

UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ DE MÉDECINE

Année 2012

N° 086

THÈSE

pour le

DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

DES de Gynécologie-Obstétrique

Par

Florence BOIFFARD
Née le 9 octobre 1982, à Nantes (44)

Présentée et soutenue publiquement le 19 septembre 2012

**ANALYSE DU GANGLION SENTINELLE DANS LE CANCER DU SEIN
PAR LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE AVEC LA METHODE OSNA :
PERFORMANCES DIAGNOSTIQUES ET IMPLICATIONS CLINIQUES**
Résultats d'une étude prospective sur 400 patientes.

Président du jury: Monsieur le Professeur Jean-Marc CLASSE

Directeur de thèse : Madame le Docteur Virginie BORDES

TABLE DES MATIÈRES

<u>INTRODUCTION</u>	p9
<u>1- RAPPEL DES CONNAISSANCES</u>	p11
1.1. La diffusion lymphatique et le curage axillaire	p11
1.2. La technique du ganglion sentinelle	p13
1.3. Méthodes d'analyse anatomo-pathologique	p17
1.4. Analyse du ganglion sentinelle par la biologie moléculaire	p19
<u>2- MATÉRIEL ET MÉTHODE</u>	p30
2.1. Caractéristiques de l'étude	p30
2.2. Prise en charge des patientes	p31
2.3. Objectifs et paramètres étudiés	p34
2.4. Comparaison des deux séries	p35
2.5. Analyse statistique	p35
<u>3- RÉSULTATS</u>	p36
3.1. Population étudiée	p36
3.2. Caractéristiques générales de la population	p37
3.3. Etude prospective exhaustive sur 400 patientes	p38
3.4. Etude comparative	p42
<u>4- DISCUSSION</u>	p48
4.1 Performances de la technique OSNA	p48
4.2 Influence du type histologique de la tumeur	p53
4.3 Caractéristiques ganglionnaires	p57
4.4 Conséquences économiques	p63
4.5 Limites de la technique	p67
<u>CONCLUSION</u>	p70
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	p71

INTRODUCTION

En 2011, le nombre de nouveaux cas de cancer du sein est estimé à 53000. Plus de la moitié d'entre eux sont diagnostiqués par le dépistage organisé permettant ainsi la mise en évidence de tumeurs de moins de 2cm pour 50% des cas. Le risque d'envahissement ganglionnaire pour ces cancers de petite taille est faible et s'élève à 23% (1). La détermination du statut ganglionnaire apporte des informations pronostiques et guide le choix des traitements adjuvants. La mise en place de la détection du ganglion axillaire sentinelle (GAS) constitue une alternative au curage axillaire, avec une morbidité moindre. L'analyse per-opératoire du GAS a pour objectif de permettre la réalisation d'un curage axillaire complémentaire dans le même temps si celui-ci est métastatique.

Plusieurs études tendent à démontrer que la réalisation différée d'un curage axillaire après un ganglion sentinelle entraînerait une morbidité plus importante que la réalisation d'un curage axillaire en première intention. Husen et al, ont analysé spécifiquement cette question à travers les 370 réponses reçues à un questionnaire spécifique. Ils ont montré que l'intervention en deux temps était plus morbide que l'intervention en un temps en terme d'œdème du membre supérieur et de paresthésie (2). En effet, les phénomènes inflammatoires locaux suivant la réalisation du ganglion sentinelle compliquent la ré-intervention. L'intervention en deux temps représente également un surcoût lié à la réhospitalisation.

Une technique d'analyse fiable du GAS en per-opératoire est donc un enjeu important car son résultat détermine la réalisation ou non d'un curage axillaire complémentaire dans le même temps. Il existe deux méthodes d'analyse extemporanée qui sont l'examen cytologique par empreinte ou grattage et l'examen sur coupes en congélation avec ou sans immunohistochimie. La méta-analyse de Tew (3) parue en 2005 retrouve pour l'examen extemporané par apposition cytologique une sensibilité globale de 63%. La sensibilité de détection des macrométastases s'élève à 81% contre 22% pour les micrométastases. En comparaison, l'examen sur coupes en congélation possède une sensibilité globale de 73% (94% de détection des macrométastases et 40% des micrométastases) (4).

Les micrométastases sont définies par une taille de métastase comprise entre 0.2 et 2mm de grand axe. Les cellules isolées sont seules ou groupées en petits amas de cellules inférieures à 0.2mm de grand axe. Aucune de ces deux techniques d'examen n'est

performante pour leur mise en évidence. Cela constitue l'une des principales limites de la réalisation de l'analyse per-opératoire anatomopathologique. La variabilité inter et intra-observateur est une autre limite.

Afin d'améliorer la sensibilité de l'examen extemporané, une nouvelle voie de recherche s'est développée, basée sur l'amplification d'ARNm spécifiques aux cellules cancéreuses. Le test moléculaire diagnostique appelé OSNA (One-Step Nucleic Acid Amplification) est aujourd'hui validé par plusieurs études et le seul à être commercialisé. Cet examen permet l'analyse complète du ou des GAS pendant l'intervention par des processus automatisés et rend un diagnostic semi-quantitatif en temps réel. Il permet d'obtenir le statut définitif du ganglion sentinelle en extemporané et ainsi de réaliser le curage axillaire s'il est nécessaire dans le même temps opératoire.

Le but de ce travail est d'étudier les résultats d'une population ayant bénéficié de la méthode OSNA et de les comparer à ceux d'une population ayant bénéficié de l'analyse anatomopathologique.

1- RAPPEL DES CONNAISSANCES

1-1 La diffusion lymphatique et le curage axillaire

1-1-1 Objectifs du curage axillaire

Les principaux objectifs du curage axillaire sont l'information pronostique, permettant de poser l'indication de traitements adjuvants, et l'amélioration du contrôle local.

Les patientes présentant un envahissement ganglionnaire axillaire ont un risque augmenté de décès, notamment par diffusion métastatique, en comparaison avec les patientes indemnes d'envahissement (5). L'étude prospective suédoise de Wilking a porté sur une large cohorte de 1622 patientes suivie en moyenne 4,3 ans sans aucune perdue de vue. Cette étude a retrouvé des risques supérieurs de récidives loco-régionales et à distance ainsi qu'un risque supérieur de décès pour les patientes présentant une atteinte ganglionnaire. Ceci est d'autant plus marqué que l'atteinte concerne plus de quatre ganglions axillaires. Avec un suivi plus important de quinze ans, le pronostic défavorable lié à l'atteinte ganglionnaire a été confirmé par l'étude américaine de Beenken (6). Chez les 588 patientes incluses, le risque de récurrence loco-régionale et la survie sans récurrence ont été significativement liés à l'importance de l'atteinte axillaire. Cet envahissement ganglionnaire représente la principale indication de traitement systémique adjuvant.

Le curage axillaire pourrait participer à l'amélioration du contrôle local de la maladie. Le risque de récurrence axillaire après curage axillaire pour une tumeur classée cliniquement T1-2, N0-1 est de 6% à 10 ans (7). Une étude prospective internationale en 2006, randomisant 473 patientes, a étudié l'impact du curage axillaire chez les patientes de plus de soixante ans. 234 patientes ont bénéficié d'une chirurgie mammaire avec curage axillaire et 239 une chirurgie mammaire seule. Toutes ont reçu un traitement hormonal adjuvant. Avec un suivi moyen de 6,6 ans, il a existé 3% de risque d'évolution axillaire chez les patientes n'ayant pas eu de curage axillaire contre 1% pour celles ayant eu l'intervention. En revanche, il n'a pas été retrouvé de différence significative sur la survie globale (75% versus 73%) ni la survie sans récurrence (67% versus 66%) (8). Ces résultats n'ont pas été confirmés par l'étude d'équivalence d'Avril en 2011 qui observait la survie globale et sans récurrence de patientes

ayant bénéficié ou non d'un curage axillaire. Les patientes étaient toutes ménopausées et avaient plus de 50 ans. Il a été randomisé 297 patientes sans réalisation de curage axillaire (groupe 1) et 310 patientes chez qui il a été réalisé un curage axillaire (groupe 2). Avec une surveillance de 5 ans, les résultats n'étaient pas équivalents. La survie globale était de 98% pour le premier groupe contre 94% pour le deuxième. La survie sans récurrence était de 96% pour le groupe 1 et de 90% pour le groupe 2. Le taux de récurrence axillaire était plus important dans le groupe 1 (9).

1-1-2 Les facteurs de risque d'envahissement ganglionnaire

L'envahissement ganglionnaire définit le risque métastatique et représente un des éléments pronostiques majeurs conduisant à la décision de traitements adjuvants. Les facteurs de risque de diffusion lymphatique sont représentés par la taille tumorale, l'âge, les embolies lymphatiques, le grade histologique et son type, les récepteurs hormonaux et la localisation de la tumeur dans le sein (10). Les trois premiers éléments sont des facteurs de risque indépendants en analyse multivariée.

1-1-3 Morbidité du curage axillaire

Le curage axillaire s'accompagne d'une morbidité altérant la qualité de vie des patientes dans 39% des cas (11).

Les complications précoces sont dominées par la lymphocèle, la douleur et les troubles sensitifs, l'hématome et les complications per-opératoires. Les canaux lymphatiques n'ayant pas de membrane basale et la lymphe n'ayant pas de propriété coagulante, les ligatures n'empêcheront pas l'extravasation de lymphe en amont par de multiples pores. Le taux de lymphocèle axillaire après curage axillaire varie de 4 à 90% (12).

Le lymphoedème constitue la complication tardive principale, sa fréquence varie entre 6 et 30% (13) et est responsable d'un impact négatif important sur la qualité de vie (14). Le délai moyen de survenue est de 14 mois et sa prévention semblerait passer par une éducation immédiate des patientes en post-opératoire pour une mobilisation précoce (15). De manière précoce, une limitation des mouvements de l'épaule touche près de 70% des patientes (16) qui peut à long terme entraîner une raideur dans 8 à 40% des cas (17).

1-2 La technique du ganglion sentinelle

1-2-1 Le concept

Le concept de ganglion sentinelle est basé sur la diffusion progressive de l'atteinte ganglionnaire, celui-ci étant le premier ganglion à drainer la tumeur. Son analyse permettra d'en déterminer son caractère métastatique. L'intérêt de la cartographie de l'envahissement ganglionnaire loco-régional a été décrit pour la première fois en 1977 par Cabannas pour orienter le prélèvement ganglionnaire dans la prise en charge du cancer de la verge (18). Ce concept a ensuite été appliqué en 1992 par Morton et al, au mélanome malin (19). En 1994, Giuliano et al, l'ont appliqué à la prise en charge du cancer du sein (20). La première publication Française en 1998, de Rodier et al, a décrit l'expérience initiale des Centres de Lutte Contre Le Cancer (21).

Le concept du ganglion axillaire sentinelle appliqué au cancer du sein consiste à sélectionner les patientes susceptibles de ne pas avoir d'envahissement ganglionnaire axillaire afin de leur éviter un curage axillaire inutile. L'objectif de cette technique est par conséquent d'obtenir une information sur le statut ganglionnaire aussi fiable que dans le curage axillaire. Ainsi cela repose sur deux critères : le taux de détection du ganglion sentinelle et le taux de faux négatifs.

Il existe deux types de méthodes de détection : la méthode colorimétrique et la méthode isotopique. L'utilisation combinée des deux méthodes permet d'augmenter le taux d'identification. La méta analyse de 2006 portant sur 69 études, représentant 10 454 patientes, a montré un taux de détection de 96,35% (moyenne : 89%, médiane: 92%) (22). En moyenne le nombre de ganglions sentinelles extraits était de 1,92 (1 à 4, médiane 2).

Le taux de faux négatifs est mesuré chez les patientes ayant au moins un ganglion sentinelle détecté et correspond au rapport du nombre de patientes chez qui les ganglions sentinelles sont indemnes d'envahissement métastatique alors qu'il existe des métastases dans les ganglions non sentinelles, sur le nombre total de patientes chez qui il existe un envahissement métastatique au niveau des ganglions qu'ils soient sentinelles ou non. Le taux de faux négatifs ne peut être précisé qu'avec la réalisation concomitante d'une détection du ganglion sentinelle et du curage axillaire complémentaire. Une méta analyse de 70 essais publiés a montré que le taux de faux négatifs poolé était de 8,4% (23).

L'essai randomisé multicentrique NSABP B-32 (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) a porté sur 80 centres canadiens et américains entre 1999 et 2004 permettant de randomiser 5611 patientes. Cet essai d'équivalence a comparé curage axillaire systématique après ganglion sentinelle versus curage secondaire uniquement en cas de ganglion sentinelle métastatique. Les résultats ne retrouvent pas de différence de survie globale ni de survie sans récurrence entre les deux groupes. Le ganglion sentinelle est donc une technique appropriée, sûre et équivalente au curage axillaire (24).

1-2-2 Morbidité du ganglion sentinelle

La morbidité de la technique du ganglion sentinelle doit être comparée à celle du curage axillaire. Il est également important d'évaluer la morbidité propre de la technique du ganglion sentinelle seule et de la double intervention comportant la détection du ganglion sentinelle et de manière différée la réalisation d'un curage axillaire complémentaire indiqué par les résultats anatomopathologiques définitifs.

Les études comparant morbidité du curage axillaire à celle du ganglion sentinelle sont nombreuses et concluent toutes à une morbidité moindre. Notamment, Purushotham et al, ont mené un essai randomisé dans l'objectif principal d'évaluer la morbidité de la technique du ganglion sentinelle comparée au curage axillaire (25). Dans cette étude, la morbidité chez 155 patientes du bras contrôle, avec chirurgie conservatrice (n=150), ou une mastectomie (n=5), et un curage axillaire est comparée à celle de 143 patientes, dont 57 ont eu une détection du ganglion sentinelle et un curage axillaire et 86 un curage axillaire seul. L'étude de la morbidité montre une diminution significative du taux de lymphocèles ponctionnées, de lymphoedème subjectif ou objectif, de paresthésies, et d'atteinte de la flexion ou de l'abduction de l'épaule, dans le groupe sentinelle. L'étude de la qualité de vie montre également une nette différence en faveur du groupe ganglion sentinelle dans la période précoce après l'intervention. Les deux groupes sont semblables à 1 an. L'étude nationale STIC GAS 2004 compare notamment qualité de vie et morbidité des deux techniques chirurgicales (26). Entre septembre 2005 et décembre 2006, 822 patientes ont bénéficié de la technique du ganglion sentinelle voire d'un curage axillaire de complément (soit dans le même temps opératoire (95 patientes) soit en seconde intention (132 patientes)) et 146 d'un curage axillaire seul d'emblée. Les questionnaires de qualité de vie (QLQ-C30 et QLQ-BR23) ont été remplis par les patientes avant traitement, à une semaine, un, deux, huit et 12 mois

après la chirurgie. Les résultats sont en faveur de la technique du ganglion sentinelle avec une nette différence observée entre une semaine et deux mois. Deux mois après l'intervention chirurgicale, les patientes du groupe ganglion sentinelle récupèrent leur qualité de vie par rapport à la situation initiale, mais il faut attendre huit mois pour les patientes du groupe curage axillaire. Les symptômes liés au bras, conséquence de la chirurgie (douleur, oedème, mouvement du bras limité) sont ressentis de façon plus importante dans le groupe curage axillaire et la différence reste significative à 12 mois. Quelle que soit la période de suivi considérée, les patientes des deux groupes ne retrouvent pas le score de leur échelle fonctionnelle avant le traitement chirurgical. L'étude randomisée ALMANAC de Mansel portant sur 1031 patients a étudié la qualité de vie après réalisation soit d'un ganglion sentinelle soit d'un curage axillaire. Il a été retrouvé une différence significative de qualité de vie en faveur du ganglion sentinelle ($p < 0,003$) (27).

Les différents travaux évaluant la morbidité de la technique du ganglion sentinelle ont montré qu'il existe une morbidité non nulle dans le groupe ganglion sentinelle seul. Dans l'essai randomisé de Purushotham et al, la morbidité des 84 patientes qui n'ont eu que la technique du ganglion sentinelle est comparée à la morbidité des patientes du groupe contrôle avec curage axillaire mais sans envahissement ganglionnaire (25). Les patientes du groupe ganglion sentinelle seul ont une fréquence de 9% de lymphocèle ponctionnée contre 23% dans le groupe curage ($p = 0,008$), un lymphoedème modéré à 12 mois avec une augmentation de volume de 20 ml contre 59,8ml ($p = 0,007$), et une meilleure qualité de vie immédiate ($p = 0,009$) et à 3 mois ($p = 0,05$). Wilke et al, ont analysé la morbidité des 4 975 patientes de l'essai de l'American College of Surgeons Oncology Group Z0010 qui n'ont subi que la détection du ganglion sentinelle sans curage axillaire associé (28). Ces auteurs ont montré que le risque d'anaphylaxie lié à l'utilisation du Bleu isosulfan est de 0,1%, le risque d'abcès de 1%, le risque de lymphocèle de 7%, et d'hématome de 1,4%. Les deux facteurs liés au risque de lymphocèle sont l'âge et le nombre de ganglions sentinelles prélevés. A 6 mois, 8,6% des patientes ont ressenti des paresthésies axillaires, 3,8% ont eu une diminution de la sensibilité du membre supérieur et 6,9% ont présenté un lymphoedème de plus de 2cm par rapport à la situation préopératoire. A six mois, le risque de lymphoedème était lié à l'âge et au BMI.

La question de la morbidité d'un curage axillaire différée après ganglion sentinelle a été évaluée dans le STIC GAS mais l'effet plus délétère d'une intervention en deux temps n'a pas été établi. En revanche, Husen dans son étude a conclu à plus d'œdème du membre supérieur et un risque accru de paresthésies (2).

1-2-3 Indication de la technique

Selon les recommandations de Saint Paul de Vence 2011 (29), la procédure du GAS s'adresse à toutes les tumeurs infiltrantes T1–T2 (≤ 3 cm) N0 à condition que certaines règles de bonnes pratiques soient respectées telles que la réalisation d'une technique d'identification combinée, la validation d'un apprentissage, le prélèvement si possible d'au moins deux GAS et la réalisation d'une analyse anatomopathologique par coupes sériées et immunohistochimies des GAS. Les contre-indications sont les tumeurs multifocales, la réalisation d'une chimiothérapie néoadjuvante et l'antécédent de chirurgie mammaire.

En ce qui concerne le carcinome canalaire in situ, la procédure est recommandée en cas de mastectomie du fait de l'impossibilité ultérieure de réaliser cette technique avec une fiabilité reconnue et du fait de lésions correspondant habituellement à des carcinomes intracanaux étendus avec un risque de sous-estimation par rapport à l'histologie définitive pouvant correspondre à un carcinome micro-invasif ou un carcinome invasif. En cas de résection conservatrice, il semble raisonnable d'associer une procédure de GAS d'emblée dans les situations « à risque » de découverte d'une (micro-) invasion à l'examen anatomopathologique définitif : CIC de haut grade, CIC étendus (> 20 mm) et en cas de suspicion de micro-invasion sur l'imagerie ou la micro biopsie préopératoire.

Les indications de curage axillaire complémentaire sont l'échec de détection, un GAS atteint en macro et micrométastase. Sa réalisation est controversée en cas de cellules isolées (29).

