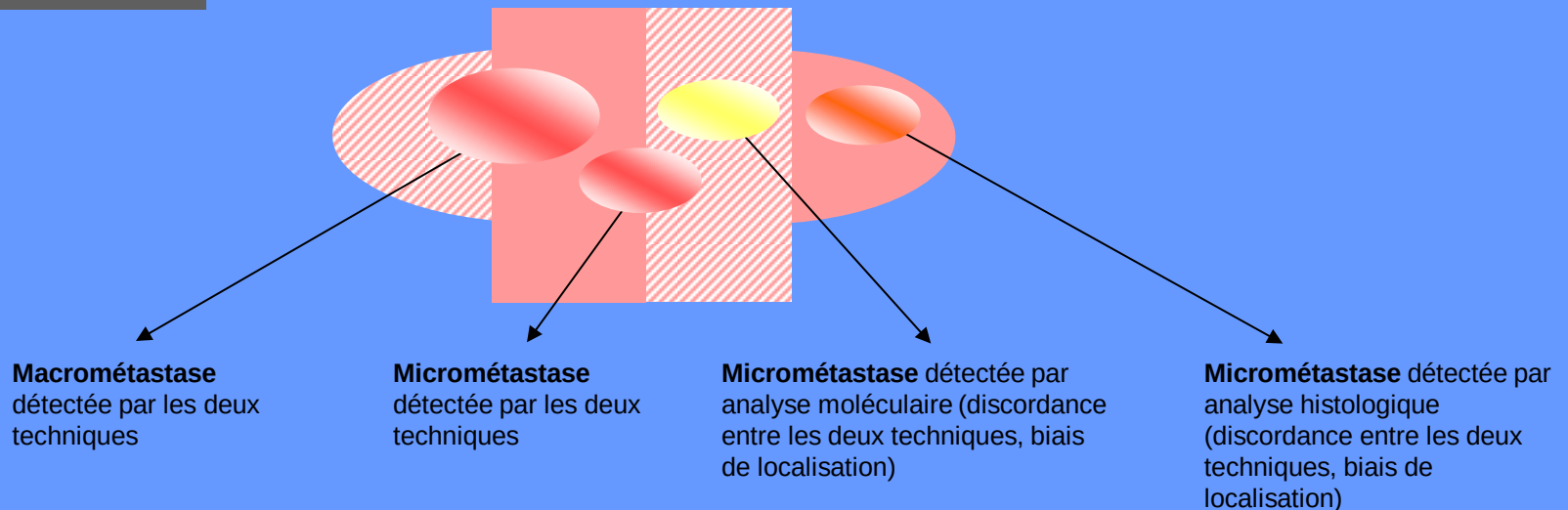
Partage en coupes alternées
du ganglion selon grand axe
tous les 2 mm



Analyse moléculaire
Tout le tissu est analysé
(lysate)

Coupes sériées pour analyse histologique
(même avec un niveau de coupes tous les 200µm sur tranche de
2 mm, environ 10% du tissu est analysé)

Biais de localisation





Comparaison de l'Analyse histologique avec examen extemporané réalisée au CEM avant 2008 versus l'analyse moléculaire OSNA mise en place depuis 2008

‣ *Breast Cancer Res Treat. 2012 Jan;131(2):509-16.*

Sentinel lymph node analysis in breast cancer: contribution of one-step nucleic acid amplification (OSNA). Godey F, Leveque J, Tas P, Gandon G, Poree P, Mesbah H, Lavoue V, Quillien V, Athias CB.

‣ Cohorte historique = analyse histologique des GAS en extemporané par apposition puis histologie définitive HES et IHC sur coupes (250µm)