1-3 Méthodes d'analyse anatomopathologique

1-3-1 Analyse définitive

La technique du ganglion sentinelle permet de ne confier au pathologiste que 1 à 4 ganglions au lieu de 10 à 15 ce qui permet une analyse anatomopathologique plus ciblée. Comme le ganglion sentinelle a plus de chance de contenir une métastase, que les ganglions non sentinelles du curage, le pathologiste a intensifié son étude du ganglion sentinelle par une augmentation du nombre de coupes plus ou moins des colorations immunohistochimiques (30). Il existe des recommandations notamment européennes et américaines permettant de guider les pratiques anatomopathologiques (31)-(32).

L'analyse définitive du ganglion sentinelle passe par une première étape macroscopique. Les ganglions sont comptés, mesurés et inclus en totalité en réalisant des coupes de 1.5 à 3mm. Puis il est réalisé une étude microscopique avec une nouvelle série de coupes sériées de 150 à 250 µm. Une première analyse sur coupes en congélation est effectuée par coloration par Hématoxyline-Eosine (HE). Celle-ci peut être complétée par une analyse immunohistochimique (IHC) par l'application d'un anticorps anti-kératine AE1-AE3 en cas d'HE négatif à la recherche de micrométastases ou cellules isolées. Cette procédure améliore de manière significative la sensibilité de détection de ces métastases de petits volumes (33).

1-3-2 Procédures per-opératoires

Cette analyse définitive différée peut être précédée d'une analyse extemporanée permettant la réalisation immédiate d'un curage axillaire de complément en cas de ganglion sentinelle métastatique. Les principales méthodes d'examen extemporané sont l'examen cytologique, par empreinte ou par grattage, et l'examen histologique sur coupes en congélation, avec ou sans IHC.

L'examen par empreintes cytologiques est rapide, 5 à 10mn, peu coûteuse et préserve le tissu lymphoïde. En revanche, elle ne permet pas de différencier les micro des macrométastases. Sa sensibilité est améliorée par l'expérience de l'équipe et l'augmentation du nombre de coupes examinées (34). Les cas de faux négatifs sont essentiellement liés aux cas de micrométastases et au carcinome lobulaire infiltrant (35). La méta-analyse de Tew (3)

parue en 2005 décrit au total 31 études portant sur la validité de l'examen extemporané par apposition cytologique et retrouve une sensibilité globale de 63%. La sensibilité de détection des macrométastases s'élève à 81% contre 22% pour les micrométastases. Il existerait de plus un taux de faux négatif plus important pour les carcinomes lobulaires du fait d'une plus faible cohésion cellulaire et d'une ressemblance des cellules avec des cellules lymphoïdes. Cox et son équipe ont rapporté une différence de performance de détection de l'atteinte ganglionnaire entre carcinomes lobulaire et canalaire (respectivement 38,7% et 55,5%) (36).

L'examen histologique sur coupes congelées se fait habituellement sur une partie du ganglion sentinelle, la moitié ou une tranche. Cette technique permet de détecter des métastases de plus petite taille que l'examen cytologique. Mais les coupes au cryostat nécessitent de dégrossir le prélèvement ce qui conduit à une potentielle perte de tissu lymphoïde. La sensibilité augmente avec le nombre de tranches examinées. La méthode des coupes congelées est plus longue de réalisation surtout si elle est associée à une analyse immunohistochimique (30 à 40 minutes passant de 40 à 50 minutes). Elle est aussi plus onéreuse. Cependant, elle permet de donner une information sur le type d'envahissement ganglionnaire et d'augmenter le taux de détection des micrométastases. La méta-analyse de 2011 (4) regroupant 47 études évaluant l'extemporané sur coupes en congélation seule conclue à une sensibilité globale de 73% (94% de détection des macrométastases et 40% des micrométastases). L'étude de Krishnamurthy de 2009 (38) retrouve une supériorité de l'examen sur coupes en congélation associé à une IHC rapide par rapport à l'analyse cytologique avec des résultats proches de l'analyse définitive. Les recommandations de l'American Society of Clinical Oncology concluent qu'entre des mains entraînées, la méthode d'extemporané par coupe congelées est préférable avec une meilleure sensibilité que la cytologie (32).

1-4 Analyse du ganglion sentinelle par la biologie moléculaire

1-4-1 Données physiopathologiques

Moll et son équipe ont publié un article portant sur les cytokératines humaines (40). Comme la plupart des cellules adénocarcinomeuses, les cellules du cancer du sein expriment fortement les cytokératines (CK) 8, 18 et 19. Ces marqueurs, spécifiques des cellules épithéliales, normalement absents des tissus mammaire et ganglionnaire sains. L'expression élevée des CK 8 et 18 seraient associée à un pronostic favorable, en revanche l'expression de CK 19 est relativement stable. Cette donnée a déjà été soulignée par Chu en 2002 qui a retrouvé la présence de CK 19 dans 98,2% des cancers du sein (41). Cependant il existe un biais car seuls les principaux types anatomopathologiques ont été testés. En effet, la dernière édition de la classification histologique des cancers du sein a permis de distinguer dix-sept types histologiques distincts (42). Certains types histologiques n'ont donc pas été étudiés dans la publication de Chu tels que les carcinomes tubuleux, mucineux, apocrines, micropapillaires. Ceux-ci ont plus récemment été examinés par Alvarenga et son équipe et la présence de la CK 19 a été retrouvée dans respectivement 93%, 86%, 100% et 100% des cas (43).

Par ailleurs l'expression de divers autres marqueurs a été étudiée dans les cancers du sein dont la mammaglobine. En effet, en 2005 Bernstein et son équipe se sont intéressés à l'expression de cette protéine dans le cancer du sein. Celle-ci a été détectée dans 72% des cancers du sein et en revanche est absente des autres tissus néoplasiques. De plus, la mammaglobine n'est pas détectée dans les cellules mammaires saines (44). Ces résultats ont confirmé des données publiées par Zehentner. Celui-ci a réalisé une revue de littérature ; cinquante publications ont retrouvé l'expression de cette protéine dans le tissu mammaire, le sang et les ganglions axillaires en cas de cancer du sein (43).

Des techniques innovantes de biologie moléculaire ont récemment été mises au point permettant l'analyse du ganglion sentinelle reposant sur la détection de certains marqueurs. Celles-ci sont rapides, exhaustives, automatisées et fiables, il s'agit de :

- la procédure OSNA® (One Step Nucleic Acid Amplification) commercialisée par l'entreprise Sysmex
- la procédure Gene Search™ commercialisée par l'entreprise Veridex

1-4-2 Méthode OSNA

1. Principe de la technique

La méthode OSNA repose sur une technologie d'amplification rapide d'acide nucléique appelée RT-LAMP (Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification) automatisée, rapide, semi-quantitative, exhaustive et fiable. Pour développer cette technique, 50 ARNm (ARN messenger) marqueurs potentiels, normalement non exprimés dans les ganglions lymphatiques, ont été sélectionnés. Le taux d'expression de ces ARNm marqueurs a été évalué par QRT-PCR sur des ganglions lymphatiques histopathologiquement métastatiques ou indemnes (figure 1 et 2). La figure 1 permet de constater un taux important de la CK19 dans les ganglions métastatiques en comparaison avec des ganglions indemnes, ainsi que d'autres marqueurs comme l'ACE et la mammaglobine. De plus, selon la figure 2, le taux d'expression de la CK19 dans les ganglions métastatiques est particulièrement élevé. Ce marqueur a donc été identifié comme offrant le plus grand potentiel en terme de sensibilité.

Le test OSNA utilise 6 amorces d'ARNm différentes synthétisées spécifiquement afin d'éviter l'amplification de pseudogènes de la CK19 ou de leurs transcrits pouvant générer des résultats faussement positifs. Ces six amorces permettent l'utilisation de l'unique marqueur CK19. Par ailleurs, l'utilisation d'une méthode isothermique constante à 65°C empêche l'amplification indésirable de l'ADN génomique, évitant ainsi des résultats faussement positifs.

Le test OSNA mesure quantitativement l'expression d'ARNmessenger de la CK19, cette quantité étant corrélée à la taille du foyer métastatique. Des seuils ont ainsi pu être déterminés (figure 3). Les résultats sont présentés ainsi (++) pour les macrométastases, (+) pour les micrométastases et (–) pour l'absence de métastase.

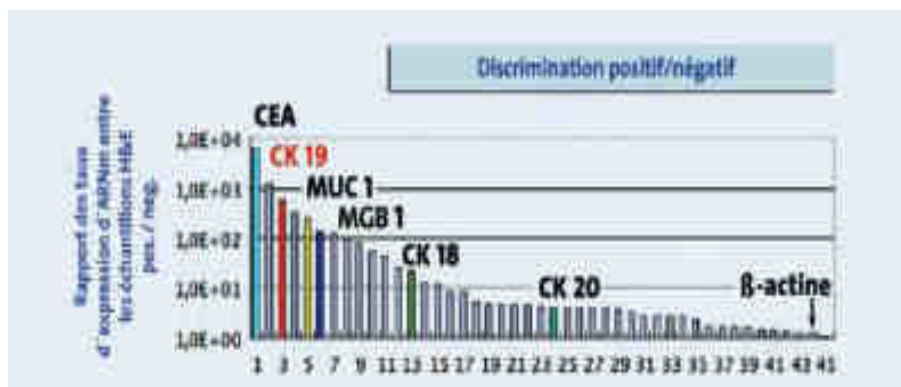


Figure 1 : Rapport des taux d'expression d'ARNm entre les ganglions positifs et négatifs.

CEA : Antigène carcinome embryonnaire, CK19 : cytokératine 19, MUC1 : mucine 1, MGB1 : mammaglobine 1, CK18 : cytokératine 18, CK20 cytokératine 20, β-actine : gène de la β-actine

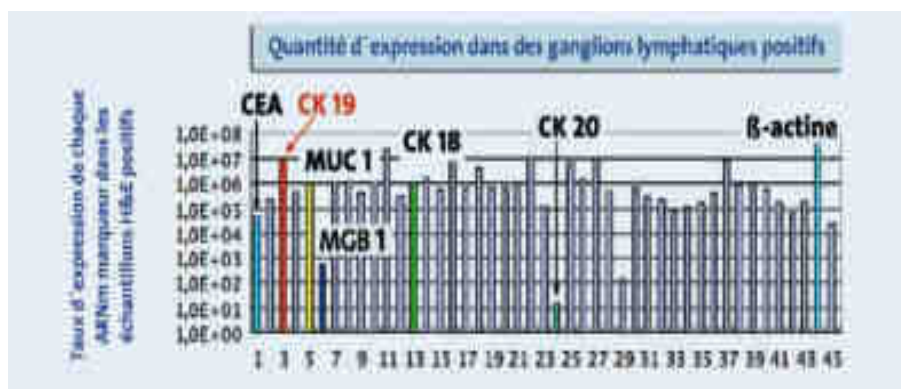


Figure 2 : taux d'expression de chaque ARNm marqueurs dans les ganglions positifs.

CEA : Antigène carcinome embryonnaire, CK19 : cytokératine 19, MUC1 : mucine 1, MGB1 : mammaglobine 1, CK18 : cytokératine 18, CK20 cytokératine 20, β-actine : gène de la β-actine

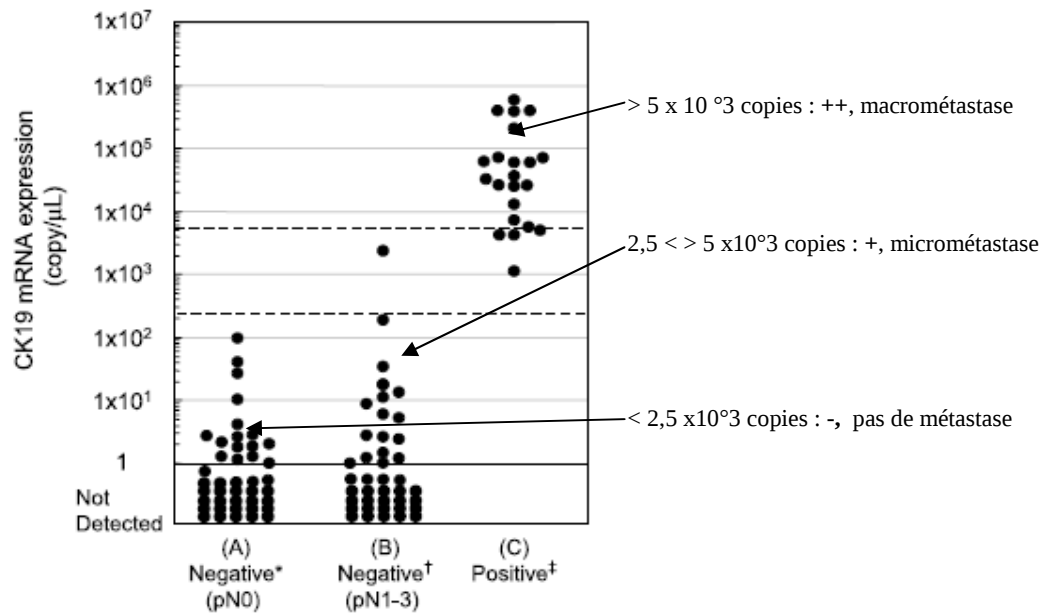


Figure 3 : seuils déterminant les différents types d'atteinte ganglionnaire selon le nombre de copies de la CK19

2. Déroulement de la procédure

Après avoir « dégraissé » et extrait le tissu extra-ganglionnaire, les ganglions sentinelles détectés sont homogénéisés manuellement en lysats tissulaires et directement soumis à amplification sans extraction préalable d'ARNmessenger. Les ganglions dans leur ensemble sont analysés (figure 4). Ceux pesant plus de 600mg sont coupés en plusieurs échantillons. Les échantillons purs et dilués au 1/10^{ème} sont analysés simultanément dans un automate appelé RD100i (figure 5) pour la présence et la quantification du gène de la CK19. La réaction d'amplification est suivie en temps réel. Les résultats sont présentés semi-quantitativement sous 3 catégories: macrométastases (++), micrométastases (+) et absence de métastase (-), et sont corrélés au nombre de copies d'ARNmessenger de la CK19. Quatre ganglions peuvent être analysés en parallèle. La détection se fait en temps réel avec un résultat en 30 minutes environ pour 1 GAS, 40 minutes pour 2 GAS, 45 pour 3 et 50 pour 4.

Dans de rares cas, un résultat positif peut être obtenu par levée d'inhibition, il est dans ce cas indiqué (+)I et non quantifiable aujourd'hui. Ce phénomène s'explique par le fait que certaines molécules non identifiées (inhibiteurs) peuvent avoir un rôle inhibiteur de la réaction

d'amplification, et de ce fait, aucune amplification ne peut avoir lieu dans l'échantillon pur. En revanche, le fait de diluer ces inhibiteurs dans l'échantillon dilué au 1/10^{ème} permet de lever cette réaction d'inhibition rendant ainsi possible une amplification dans le cas d'une expression de CK19. Le résultat est positif, toutefois, il n'est pas quantifiable et ne permet pas de conclure entre la présence de micro ou macrométastase.

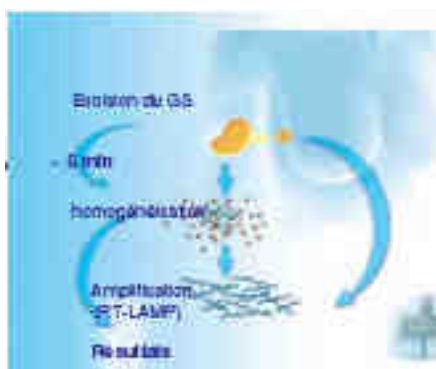


Figure 4 : procédure de la méthode OSNA

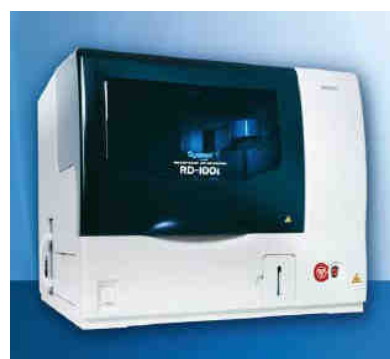


Figure 5 : automate RD100i

1-4-3 Méthode Gene Search™

Ce test détecte qualitativement l'expression de deux protéines, la mammaglobine (MG) et la cytokératine 19 (CK19). En utilisant un ARN issu de ganglions lymphatiques sentinelles disponibles de 254 sujets atteints de cancer du sein, il a été démontré que l'association de la mammaglobine et de la CK19 était optimale pour détecter une métastase ganglionnaire avec une sensibilité de 90% et une spécificité de 94% **(45)**.

Cette procédure consiste en une réaction RT-PCR en temps réel. Tout d'abord, en utilisant GeneSearch™ ARN Sample Preparation Kit, le tissu ganglionnaire est homogénéisé pour libérer les molécules d'ARN. L'ARN est purifié à partir d'homogénat de tissu et la RT-PCR est effectuée sur un échantillon d'ARN. Celle-ci se produit dans une réaction complètement isolée, homogène et en une étape. Trois marqueurs génétiques (MG, CK19 et un gène de contrôle interne [IC, porphobilinogène désaminase, PBGD]) sont inclus dans cette

réaction. Un brin d'ADN complémentaire (ADNc) est produit à partir d'un ARN messager (ARNm) en utilisant la fonction de transcription inverse d'une ADN polymérase thermostable. Le mélange réactionnel (un tampon contenant des amorces et des sondes d'ADN spécifiques au marqueur, des désoxyribonucléosides tri-phosphates [dNTP] et de l'ADN-polymérase) est chauffé pour activer l'ADN-polymérase, puis refroidi pour laisser s'hybrider spécifiquement les amorces inverses (antisens) spécifiques à la cible au niveau des ARNm cibles. Les amorces hybridées sont étendues par l'ADN-polymérase en présence d'un excès de dNTP pour former des brins d'ADNc.

Après avoir produit des ADNc, le mélange réactionnel contenant l'hybride ADNc:ARN est à nouveau chauffé pour dénaturer les brins. Le mélange réactionnel est refroidi, ce qui permet aux amorces directes (sens) spécifiques à la cible de s'hybrider et à l'activité ADN-polymérase/ADN-dépendant d'étendre le brin sens vers les zones d'amorces inverses. Ce processus d'amplification produit des séquences d'ADN double brin appelées amplicons. Les cycles suivants de dénaturation et d'hybridation/extension augmentent de manière exponentielle la quantité de ces amplicons qui sont ensuite détectés à l'aide de sondes d'ADN spécifiques à la séquence.

La production d'amplicons cibles est détectée à l'aide d'une sonde contenant une séquence d'ADN en partie spécifique à l'amplicon cible. Cette sonde est reliée à une molécule fluorescente et à une molécule qui éteint la fluorescence (quencher). La sonde hybride la séquence cible, puis est coupée par l'activité exonucléase de l'ADN-polymérase à mesure que l'extension de l'amorce dépasse la région de la sonde. Ce clivage a pour résultat de séparer la molécule fluorescente du quencher, ce qui augmente la fluorescence. En mesurant la fluorescence, il est possible de détecter la présence d'amplicons cibles.