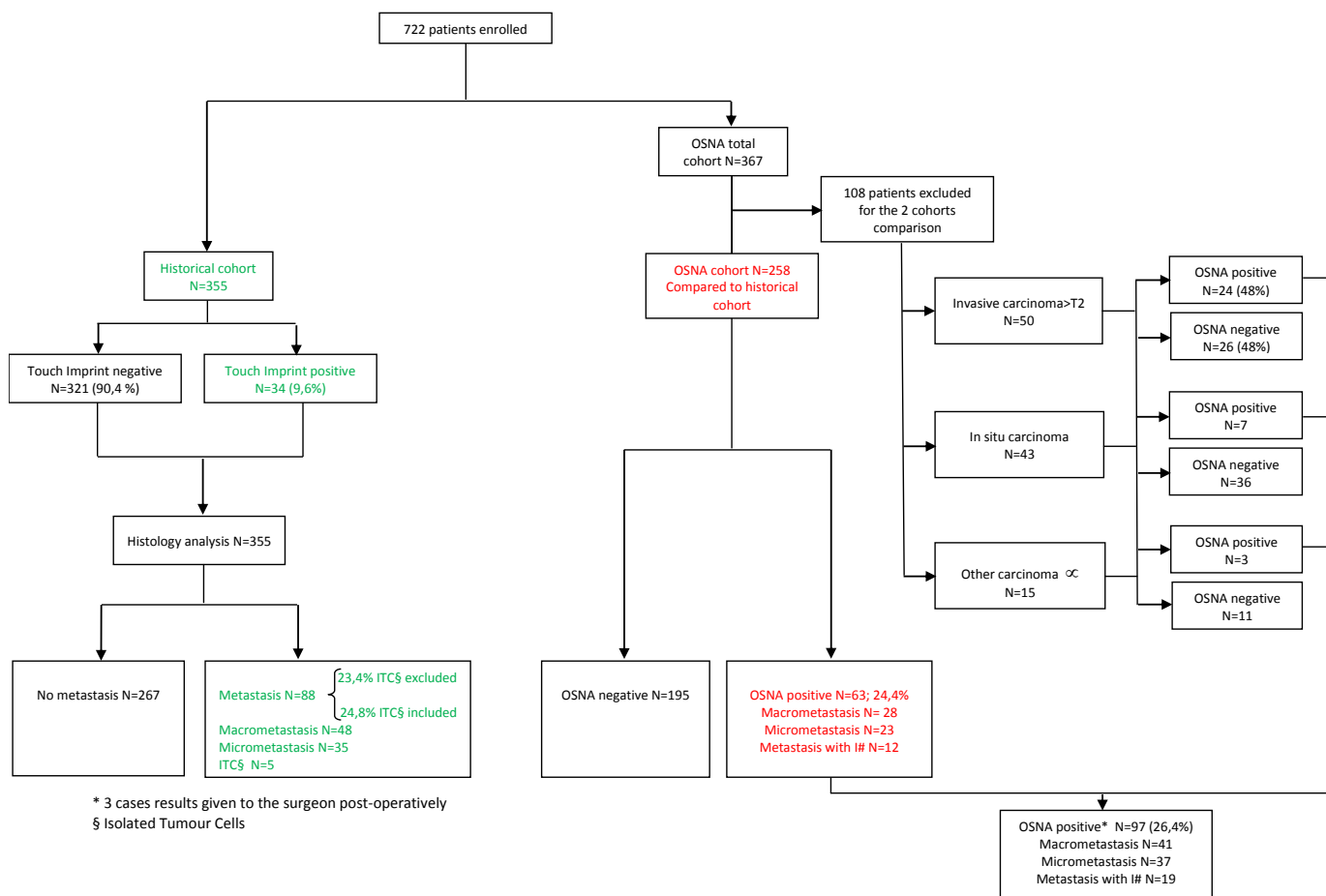
→ 355 patients

‣ Cohorte OSNA = analyse moléculaire OSNA en gardant une coupe pour analyse histologique

→ 367 patients

Résultats analyse OSNA de 367 patients et comparaison des 2 cohortes (historique et OSNA)

Fig.1 Flow chart for the comparison of OSNA and historical cohorts



Cohortes de patients:

Cohorte historique = analyse histologique
Cohorte OSNA = analyse OSNA

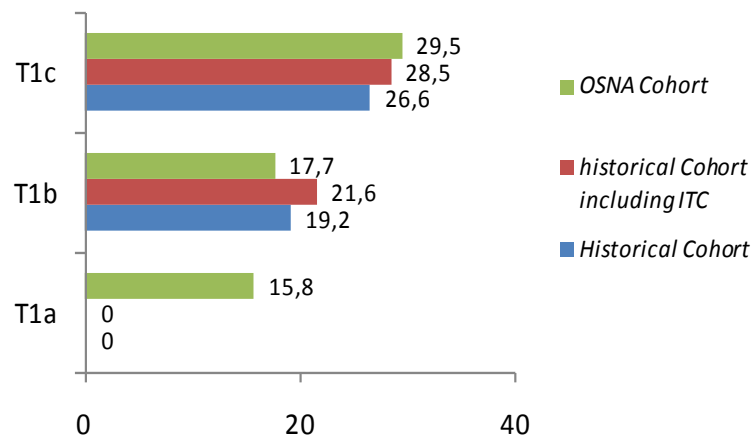
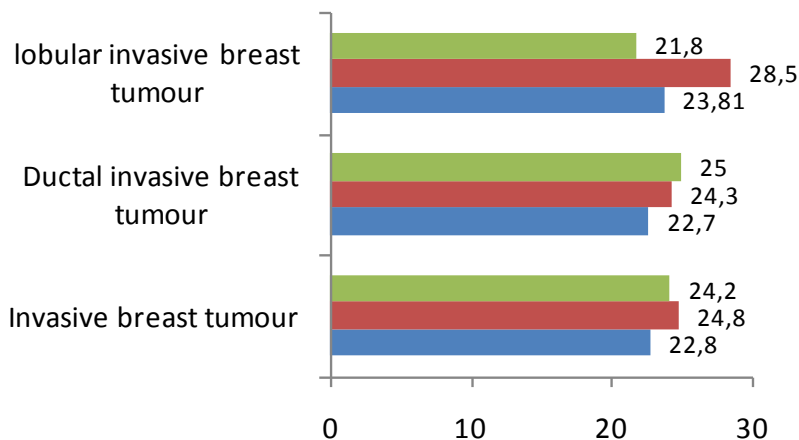
		OSNA total Cohort		OSNA Restricted Cohort	Historical Cohort
Number of patients		367		258	355
Medium age of patients		56.8 years		56.8	56.9
Tumour histology	Ductal invasive carcinoma	248	→	212	313
	Lobular invasive carcinoma	60		46	42
	In situ carcinoma	43			
	Other	16			
Tumour size	1a	21		19	16
	1b	104		93	125
	1c	148		146	214
	2	50			
	Missing values	44			
SBR Grade	1	94			
	2	171			
	3	68			
	Missing values	34			
Hormones receptor status	Estrogen/progesterone +	300			
	Estrogen/progesterone -	51			
	HER2 +	21			
	Triple Negative	29			