Chaque marqueur génétique est détecté à l'aide de molécules fluorescentes ayant différentes longueurs d'ondes d'excitation et d'émission. La fluorescence de chacun des marqueurs génétiques est mesurée après chaque cycle de température. L'amplification des marqueurs génétiques est détectée en augmentant la fluorescence due à la libération du fluorophore qui se trouve à proximité du quencher. La valeur Ct est déterminée lorsque le signal fluorescent dépasse un seuil prédéfini. Si les contrôles externes sont valides, la valeur Ct de chaque marqueur génétique de l'échantillon patient est comparée aux valeurs seuil Ct spécifiques au marqueur. Si la valeur Ct d'un ou des deux marqueurs génétiques est inférieure à la valeur seuil, l'échantillon est considéré positif. Toutes les amplifications, les détections de

fluorescence et les interprétations des signaux sont effectuées automatiquement par l'appareil SmartCycler.

A la différence d'OSNA, le résultat est qualitatif, rendu comme positif (pour macro ou micro métastase), négatif (cellules tumorales isolées ou absence de toutes cellules tumorales) ou invalide. En revanche, il n'existe pas de phénomène de positif par levée d'inhibition.

1-4-4 Études de validation de la biologie moléculaire

Concernant la technique OSNA, la première étude réalisée par Tsujimoto en 2007 (46) a retrouvé un taux de concordance avec l'analyse histologique définitive à 98,2%. Pour confirmer ces résultats, des études de concordance avec la méthode histologique définitive ont été mises en place pour les deux approches moléculaires. Elles ont toutes utilisé une approche similaire avec l'analyse histologique comme standard pour la comparaison.

Pour chaque publication, les ganglions ont été coupés en quatre tranches égales a, b, c et d. Les tranches a et c ont été analysées soit par la méthode histologique de coupe en congélation avec coloration HE soit par la biologie moléculaire. Les tranches b et d ont été analysées par l'autre technique (figure 6). 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 a pu 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 moléculaire (RT-spécifiques des marqueurs CK19, FOXA1 et SPDEF et western blot CK19) ont été réalisées: le but de l'investigation des cas discordants (ICD) a consisté à déterminer si la discordance était due à un biais de localisation tissulaire (BLT). Tous les BLT ont été exclus des analyses statistiques.

Le tableau 1 regroupe les résultats des études de concordance réalisées pour la méthode OSNA®. Au total sur les 3631 GAS analysés par OSNA dans un objectif de comparaison de concordance avec l'analyse anatomopathologique, on retrouve un taux de concordance moyen avec l'examen anatomopathologique standard de **96,1%** (de 95 à 98,8%). Dans toutes les études, les cas d'analyse discordante entre la biologie moléculaire et l'analyse conventionnelle sont le plus souvent expliqués par les biais d'allocation tissulaire et notamment pour les micrométastases.

Dans l'étude prospective de validation américaine portant sur la plus importante série de 496 patientes (47), selon l'analyse anatomopathologique, on retrouve un taux d'envahissement ganglionnaire de 20,4% avec 68,8% de macrométastases et 31,2% de micrométastases. La technique OSNA a détecté 90,5% de ces macrométastases et 48,8% des micrométastases mais elle a également détecté 38 métastases supplémentaires (9 macrométastases et 29 micrométastases). Après relecture anatomopathologique, 18 de ces métastases ont été finalement identifiées (9 macro et 9 micro). Dans cette étude, un examen extemporané par empreinte cytologique a également été réalisé sur 532 ganglions et comparé aux performances diagnostiques de la technique OSNA et aux résultats histologiques définitifs. En extemporanée la sensibilité d'OSNA était de 85,5% dans la détection de l'atteinte des ganglions, significativement supérieure à celle de la cytologie par empreinte (63%, $p=0,0018$).

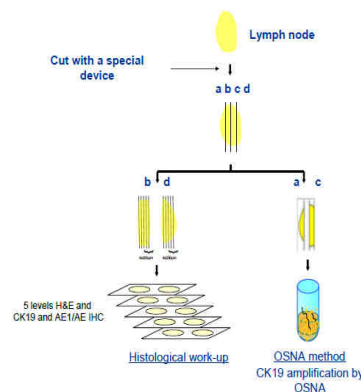


Figure 6 : protocole de l'étude du ganglion sentinelle

Référence	Année	Nombre patientes	Nombre ganglions	BLT	Histo+/ OSNA+	Histo-/ OSNA-	Histo+/ OSNA -	Histo-/ OSNA +	Concordance	SSB	SPE	VPP	VPN	Faux positifs	Faux négatifs
Tsujimoto (46)	2007		325	2	43	276	2	2	98.2%	91.6%	99.3%	95.6%	99.3%	0.7%	4.4%
Visser (48)	2008	32	346	7	61	267	3	8	96.8%	95.3%	94.7%	88.4%	98.9%	1.1%	4.7%
Schem (49)	2008	93	343	13	104	211	0	15	91.8%	98.1%	90.8%	87.4%	100%	0%	0%
Tamaki 1 (50)	2009	34	124	0	19	101	1	3	96.8%	95%	97.1%	86.4%	99%	1%	5%
Tamaki 2 (50)	2009	164	450	10	70	348	2	20	93,1%	87.7%	94.3%	77.8%	99.4%	0.6%	2.8%
Bernet (51)	2009	Np	174	7	33	138	1	2	98.3%	97.1%	98.6%	94.3%	99.3%	1.9%	8.3%
Feldman (47)	2010	496	1044	19	107	868	30	20	95.8%	82.7%	97.7%	84.3%	96.7%	3.3%	21.9%
Snook (52)	2010	204	412	17	66	313	6	10	95.9%	91.7%	96.9%	86.8%	98.1%	0.7%	2.9%
Le Frère-Belda (53)	2011	233	503	22	51	413	5	12	96.5%	91.1%	97.2%	81%	98.8%	1.2%	8.9%
Au total			3631	97					96.1%	91.7%	97%	85.8%	98.3%	1.7%	8.3%

Tableau 1: Résultats des analyses histologiques et méthode OSNA des différentes séries

BLT : Biais de localisation tissulaire, SSB : sensibilité, SPE : spécificité, VPP : valeur prédictive positive, VPN : valeur prédictive négative

La technique Gene Search™ a eu le marquage CE en juin 2006 et l'agrément de la FDA (Food and Drug Administration) en juillet 2007 dans le cadre de la détection de métastases ganglionnaires des cancers du sein, à la condition que la moitié du ganglion soit examinée en méthode traditionnelle.

Les études de validation regroupées dans le tableau 2 retrouvent une concordance satisfaisante avec l'analyse anatomo-pathologique traditionnelle. Cependant depuis 2009, la commercialisation de Gene Search™ a été stoppée pour des raisons de manque de lisibilité commerciale selon l'analyse du Dow Jones Newswire.

Référence	Année	Nombre patientes	Nb de ganglions analysés	SSB	SPE	Concordance avec histologie définitive
Julian (54)	2007	416	Np	87.6%	94.2%	92%
Viale (55)	2007	293	293	77.8%	95%	90.8%
Martinez (56)	2008	82	Np	88.9%	95.7%	95.2%
Mansel (57)	2009	82	124	92%	97%	96%
Veys (58)	2009	367	Np	89%	94.5%	93.5%
Tafe (59)	2009	59	Np	88.9%	93.5%	86.4%
Cutress (60)	2009	254	491	96%	95%	95%
Baranzelli (61)	2009	83	157	92%	98%	Np

Tableau 2 : Résultats des analyses histologiques et méthode qRT-PCR Gene Search des différentes séries
Np : non précisé, SSB : sensibilité, SPE : spécificité

1-4-5 Diffusion de la méthode

Le tableau 3 fait état de la diffusion de la technique en Europe à la date de février 2012 et des protocoles d'utilisation. Pour les analyses anatomopathologiques, il existe une obligation réglementaire de conserver un historique des pièces. En ce qui concerne les lysats après analyse OSNA, il n'existe pas de recommandation et chaque centre peut décider de sa technique de conservation. L'analyse de l'intégralité du ganglion et la conservation du lysat représentent la principale procédure réalisée par la majorité des pays européens. Excepté en France où il est réalisé une tranche centrale pour la conservation historique.

Pays	Nb de site utilisant OSNA en routine	Protocole			Total des GAS	Total des patientes	Nb de GAS par patiente	Taux de (+) / (++)	Taux d'atteinte métastatique par patiente
		Tranche centrale	4 tranches	GAS entier					
Italie	17	478	1020	2000	3498	2676	1.3	53 : 47	24.7%
France	13	4249	306	1393	5948	3273	1.8	58 : 42	26.5%
Royaume-Uni	15	0	864	3760	4624	2490	1.9	46 : 54	32.8%
Espagne	84	531	280	18513	19324	10508	1.8	48 : 52	31.9%
Autres	10	470	222	754	1446	737	2.0	49 : 51	31.6%
Total en Europe	139	5728	2692	26420	34840	19684	1.8	50 : 50	30.2%

Tableau 3 : Situation de la diffusion de la technique OSNA en février 2012, données Sysmex

2- MATERIEL ET METHODE

2-1 Caractéristiques de l'étude

Cette étude comporte deux parties :

- une première partie prospective unicentrique réalisée à l'Institut de Cancérologie de l'Ouest René Gauducheau Saint Herblain entre février 2010 et avril 2012 concernant toutes les patientes ayant bénéficié de la méthode OSNA.
- une deuxième partie comparant les résultats de cette série prospective à une population contrôle, rétrospective, de patientes ayant bénéficié d'une prise en charge anatomopathologique de leurs ganglions sentinelles. Elle provient de la base de données informatisée BERENIS (Base d'Evaluation et de REcherche du Néoplasme Infiltrant et In Situ) regroupant les données à la fois cliniques et paracliniques du diagnostic, du traitement, et du suivi des patientes traitées au Centre René Gauducheau pour un carcinome mammaire depuis 1985.

Les critères d'inclusion sont identiques pour les deux études. Il s'agit de toutes les patientes présentant un carcinome mammaire et ayant une indication à la réalisation d'un ganglion sentinelle selon les recommandations de Saint-Paul-de-Vence 2011 (29).

- Pour les carcinomes infiltrantes :

- toute tumeur T1 et T2 de moins de 3 cm,
- unifocale,
- sans adénopathie axillaire clinique suspecte

- Pour les carcinomes in situ :

- toute indication de mastectomie. S'il est mis en évidence à l'analyse anatomopathologique définitive du carcinome invasif ou micro-invasif, la réalisation du GAS sera ensuite impossible
- les situations « à risque » de découverte d'une (micro-) invasion à l'examen anatomopathologique définitif ; carcinome in situ (CIS) de haut grade, CIS étendus (> 20 mm) et en cas de suspicion de micro-invasion sur l'imagerie ou la micro biopsie préopératoire.

Les critères d'exclusion, identiques aussi entre les deux études, sont :

- les tumeurs infiltrantes de plus de 3 cm
- la réalisation de chimiothérapie néo-adjuvante

- les antécédents de chirurgie mammaire
- les patientes ayant une allergie au bleu patente rendant impossible la détection colorimétrique du ganglion sentinelle.

2-2 Prise en charge des patientes

Globalement, la prise en charge des patientes était identique dans les deux parties de l'étude.

2-2-1 Bilan pré-opératoire

Toutes les patientes incluses ont préalablement bénéficié d'une microbiopsie échoguidée ou d'une macrobiopsie sous stéréotaxie permettant de poser le diagnostic de néoplasme du sein. Ces tumeurs ont toutes une présentation clinique et radiologique uni focale à l'aide d'un bilan sénologique avec mammographie, échographie voire IRM dans certains cas (essentiellement pour le type histologique lobulaire).

2-2-2 Prise en charge chirurgicale et anatomopathologique

Les modalités de la chirurgie sont décidées en fonction des conclusions radiologiques et de l'examen clinique réalisé par le chirurgien et validées en réunion de concertation préthérapeutique. La chirurgie conservatrice consiste en une zonectomie, tumorectomie, quadrantectomie ou pamectomie. Une chirurgie conservatrice avec oncoplastie est parfois réalisée. La chirurgie radicale correspond à une mastectomie accompagnée ou non d'une reconstruction mammaire immédiate, soit par lambeau du grand dorsal, soit par pose de prothèse définitive ou d'expandeur.

Sur le plan axillaire, il est réalisé une détection combinée du ou des ganglions sentinelles (par les méthodes isotopique et colorimétrique). Les prélèvements ganglionnaires sont dégraissés en salle d'intervention puis adressés en biologie moléculaire pour l'analyse OSNA. Selon les résultats, ce geste est complété d'un curage axillaire limité aux deux premiers étages de Berg.

Toutes les lames histologiques sont analysées selon la classification de l'OMS et selon le score de Scarff-Bloom-Richardson (SBR). La taille tumorale est définie par la taille de la lésion principale selon les recommandations de l'AJCC (62). L'exérèse est jugée complète si la limite de résection la plus proche est à plus d'1 mm de la tumeur pour le carcinome infiltrant. Elle est incomplète si la tumeur est proche $\leq$ à 1mm ou atteint la section chirurgicale. Il en est de même pour le carcinome in situ avec une limite de résection à plus de 3mm. De plus, il est déterminé la sensibilité aux récepteurs hormonaux à l'œstrogène et à la progestérone ainsi qu'à l'HER2 (Human epidermal growth factor receptor). Enfin, il est noté l'éventuelle présence d'embolies vasculaires et lymphatiques.

Concernant l'analyse du/des ganglions sentinelles des patientes issues de la base Béréniis, l'analyse a été réalisée par les méthodes anatomopathologiques traditionnelles. Tout d'abord, il a été pratiqué une analyse extemporanée par empreinte cytologique. Puis au décours de cette analyse, si le résultat était positif, le geste opératoire était complété par un curage axillaire. Les ganglions prélevés ont bénéficié ensuite tous d'une analyse définitive avec des coupes sériées de 250 μ m et une coloration Hématoxyline-Eosine (HE) complétée en cas de négativité par une analyse immunohistochimique. Puis à partir de février 2010, la biologie moléculaire méthode OSNA a été développée. Tout d'abord, une phase d'implémentation clinique a été mise en place dans le centre entre février 2010 et janvier 2011 où il a été prélevé une tranche centrale de 1 mm qui était ensuite fixée et incluse en paraffine pour l'analyse histologique en cas de négativité d'OSNA. Depuis cette date, le/les ganglions sont confiés en totalité à la biologie moléculaire pour l'analyse OSNA. Dans le laboratoire de biologie moléculaire, il y est réalisé la pesée du/des ganglion(s), le broyage du/des ganglion(s), la préparation du broyat et de ses dilutions et l'amplification sur la machine. Le broyat est ensuite conservé et stocké. Le résultat est ensuite rendu par téléphone au chirurgien directement en salle d'intervention, lui permettant d'adapter son geste chirurgical.

2-2-3 Traitements adjuvants

L'indication des traitements adjuvants (radiothérapie, chimiothérapie et hormonothérapie) est décidée selon les recommandations, validées en réunion de concertation pluridisciplinaire postopératoire (RCP).

1. La radiothérapie

En l'absence de chimiothérapie adjuvante, la radiothérapie est débutée au plus tard dans les 12 semaines après la chirurgie. Après une chimiothérapie adjuvante, la radiothérapie est effectuée dans les 5 semaines après la fin de la chimiothérapie et dans les 6 mois après la chirurgie.

Après une chirurgie conservatrice, il y a une irradiation systématique de la glande (sauf pour les carcinomes in situ de bas grade) avec un surdosage du lit tumoral pour les carcinomes infiltrants.

En cas de chirurgie radicale, il est proposé une irradiation de la paroi thoracique si :

- taille du foyer supérieure à 30mm
- atteinte ganglionnaire
- si pN0 et 1 critère comme emboles, carcinome in situ extensif, multicentricité

L'irradiation du creux sus-claviculaire est réalisée pour toute atteinte ganglionnaire macrométastatique.

Les doses délivrées sont de 50 Grays réparties en 25 séances, avec un complément d'irradiation (« boost ») pouvant varier de 10 à 20 grays (le plus souvent 15 gy).

2. La chimiothérapie et hormonothérapie

L'indication des traitements adjuvants systémiques (chimiothérapie et hormonothérapie) est décidée selon les recommandations validées en RCP postopératoire.

La chimiothérapie est proposée pour toute atteinte ganglionnaire ou s'il est présent des facteurs de mauvais pronostic. Celle-ci est à base d'anthracycline et de taxanes.

L'hormonothérapie est systématiquement proposée pour les tumeurs infiltrantes hormonosensibles avec tamoxifène pour les patientes non ménopausées et anti-aromatase pour les femmes ménopausées.

2-3 Objectifs et paramètres étudiés

2-4-1 Objectifs

L'objectif principal est d'étudier les performances diagnostiques de la méthode d'analyse OSNA comparées à celles des méthodes traditionnelles anatomopathologiques extemporanées et définitives.

Les objectifs secondaires sont d'étudier :

- le temps nécessaire à l'analyse moléculaire du ou des ganglions
- le taux d'envahissement ganglionnaire dans le curage axillaire complémentaire selon le type d'envahissement initial du ganglion sentinelle et selon la méthode d'analyse utilisée.

2-4-2 Paramètres étudiés

Les paramètres étudiés concernent :

- Les caractéristiques générales de la population à savoir l'âge, l'indice de masse corporelle des patientes, la classification TNM, la taille tumorale radiologique estimée au bilan sénologique.
- Les caractéristiques anatomopathologiques avec la taille histologique p(T) représentée par la taille de la lésion principale, le type histologique, la composante in situ, l'atteinte ganglionnaire p(N), le grade histopronostique SBR, le statut des récepteurs hormonaux aux oestrogènes et à la progestérone (seuil de positivité de 10%), le statut HER 2 (positif pour marquage intense +++ en immunohistochimie simple et marquage modéré ++ avec FISH positive), et la présence d'emboles vasculaires.
- Le nombre de ganglion sentinelle prélevé et le nombre d'analysé. Les résultats par ganglion et le résultat final.
- L'indication d'un curage axillaire complémentaire, le nombre de ganglion prélevé et le nombre de ganglion atteint.
- Le type d'intervention initiale puis l'indication ou non de reprise chirurgicale du sein.
- Le délai d'attente des résultats ganglionnaires en extmporané. Celui-ci a été défini comme étant le délai d'attente entre la fermeture du site opératoire et l'obtention des résultats. Ce temps traduisant un allongement du temps d'occupation de salle. Il a été calculé à partir du temps d'intervention totale, du temps d'analyse et enfin la notion de départ pour l'analyse

du/des ganglions sentinelles dans les quinze minutes après l'incision (à plus ou moins cinq minutes).

2-4 Comparaison des deux séries

Chaque dossier de patiente ayant eu une analyse OSNA a été apparié avec deux dossiers de patiente avec analyse histologique classique. Cet appariement a été basé sur les quatre facteurs d'envahissement ganglionnaire principaux précédemment cités qui sont l'âge de la patiente, le type histologique de la tumeur, sa taille et son grade. Pour tous les cancers infiltrants, l'appariement a été effectué à deux ans près, selon le type histologique précis, à un millimètre près pour la taille de la lésion principale et selon le grade de la tumeur. Pour les carcinomes canaux in situ, il a été réalisé le même travail mais à 5mm près pour la taille du foyer carcinomateux. Les deux populations sont ainsi strictement comparables sur leur pronostic d'envahissement métastatique ganglionnaire.

2-5 Analyse statistique

Les variables qualitatives et quantitatives ont été présentées respectivement, pour la population globale et par groupe d'intérêt, sous forme de nombre, pourcentage et sous forme de médiane, minimum, maximum, moyenne et écart-type. La comparaison entre les groupes d'intérêt a été faite grâce au test exact de Fisher. Tous les tests sont bilatéraux et le seuil de significativité est fixé à 0,05.

2- RESULTATS

3-1 Population étudiée

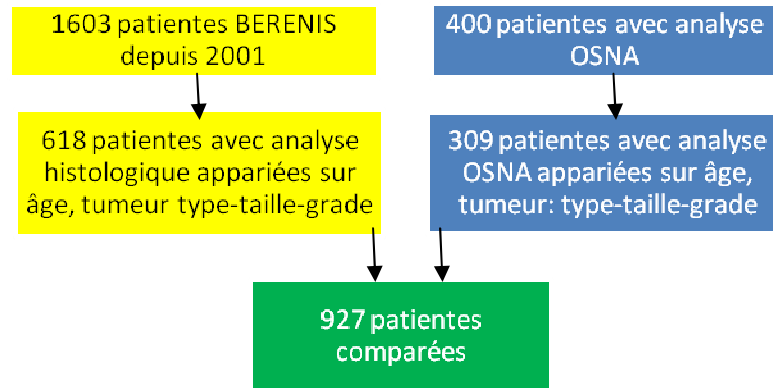


Figure 7 : Description des populations

Quatre-cents patientes ont bénéficié d'une analyse du ganglion sentinelle par la technique OSNA de février 2010 à avril 2012. L'intégralité de cette population n'a pu être retenue dans l'étude comparative du fait de l'absence de possibilité d'appariement avec la population BERENIS. Il a parfois été impossible d'apparier sur les âges extrêmes, les types histologiques plus rares ou lorsqu'une des données était manquante de la base. 309 patientes ayant bénéficié de la méthode OSNA ont pu être appariées avec 618 patientes de la base Bérénis.

3-2 Caractéristiques générales de la population

Caractéristiques générales de la population	Etude comparative		
	OSNA 400 patientes	OSNA 309 patientes	Histologie 618 patientes
Caractéristiques globales			
- Age moyen (année)	59 (29-88)	58 (29-88)	58 (31-89)
- IMC moyen(kg/m ²)	24 (15-49)	24 (15-49)	NP
Caractéristiques pré-opératoire de la tumeur			
- Clinique			
o T0	245 (61,25%)	185 (60%)	293 (47,3%)
o T1	138 (34,5%)	114 (36,9%)	287 (46,3%)
o T2	17 (4,25%)	10 (3,23%)	38 (6%)
- Mesure radiologique en mm	16 (3-100)	15 (4-80)	NP
Type d'intervention chirurgicale réalisée			
- Chirurgie conservatrice	279 (69,75%)	224 (72,5%)	525 (85%)
- Oncoplastie	70 (17,5%)	53 (17%)	NP
- Mastectomie simple	33 (8,25%)	21 (6,8%)	93 (15%)
- Mastectomie + reconstruction immédiate	18 (4,5%)	11 (3,5%)	NP
Caractéristiques anatomopathologiques			
- Type histologique du foyer principal			
o CCI	287 (71,75%)	250 (81%)	500 (81%)
o CLI	40 (10%)	33 (8,8%)	54 (8,8%)
o CI mixte (CCI+CLI)	6 (1,5%)	1 (0,3%)	18 (0,3%)
o CCIS	39 (9,75%)	16 (5,8%)	36 (5,8%)
o CI tubuleux	14 (3,5%)	9 (3%)	18 (3%)
o Autres	14 (3,5%)	0 (0%)	0 (0%)
- Taille moyenne de la lésion principale en mm	14,36	14 (2-80)	13,3 (2-75)
- Grade SBR de la tumeur pour CI			
o I	118 (29,5%)	105 (34%)	210 (34%)
o II	192 (48%)	153 (49,5%)	309 (50%)
o III	50 (12,5%)	34 (11%)	65 (10,6%)
- Grade de la tumeur pour CCIS			
o Bas	4 (1%)	1 (0,3%)	2 (0,3%)
o Intermédiaire	13 (3,25%)	6 (1,9%)	12 (2%)
o Haut	22 (5,5%)	10 (3,2%)	20 (3,2%)
- Expression Récepteurs hormonaux			
o Œstrogène positif	347 (86,75%)	278 (90%)	550 (89%)
o Progestérone positif	299 (74,75%)	249 (80,6%)	457 (74%)
- Expression HER2	20 (5%)	13 (4,2%)	35 (5,7%)
- Présence embolies vasculaires	53 (8,75%)	30 (9,7%)	61 (9,9%)
Reprise chirurgicale			148 (24%)
- Reprise des berges	18 (4,5%)	17 (5,5%)	NP
- Curage axillaire secondaire	2 (0,5%)	2 (0,6%)	108 (17,5%)
- Mastectomie	24 (6%)	18 (6%)	NP
Mastectomie+ reconstruction	9 (2,25%)	6 (1,9%)	NP
Traitements adjuvants			
- Chimiothérapie	148 (37%)	118 (38,2%)	170 (27,5%)
- Radiothérapie	339 (84,75%)	270 (87,4%)	562 (91%)
- Hormonothérapie			
o Tamoxifène	105 (26,25%)	93 (30%)	217 (35,1%)
o Anti-aromatase	232 (58%)	182 (59%)	286 (46,3%)
o Autre	1 (0,25%)	1 (0,3%)	26 (4,3%)

Tableau 4 : Caractéristiques des populations étudiées dans l'étude prospective OSNA et comparative.

IMC : indice de masse corporelle, CCI : carcinome canalaire infiltrant, CLI : carcinome lobulaire infiltrant, CCIS : carcinome canalaire in situ, CI : carcinome infiltrant, NP : non précisé

3-3 Etude prospective sur 400 patientes

3-3-1 Performances diagnostiques globales

Sur les quatre-cents patientes incluses, 804 ganglions ont été prélevés et 750 analysés par la méthode OSNA. Cinquante-trois ganglions ont pesé moins de 50mg et ont été par conséquent trop petits pour l'analyse moléculaire. Ils ont été adressés en anatomopathologie. Un seul ganglion a été jugé trop gros, de 30*10mm et adressé en histologie. Il a alors été mis en évidence une macrométastase en examen extemporané et un curage axillaire a été réalisé dans le même temps.

Il est déterminé un taux d'**envahissement ganglionnaire global de 27,5% (macrométastases et micrométastases)**. Plus précisément, il est mis en évidence **13,5% de macrométastases, 8,75% de micrométastases et 5,25% de ganglions positifs par levée d'inhibition**.

Dans 27,5% des cas soit chez 109 patientes, le geste opératoire a été complété d'un curage axillaire lors de la même intervention. Il est noté 5 situations (1,25%) où le curage axillaire a été secondaire. Quatre cas lors de la phase d'implémentation clinique où l'analyse OSNA a été rendue négative et l'analyse histologique a détecté une micrométastase sur la tranche. Se pose alors la question du biais de localisation tissulaire. La dernière patiente a présenté à l'analyse histologique définitive une tumeur multifocale mixte lobulaire et canalaire infiltrantes.

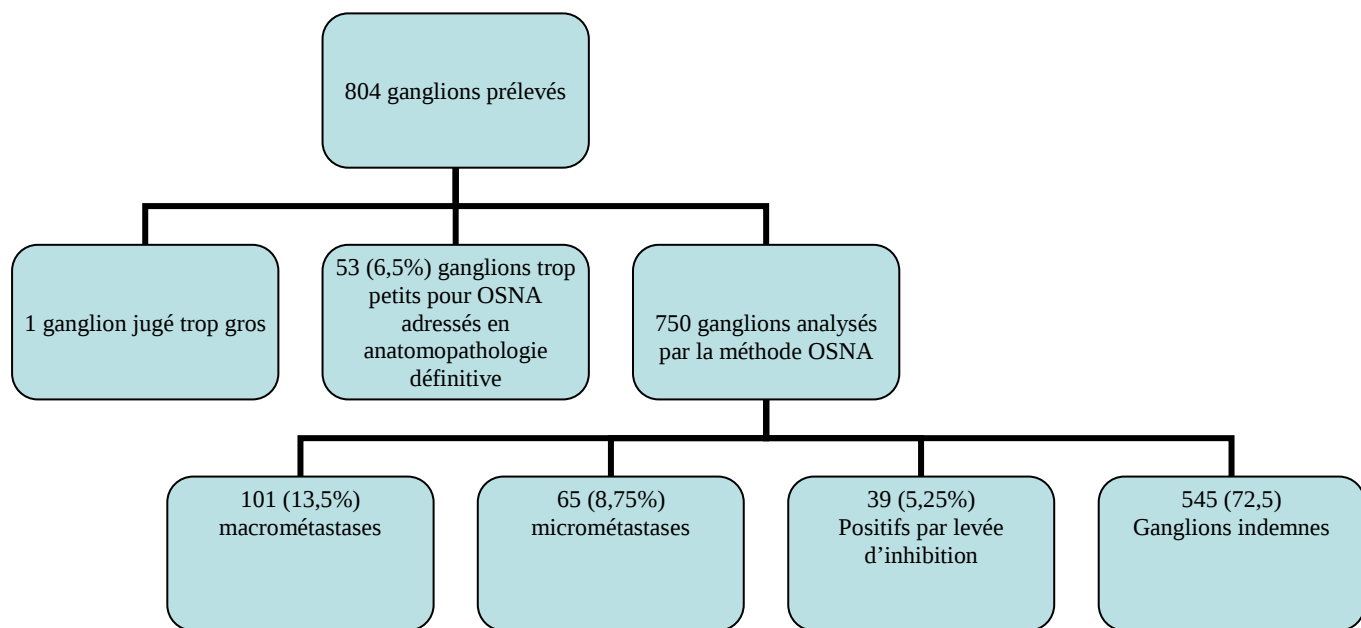


Figure 8 : Répartition des 804 ganglions prélevés

3-3-2 Performances diagnostiques selon le type histologique

L'étude des performances de détection de métastases selon les types histologiques n'a **pas** permis de mettre en évidence **de différence significative** en ce qui concerne les carcinomes infiltrants canaux et lobulaires, ni les carcinomes in situ ($p=0,71$ pour le tableau 5). Pour les autres types histologiques, les effectifs sont trop réduits pour être interprétables.

Type histologique	Nb de patientes	Nb et taux (%) d'atteinte ganglionnaire globale	Nb et taux (%) d'atteinte ganglionnaire par macro-métastases	Nb et taux (%) d'atteinte ganglionnaire par micro-métastases	Nb et taux (%) d'atteinte ganglionnaire par positif par levée d'inhibition	Nb et taux (%) de ganglions négatifs
CCI	288	83 (28,7%)	41 (14,2%)	26 (9%)	16 (5,5%)	205 (71,2%)
CCI+CLI	6	2 (33,2%)	1 (16,6%)	0 (0%)	1(16,6%)	4 (66,6%)
CLI	40	13 (32,5%)	10 (25%)	3 (7,5%)	0 (0%)	27 (67,5)
CCIS	38	7 (18%)	0 (0%)	5 (13%)	2 (5%)	31(82%)
CI tubuleux	14	4 (28,3%)	2 (14,3%)	1 (7%)	1 (7%)	10 (71,5%)
Autres*	14	1 (7%)	0 (0%)	0 (0%)	1(7%)	13 (93%)
Total	400	27,5%	13,5%	8,75%	5,25%	72,5%

Tableau 5 : Performances diagnostiques selon les types histologiques.

Nb : nombre de patientes, CCI : carcinome canalaire infiltrant, CLI : carcinome lobulaire infiltrant, CCIS : carcinome canalaire in situ, CI : carcinome infiltrant.

* autres : carcinomes colloïde, micropapillaire et à stroma lymphoïde.

3-3-3 Délai d'attente des résultats

La durée moyenne d'analyse d'un ganglion par la méthode OSNA est de 40 minutes, et respectivement de 45, 50 et 57 minutes pour 2, 3 et 4 ganglions. Ce temps représente la durée comprise entre le moment où le prélèvement quitte la salle d'intervention et celui où est rendu le résultat téléphonique.

Pour tous les types de chirurgie du sein confondus, il existe un délai d'attente après la fermeture du site opératoire dans près de 50% des cas. Cette attente s'élève à quinze minutes pour des GAS prélevés dans les 10 à 15 minutes après le début de la chirurgie. Si les GAS sont détectés 20 minutes après le début d'intervention, cette attente après la fermeture augmente de 20 minutes. Plus le nombre de GAS adressés au laboratoire augmente, plus le risque d'attente augmente et plus les minutes d'attente s'élèvent, jusqu'à 30 minutes pour quatre ganglions.

Il est réalisé quatre types d'intervention (chirurgie conservatrice, oncoplastie, mastectomie ou mastectomie avec reconstruction immédiate). Dans près de 70% des cas, il s'agit d'une chirurgie conservatrice qui en moyenne dure 55 minutes de l'incision à la fermeture (temps extrêmes 20-140 minutes). Il existe un délai d'attente dans presque un cas sur deux de 15 minutes pour obtenir les résultats de la biologie moléculaire. Cela allonge alors d'autant le temps d'occupation de salle. Et ce, que les GAS soient détectés dans les 10, 15 ou 20 minutes après le début de l'intervention.

Les oncoplasties représentent 17,5% des interventions avec une durée moyenne de 55 minutes (temps extrêmes 29-130 minutes). Dans plus de 50% des cas, il existe une attente entre 12 et 20 minutes selon que les GAS sont détectés dans les dix à vingt minutes.

Lorsqu'il est réalisé une mastectomie simple, dans un tiers des cas, le délai d'attente du résultat en fin d'intervention est de 11 minutes pour une chirurgie en moyenne de 67 minutes.

Enfin, près de 5% des patientes ont bénéficié d'une mastectomie avec reconstruction mammaire immédiate par prothèse, expandeur ou lambeau du grand dorsal. Ces chirurgies durent en moyenne 120 minutes (temps extrêmes 50-270 minutes). L'attente des résultats de la biologie moléculaire n'excède pas 6% des cas avec entre 5 et 10 minutes d'attente réelle selon que les GAS ont été détectés à 15 ou 20 minutes après l'incision.

Au total, l'attente des résultats concerne essentiellement les chirurgies courtes avec les chirurgies conservatrices et les oncoplasties. Le délai d'attente des résultats est en moyenne de 15 minutes. Dans un cas sur trois, celui-ci est prolongé pour les mastectomies.

3-4 Etude comparative

3-4-1 Performances diagnostiques globales

Concernant le taux d'envahissement ganglionnaire global, il est retrouvé une **différence statistiquement significative entre l'analyse OSNA et l'examen extemporané par empreinte cytologique ($p < 0,000001$)** avec respectivement détection de métastases dans 29,5% versus 9,9%. En revanche, il n'existe pas de différence significative entre la méthode OSNA et l'analyse histologique définitive sur le taux d'envahissement global ($p = 0,21$) avec respectivement 29,5% versus 25,7% de mise en évidence de métastases.

Les résultats OSNA positifs par levée d'inhibition sont regroupés avec les macrométastases. Les positifs avec cellules isolées à l'histologie définitive sont rassemblés avec les micrométastases. Dans l'étude des types d'envahissement métastatique en macrométastase et micrométastase, il n'est pas mis en évidence de différence significative (respectivement $p = 0,09$ et $p = 0,64$) entre les deux techniques d'analyse.

Nombre de patients	OSNA	Examen extemporané	Examen histologique définitif	Comparaison OSNA/ Examen extemporané p	Comparaison OSNA/ histologie définitive P
Macrométastases	62 45 macro 17 +I	61	92	<0.000001	0,09
Micrométastases	29		62 micro 6 5 CI 7		0,64
Résultat négatif	218	557	459		0,63
Total	309	618	618		
Envahissement axillaire global (%)	29,5%	9,9%	25,7%	<0,000001	0,21 NS

Tableau 6 : Performances diagnostiques de la méthode OSNA comparée avec celles de l'anatomopathologie.
+I : positif par levée d'inhibition, CI : cellules isolées

3-4-2 Performances diagnostiques selon le type histologique

S'il est comparé isolément le taux d'envahissement ganglionnaire selon le type histologique, il n'est pas noté de différence diagnostique pour les carcinomes canaux et lobulaires (respectivement $p=0,60$ et $0,81$) entre la biologie moléculaire méthode OSNA et l'histologie définitive par coloration H&E +/- immunohistochimie. Les données ne sont pas comparables lorsque ces deux types histologiques sont présents sur la même tumeur du fait d'une trop petite population. Il en est de même pour les types histologiques plus rares qui sont les carcinomes colloïdes, micropapillaires et à stroma lymphoïde.

En revanche, la biologie moléculaire méthode OSNA met en évidence significativement plus de métastases ganglionnaires que l'analyse cytologique par empreinte en extemporané sur tous les types histologiques hormis les canaux et lobulaires mixtes et les types plus rares. En effet, les effectifs de ces populations étant trop faibles pour être comparés. Les résultats sont regroupés dans le tableau 7.

En ce qui concerne **les carcinomes canaux in situ, il est retrouvé significativement plus de métastases ganglionnaires avec la méthode OSNA (22,2%) qu'avec l'histologie traditionnelle (2,8%) ($p=0,038$)**. En effet, dans notre population OSNA, il a été mis en évidence quatre métastases ; deux micro et deux positifs par levée d'inhibition contre une micrométastase dans le groupe histologie. Le tableau 8 regroupe les caractéristiques des patientes ayant présenté un envahissement ganglionnaire avec un carcinome canalaire in situ. Il s'agissait pour trois d'entre elles de patientes en moyenne de 55 ans présentant une tumeur de haut grade entre 30 et 45mm, n'exprimant pas les récepteurs hormonaux. Le dernier cas a été celui d'une femme de 69 ans, avec une tumeur de grade intermédiaire de 15mm sensible à l'œstrogène et à la progestérone sans nécrose. Pour aucune de ces tumeurs il n'a été retrouvé de composante microinvasive ou invasive à l'histologie. Tous les curages complémentaires réalisés ont été indemnes de métastase.

En ce qui concerne **les carcinomes tubuleux, il est mis en évidence une différence significative de détection de métastase ganglionnaire en faveur de la biologie moléculaire méthode OSNA avec 33% de métastases contre 0% avec l'histologie ($p=0,023$)**. Le tableau 8 présente les caractéristiques de celles-ci, avec 1 cas de macrométastase, un de positif par levée d'inhibition et un cas de micrométastase. Ces tumeurs mesuraient toutes plus de 1cm et comportaient des récepteurs hormonaux. Dans aucun cas il n'a été retrouvé d'envahissement métastatique dans le curage complémentaire.

Type histologique	Type d'analyse	Nombre de patientes	Taux d'atteinte en macrométastases et +I	Taux d'atteinte en micrométastases et CI	Taux de GAS négatif	Taux global d'envahissement ganglionnaire	Significativité <i>P</i> Histologie	Significativité <i>P</i> Extempo
Tout type histologique	OSNA	309	62(45 macro, 17+I)	29	218	29,5%	0,21	<0,000001
	Histologie	618	92	67(62 micro, 5 CI)	465	25,7%		
	Extemporane	617			562	9,9%		
CCI	OSNA	251	49 (35 macro, 14 +I)	24	178	29,1%	0,60	<0,000001
	Histologie	498	78	57(55 micro, 2 CI)	363	27,1%		
	Extemporane	497			444	10,7%		
CCI+CLI	OSNA	1	0	0	1	NC	NC	NC
	Histologie	2	0	0	2	NC		
	Extemporane	2			2	NC		
CLI	OSNA	27	8 (8 macro)	2	17	37%	0,814	0,008
	Histologie	68	14	9 (6 micro, 3 CI)	45	33,8%		
	Extemporane	68			60	11,8%		
CCIS	OSNA	18	2(+I)	2	14	22,2%	0,038	0,010
	Histologie	36	0	1(1 micro)	35	2,8%		
	Extemporane	36			36	0%		
CI tubuleux	OSNA	9	2(1 macro, 1+I)	1	6	33,3%	0,023	0,023
	Histologie	20	0	0	20	0%		
	Extemporane	20			20	0%		
Autres	OSNA	2	0	0	2	NC	NC	NC
	Histologie	4	0	0	4	NC		
	Extemporane	4			4	NC		

Tableau 7 : Performances diagnostiques de la méthode OSNA comparée avec celles de l'anatomopathologie selon le type histologique.