% GAS métastatiques OSNA versus Histologie définitive (Tumeurs <2cm)

24,2% GAS+ avec OSNA

24,8% GAS+ avec histologie conventionnelle (avec Cellules tumorales isolées)

22,8% GAS+ avec histologie conventionnelle (sans Cellules tumorales isolées)



OSNA : l'examen extemporané de choix

► Approche histologique

- *Examen extemporané*
coupe congelée / empreinte:
(si réalisée)
 - *Faible sensibilité*
(biais d'échantillonnage)
- **Analyse définitive post opératoire**
Coupe en paraffine:
H&E + IHC
 - Seul 5% du ganglion est analysé
(dépendant de la méthode utilisée)
 - Pas de standardisation

► Méthode OSNA

- **Analyse peropératoire du ganglion entier** (pas de biais d'échantillonnage)
 - Haute sensibilité
 - Standardisée
- *Pas d'analyse post-opératoire nécessaire*
 - *Possibilité de conserver une partie du tissu ou empreinte pour analyse histologique*
 - *Congélation du lysat pour d'autres analyses moléculaires*

OSNA:c'est un examen moléculaire définitif des GS possible en peropératoire

OUI c'est examen extemporané moderne mais aussi...¹⁶



OSNA ce n'est pas qu'un examen extemporané, c'est aussi une analyse définitive de qualité

- **résultats comparables à une analyse histologique définitive intensive** avec une indication sur la taille de la métastase (micro ou macrométastase)
- **Automatisation** complète après l'étape de préparation du lysat ganglionnaire
- **Procédure standardisée et contrôlée** → comparaison possible
 - Contrôles de qualité internes lors de chaque analyse
 - Contrôles de qualité externes 8 par an
- Possibilité **d'analyser la totalité du ganglion sentinelle**



Quantifier l'envahissement tumoral dans les GS avec OSNA

- Initialement la technique a été standardisée sur une l'analyse histologique pour rendre
 - Micrométastase: >250 et <5000 copies d'ARNmCK19
équivalent d'une taille histologique 0,2mm à 2mm
 - macrométastase: >5000 copies d'ARNmCK19
équivalent d'une taille histologique >2mm
- le nombre de copies d'ARNm CK19 est une variable qui permet d'évaluer le risque d'envahissement tumoral d'autre ganglion
 - raisonner en tenant compte de ce résultat
- Le nombre de copies dans l'ensemble des GS traduit le volume tumoral total qu'il est probablement préférable de prendre en compte ce résultat

ESSO 2012

Résultats 302 patients

OSNA + et curage axillaire

	SLN OSNA+ Rennes-Rouen	
Number of patients		352
Rennes		266
Rouen		86
Tumour histology	Ductal invasive carcinoma	261
	Lobular invasive carcinoma	52
	In situ carcinoma	17
	Other carcinoma	6
Hormones receptor status	Estrogène +	247
	Estrogène -	39
	Progesterone +	257
	Progesterone -	78
HER 2 status	HER 2+	37
	HER 2-	217
SBR grade	1	66
	2	177
	3	79
Tumour size	1a	8
	1b	54
	1c	113
	2	68
	3	5
	4	1

OSNA+ SLN

Two french cancer institutions
Rennes (Eugene Marquis)
and Rouen (Henri Becquerel)

- 302/352 axillary lymph node dissections (ALND) after SLN biopsy
- The study focused on 302 patients with ALND including:
 - 233 ductal breast carcinoma
 - 44 lobular breast carcinoma

CK19 mRNA Copy numbers distribution in the study population

- Considering CK19 mRNA copy numbers the population was divided in 4 quartiles:
 - quartile 1 (Q1): > 250 and < 830
 - quartile 2 (Q2): > 830 and < 4 350
 - quartile 3 (Q3): > 4 350 and < 25 500
 - quartile 4 (Q4): > 25 500

Prediction of metastatic non-SLN

➤ Q1+Q2 patients with risk of axillary lymph nodes metastasis <16%

- ductal carcinoma
 - <16% if copy numbers <4350
- lobular carcinoma
 - <12% if copy numbers <4350

➤ Q3+Q4 patients with risk of axillary lymph nodes metastasis >28%

- ductal carcinoma
 - >28% if copy numbers >4350
 - >29% if copy numbers >25 500
- lobular carcinoma
 - >36% if copy numbers >4350
 - >64% if copy numbers >25 500

DUCTAL BREAST CARCINOMA : Risk of ALN Metastasis considering CK 19 m RNA copy numbers in SLN						
p=0.09 NS		Ck 19 m RNA copy numbers				
		Q1 >250 <830	Q2 >830 <4350	Q3 >4350 <25500	Q4 >25500	Total
NO ALN metastasis	N	42	53	43	43	181
	%	85,71	84,13	71,67	70,49	
ALN metastasis	N	7	10	17	18	52
	%	14,29	15,87	28,33	29,51	
TOTAL		49	63	60	61	233

LOBULAR BREAST CARCINOMA : Risk of ALN Metastasis considering CK 19 m RNA copy numbers in SLN						
P=0.015 Significative		Ck 19 m RNA copy numbers				
		Q1 >250 <830	Q2 >830 <4350	Q3 >4350 <25500	Q4 >25500	Total
NO ALN metastasis	N	9	8	7	5	29
	%	90	88,89	63,64	35,71	
ALN metastasis	N	1	1	4	9	15
	%	10	11,11	36,36	64,29	
TOTAL		10	9	11	14	44