+I : positif par levée d'inhibition, CI : cellules isolées, NC : non comparable, Autres : carcinomes colloïdes, micropapillaires et à stroma lymphoïde

Type histologique de tumeur	Age patiente	Taille tumeur en mm	Grade	RO et RP	Nb de GAS envahis (et type d'envahissement)	Nb de ganglions envahis dans curage
CCIS	56	30	Haut	RO-, RP-	2 (2 micro)	0/6
	57	40	Haut	RO-, RP-	2 (1 micro, 1 +I)	0/8
	53	45	Haut	RO-, RP-	1 (1 micro)	0/5
	69	15	Intermédiaire	RO+, RP+	1 (1 +I)	0/5
CI tubuleux	61	11	1	RO+, RP+	1 (1 macro)	0/7
	50	10	1	RO+, RP+	2 (1 micro, 1 +I,)	0/9
	47	20	1	RO+, RP+	1 (1 micro)	0/9

Tableau 8 : Caractéristiques des patientes présentant des GAS positifs avec la méthode OSNA avec un CCIS et CI tubuleux.

CCIS : carcinome canalaire in situ, CI : carcinome invasif, +I : positif par levée d'inhibition, micro ; micrométastase, macro ; macrométastase

3-4-3 Taux de reprise chirurgicale secondaire pour curage axillaire

Le taux de reprise secondaire pour curage axillaire est de 17,5% avec l'analyse histologique classique et de 0,6% avec la méthode OSNA. Ce taux est dû dans 85% des cas à un échec de l'analyse per-opératoire et dans 15% des cas à une cause tumorale. C'est-à-dire, une tumeur démontrée multifocale ou multicentrique à l'analyse définitive. Les échecs de l'analyse extemporanée ont concerné 5 (4,6%) cas de cellules isolées, 55 (50%) cas de micrométastases et 33 (30%) de macrométastases.

Les deux patientes ayant eu une indication de curage secondaire suite à une analyse OSNA négative sont issues de la phase d'implémentation clinique où une tranche centrale de 1mm était adressée en anatomopathologie. Sur cet échantillon, on retrouve une micrométastase dans les deux cas. Ceci peut témoigner de biais de localisation tissulaire.

3-4-4 Les caractéristiques ganglionnaires

Concernant la population OSNA, il a été prélevé en moyenne deux ganglions sentinelles par patiente avec l'analyse OSNA contre 2,5 en moyenne pour la population Béréniis. Sur les 629 ganglions prélevés pour l'analyse moléculaire, 43 (6%) ont été récusés car inférieurs à 50mg et adressés en anatomopathologie définitive. Aucun cas de métastase n'a été retrouvé sur ces ganglions de petite taille. Un curage axillaire complémentaire a été réalisé pour tout ganglion sentinelle positif que ce soit en macrométastase, micrométastase, positif par levée d'inhibition (lorsqu'il s'agit d'une analyse OSNA) ou cellules isolées (lorsqu'il s'agit d'une analyse anatomopathologique). Celui-ci a été réalisé soit dans le même temps opératoire soit en deuxième intention.

Le tableau 9 regroupe les caractéristiques d'envahissement des ganglions non sentinelles (GNS) selon le type d'envahissement des GAS.

Lorsque l'atteinte initiale est positive en macrométastase (que l'analyse soit faite par la méthode OSNA ou par l'histologie traditionnelle), il existe un risque d'atteinte des ganglions dans le curage dans 22,6%. Il n'existe pas de différence significative d'envahissement des ganglions non sentinelles selon la méthode d'analyse des GAS utilisée ($p=0,291$). Dans 55% des cas, un seul GAS a été atteint et dans 32% des cas 2 GAS. Ces envahissements métastatiques se sont accompagnés essentiellement d'atteinte d'un voire deux GNS. Lorsque plus de deux GAS ont été métastatiques, il a existé au moins deux GNS positifs dans le curage.

Lorsque l'atteinte est positive en micrométastase, il est retrouvé un envahissement axillaire dans le curage dans 8% des cas, sans qu'il existe de différence selon la méthode d'analyse du ganglion sentinelle utilisée ($p=0,675$). Dans 100% des cas, les micrométastases n'ont été retrouvées que sur un GAS. Dans 6 cas sur 8, l'atteinte complémentaire dans le curage s'est résumée à un GNS métastatique.

En ce qui concerne les résultats des 17 GAS positifs par levée d'inhibition, un seul cas de curage métastatique a été retrouvé avec deux GNS atteints.

En revanche, aucun cas de GAS métastatique en cellules isolées n'a été suivi de curage métastatique (0/5).

De manière générale, **le type de la métastase initiale dans le GAS est corrélé de manière significative à l'envahissement des GNS dans le curage axillaire ($p=0,001$).**

L'envahissement métastatique correspond à une atteinte unique du ganglion sentinelle dans 84% des cas. Dans les 16% de curage axillaire complémentaire positif, 66% ont consisté à une atteinte de 1 à 2 ganglions sentinelles.

Résultats GAS	GNS positifs dans CA suite à OSNA	GNS positifs dans CA suite à histologie	Total	<i>p</i>	Nb de GAS métastatiques	Nb de GNS atteints dans CA
Macrométastases	12/45 (29%)	19/92 (20,6%)	31/137 (22,6%)	0,291	1 17 (55%) 2 10 (32%) 3 3 (9%) 4 1 (3%)	0 105 (77%) 1 10 (7%) 2 9 (6,6%) 3 4 (3%) 4 5 1 6 3 >6 4
Positifs par levée d'inhibition	1/17 (5,8%)		1/17 (6%)		1 0 2 1 (100%) 3 0 4 0	0 16 (94%) 1 1 (6%) >1 0
Micrométastases	3/29 (10%)	5/62 (6,4%)	8/91 (8%)	0,675	1 8 (100%) 2 0 3 0 4 0	0 84 (91%) 1 6 (6,5%) 2 1 (1,1%) 3 1 (1,1%)
Cellules isolées		0/5 (0%)	0/5 (0%)			0 5 (100%)
Total	16/91 (18%)	24/159 (14%)	40/250 (16%)			
<i>p</i>	0,087	0,02	0,001			

Tableau 9 : Envahissement des GNS selon le type d'envahissement du GAS.
GAS : ganglion sentinelle, GNS : ganglion non sentinelle, CA : curage axillaire

3- DISCUSSION

4-1 Performances de la technique OSNA

4-1-1 Performances de l'analyse définitive

Notre étude compare l'analyse des ganglions sentinelles dans leur ensemble par la méthode OSNA avec l'analyse histologique traditionnelle de coupes congelées avec coloration H&E +/- immunohistochimie sur des coupes sériées de 250 µm pour une population de patientes à risque d'envahissement ganglionnaire comparable. On retrouve un taux similaire d'envahissement ganglionnaire global (respectivement 29,5% contre 25,7%). Concernant le type d'envahissement métastatique, il n'est pas mis en évidence de différence de diagnostic pour les macro et micrométastases. Cependant, pour les macrométastases, cette différence est proche de la significativité ($p=0,09$) et nécessiterait une étude sur de plus grands effectifs.

L'étude publiée par Sagara et son équipe en 2011 (63) porte sur la concordance diagnostique entre biologie moléculaire et coupes congelées avec coloration à l'Hématoxyline-Eosine sur des coupes de 2mm associées à une analyse immunohistochimique. Cette étude est divisée en deux. Elle étudie tout d'abord des coupes de 2mm de ganglions sentinelles prélevés chez 53 patientes. Les tranches ont été alternativement analysées soit par OSNA soit par histologie. Il a été retrouvé respectivement 10,5%, 6,9% et 2,8% de macro, micrométastases et postifs par levée d'inhibition. Ces résultats sont inférieurs aux nôtres du fait probablement des biais de localisation tissulaire. Une concordance totale de 93% a été retrouvée, ce qui est similaire avec l'étude de validation de Tamaki (51). Pour éviter ces biais de localisation, les études suivantes ont étudié les ganglions dans leur ensemble.

Sur l'essai de 2011, Osako retrouve plus de métastases diagnostiquées par la méthode OSNA (64). Cet auteur a étudié l'envahissement axillaire chez 183 patientes atteintes d'une tumeur classée pT1-2 avec un ganglion sentinelle métastatique. Toutes ont bénéficié d'un curage axillaire complémentaire après la mise en évidence d'une métastase dans le ganglion sentinelle (analysé par OSNA). Chez 64 patientes, ce curage a été analysé en histologie classique avec coloration HE sans IHC sur une coupe unique. Pour les 119 autres patientes, il s'agissait de la méthode OSNA. Sur ces deux populations comparables, il a été mis en évidence significativement plus de métastases et surtout plus de micrométastases par la biologie moléculaire (55,5% versus 20,3% pour l'envahissement ganglionnaire global,

micrométastases 30,3% versus 1,6%). Le biais important noté ici, est qu'il n'a été pratiqué ni coupes sériées ni IHC pour l'analyse histologique ce qui diminue la sensibilité de détection surtout pour les micrométastases.

Castellano en 2011 (65) a aussi mis en évidence plus de micrométastases avec la procédure OSNA. Il a réalisé une étude comparant tout d'abord les performances d'OSNA (chez 123 patientes) avec la cytologie par empreinte associée à la coloration HE et IHC en per-opératoire puis avec l'histologie définitive avec coloration HE complétée par IHC sur des coupes sériées de 100µm (chez 156 patientes). Préalablement, a été évaluée l'expression de CK19 dans la tumeur et 13 patientes ont été exclues pour une faible expression. Il a été mis en évidence plus de détection de micrométastases par la biologie moléculaire OSNA par rapport à l'histologie (18% versus 8%, $p<0,01$). En revanche, le taux de détection des macrométastases était inférieur avec la biologie moléculaire (11% versus 20%) mais ce résultat n'était pas significatif.

Après avoir publié son étude de validation (50), Tamaki (66) a mis en place une étude multicentrique portant sur les performances d'OSNA en utilisation de routine avec analyse du ganglion sentinelle dans son ensemble, excepté une tranche centrale de 1mm destinée à l'analyse histologique coloration HE. Cette procédure a essentiellement permis, outre la comparaison des performances, la conservation de tissus. L'autre objectif de cette étude a été la corrélation entre expression de cytokératine 19 et envahissement des ganglions non sentinelles (GNS), celui-ci sera développé ultérieurement. Sur les 413 patientes présentant des tumeurs du sein classées de Tis à T2-N0, il a été détecté plus de métastases par la méthode OSNA que par l'histologie (22,5% contre 15,8%, $p<0,01$). Mais il est nécessaire de rester prudent sur ces conclusions car il existe un important biais de localisation tissulaire (BLT) compte tenu du fait que l'analyse histologique n'a disposé que d'une tranche centrale de 1mm. Par ailleurs, il est noté huit cas de discordance avec analyse OSNA négative mais histologie positive. Pour sept d'entre eux il s'agissait de micrométastases, ces cas participent donc aux BLT. Mais pour l'un d'entre eux, il a été retrouvé une macrométastase sur une tumeur exprimant peu la cytokératine 19, il s'agit donc d'un résultat faux négatif.

Enfin, l'étude française de Godey compare l'analyse des ganglions dans leur ensemble par la méthode OSNA (chez 258 patientes) avec l'analyse histologique classique (chez 355 patientes) (67). Il s'agit de coupes sériées tous les 250µm avec coloration HE et IHC. Cette cohorte provient d'une cohorte historique issue de patientes prises en charge dans le centre l'année précédente. Les deux techniques sont montrées aussi performantes en ce qui concerne les taux d'envahissement ganglionnaire global, les taux de macro ou micrométastases. De

plus, il n'est pas mis en évidence de différence selon que les ganglions positifs avec cellules isolées soient pris en compte ou non. Il n'est pas noté dans l'étude si les caractéristiques des deux populations sont comparables.

Notre étude est par conséquent la première à comparer la technique OSNA avec l'histologie traditionnelle en utilisant une méthodologie stricte avec deux populations appariées strictement comparables. Les deux méthodes d'analyses, dans notre étude, sont aussi performantes ($p=0,21$).

4-1-2 Performances de l'analyse per-opératoire

Notre étude compare la procédure OSNA avec l'analyse extemporanée par empreinte cytologique. Il est retrouvé pour les 618 patientes de notre population un taux d'envahissement ganglionnaire de 9,9%. Celui-ci est comparable avec la littérature, notamment avec les 9,6% retrouvés dans l'étude de Godey (67). Ce type d'analyse est moins performant que l'analyse OSNA (taux d'envahissement ganglionnaire de 29,5% contre 9,9% avec $p < 0,05$). Ces mêmes conclusions ont été publiées par Castellano (65). La première partie de son étude précédemment citée a comporté une comparaison entre la méthode OSNA et l'empreinte cytologique. Avant l'analyse moléculaire, les 131 ganglions sont passés par une étape d'analyse cytologique. Il a été retrouvé un taux Kappa de concordance de 0,52 entre les deux techniques soit seulement 52% de concordance.

Précédemment, lors de la phase de validation de la technique OSNA, l'étude de Frère-Belda a comparé notamment la procédure OSNA avec les deux types d'analyse extemporanée (53). Cette étude prospective multicentrique a porté sur 233 patientes et 503 ganglions sentinelles. Il a été réalisé quatre tranches, alternativement adressées en biologie moléculaire pour analyse OSNA et histologie pour analyse traditionnelle. Sur les 8 centres concernés par l'étude, 5 ont pratiqué une analyse extemporanée. 350 échantillons ganglionnaires ont bénéficié d'une analyse per-opératoire, 187 par les coupes congelées et 163 par l'empreinte cytologique. La sensibilité retrouvée pour chacune des méthodes a été respectivement de 63,6% et 47,1% avec une spécificité pour les deux de 100%. Ces résultats sont inférieurs à la sensibilité de la technique OSNA de 91,1% mise en évidence dans l'étude.

Par la suite, Osako et son équipe se sont penchés sur la comparaison de l'analyse OSNA avec l'histologie coloration H&E sur des coupes de 2mm en per-opératoire (68). Il est comparé de manière rétrospective 618 patientes ayant bénéficié d'une analyse classique

histologique extemporanée avec 531 patientes ayant eu une procédure OSNA. Il est mis en évidence une différence significative de performance sur le taux d'envahissement globale (22,8% contre 17,6%) avec une supériorité de la technique OSNA ainsi que sur le taux d'envahissement par micrométastases (8,7% contre 4,5%). Cependant, le biais à noter est qu'il n'a pas été réalisé d'immunohistochimie ce qui diminue la sensibilité diagnostique des micrométastases.

La biologie moléculaire méthode OSNA permet de rendre un diagnostic aussi fiable que l'analyse histologique définitive et ce en per-opératoire. Il présente de plus l'avantage qu'il soit semi-quantitatif, ce qui n'est pas le cas de l'analyse cytologique.

Référence	Année	Nombre patientes	Nombre ganglions	Type de ganglion	Type d'analyse	Type d'analyse histologique	Concordance OSNA/ Histologie	Taux d'envahissement global	Taux de Macro-métastases	Taux de Micro-métastases	Taux de positifs par levée d'inhibition
Osako (68)	2010	531 618		GAS GAS	OSNA Histologie	Extemporaneé: Coupes 2mm, Coloration HE		22.8% 17.6%	14.1% 13.1%	8.7% 4.5%	*
Sagara (63)	2011	248	306	GAS	OSNA	Définitif : Coupes en congélation coloration HE, coupes 2mm	93%	20.2%	10.5%	6.9%	2.8%
Osako (64)	2011	119		GNS	OSNA Histologie	Définitif : Coupes en congélation, pas d'IHC, 1 section		55.5% 20.3%	25.2% 18.8%	30.3% 1.6%	*
Castellano (65)	2011	110 156	131	GAS GNS	OSNA Histologie	Extempo : cytologie par empreinte + HE + IHC Définitif : Coupes sériées 100µm, coloration HE + IHC	0,52 (Test de Cohen)	29% 28%	11% 20%	18% 8%	*
Tamaki (66)	2012	413	775	GAS	OSNA	Tranche centrale 1mm, avec analyse définitive par coloration HE		22,5% 15,8%			
Godey (67)	2012	258 355		GAS	OSNA Histologie	Définitif : Coupes sériées 250µm, coloration HE +- IHC		24,4% 24,8%	10,8% 13,5%	9% 11%	4,6%
Notre étude	2012	309 618		GAS	OSNA Histologie	Définitif : Coupes sériées 250µm, coloration HE +- IHC Extemporaneé : cytologie par empreinte		29,5% 25,7% 9,9%	14,5% 9,4%	9,4% 10,8%	5,5%

Tableau 10 : Comparaison des performances entre la méthode OSNA et l'histologie.

GAS : ganglion axillaire sentinelle, GNS : ganglion non sentinelle, HE : Hématoxyline-Eosine, IHC : immunohistochimie

4-2 Influence du type histologique de la tumeur

Peu de publications jusqu'à présent comportent des données sur les performances d'OSNA selon le type histologique. Notre étude a permis la comparaison notamment des deux types histologiques principaux, le carcinome canalaire infiltrant (749 cas) et le lobulaire infiltrant (95 cas). Pour chacun de ces deux types, il n'a pas été mis en évidence de différence significative de performance diagnostique (respectivement $p=0,60$ et $p=0,80$). Ces résultats sont identiques à ceux publiés récemment par Godey et son équipe (67). Leurs résultats sont analysés selon le type anatomopathologique de la tumeur, soit canalaire (248 cas) soit lobulaire (60 cas). Il n'est pas retrouvé, dans leur étude, de différence de performance entre les deux types (respectivement 27,8% et 30% d'envahissement ganglionnaire). Dans leur étude, comme dans la nôtre, les types histologiques plus rares ont été exclus car n'étant pas assez représentés.

4-2-1 Cas du carcinome canalaire in situ

Dans notre étude, il est retrouvé 7 cas (18%) d'envahissement axillaire sur l'intégralité des carcinomes canaux in situ (CCIS) avec cinq cas de micrométastases et deux cas de positifs par levée d'inhibition. Il s'agissait de tumeurs de grades intermédiaire (2 cas) et haut (5 cas) mesurant pour cinq d'entre elles plus de 30mm chez des patientes toutes de plus de 50 ans sans micro-invasion retrouvée. De plus, pour les CCIS, il a été mis en évidence plus de métastases diagnostiquées par la méthode OSNA par rapport à l'histologie traditionnelle (22% contre 2,8%, $p<0,05$). Ce taux de métastases axillaires est particulièrement élevé comparé aux données disponibles dans la littérature (regroupées dans le tableau 11).

La méta-analyse d'Ansari regroupe les résultats de 22 publications portant sur l'envahissement ganglionnaire des CCIS et au total 3166 patientes. Il retrouve un risque d'envahissement axillaire de 3,7% pour les CCIS toutes situations confondues. Lorsque le diagnostic est établi en pré-opératoire, ce risque augmente à 7,4% (69). Les auteurs concluent alors à un risque significativement plus élevé de métastases axillaires lorsque le bilan pré-opératoire fait état d'un carcinome axillaire in situ, avec un odds ratio à 2,11. Cependant, cela regroupe diverses méthodes d'analyse histologique des GAS avec des résultats très disparates

suivant les méthodes utilisées. En effet, pour les deux plus importantes séries de Wilkie et Intra, le risque d'envahissement métastatique varie de 5% à 1,9%. Dans la publication de Wilkie, une étude rétrospective sur dix ans a regroupé 559 patientes atteintes d'un carcinome in situ sans micro-invasion. L'atteinte métastatique a concerné 27 patientes (5%). Dans 70% des cas, ce diagnostic a été réalisé par IHC (70). Le type d'envahissement ganglionnaire n'est pas précisé. La publication d'Intra a porté sur 854 patientes atteintes par un carcinome canalaire in situ sans micro-invasion. Douze d'entre elles ont été diagnostiquées métastatiques (1,9%). Il n'a jamais été réalisé d'analyse IHC (71). Dans 7 cas, l'atteinte a été par micrométastases et dans 5 par des macrométastases. Cette proportion de macrométastases est importante par rapport à celle retrouvée dans la méta-analyse d'Ansari. En effet, lorsque le type d'atteinte est stipulé, il est retrouvé un envahissement de type micrométastase ou cellules isolées dans 79% des cas (69). De plus, l'étude de Lara a mis en évidence un envahissement axillaire chez 13% des 102 patientes en utilisant exclusivement l'immunohistochimie (72). Boler et son équipe ont récemment publié un taux de métastases à 5% dont 70% des cas ont été diagnostiqués par IHC (73). Il s'agissait de tumeurs de grades intermédiaire à haut de plus de 30mm.

La première étude avec l'utilisation de la biologie moléculaire technique OSNA est publiée par Osako (74). Il compare, sur des cas exclusivement de CCIS, une série de 338 GAS analysés par histologie (coupes congelées 2mm, coloration HE) avec 285 analysés par la méthode OSNA. Il observe plus de métastases par l'analyse moléculaire que la technique histologique classique avec 4,2% de GAS positifs avec OSNA et 0,3% avec l'histologie définitive, soit dix fois moins ($p=0,0018$). Sur les 13 patientes avec envahissement ganglionnaire, seulement une a un envahissement par macrométastases.

Dans notre étude, l'histologie a permis le diagnostic de 2,8% de métastases ce qui est concordant avec les séries les plus importantes. Avec la méthode OSNA, le taux d'envahissement ganglionnaire retrouvé est de 18%. Cela est proche de dix fois le taux d'envahissement diagnostiqué par l'histologie, comme dans la série d'Osako. Il s'agit exclusivement de micrométastases et de positifs par levée d'inhibition, aucun cas de macrométastase. Celles-ci concernent, pour la majorité, des cas de CCIS à risque d'envahissement ganglionnaire. Il semble que la biologie moléculaire OSNA soit plus performante que l'histologie dans la détection de métastases pour les carcinomes in situ.

Type histologique	Auteur	Année	Nb de patientes	Risque d'envahissement axillaire global	Remarques
CCIS	Lara (72)	2003	102	13%	IHC
	Wilkie (70)	2005	559	5%	1,5% avec HE et 3,5% avec IHC
	Intra (71)	2008	854	1,9%	Pas d'IHC
	Ansari (69)	2008	3166	3,7%	7,4% quand diagnostic connu en pré-opératoire
	Boler (73)	2012	63	5%	Pour tumeurs grade intermédiaire à haut > 3Omm
	Osako (74)	2012	623	4,2%	10 fois plus que l'histologie
	Notre étude	2012	38	18%	Pour tumeurs grade intermédiaire à haut dont 70% > 3Omm, 10 fois plus que l'histologie

Tableau 11 : Envahissement axillaire pour le carcinome in situ
CCIS : carcinome canalaire in situ, FDR : facteur de risque

4-2-2 Cas du carcinome tubuleux

Le travail d'Alvarenga et son équipe a permis de mettre en évidence la présence de la CK19 dans les carcinomes tubuleux (43). Par conséquent, la technique OSNA est applicable dans le cas de ces tumeurs. Notre étude retrouve un envahissement ganglionnaire dans 28% des cas avec ce type histologique. Et en comparaison avec l'histologie traditionnelle, la biologie moléculaire serait significativement plus performante (33% contre 0%, $p < 0,05$). Mais de taux d'envahissement ganglionnaire retrouvé par la procédure OSNA est particulièrement élevé.

Le carcinome tubuleux est un type histologique associé à un meilleur pronostic que le type histologique canalaire. Rakha a publié un article portant sur la comparaison entre des patientes présentant un carcinome canalaire de grade 1 (212) et des patientes atteintes d'un carcinome tubuleux (102) sur une analyse rétrospective (75). Le carcinome tubuleux était associé à une meilleure survie sans récurrence ($p < 0.001$) et une meilleure survie spécifique du cancer du sein ($p = 0.003$). Dans cette étude, aucune des patientes n'a développé de métastase à distance ou sont décédées sans une récurrence d'un autre type histologique.

Selon les publications, le risque de métastases axillaires en cas de carcinome tubuleux s'élève de 7 à 33% (76)(77)(78)(79)(80)(81). Tous ces résultats sont relativement hétérogènes. Les séries les plus importantes retrouvent la taille tumorale comme facteur de risque d'envahissement ganglionnaire (76)(80) avec un risque plus élevé pour les tumeurs de plus de 1cm. L'étude de Papadatos en 2001 est une méta-analyse associée à une série rétrospective australienne (31 patientes) avec au total 680 patientes (76). L'auteur retrouve une fréquence globale des métastases ganglionnaires de 16%. Aucune des tumeurs de moins de 10mm ($n = 16$) n'est accompagnée de métastases ganglionnaires par rapport aux 16%

citées ($p = 0,018$). La méta-analyse des 680 patientes montre une fréquence globale de métastases ganglionnaires de 13,8% (95 pour cent intervalle de confiance 9,3 à 18,3). Dans la série rétrospective de Javid portant sur 111 patientes, une exploration axillaire est réalisée dans 80% (89 patientes sur 111) (80). Neuf patientes (8,1%) présentent un envahissement ganglionnaire. Celui-ci est associé à la taille tumorale ($p = .003$). Toutes les tumeurs avec envahissement ganglionnaire sont supérieures à 1 cm. Dans l'étude de Cabral, les dossiers de 44 patientes sont étudiés. 32 patientes ont eu une exploration axillaire et 4 d'entre elles étaient métastatiques (13%) (77). Ce risque d'envahissement ganglionnaire atteint 33% si la taille dépasse 1,5cm ($p=0,01$). Ces notions n'ont pas été confirmées par l'étude de Leikola (81). Il retrouve un risque global de 27% dans sa série rétrospective de 33 patientes sans aucun facteur de risque retrouvé. La taille moyenne associée à l'envahissement axillaire était de 9-10mm. Il en est de même pour l'étude rétrospective italienne de Livi portant sur 307 patientes. Un envahissement ganglionnaire a été retrouvé dans 15% des cas ($n=46$). Aucun lien avec la taille n'a été mis en évidence ; 15 cas d'envahissement pour des tumeurs de moins de 1cm, 19 pour des tumeurs entre 10 et 20cm et 12 quand la tumeur était supérieure à 2cm.

Notre taux d'envahissement ganglionnaire est le plus élevé des séries présentées, bien que proche de la série de Leikola et de celle de Cabral pour les tumeurs de grande taille (81)(77). Chez trois patientes sur quatre de notre étude, il s'agissait de tumeurs de plus de 1cm, facteur de risque souvent établi dans la littérature. Même si notre petite population possède pour la plupart un facteur de risque d'envahissement axillaire, il se pose la question d'une surévaluation de détection de métastase avec OSNA. La validité de la technique OSNA dans les carcinomes tubuleux infiltrants nécessitera des études complémentaires avec des effectifs plus importants.

Type histologique	Auteur	Année	Nb de patientes	Risque d'envahissement axillaire global	Remarques
Tubuleux	Papadatos (76)	2001	680	6,6%	Méta-analyse
	Cabral (77)	2003	44	13%	mais 33% si taille > 15mm
	Sullivan (78)	2005	73	7%	3/5 pour des tumeurs < 1cm
	Livi (79)	2005	307	15%	
	Leikola (81)	2006	33	27%	Pas de facteur de risque retrouvé
	Javid (80)	2009	111	8,1%	Dont 100% pour tumeurs > 1cm
	Notre étude	2012	14	28%	3/4 tumeurs > 1cm et 1 de 7mm

Tableau 12 : Envahissement axillaire pour le carcinome tubuleux

4-3 Caractéristiques ganglionnaires

4-3-1 Envahissement ganglionnaire par micrométastases

1- Hétérogénéité des méthodes diagnostiques

La mise en évidence de micrométastases, c'est-à-dire de métastases de taille comprise entre 2mm et 0,2mm, est de pratique complexe et subjective rendant les conclusions des études et leurs comparaisons difficiles (33). En effet, la publication de Salhab en 2011 sur les méthodes diagnostiques des micrométastases et leur pronostic fait état d'une grande inhomogénéité des pratiques et donc d'une difficulté d'interprétation et de comparaison des résultats. En effet, en per-opératoire, les micrométastases sont diagnostiquées dans 22% des cas avec la cytologie par empreinte, taux passant à 40% lorsqu'il s'agit de coupes congelées. De plus, en analyse définitive, le taux de diagnostic est très variable suivant les épaisseurs de coupe réalisées comme il est observé dans l'étude Valla (82). La mise en évidence des micrométastases est aussi corrélée à l'utilisation éventuelle d'immunohistochimie. En effet, dans la série multicentrique d'Houvenaeghel, sur les 700 observations de micrométastases, 312 soit 44,6% ont été diagnostiquées seulement immunohistochimie (83). Cette étude rétrospective a porté sur les dossiers de micrométastases de 16 centres. Dans 53,4% des cas, le diagnostic a été porté par l'analyse opératoire dont 43,9% des cas par l'analyse de coupe en congélation. L'analyse définitive a été pratiquée sur des coupes sériées et coloration H&E et a permis le diagnostic de 55,4% des micrométastases, le reste ayant nécessité pour leur diagnostic l'immunohistochimie.

Notre étude démontre une efficacité semblable de la biologie moléculaire méthode OSNA avec l'histologie traditionnelle de coloration H&E et IHC sur coupes sériées de 250µm dans la détection des micrométastases. Il a été mis en évidence dans 10% des cas un envahissement par micrométastases avec la biologie moléculaire et dans 6,4% avec l'histologie ($p=0,64$). Cette procédure innovante permet donc le diagnostic de ces métastases de petit volume de manière fiable en per-opératoire avec une technique automatisée.

2- Pronostic lié aux micrométastases

Le diagnostic de ces métastases de petit volume représente un enjeu important du fait du pronostic associé. En effet, en 2011, Lupe et son équipe ont publié une importante série de 9616 patientes suivie sur dix ans (84). Celles-ci présentaient des cancers du sein à des stades précoces pT1-2, dont 490 avaient un envahissement ganglionnaire par micrométastases, 1149 macrométastases et 7977 étaient indemnes de tout envahissement métastatique. Il a été observé un risque de récurrence locale à 6,1% pour les patients sans atteinte ganglionnaire (pN0), 6,8% pour les atteintes par micrométastases (pNmic) et 8,7% pour les atteintes avec macrométastases (pNmac). En ce qui concerne le taux de récurrence régionale, celui-ci s'élevait à 3,1%, 6,2% et 10,3% respectivement pour les pN0, pNmic et les pNmac. Enfin, pour le risque global de récurrence loco-régionale, 8%, 11,6% et 15,2% sont retrouvés pour les pN0, pNmic et pNmac. Tous ces résultats sont significatifs et prouvent donc un pronostic plus sombre pour les patientes avec atteinte micrométastatique comparées à celles pN0.

Concernant la survie globale et sans récurrence, des résultats similaires sont retrouvés dans la large étude danoise de 2007 (85). Celle-ci a porté sur 6959 patientes de moins de 75 ans atteintes de cancer du sein classé de T1 à T3, N0-N1, M0 selon la classification TNM. Sur un suivi moyen de 10 ans et deux mois, les patientes ayant un envahissement axillaire par micrométastases (420) avaient significativement une survie sans récurrence diminuée par rapport aux patientes indemnes d'envahissement ganglionnaire (4767 patientes) (risque relatif =1.20, 95% CI: 1.01-1.43). Cortesi et son équipe ont aussi récemment étudié le pronostic lié aux micrométastases sur 2078 patientes avec un suivi moyen de 48 mois (86). La survie globale et la survie sans récurrence étaient de 99,2% et 100% pour les pN0, 100% et 100% pour les pN0i+ (atteinte avec cellules isolées), 96% et 93,2% pour les pNmic et enfin 96,1% et 92,4% pour les pNmac. Ces résultats suggèrent que la survie globale et la survie sans récurrence sont donc similaires que les patients soient métastatiques en micro ou macrométastases. Il est cependant important de rester prudent sur les conclusions avec une durée moyenne de suivi relativement peu importante.

L'identification de ces patients métastatiques en micrométastases par une technique d'analyse fiable est donc primordiale. En effet, bien qu'il s'agisse d'un envahissement ganglionnaire de petit volume, leur pronostic est lié à cette atteinte et l'adaptation des traitements adjuvants est nécessaire.

4-3-2 Envahissement des ganglions non sentinelles

Dans notre étude, en considérant la population globale de 927 patientes, il est mis en évidence un envahissement métastatique dans le curage axillaire dans 22,6% après macrométastase, 8% après micrométastase, 6% après positif par levée d'inhibition et aucune métastase après les cellules tumorales isolées. La taille de la métastase initiale est corrélée à l'atteinte du curage complémentaire de manière significative ($p=0,001$). De nombreux auteurs, depuis quelques années, étudient les caractéristiques de l'envahissement des ganglions non sentinelles dans le curage complémentaire après mise en évidence d'un GAS métastatique. Les plus grandes séries sont rassemblées dans le tableau 13.

En effet, Viale en 2005 reprend une série de 1228 patients et retrouve un taux global de métastases sur GNS de 39,4% quand le GAS était positif (87). Respectivement ce taux est de 50,3%, 21,4% et 14,7% selon qu'il s'agit d'une macro, micrométastase ou de cellules isolées. D'après son étude, le type et la taille de la métastase initiale sont des facteurs de risque d'atteinte du curage complémentaire. Les patients positifs en cellules isolées et micrométastases jusqu'à 1mm ont 16,2% d'atteinte complémentaire. Ce risque augmente à 30,2% puis à 50,3% s'il s'agissait de micrométastases entre 1 et 2mm et macrométastases respectivement. Par ailleurs, le nombre de GAS atteints et la présence d'embolies vasculaires dans la tumeur initiale représentaient aussi des facteurs de risque. La notion de taille de la micrométastase est un élément déjà souligné par Cserni en 2004 (88). Il a réalisé une méta-analyse de 25 articles concernant l'envahissement des GNS après micrométastases. Il rapporte une incidence d'envahissement des GNS après micrométastase isolée dans GAS à 20%. Ce taux chute à 9% quand seule l'analyse immunohistochimique met en évidence cette micrométastase. Cette notion n'a en revanche pas été confirmée par l'étude multicentrique de Houvenaeghel (83) ni par celle de Menez en 2005(89). Dans l'étude d'Houvenaeghel, la taille exacte des micrométastases est indiquée dans 488 cas sur 700: pour 301 patientes la taille est supérieure à 0,2 mm (61,7%) et pour 187 patientes la taille est $\leq 0,2$ mm (38,3%). Concernant les micrométastases, 43 cas comportent un curage positif et 30 cas pour les cellules isolées. Il n'est pas retrouvé de différence significative entre les deux groupes ($p=0,16$). De même, Menez publie un risque similaire de métastases dans les GNS que le GAS soit positif en cellules isolées ou micrométastases (respectivement 19% et 20%) sur une série de 124 patientes (89).

La récente méta-analyse de Van La Parra étudie les résultats de 56 articles lui permettant d'isoler des facteurs de risque indépendants de métastase dans le curage

complémentaire. Ils sont représentés par la macrométastase, le dépassement capsulaire, l'existence de plus de un GAS positif, un ratio GAS positif supérieur à 50%, une tumeur initiale de plus de 2cm et la présence d'embolies vasculaires (90).

Boler et son équipe publient cette année des conclusions similaires concernant les facteurs de risque tels que macrométastases et dépassement capsulaire (91). Sur une étude rétrospective de 332 patientes atteintes de cancer infiltrant stades T1-2, 134 présentent un ganglion sentinelle positif et 116 ont un curage complémentaire. Les patientes atteintes de tumeurs au stade T2 (OR = 3,2, IC 95%, 1,74 à 5,58), ou de tumeurs avec un envahissement lymphovasculaire (OR = 8,0; IC à 95%, de 4,44 à 14,27), ou un carcinome infiltrant type canalaire (OR = 2,92, IC 95%, 1,1 à 8,0) sont plus susceptibles d'avoir un GAS positif. Chez les patientes avec curage axillaire, les taux d'envahissement des GNS sont de 10%, 11,5% et 50% pour des GAS positifs en cellules tumorales isolées (CTI), micrométastases et macrométastases, respectivement. Mettre en évidence des cellules isolées ou des micrométastases dans le GAS (OR = 0,28, IC 95%, de 0,08 à 0,99) sont des facteurs prédictifs de non envahissement des GNS.

Trois publications concernant OSNA étudient le taux d'envahissement des GNS dans les curages complémentaires. Comme il est présenté dans le tableau 14, Sagara et Tamaki mettent en évidence un taux global de GNS positifs après GAS positifs respectivement de 35% et 33,7% (63)(66). La proportion de GNS positifs pour les macrométastases est de 56% et 44%, 35% et 17,6% pour les micrométastases ainsi que 14% et 50% pour les positifs par levée d'inhibition. Pour les macrométastases, ces taux sont relativement comparables avec ceux présentés dans le tableau 16 où le GAS est analysé par les techniques histologiques classiques. Concernant les micrométastases, il est plus difficile de comparer compte tenu du fait de la grande hétérogénéité des résultats. Cependant, ceux présentés dans l'étude de Godey et notre étude sont comparables entre eux mais semblent inférieurs aux précédents. En effet, de manière globale, nous avons mis en évidence 18% d'atteinte dans le curage lorsque de la GAS était positif. Ce taux passe à 29% quand il s'agit de macrométastases et 10% pour les micrométastases. Cela est dû aux différences de populations étudiées. Dans la publication de Tamaki, il existe près de 73% de tumeurs T0-1, 26% de T2 et 0,5% de T3. Dans notre série, près de 97% des tumeurs sont classées T0-1 et moins de 3% sont T2. Il existe donc un risque d'envahissement ganglionnaire moindre dans notre série que dans celle de Tamaki. Ces mêmes constations sont réalisables pour l'étude de Godey (67).