Quel est le meilleur seuil pour prédire le risque d'envahissement d'autres ganglions (1)

Peg V, Espinosa-bravo M, Vieites B et al (2013). Intraoperative molecular analysis of total tumor load in sentinel lymph node : a new predictor of axillary status in early breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat 139:87-93

→ **15000 copies**

Deambrogio C, Castellano I, Paganotti A et al (2014). A new clinical cut-off cytokeratin 19 mRNA copy number in sentinel lymph node better identifies patients eligible for axillary lymph node dissection in breast cancer. J Clin Pathol 67:702-6

→ **7700 copies**

Au seuil de 15000 copies, en excluant les faux négatifs de notre série, la valeur prédictive négative du test est très bonne 95,6% avec une sensibilité qui augmente à 86.6%, de la même façon **au seuil 5000 copies la VPN est alors de 97.5% et la sensibilité du test augmente à 93.5%.**

	Osna > 15 000	Osna < 15 000	Osna > 5 000	Osna < 5 000	Total
Curage axillaire +	26 (39,4%) =VP	12 (12,1%) = FN dont 8 avec une métastase en histologie dans tranche centrale	29 (43%) = VP	9 (9%) = FN dont 7 avec une métastase en histologie dans tranche centrale	38 (23%)
Curage axillaire -	40	87	37	90	
Total	66	99	66	99	165

OSNA et nomogrammes

- Breast Cancer Res Treat (2014) 147:371–380. **Nomogram including the total tumoral load in the sentinel nodes assessed by one-step nucleic acid amplification as a new factor for predicting nonsentinel lymph nodes metastasis in breast cancer patient.** *Isabel T. Rubio, Martin Espinosa-Bravo, Maxi Rodrigo, Maria Amparo Viguri Diaz, David Hardisson, Amaia Sagasta, Basilio Duen~as, Vicente Peg*
 - 697 patients
 - **Results:** On multivariate logistic regression analysis, **tumor size, number of affected SLN, Her2 overexpression, LVI, and total tumoral load** were each associated with the likelihood of additional NSLN metastasis ($p \leq 0.05$). Neither age, tumor grade, hormone receptors nor type of surgery had a statistically significant association with the likelihood of non- SLN metastasis
- OSNA dans un nomogramme qui prend en compte le nombre de copies d'ARNmCK19 plus de 2000 cas dans plusieurs pays européens, poster présenté à l'ASCO → en attente de publication.
 - La taille tumorale
 - Le nombre de copies ARNmCK19



ELABORATION OF A NOMOGRAM TO PREDICT NON SENTINEL NODE STATUS IN BREAST CANCER PATIENTS WITH POSITIVE SENTINEL NODE, INTRA-OPERATIVELY ASSESSED WITH ONE STEP NUCLEIC ACID AMPLIFICATION (OSNA).

Prof. DI FILIPPO F., GIANNARELLI D.

ON BEHALF OF EUROPEAN AND ITALIAN OSNA USERS

BACKGROUND

➤ Diagnostic axillary lymph node dissection (ALND) has been replaced by sentinel node biopsy (SNB) in nodal staging. Patients with a micrometastasis or macrometastasis in the SN have a risk of non-SL (NSN) metastases ranging from 20 to 50 %, respectively. Therefore most of the patients are submitted to an unnecessary ALND.

➤ The clinical trial for positive SN, ACOSOG-Z0011, that randomized breast cancer (BC) patients to observation or ALND failed to reach its targeted accrual of 1900 patients but seems to demonstrate no differences in terms of axillary recurrence rate and survival between the two groups. The low number of 856 patients, in combination with the fact that 97% of patients received systemic chemotherapy and whole breast irradiation (BRI) limit the reliability of the results and leaves the question if they can be generalized to all patients undergoing SNB¹.

➤ Taking into account these considerations, accurate estimation of a likelihood of additional NSN metastases may be of paramount importance in the decision making about further treatment. As a consequence, the development of a mathematical model for predicting a patient-specific risk of NSL metastases is strongly warranted.

➤ We have developed an European Database with positive SN detected by the molecular method OSNA, able to intra-operatively identify patients with micrometastases (CK19 mRNA copies 250-5000) or macrometastases (number of copies > 5000)².

METHODS

➤ An European OSNA database was developed, only patients whose SN was intra-operatively assessed with OSNA were included. The parameters listed in table 1 and 2 were analyzed.

➤ A total of 2460 patients were included in the database (977 micrometastases and 1483 macrometastases) with the collaboration of 22 European and Italian OSNA centers.

➤ Univariate analysis was performed to determine factors associated with NSN metastases. Chi-square test was used for categorical variables. All variables with p values less than 0.05 were included in the logistic analysis using backward stepwise method.

RESULTS

➤ Multivariate logistic regression analysis demonstrated that only the number of a CK19 mRNA copies (p<0.0001), T size (p<0.0001) and LVI (p<0.0001) maintained their independent value (Tab. 3).