Certains de ces auteurs ont ensuite évalué s'il existait une corrélation entre le taux d'expression de la CK19, c'est-à-dire le type de métastase, et l'envahissement des GNS.

Tamaki met en évidence une corrélation significative entre l'importance de la métastase initiale et la présence de GNS positifs dans le curage. De même, Godey retrouve un risque significativement plus élevé d'avoir un curage positif lorsque le GAS est envahi en macrométastase. Dans notre série, le taux d'expression de la CK19 n'est pas corrélée statistiquement à la présence de métastase dans les ganglions non sentinelles ($p=0,08$). Ce taux est cependant proche de la significativité et nécessitera des études complémentaires avec des effectifs plus importants afin de valider cette donnée.

La proportion de GNS envahis ne semble pas différer selon la méthode d'analyse du GAS choisie que ce soit par l'histologie ou OSNA. De plus, le type de GAS en tant que facteur de risque de GNS positif est un élément aussi mis en évidence dans les publications de biologie moléculaire.

	Année	Nb de patients	Taux de GAS+/GNS+	Taux de GAS macro/GNS+	Taux de GAS micro/GNS+	Taux de GAS CI+/GNS+
Cserni (88)	2004	Méta-analyse			20% (9% IHC)	
Viale (87)	2005	1228	39,4%	50,3%	21,4%	14,7%
Menez (89)	2005	124		46%	20%	19%
Houvenaeghel (83)	2006	700			14%	
Van La Parra (90)	2011	Méta-analyse	40-60%	51%	17%	
Boler (91)	2012	116	32%	50%	11,5%	10%
Notre étude	2012	618	14%	20,6%	6,4%	0%

Tableau 13 : Corrélation entre l'envahissement du GAS et des GNS avec l'histologie classique.

Nb : nombre, GNS : ganglions non sentinelles, GAS : ganglions sentinelles, macro : macrométastase, micro : micrométastase, CI : cellules isolées.

	Année	Nb de patientes	Taux de GAS+/GNS+	Taux de GAS macro/GNS+	Taux de GAS micro/GNS+	Taux de GAS I+/GNS+
Sagara (63)	2011	248	35%	56%	35%	14%
Tamaki (66)	2012	413	33,7%	44%	17,6% ($p=0,012$)	50%
Godey (67)	2012	258	19,6%	35% ($p<0,05$)	12,5%	6,6%
Notre étude	2012	309	18% (TS $p=0,08$)	29%	10%	5,8%

Tableau 14 : Corrélation entre l'importance de l'expression de CK19 et l'envahissement des GNS avec OSNA.

GNS : ganglions non sentinelles, GAS : ganglions sentinelles, TS : tendance significative.

4-3-3 Place du curage axillaire de complément

Dans notre étude, sur les 250 patientes avec atteinte axillaire, il s'agit dans 84% des cas d'une atteinte unique du ganglion sentinelle. Le curage axillaire est métastatique dans 16% des cas avec dans 66% des cas l'atteinte de un à deux ganglions. Le nombre de ganglions envahis a un intérêt limité dans le choix des traitements adjuvants. La lymphadénectomie étant un geste chirurgical pourvoyeur de morbidités, plusieurs études se penchent sur l'impact de la réalisation seule d'un ganglion sentinelle même en présence d'une métastase.

Shangani réalise en 2009 une méta-analyse sur l'impact d'un curage axillaire pour les stades précoces de cancer du sein sans adénopathie clinique (92). Il rapporte les résultats de 4 études dont trois sont prospectives et randomisées. Tous les essais rapportent un taux plus élevé de récurrence axillaire (1,5% -3%, la médiane de suivi 5-15 ans) en l'absence de curage axillaire ou de radiothérapie. La survie globale est similaire avec et sans lymphadénectomie axillaire dans 3 des 4 essais. Les résultats de la méta-analyse ne trouvent aucune différence significative sur la survie globale (odds ratio [OR] 1,55; intervalle de confiance à 95% [IC], 0,74 à 3,24); métastases à distance (OR 0.91; 95% CI, 0.65-1.29), ou récurrence contralatérale (OR 1.11; 95% CI, 0.68-1.83) lorsqu'il est réalisé un curage axillaire. En revanche, un taux significativement plus faible de récurrence axillaire est observé après lymphadénectomie (OR = 0,28, IC 95%, 0,11 au 0,73, $p < 0.01$).

Plus récemment, le Collège américain des Chirurgiens Oncologues publie ses conclusions dans l'étude ACOSOG Z0011. Giuliano et son équipe démontrent que la réalisation d'un ganglion sentinelle seul sans curage peut offrir un excellent contrôle régional de la maladie dans les cancers à un stade précoce traité par chirurgie conservatrice, radiothérapie et traitement adjuvant systémique (93). Cette étude de phase 3, multicentrique, randomise des patientes présentant des stades précoces T1-2 de cancer du sein infiltrant avec envahissement de 1 à 2 GAS sans adénopathie palpable au préalable. Avec un suivi moyen de 6,3 ans, il n'existe pas de différence significative sur la récurrence locale (1,8% pour le GAS seul avec 446 patientes versus 3,6% dans le bras curage axillaire avec 445 patientes), ni sur la récurrence régionale (0,9% pour le GAS contre 2,5% pour le curage) entre les deux bras. Cette étude est stoppée prématurément en raison d'un faible taux de participation. Cependant les conclusions portant sur 856 patientes suggèrent qu'il n'est pas nécessaire de réaliser un curage axillaire complémentaire chez les patientes avec un GAS positif sans atteinte axillaire

clinique. Ces conclusions ne concernent pas les cas où plus de deux GAS sont métastatiques et en cas de mastectomie.

Des recommandations sont ensuite mises en place avec la 12^e conférence de consensus de Saint Gallen (94). Il n'est pas préconisé de réaliser un curage axillaire de complément lorsque les GAS sont positifs en cellules isolées ou micrométastases. Il en est de même s'il est retrouvé au maximum 2 macrométastases avec une chirurgie conservatrice suivie d'une radiothérapie. Cependant, en terme de risque de récurrence axillaire, les patientes dont le cancer est récepteurs hormonaux (RH) positifs ont un risque de récurrence significativement retardé par rapport aux patientes récepteurs hormonaux négatifs. Le point de croisement entre ces deux populations étant précisément à 7 ans comme il est publié par Jatoi dans son étude observationnelle en 2007 (95). Or dans l'essai Z0011, dont le recul est de 6,3 ans, la proportion de patientes RH positifs est particulièrement importante, de l'ordre de 82%. Il est donc particulièrement important d'attendre les résultats du suivi à plus long terme avant de tirer des conclusions impactant les pratiques.

4-4 Conséquences économiques

4-1 Temps d'analyse

Notre étude évalue le temps nécessaire à l'analyse des ganglions sentinelles. 40 minutes étaient nécessaires à l'analyse d'un ganglion, 45, 50 et 57 pour 2, 3 et 4 ganglions. Ce délai représente le temps à partir du moment où le GAS est prélevé jusqu'à la réception des résultats.

Cependant, les temps cités par le laboratoire Sysmex sont inférieurs avec 30 minutes pour 1 GAS, 40 minutes pour 2 GAS, 45 pour 3 et 50 pour 4. Mais il s'agit ici du temps d'analyse pure et non remis dans le contexte clinique en prenant en compte le temps d'acheminement au laboratoire.

Quelques études s'intéressent à ces temps d'analyse. Tout d'abord, celle de Le Frère-Belda et son équipe qui recense un temps moyen d'analyse pure de 33, 40, 48 et 54 minutes pour respectivement 1, 2, 3 et 4 ganglions (53). Ces temps sont relativement superposables à ceux donnés par le laboratoire. Dans la publication de Sagara (63) il est comparé la durée nécessaire à la procédure OSNA avec celle de l'histologie par coloration HE sur des coupes congelés de 2mm. Il met en évidence un temps significativement plus long pour OSNA avec

34-45 minutes versus 22-25 minutes ($p < 0,0001$). Par ailleurs, Godey et son équipe (67) recense les temps nécessaires à l'analyse des ganglions et retrouvent respectivement 32,9 minutes ; 36,4 minutes ; 41,6 minutes et 48,5 minutes pour 1 ; 2 ; 3 et 4 ganglions. Ces durées comprennent le temps de transport vers le laboratoire. Cette équipe possède une voie d'acheminement au laboratoire bien établie avec un temps nécessaire réduit au maximum.

Les temps d'analyse dans notre étude sont plus importants que ceux cités ci-dessus. En moyenne 8 minutes de plus sont nécessaires pour chaque ganglion. Il faudrait donc définir si cette différence est due à un problème d'éloignement du centre d'analyse par rapport au bloc opératoire ou si des progrès dans la rapidité d'exécution des étapes sont possibles.

Aucune étude jusqu'alors ne s'est penchée sur les modifications des temps opératoires liées à la procédure OSNA et ses conséquences. Il s'agit en effet d'une procédure significativement plus longue que l'histologie classique que celle-ci soit par cytologie ou coloration. Dans notre étude, ces temps d'analyse sont comparés avec les durées des différents types d'intervention. Dans un cas sur deux, il existe un délai d'attente d'environ quinze minutes lorsqu'il s'agit d'une chirurgie conservatrice (tumorectomie, zonectomie, pamectomie et quadrantectomie) ou d'une oncoplastie. Cette même attente est réduite à 10 minutes dans un cas sur trois pour les mastectomies. En revanche, lorsqu'il est réalisé une reconstruction mammaire immédiate dans le même temps, les résultats sont rendus avant la fin de l'intervention. Les modifications des temps opératoires concernent donc les chirurgies les plus fréquentes. Ces éventuels allongements du temps d'occupation de salle n'ont pourtant pas modifié les pratiques de programmation opératoire depuis la mise en place de la technique dans le centre. Le nombre de chirurgies programmées n'a pas été modifié.

4-2 Impact économique de la procédure

La méthode OSNA est une technique innovante coûteuse : le coût par patient s'élève à près de 420€ (215€ en réactifs et consommables, 65€ pour les annuités d'équipement, 20€ en contrat de maintenance, 50€ en personnels, 70€ en frais de logistique et structure). Celle-ci est à comparer avec les coûts engendrés par la réalisation d'un examen extemporané par histologie classique. Aucune publication prospective et multicentrique évaluant le coût de stratégie d'analyse du statut ganglionnaire dans le cancer du sein n'est retrouvée dans la littérature. Jeruss en 2006 propose un modèle dans un centre comparant la réalisation d'un examen extemporané par empreinte cytologique avec l'analyse histologique définitive. La

qualité de vie et le coût sont étudiés chez 342 patientes. Il conclue que l'analyse en extemporanée est plus avantageuse que l'analyse anatomopathologique définitive, sans examen extemporané (96). En 2010, Canavese et son équipe publient une analyse mono centrique portant sur des coûts théoriques de deux stratégies avec et sans examen extemporané (97). 118 patientes présentant des stades T1a-T1b n'ont pas bénéficié d'une analyse per-opératoire par coupes congelées et coloration H&E. Un curage axillaire secondaire est réalisé chez 10,2% d'entre elles. Pour 258 patientes présentant un stade T1c, une analyse macroscopique per-opératoire est pratiquée. Chez 12,8% des patientes, un curage axillaire secondaire est réalisé. L'absence d'examen extemporané a réduit la durée opératoire de 23 à 34% au prix d'une réintervention dans 11,6% des cas. Dans cette étude, les patientes présentant un stade T2 avec une tumeur de moins de 3cm n'ont pas été incluses. Cela a donc diminué le taux de curage axillaire secondaire par rapport aux pratiques courantes. Holm en 2008 publie une étude rétrospective sur un centre portant sur 1209 patientes (98). sont étudiés le taux de reprise pour curage axillaire, les durées opératoires et le coût de la prise en charge avant (706 patientes) et après (503 patientes) introduction de l'analyse extemporanée par coloration et immunohistochimie. Le taux de ganglion sentinelle positif à l'analyse définitive diminue de 93 à 52% ($p < 0,0001$) pour les métastases de cellules tumorales isolées, de 56 à 36,4% ($p < 0,02$) pour les micrométastases, et 16 à 5% ($p < 0,01$) pour les macrométastases. Les interventions chirurgicales sont légèrement prolongées pour les tumorectomies mais pas pour les mastectomies après l'introduction de l'analyse per-opératoire par IHC et coloration. Enfin, l'analyse des coûts montre un gain de coût global d'environ 40%. Cette étude montre un bénéfice économique à la pratique de l'analyse extemporanée histologique. La publication de Cutress compare les coûts engendrés par l'histologie avec ceux de la biologie moléculaire méthode GeneSearch™ (60). Ils sont estimés en rétrospectif à partir de trois modèles de traitements (modèle 1 : patients avec curage axillaire, modèle 2 : patients avec ganglion sentinelle et analyse histopathologique ultérieure et modèle 3 : patients avec ganglion sentinelle et examen extemporané avec GeneSearch™). Il conclue à un coût par patient plus élevé pour le modèle 3. Cependant, cette comparaison n'a pas pris en compte les coûts d'analyse histologique extemporanée avec ceux de la reprise chirurgicale secondaire pour curage.

L'unique publication existant sur les conséquences économiques de la méthode OSNA est celle de Guillen-Paredes en 2011 (99). Il s'agit d'une étude rétrospective monocentrique portant sur 45 patientes traitées avec analyse anatomopathologique définitive (groupe 1) comparées à 35 patientes traitées avec la méthode OSNA (groupe 2). La durée de la chirurgie

de la première opération dans le groupe 1 est significativement plus courte, mais le temps total est également plus élevé dans ce groupe. La durée moyenne d'hospitalisation est plus longue dans le groupe 1 ($P < .001$). Le coût moyen du séjour hospitalier est plus élevé dans le groupe 1 par rapport au groupe 2 ($P < .001$), avec une différence moyenne de 199,69 €. Le coût moyen de la chirurgie est plus élevé dans le groupe 1 ($P < .001$), avec une différence moyenne de 157,49 €. Le coût moyen par analyse SLN est significativement plus élevée dans le groupe 1, avec une différence moyenne de 162,5 €. Le coût par patient est significativement plus élevé dans le groupe 1 ($p < 0.005$). Une économie moyenne de 439,67 € par patient est réalisée en utilisant la méthode OSNA.

Dans notre étude, il existe un allongement du temps opératoire dans la moitié des chirurgies courtes d'environ 15 minutes. En revanche, il est réalisé trente fois moins de curage axillaire secondaire depuis l'utilisation de la technique OSNA. Ces libérations de plages opératoires, c'est autant de nouveaux patients entrant dans la filière de soins permettant ainsi de réduire les délais de prise en charge. De plus, le coût engendré par une hospitalisation de 24 à 48 heures (que cette intervention soit réalisée en ambulatoire ou non), pour la réalisation d'une lymphadénectomie axillaire, n'est pas négligeable. Toutes ces données sont à évaluer sur le plan médico-économique. Prochainement, le STIC SAGE (Stratégies d'Analyse du Ganglion sEntinelle) va débuter évaluant le coût et l'impact médico-économique des différentes stratégies d'analyse du ganglion sentinelle dans la prise en charge des patientes traitées pour un carcinome mammaire infiltrant. Cette étude va comparer trois stratégies d'analyse du GAS : l'analyse par la biologie moléculaire par la méthode OSNA, l'analyse anatomopathologique définitive avec coloration H&E plus ou moins immunohistochimie et enfin l'analyse extemporanée suivie d'une analyse anatomopathologique définitive. L'étude SAGE analysera ces 3 situations de manière prospective, multicentrique (17 centres) et observationnelle.

4-5 Limites de la technique

4-5-1 Tumeurs à faible taux d'expression de CK 19

En 2002, Chu publie une importante étude sur l'expression des cytokératines dans les tissus humains et néoplasiques. Or, il ne retrouve pas l'expression de cytokératine 19 dans approximativement 2% des cancers du sein (41). Cette même proportion est aussi notée dans l'étude de Castellano (65). Une analyse immunohistochimique a été réalisée au préalable chez les 110 patientes ne mettant pas en évidence de CK19 dans 2,8% des cas. L'absence d'expression de la CK19 est donc source de faux négatif. De plus dans l'étude multicentrique de Tamaki, un cas similaire de faux négatif est noté (66). Par ailleurs, se pose le problème des tumeurs du sein basal-like de la femme jeune, qui selon Parikh, seraient associées à l'absence d'expression de CK19 dans 30% des cas (100).

Pour certains auteurs, il est nécessaire de tester les tumeurs à la recherche de la CK19 avant le choix de réalisation de la procédure OSNA. L'équipe espagnole de Vilardell (101) a réalisé trois études. Une série prospective sur 197 patientes est réalisée déterminant le taux d'expression de CK19. Il retrouve 28,9% de type luminal A (Récepteur œstrogène + et/ou Récepteur progestérone +, Ki67<14 %, Her2-), 52,3% de luminal B (Récepteur œstrogène + et/ou Récepteur progestérone +, Ki67>14 %, Her2-), 7,1% de type HER2 positif et 11,7% de type Triple négatif dont 7,9% de basal-like (CK5/6 et EGFR positifs). Au total, six cas (soit 3,04%) de tumeur CK19 négative sont mis en évidence dont cinq d'entre eux (6,4%) sont des types luminal et un triple négatif (4,2%). Chez ces patientes, l'analyse des ganglions est effectuée par histologie. Puis, il est mis en place deux séries rétrospectives. Une première portant sur 41 tumeurs type triple négatif dont 30 basal-like. Aucune d'entre elles n'est CK19 négative. Ces deux études ne concluent pas au risque accru de non expression de la cytokératine 19 sur les tumeurs basal-like. Enfin, il est étudié les cas de 211 patientes. 86 d'entre elles sont métastatiques ganglionnaires et une analyse immunohistochimique est possible dans 68 cas (dans les 18 cas restants, le matériel n'était pas suffisant pour l'analyse). Au total, il est noté un cas de ganglions CK19 négatif qui est corrélé à une tumeur initiale CK19 négatif, soit un taux de 1,4% de faux négatif.

D'autres articles retrouvent des taux de faux négatif plus faibles de 0,2 à 0,5% (50),(52),(62). Cet écart avec les taux d'expression de CK19 précédemment cités dans les tumeurs suggèrent une différence entre les expressions dans le sein et dans les voies

lymphatiques. Il s'agirait en effet d'une absence de translation de la protéine CK19 et non une absence de transcription de l'ARN messager.

4-5-2 Résultats positifs par levée d'inhibition

Il s'agissait jusqu'alors de la plus grosse problématique posée par la technique OSNA dans la prise en charge des patientes. 5,25% de notre population ont présenté ce type d'atteinte.

Le problème posé par ce type de résultat ne survient pas en per-opératoire puisque, selon les recommandations actuelles, que le GAS soit positif pour une micro ou une macrométastase, un curage axillaire de complément était indiqué. En revanche, il se pose au moment de la décision des traitements adjuvants pour l'indication de chimiothérapie et l'indication de radiothérapie des aires ganglionnaires. En effet, les indications diffèrent selon l'importance des métastases axillaires. A l'Institut de Cancérologie de l'Ouest, il s'agit essentiellement de l'indication d'irradiation des aires axillaires qui est pratiquée en cas de macrométastase seulement.