Table 1: Clinicopathologic characteristics of patients

Characteristics	N° of patients	%
HISTOLOGIC		
DC	2449	(99.5)
LC	285	(11.5)
GRADING		
Min 171	(6.9)	
G1	1897	(76.7)
G2	1365	(55.4)
G3	428	(17.4)
ER		
Min 184	(7.5)	
Pos	2063	(84.3)
HER2		
Min 190	(7.7)	
Pos	1844	(75.0)
HER2		
Min 221	(9.0)	
Pos	2058	(83.7)
Ki-67		
Min 352	(14.3)	
Pos	994	(40.4)
HER2		
Min 352	(14.3)	
Pos	994	(40.4)
T (mm)		
<12	618	(25.1)
12-25	676	(27.5)
25-35	642	(26.1)
>35	564	(22.9)
TYPE		
Min 778	(31.6)	
Multiple	1882	(76.5)
LVI		
Min 1134	(46.1)	
Pos	863	(35.1)
Lymphatic		
Min 743	(30.2)	
Pos	862	(35.1)
HER2		
Min 352	(14.3)	
Pos	994	(40.4)

Table 2: Characteristics of sentinel node and non sentinel node

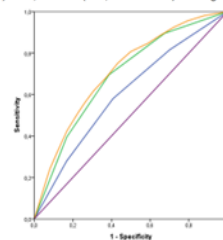
Characteristics	N°	%
N° of SN examined	1273	(51.7)
1	801	(62.9)
2	277	(21.8)
3	88	(6.9)
4	17	(1.3)
5	4	(0.3)
N° of positive SN		
1	1769	(71.8)
2	527	(21.4)
3	136	(5.5)
4	29	(1.2)
5	3	(0.1)
SN micrometastases	977	(39.7)
SN macrometastases	1483	(60.3)
N° of nodes removed		
Median (range)	14 (3-43)	
Mean	14.8	
N° of positive NSN	829	(33.7)
Median (range)	2 (1-30)	
Mean	3.2	
N Ratio N° SN / N° SN removed		
<0.25	21	(2.6)
0.25-0.50	475	(58.4)
0.50-1.00	304	(37.4)
1.00-2.00	1763	(71.8)
N° of CK19 copies		
<1300	613 (25.0)	
1300-2500	438 (25.9)	
2500-5000	488 (24.7)	
>5000	801 (34.4)	

Univariate analysis	OR (95% C.I.)	P	Multivariate analysis	OR (95% C.I.)	P
HISTOLOGIC					
DC vs LC	0.80 (0.49-1.37)	0.44			
GRADING					
G2 vs G1	1.45 (1.13-1.87)	0.005			
G3 vs G1	1.74 (1.32-2.31)	<0.0001			
ER					
Pos vs neg	1.19 (0.87-1.61)	0.27			
HER2					
Pos vs neg	1.22 (0.87-1.73)	0.09			
Ki-67					
Pos vs neg	1.13 (0.80-1.61)	0.43			
HER2					
Pos vs neg	0.79 (0.50-1.26)	0.01			
HER2					
High vs low	1.29 (1.06-1.56)	0.01			
T (mm)					
12-25 vs <12	1.33 (1.02-1.74)	0.03	1.30 (0.89-1.93)	<0.0001	
19-25 vs <12	2.04 (1.40-2.95)	<0.0001	1.79 (1.34-2.39)	<0.0001	
>25 vs <12	2.70 (2.02-3.61)	<0.0001	2.22 (1.70-2.92)	<0.0001	
TYPE					
Multiple vs single	1.55 (1.19-2.02)	0.001			
LVI					
Pos vs neg	2.88 (2.37-3.49)	<0.0001	n.s.		
COPIES					
Median (<1300) vs >1300	0.57 (0.37-0.92)	<0.0001			
COPIES					
1300-2500 vs <1300	2.15 (1.62-2.85)	<0.0001	2.15 (1.62-2.87)	<0.0001	
2500-5000 vs <1300	4.26 (3.24-5.62)	<0.0001	4.26 (3.24-5.62)	<0.0001	
>5000 vs <1300	7.18 (5.49-9.45)	<0.0001	6.80 (5.18-9.01)	<0.0001	
MOLECULAR SURVEY					
Luminal A vs triple neg	0.99 (0.79-1.24)	0.05			
Luminal B vs triple neg	1.39 (0.97-1.91)	0.07			
HER2 vs triple neg	0.78 (0.52-1.18)	0.24			

➤ We wanted to build a nomogram that surgeons can utilize during the operation, therefore LVI was excluded because its unreliability assessed only with a preoperative core biopsy.

➤ The model showed a sensitivity of 98.1%, a specificity of 19%, while the positive and negative predictive value were 36.2% and 92.5%, respectively.

➤ The discrimination of the model, quantified with the area under receiver operating characteristics (ROC) curve, was 0.71 (95% C.I. 0.69-0.73) showing a good discrimination (Fig. 1).



Copy no. 0.69 [0.67-0.71], T 0.60 [0.58-0.63], Model 0.71 [0.69-0.73], Reference line

Figure 1 ROC curves of number of CK19 mRNA copy number, T size (quartiles) and the model containing these two variables.

➤ The model correctly performs well both at low and high risk cases as shown in the calibration plot (Fig. 2). The tumor regression model between predicted and actual probabilities has a slope of 0.98 (95% C.I. 0.89-1.07) and a constant of 0.01 (95% C.I. 0.03-0.04). In our nomogram, the mean difference between predicted and calibrated probabilities was 2.3%, with a maximum difference of 4.0% (Fig. 2). This information is of clinical utility because it permits the clinicians the opportunity to inform the patient regarding both the predicted probability of NSN metastases and the range of probability.

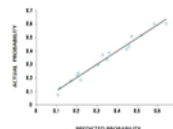


Figure 2 The model correctly performs well both at low and high risk cases as shown in calibration plot.

➤ The significant variables were then incorporated in a nomogram to predict NSN status (Fig. 3).

Factor	Point
Tumor size < 12 mm	0
Tumor size > 12 mm and < 18 mm	0.50
Tumor size > 18 mm and < 25 mm	0.54
Tumor size > 25 mm	0.79
Number of copies < 2000	0
Number of copies > 2000 and < 12000	0.70
Number of copies > 12000 and < 111000	1.34
Number of copies > 111000	1.95

Figure 3 Nomogram to calculate the risk percentage of NSN positivity. The score of each of 2 variables are summed and reported on the total score row, immediately below is identified the percentage of NSN positivity.

Table 4: Results of Multivariate Analysis (patients with positive nodes > 4)	OR (95% C.I.)	P
GRADING		
G2 vs G1	2.11 (1.22-3.64)	0.007
G3 vs G1	2.28 (1.22-4.27)	0.009
COPIES		
1300-2500 vs <1300	3.90 (2.42-6.21)	<0.0001
2500-5000 vs <1300	6.81 (4.42-10.49)	<0.0001
>5000 vs <1300	8.83 (5.94-13.56)	<0.0001
MOLECULAR SURVEY		
Luminal A vs triple neg	2.60 (1.33-5.18)	0.005
Luminal B vs triple neg	3.13 (1.36-7.18)	0.007
HER2 vs triple neg	2.28 (0.86-7.91)	0.10

➤ Our nomogram was also proven to identify patients with NSNs ≥ 4 (Tab. 4). This information is very useful for the oncologist for the decision whether to give chemotherapy in luminal A-B (HER2-) patients, and for radiotherapy to deliver regional node irradiation 4 - 5.

CONCLUSIONS

➤ In our analysis we have evaluated only parameters available at the time of operation because the final nomogram has to be employed by the surgeons as a guide for the surgical decision-making whether to perform or not ALND in BC women.

➤ The large population employed and the power of number of CK19 mRNA copies are the right prerequisites for a reliable nomogram.

➤ Moreover, the possibility to identify patients at high risk (≥ 4 nodes) might be of paramount importance to deliver the right treatment planning

REFERENCES

- Giuliano AE, et al, JAMA 2011; 305(6): 569-575
- Buglioni S, Di Filippo F et al, PLoS One 2013; 8(3): e58823
- Iannotti A, et al, J Clin Oncol (2008), 16: 1364-1370
- A. Goldschmidt, et al, Panel members Ann Oncol 2013; 00: 1-18, 2013
- Haffty BG et al, J Clin Oncol 2011, 29(34): 4479-81

ACKNOWLEDGEMENTS

The study was funded by a grant from Synnex Corporation.



Replacer OSNA dans le débat : Est-il SAGE de réaliser un examen extemporané du ganglion sentinelle?

👉 **Oui** à condition d'avoir une technique extemporanée fiable

- 👉 OSNA est l'examen de choix
- 👉 A quel prix?

👉 **Pourquoi?**

- 👉 Il reste des indications de curage axillaire si GS métastatique:
 - 👉 autant les réaliser dans le même temps opératoire que la chirurgie tumorale mammaire, c'est mieux!
 - 👉 Si la décision est difficile l'indication de curage sera discutée en RCP et réalisée dans un deuxième temps.
- 👉 Pour les indications de reconstruction mammaire immédiate avec GS non métastatique:
 - 👉 GS négatif permet de s'assurer qu'il n'y aura pas de traitement complémentaire par radiothérapie qui pourrait altérer la prothèse



OSNA avant 2011

L'expérience du CEM

→ Juin 2010:

- **26,43% patients (97/367)** avec au moins 1GS +
- **96 (98,9%)** curages axillaires réalisés dans le même temps opératoire que la biopsie du GS et l'ablation de la tumeur

→ Février 2011:

- **27,2% patients (136/500)** avec au moins 1GS +
- **122 (89,7%)** curages axillaires réalisés dans le même temps opératoire que la biopsie du GS et l'ablation de la tumeur

OSNA 2011- 2015

L'expérience du CEM

Après la publication Giulliano et al 2011

		OSNA Résultats			
		MAC	MIC	NEG	TOTAL
Acte chirurgical	GS + Chirurgie mammaire + Curage (1 seul temps chirurgical)	119	63	21	203
	Curage seul (2 ^{ème} temps chirurgical)	20	16	6	42
	GS + Chirurgie mammaire	21	74	510	605
	GS seul sans chirurgie mammaire	48	86	314	448
	TOTAL	208	239	851	1298

➤ **150 cas avec biopsie du GS lors de la chirurgie mammaire et macrométastase OSNA**

- 119 (79,3%) curages dans le même temps opératoire
- 20 curages différés
- 21 (14%) pas de curage

➤ **153 cas avec biopsie du GS lors de la chirurgie mammaire et micrométastase OSNA**

- 63 (41,2%) curages dans le même temps opératoire
- 16 curages différés
- 74 (48,3%) pas de curage



Intérêt à l'avenir de l'examen extemporané OSNA pour éviter une reprise chirurgicale pour curage

↳ Les indications du GS se sont étendus

- ↳ Plus grosses tumeurs
- ↳ GS en néoadjuvant
- ↳ GS après chirurgie antérieure

↳ Le débat n'est pas clos:

- ↳ De nouvelles situations avec peu d'étude
- ↳ Pour les macrométastases: sûrement pour la plupart
- ↳ Pour les micrométastases: parfois
- ↳ En fonction des caractéristiques tumorales et autres traitement adjuvant



OSNA pour la recherche des petites métastases

- GS+ et carcinome in situ doit faire suspecter un petit carcinome infiltrant (dans notre étude 69 patientes 13%GS+)
- RMI
- Peut-être que c'est mieux de quantifier les petites métastases afin de savoir que cela n'a pas d'impact plutôt que de ne pas savoir et de méconnaître un intérêt pour la prise en charge des patientes:
→ avec OSNA c'est inclus dans le prix! Pas de coupes supplémentaires tout le ganglion est analysé

Analyse des ganglions sentinelles : intérêt de l'analyse moléculaire OSNA (One Step Nucleic Acid amplification) pour l'analyse des métastases ganglionnaires des petites tumeurs mammaires



Godey F., Bendavid-Athias C., Rouquette S, Leveque J.
Centre de Lutte Contre le Cancer Eugène Marquis, rue de la Bataille Flandres-Dunkerque, CS 44229,35042 Rennes cedex.

OBJECTIFS

Après une première étude des ganglions sentinelles (GAS) analysés avec OSNA au CRLCC Eugène Marquis de Rennes dont les principaux résultats sont rappelés, les résultats des GAS analysés avec OSNA pour 69 patientes opérées d'un carcinome intracanaire (CIC) et 34 patientes opérées d'un carcinome infiltrant de petite taille T1a sont présentés et discutés.

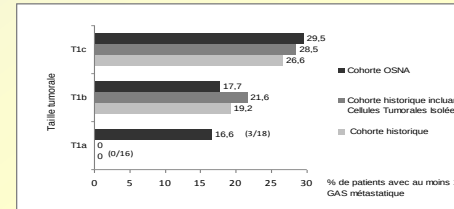
MÉTHODES UTILISÉES

La Technique OSNA (one step nucleic acid amplification) Sysmex recherche l'ARN de la CK 19 (Cytokeratine 19) sur un lysat du GAS sans extraction d'ARN selon la technique RT LAMP. Les GAS analysés en histologie ont été examinés en extemporanée par apposition, puis épuisés en coupes étagées de 250 microns, chaque coupe a subi un immunomarquage par la cytokératine (clone AE1, AE3, Dako). Les ganglions de curage ont été examinés par coloration HES.

RESULTATS

Résultats avec OSNA des GAS de 367 patientes versus 355 patientes pour lesquelles les GAS avaient été analysés en histologie conventionnelle (Sentinel lymph node analysis in breast cancer: contribution of one-step nucleic acid amplification (OSNA). *Breast Cancer Res. Treat.* 2011 Oct 13):
Ces premiers résultats n'ont pas montré de différence significative entre l'analyse histologique et l'analyse OSNA pour les patientes opérées d'un carcinome canalaire ou lobulaire infiltrant < 2cm : taux d'envahissement des GAS avec OSNA 24,3% versus 22,8% sans inclure les cellules tumorales isolées (CTI) ou 24,8% avec CTI. Toutefois le taux de détection de métastases dans les GAS pour les petites tumeurs T1a avec OSNA était de 16,6 % (3/18) versus 0% (0/16) avec histologie (figure 1).

Fig 1 : Comparaison de l'analyse OSNA et de l'analyse histologique conventionnelle pour la détection de métastases dans les ganglions sentinelles selon la taille tumorale



Analyse des GAS avec OSNA pour 34 patientes opérées d'une tumeur T1a : GAS+ OSNA pour 5 patientes (14,3%) présentant un carcinome canalaire (tableau 1)

3 patientes ont présenté une tumeur triple négative dont 2 avaient une mutation BRCA1, 1 patiente était encore sous traitement hormonal pour le traitement d'un cancer du sein controlatéral, 1 patiente était opérée pour un carcinome intracanaire mais finalement l'analyse histologique sur pièce opératoire a retrouvé un carcinome infiltrant T1a.

Tableau 1 : GAS+ OSNA et Carcinome infiltrant T1a

Age	ATCD	Taille Histo mm	Grade SBR	Ki 67 %	RH	HER2	GAS	Curage axillaire	Décision RCP
46	Mutation BRCA1	5	3	30	-	-	1 positif sans quantification	Négatif	Radiothérapie
71	Cancer sein controlatéral	5	1	5	+	-	1 positif sans quantification	Négatif	Radiothérapie Hormonothérapie
33	Mutation BRCA1 cancer sein et ovaire chez mère	5	3	30	-	-	1 macro-métastase	Négatif	Chimiothérapie + mammectomie bilatérale prophylactique
62		<5	1	<5	+	-	1 micro-métastase	non fait	Radiothérapie Hormonothérapie
55	Carcinome intra-canaire à la biopsie	4	2	5	-	-	1 micro-métastase	Négatif	Radiothérapie

Analyse des GAS avec OSNA pour 69 patientes opérées d'un carcinome intracanaire étendu : GAS+ OSNA pour 9 patientes (13%) (tableau 2). 7 mammectomies et 2 zonectomies ont été réalisées, la plupart pour des carcinomes intracanales de haut grade.

CONCLUSION

La technique OSNA permet une analyse de tout le ganglion, cette technique est standardisée, elle est réalisée sur GAS frais en extemporanée, ainsi tous les curages axillaires justifiés peuvent être réalisés dans le même temps opératoire évitant des reprises chirurgicales pour positivité du GAS.
La technique OSNA a été calibrée pour que l'on obtienne les mêmes résultats que l'analyse histologique ce que nous avons pu vérifier et publier pour les patientes opérées au CRLCC Eugène Marquis de Rennes.

Nous avons poursuivi notre étude pour les patientes présentant des petites tumeurs car le taux d'envahissement des GAS paraissait plus important avec OSNA que ce que nous retrouvons habituellement avec l'analyse histologique. Au final avec la technique OSNA le taux d'envahissement des GAS est de 14,3% pour les petites tumeurs mammaires infiltrantes T1a et de 13,2% pour les carcinomes intracanales. Il n'a jamais été retrouvé de ganglions envahis dans les curages axillaires à l'analyse histologique pour ces petites tumeurs ce qui n'est pas incohérent car on sait que la taille des métastases ganglionnaires est proportionnelle à la taille tumorale et que l'analyse histologique sur les ganglions de curage est adaptée pour la recherche de macrométastases mais pas suffisamment détaillée pour la recherche de micrométastases. Les patientes présentant des petites tumeurs T1a pour lesquelles l'analyse OSNA a mis en évidence une métastase présentaient par ailleurs des facteurs de risque particuliers tumeur triple négative, facteurs de prolifération élevés, des antécédents personnels ou familiaux de mauvais pronostic.

Compte tenu de la bonne concordance pour les tumeurs plus grosses, nous pouvons supposer que du fait de l'analyse exhaustive du GAS la sensibilité analytique est très bonne pour la détection des petites métastases avec OSNA. Cette précision analytique nous apporte de nouvelles opportunités pour l'étude des petites métastases dont l'impact clinique est actuellement très largement débattu afin de mieux définir le traitement approprié. Dans le cas particulier des carcinomes intracanales la présence d'une métastase ganglionnaire peut nous faire suspecter un foyer de microinfiltration qui n'est pas toujours détectable sur la pièce de mammectomie.

Tableau 2 : GAS+ OSNA et Carcinome intracanaire

Age	ATCD	Taille Histo mm	Grade	RH	Chirurgie	GAS	Curage axillaire	Décision RCP
42	ATCD familiaux ++ cancer sein sœur et cousine mais pas de mutation BRCA1	50	Haut grade avec nécrose extensive	-	Mammectomie	3 micro-métastases	Négatif	Chimiothérapie + mammectomie prophylactique controlatérale
34		60	Haut grade avec nécrose extensive	RP+ RE-	Mammectomie	1 positif sans quantification	Négatif	Surveillance
62	ATCD familiaux cancer sein chez mère et sœur	30	Haut grade avec nécrose extensive	-	Zonectomie	1 micro-métastase	Négatif	Radiothérapie Reprise marge
38		60	Haut grade avec nécrose ponctuelle	RE+ Rp-	Mammectomie	1 micro-métastase	Négatif	Surveillance
64		45	Grade intermédiaire avec nécrose ponctuelle	+	Zonectomie	1 positif sans quantification	Négatif	Radiothérapie + Hormonothérapie
70		65	Grade intermédiaire avec nécrose ponctuelle	+	Mammectomie post tumorectomie	1 positif sans quantification	Négatif	Surveillance
43			Haut grade avec nécrose extensive	-	Mammectomie+ Reconstruction mammaire immédiate	1 micro-métastase	non fait	Surveillance
42	Cancer ovaire stade la traité par chirurgie exclusive	50	Haut grade avec nécrose extensive	-	Mammectomie+ Reconstruction mammaire immédiate	1 micro-métastase	non fait	Surveillance
45	ATCD familiaux Cancer sein sœur	45	Bas grade sans nécrose	+	Mammectomie	1 macro-métastase	Négatif	Hormonothérapie



CONCLUSION: Analyse moléculaire OSNA des GS Tumeurs mammaires

- OSNA pour ceux qui souhaitent un examen extemporané mais pas que...
- La mise en place est plus simple si les indications d'extemporané sont moins nombreuses: l'analyse est réalisée en peropératoire, mais le résultat n'est pas attendu et donc pas de temps d'attente au bloc opératoire.
- C'est aussi une alternative à l'analyse histologique pour ceux qui veulent une analyse fine et standardisée des GS → actuellement BHN ou PHN mais cet acte doit avoir une nomenclature en B ou P selon le laboratoire qui prend en charge l'analyse.
- Les résultats sont comparables quelques soit le laboratoire qui traite l'analyse
 - Fiable
 - Reproductible
 - Non opérateur dépendant
 - Intérêt pour des études prospectives multicentriques



CONCLUSION: l'analyse moléculaire OSNA des GS Colon, Gastrique, ORL,...

- Intérêt comme analyse extemporanée fiable quand il existe une indication de curage complémentaire
- Intérêt aussi pour détecter les petites métastases ganglionnaires pour assurer une meilleure classification des patients



Merci de votre attention