La société SYSMEX a collecté sur l'été 2011, les lysats de 47 patientes avec un tel résultat pour des analyses complémentaires. En utilisant des colonnes de gel de filtration, le laboratoire espère réduire les effets du facteur inhibant la réaction OSNA. Ces colonnes Microspin s'intègrent facilement au protocole sans allongement de la procédure. Trois tailles de pores sont évaluées pour déterminer la meilleure matrice. Tous les échantillons sont testés en parallèle avec ou sans colonne et sont analysés sur le même automate en une seule fois pour garantir la comparabilité des résultats. Avec la procédure standard, 74% des échantillons sont toujours inhibés, 13% reviennent négatifs et 13% positifs. Avec la nouvelle procédure, aucun des échantillons est inhibé, 89% reviennent positifs contre 11% négatifs. Des essais sont par ailleurs effectués sur des échantillons positifs et négatifs ne montrant pas d'interaction des résultats avec l'utilisation des Microspin. En effet, les taux de concordance sont respectivement de 90,5% et 94,7%.

La vérification de la faisabilité en routine et des performances de la nouvelle procédure a débuté depuis juillet 2012 afin d'obtenir le marquage CE conformément aux règles européennes en vigueur pour les dispositifs médicaux.

4-5-3 Identification des cellules isolées

La procédure OSNA ne détecte pas le seuil de CK19 correspondant à la présence de cellules isolées. Cet élément ne semble pas constituer une réelle limite à la technique. En effet, comme il est présenté précédemment dans plusieurs publications, le pronostic associé à la mise en évidence de ces métastases de petit volume semble proche de celui des patientes indemnes d'envahissement ganglionnaire. Comme en témoigne l'étude de Cortesi et son équipe qui retrouve sur un suivi moyen de 48 mois (86) une survie globale et la survie sans récurrence de 99,2% et 100% pour les pN0 et de 100% et 100% pour les pN0i+ (atteinte avec cellules isolées).

4-5-4 Conservation des lysats

Les recommandations de l'EWGBSP (European Working Group for Breast Screening Pathology) insistent sur la nécessité d'une conservation tissulaire (102). Jusqu'alors, concernant la biologie moléculaire, il n'existait pas de recommandation ni en France ni en Europe. Actuellement, les méthodes de conservation des tissus sont très différentes selon les centres. Certaines équipes prélèvent une tranche centrale ganglionnaire pour l'analyse histologique et archivent ce prélèvement tissulaire avec le risque de ne pas diagnostiquer les micrométastases en per-opératoire du fait du biais d'allocation tissulaire. D'autres broient la totalité du ganglion pour l'analyse en biologie moléculaire et c'est alors le lysat qui est stocké à -80°C (température permettant la conservation de l'ARN messager plusieurs années) ou dans l'azote liquide. Enfin, il est possible de réaliser une cytologie avec étalement sur lame des cellules contenues sur le bistouri qui a servi à préparer les ganglions avant broyage. Cette dernière technique est cependant peu répandue. En France, des recommandations établies par la Société Française d'Analyse du Ganglion Sentinelle vont prochainement être publiées recommandant la réalisation d'une apposition cytologique sur le ganglion sentinelle préalablement sectionné en deux avant la préparation du lysat.

CONCLUSION

Dans notre étude, la procédure OSNA est une méthode d'analyse aussi fiable que l'analyse histologique par coloration et immunohistochimie. Elle semble être plus performante sur certains types histologiques, le CCIS et le carcinome tubuleux. La méthode OSNA rend des résultats semi-quantitatifs en temps réel. Cela permet donc de connaître le statut ganglionnaire précis et définitif de la patiente en cours d'intervention et d'adapter le geste opératoire. Aujourd'hui, il est nécessaire de compléter la chirurgie par un curage axillaire devant les résultats positifs en macro, micrométastases et positifs par levée d'inhibition. Le fait de réaliser la lymphadénectomie dans le même temps représente ainsi un bénéfice pour la patiente par diminution de la morbidité opératoire. De plus, cela permet de débiter le traitement adjuvant systémique plus précocement. Ces résultats sont automatisés et non opérateurs dépendants ou types d'analyse dépendants.

Cette procédure profite aux patientes mais aussi aux établissements de soins. Eviter les reprises chirurgicales conduit à diminuer des coûts d'hospitalisation et permet d'accueillir de nouveaux patients dans la filière de soins et de diminuer les délais de prise en charge.

Les études de survie tendent aujourd'hui à remettre en question l'impact du curage complémentaire dans certaines situations. En l'absence de niveau de preuve suffisant, le curage axillaire est la recommandation après tout GAS positif. Une partie importante de la population métastatique ganglionnaire ne tirerait pas bénéfice de la réalisation d'un curage de complément en terme de récurrence loco-régionale et de survie, si un traitement adjuvant est réalisé. Un essai de phase III multicentrique randomisé va débiter étudiant la non-infériorité de la réalisation ou non du curage axillaire en cas d'envahissement des GAS.

BIBLIOGRAPHIE

1. Institut national du cancer. «□La situation du cancer en France en 2011□»
2. Husen M, Paaschburg B, Flyger HL. Two-step axillary operation increases risk of arm morbidity in breast cancer patients. *Breast* 2006 Oct;15(5):620-8
3. Tew K, Irwig L, Matthews A, Crowe P, Macaskill P. Meta-analysis of sentinel node imprint cytology in breast cancer. *Br J Surg*. 2005 Sep;92(9):1068-80.
4. Wang Z, Wu LC, Chen JQ. Sentinel lymph node biopsy compared with axillary lymph node dissection in early breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Oct;129(3):675-89.
5. Wilking N, Rutqvist LE, Carstensen J, Mattsson A, Skoog L. Prognostic significance of axillary nodal status in primary breast cancer in relation to the number of resected nodes. Stockholm Breast Cancer Study Group. *Acta Oncol*. 1992;31(1):29-35.
6. Beenken SW, Urist MM, Zhang Y, Desmond R, Krontiras H, Medina H, et al. Axillary lymph node status, but not tumor size, predicts locoregional recurrence and overall survival after mastectomy for breast cancer. *Ann Surg*. 2003 May;237(5):732-8
7. Osborne MP, Ormiston N, Harmer CL, McKinna JA, Baker J, Greening WP. Breast conservation in the treatment of early breast cancer. A 20-year follow-up. *Cancer*. 1984 Jan 15;53(2):349-55.
8. International Breast Cancer Study Group, Rudenstam CM, Zahrieh D, Forbes JF, Crivellari D, Holmberg SB, et al. Randomized trial comparing axillary clearance versus no axillary clearance in older patients with breast cancer: first results of International Breast Cancer Study Group Trial 10-93. *J Clin Oncol*. 2006 Jan 20;24(3):337-44.
9. Avril A, Le Bouëdec G, Lorimier G, Classe JM, Tunon-de-Lara C, Giard S, et al. Phase III randomized equivalence trial of early breast cancer treatments with or without axillary clearance in post-menopausal patients results after 5 years of follow-up. *Eur J Surg Oncol*. 2011 Jul;37(7):563-70.
10. Houvnaeghel G, Nos C, Giard S, Mignotte H, Esterni B, Jacquemier J, et al. A nomogram predictive of non-sentinel lymph node involvement in breast cancer patients with a sentinel lymph node micrometastasis. *Eur J Surg Oncol*. 2009 Jul;35(7):690-5.
11. Ivens D, Hoe AL, Podd TJ, Hamilton CR, Taylor I, Royle GT. Assessment of morbidity from complete axillary dissection. *Br J Cancer*. 1992 Jul;66(1):136-8.
12. Pogson CJ, Adwani A, Ebbs SR. Seroma following breast cancer surgery. *Eur J Surg Oncol*. 2003 Nov;29(9):711-7.
13. Petrek JA, Heelan MC. Incidence of breast carcinoma-related lymphedema. *Cancer*. 1998 Dec 15;83(12 Suppl American):2776-81.
14. Velanovich V, Szymanski W. Quality of life of breast cancer patients with lymphedema. *Am J Surg*. 1999 Mar;177(3):184-7
15. Anderson RT, Kimmick GG, McCoy TP, Hopkins J, Levine E, Miller G, Ribisl P, Mihalko SL. A randomized trial of exercise on well-being and function following breast cancer surgery: the RESTORE trial. *J Cancer Surviv*. 2012 Jun;6(2):172-81.
16. Hack TF, Cohen L, Katz J, Robson LS, Goss P. Physical and psychological morbidity after axillary lymph node dissection for breast cancer. *J Clin Oncol*. 1999 Jan;17(1):143-9.
17. Keramopoulos A, Tsionou C, Minaretzis D, Michalas S, Aravantinos D. Arm morbidity following treatment of breast cancer with total axillary dissection: a multivariate approach. *Oncology*. 1993 Nov-Dec;50(6):445-9.
18. Cabanas RM. An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer*. 1977 Feb;39(2):456-66.

19. Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg*. 1992 Apr;127(4):392-9.
20. Giuliano AE, DM K, Guenther JM, Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg*. 1994 Sep;220(3):391-8
21. Rodier JF, Routiot T, Mignotte H, Janser JC, Bremond A, Bartier C, et al. Identification of axillary sentinel node by lymphotropic dye in breast cancer. Feasibility study apropos of 128 cases. *Chirurgie*. 1998 Jun;123(3):239-46.
22. Kim T, Giuliano AE, Lyman GH. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in early-stage breast carcinoma: a metaanalysis. *Cancer*. 2006 Jan 1;106(1):4-16.
23. Newman LA. Current issues in the surgical management of breast cancer: a review of abstracts from the 2002 San Antonio Breast Cancer Symposium, the 2003 Society of Surgical Oncology annual meeting, and the 2003 American Society of Clinical Oncology meeting. *Breast J*. 2004 Jan-Feb;10 Suppl 1:S22-5.
24. Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, Brown AM, Harlow SP, Costantino JP, et al. Sentinel-lymph-node resection compared with conventional axillary-lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2010 Oct;11(10):927-33.
25. Purushotham AD, Upponi S, Klevesath MB, Bobrow L, Millar K, Miles JP, et al. Morbidity after sentinel lymph node biopsy in primary breast cancer: results from a randomized controlled trial. *J Clin Oncol*. 2005 Jul 1;23(19):4312-21
26. Classe JM, Livartowski A, Baffert S. Évaluation médico-économique de la technique du ganglion sentinelle comparée au curage axillaire dans les cancers du sein opérables d'emblée. *Institut National du Cancer*. Mai 2009
27. Mansel RE, Fallowfield L, Kissin M, Goyal A, Newcombe RG, Dixon JM, Yiangou C, Horgan K, Bundred N, Monypenny I, England D, Sibbering M, Abdullah TI, Barr L, Chetty U, Sinnott DH, Fleissig A, Clarke D, Ell PJ. Randomized multicenter trial of sentinel node biopsy versus standard axillary treatment in operable breast cancer: the ALMANAC Trial. *J Natl Cancer Inst*. 2006 May 3;98(9):599-609.
28. Wilke LG, McCall LM, Posther KE, Whitworth PW, Reintgen DS, Leitch AM, et al. Surgical complications associated with sentinel lymph node biopsy: results from a prospective international cooperative group trial. *Ann Surg Oncol*. 2006 Apr;13(4):491-500.
29. Recommandations pour la Pratique Clinique: Nice-Saint-Paul-de-Vence 2011. *Oncologie*. 2011 Vol 13, Num 10-11, Oct-Nov
30. De Mascarel I, Mac Grogan G. Strategies for management of axillary lymph nodes in breast cancer. Point of view of the Institut Bergonié. *Ann Pathol*. 2003 Dec;23(6):518-33.
31. Cserni G. Pathological work-up and assessment of sentinel lymph nodes in melanoma patients. *Magy Onkol*. 2003;47(1):51-7.
32. Lyman GH, Giuliano AE, Somerfield MR, Benson AB, Bodurka DC, Burstein HJ, et al. American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005 Oct 20;23(30):7703-20.
33. Salhab M, Patani N, Mokbel K. Sentinel lymph node micrometastasis in human breast cancer: an update. *Surg Oncol*. 2011 Dec;20(4):e195-206.
34. Layfield M, Agrawal A, Roche H, Cutress I. Intraoperative assessment of sentinel lymph nodes in breast cancer. *Brit J Surg* 2011; 98: 4-17.
35. Chicken DW, Kocjan G, Falzon M, Lee AC, Douek M, Sainsbury R, et al. Intraoperative touch imprint cytology for the diagnosis of sentinel lymph node metastases in breast cancer. *Br J Surg*. 2006 May;93(5):572-6.

36. Cox C, Centeno B, Dickson D, Clark J, Nicosia S, Dupont E, et al. Accuracy of intraoperative imprint cytology for sentinel lymph node evaluation in the treatment of breast carcinoma. *Cancer*. 2005 Feb 25;105(1):13-20.
37. Classe JM, Loussouarn D, Campion L, Fiche M, Curtet C, Dravet F, et al. Validation of axillary sentinel lymph node detection in the staging of early lobular invasive breast carcinoma: a prospective study. *Cancer*. 2004 Mar 1;100(5):935-41.
38. Krishnamurthy S, Meric-Bernstam F, Lucci A, Hwang RF, Kuerer HM, Babiera G, et al. A prospective study comparing touch imprint cytology, frozen section analysis, and rapid cytokeratin immunostain for intraoperative evaluation of axillary sentinel lymph nodes in breast cancer. *Cancer*. 2009 Apr 1;115(7):1555-62.
39. Hughes SJ, Xi L, Raja S, Gooding W, Gilanders WE, Mikhitarian K, et al. A rapid, fully automated, molecular-based assay accurately analyzes sentinel lymph nodes for the presence of metastatic breast cancer. *Ann Surg*. 2006 Mar;243(3):389-98.
40. Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol*. 2008 Jun;129(6):705-33.
41. Chu C, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology*. 2002 May;40(5):403-39.
42. Ellis P, Schnitt SJ, Sastre-Garau X. Invasive breast carcinoma. In: Tavassoli FA, Devilee P, eds. *WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. Lyon: Lyon Press, 2003.
43. Alvarenga CA, Paravidino PI, Alvarenga M, Dufloth R, Gomes M, Zeferino LC, et al. 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 Jun;64(6):493-7.
44. Bernstein JL, Godbold JH, Raptis G, Watson MA, Levinson B, Aaronson SA, et al. Identification of mammaglobin as a novel serum marker for breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2005 Sep 15;11(18):6528-35.
45. Backus J, Laughlin T, Wang Y, White R, Baden J, Justus Min C, et al. Identification and characterization of optimal gene expression markers for detection of breast cancer metastasis. *J Mol Diagn*. 2005 Aug;7(3):327-36.
46. Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, Kaneko T, Iwase T, Akiyama F, et al. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2007 Aug 15;13(16):4807-16.
47. Feldman S, Krishnamurthy S, Gillanders W, Gittleman M, Beitsch PD, Young PR, et al. A novel automated assay for the rapid identification of metastatic breast carcinoma in sentinel lymph nodes. *Cancer*. 2011 Jun 15;117(12):2599-607.
48. Visser M, Jiwa M, Hostman A, Brink AA, Pol RP, van Diest P, et al. Intra-operative rapid diagnostic method based on CK19 mRNA expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer. *Int J Cancer*. 2008 Jun 1;122(11):2562-7.
49. Schem C, Maas N, Bauerschlag DO, Carstensen MH, Loning T, Roder C, et al. 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 Feb;454(2):203-10.
50. Tamaki Y, Akiyama F, Iwase T, Kaneko T, Tsuda H, Sato K, 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 Apr 15;15(8):2879-84.
51. Bernet L, Cano R, Martinez M, Duenas B, Matias-Guiu X, Morell L, et al. Diagnosis of the sentinel lymph node in breast cancer: a reproducible molecular method: a multicentric Spanish study. *Histopathology*. 2011 May;58(6):863-9.

52. Snook KL, Layer GT, Jackson PA, de Vries CS, Shousha S, Sinnett HD, et al. Multicentre evaluation of intraoperative molecular analysis of sentinel lymph nodes in breast carcinoma. *Br J Surg*. 2011 Apr;98(4):527-35
53. Frère-Belda MA, Bats AS, Gillaizeau F, Poulet B, Clough KB, Nos C, et al. 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.
54. Julian TB, Blumencranz P, Deck K, Withworth P, Berry SM, Rosenberg A, et al. Novel intraoperative molecular test for sentinel lymph node metastases in patients with early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Jul 10;26(20):3338-45.
55. Viale G, Dell'Orto P, Stufano V, De Brito Lima LN, Paganelli G, Maisonneuve P, et al. Comparative evaluation of an extensive histopathologic examination and a real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction assay for mammaglobin and cytokeratin 19 on axillary sentinel lymph nodes of breast carcinoma patients. *Ann Surg*. 2008 Jan;247(1):136-42.
56. Martinez M, Veys I, Majjaj S, Lespagnard L, Schobbens JC, Rouas G, et al. Clinical validation of a molecular assay for intra-operative detection of metastases in breast sentinel lymph nodes. *Eur J Surg Oncol*. 2009 Apr;35(4):387-92
57. Mansel RE, Goyal A, Douglas-Jones A, Woods V, Goyal S, Monypenny I, et al. Detection of breast cancer metastasis in sentinel lymph nodes using intra-operative real time GeneSearch BLN Assay in the operating room: results of the Cardiff study. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 Jun;115(3):595-600.
58. Veys I, Majjaj S, Salgado R, Schobbens JC, Manouach F, Bourgeois P, et al. Evaluation of the histological size of the sentinel lymph node metastases using RT-PCR assay: a rapid tool to estimate the risk of non-sentinel lymph node invasion in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Dec;124(3):599-605.
59. Tafe LJ, schwab MC, Lefferts JA, Wells WA, Tsongalis GJ. A validation study of a new molecular diagnostic assay: the Dartmouth-Hitchcock Medical Center experience with the GeneSearch BLN assay in breast sentinel lymph nodes. *Exp Mol Pathol*. 2010 Feb;88(1):1-6.
60. Cutress RI, McDowell A, Gabriel FG, Jeffrey MJ, Agrawal A, Wise M, et al. Observational and cost analysis of the implementation of breast cancer sentinel node intraoperative molecular diagnosis. *J Clin Pathol*. 2010 Jun;63(6):522-9
61. Baranzelli MC, Penault-Llorca F, Revillon F, Mishellany F, Portefaix G, Chauvet MP, et al. Intraoperative determination of axillary node metastasis by RT-PCR. *Bull Cancer*. 2010 Mar;97(3):349-55
62. Singletary SE, Connolly JL. Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin*. 2006 Jan-Feb;56(1):37-47
63. Sagara Y, Ohi Y, Matsukata A, Totsumoto D, Baba S, Tamada S, et al. Clinical application of the one-step nucleic acid amplification method to detect sentinel lymph node metastasis in breast cancer. *Breast Cancer*. 2011 Dec 28.
64. Osako T, Iwase T, Kimura K, Yamashita K, Horii R, Akiyama F. Accurate staging of axillary lymph nodes from breast cancer patients using a novel molecular method. *Br J Cancer*. 2011 Aug 30.
65. Castellano I, Macri L, Deambrogio C, Balmativola D, Bussone R, Ala A, et al. Reliability of Whole Sentinel Lymph Node Analysis by One-Step Nucleic Acid Amplification for Intraoperative Diagnosis of Breast Cancer Metastases. *Ann Surg*. 2011 Oct 4.
66. Tamaki Y, Sato N, Homma K, Nishimura R, Tsujimoto M, Yoshidome K, et al. Routine clinical use of the one-step nucleic acid amplification assay for detection of sentinel lymph node metastases in breast cancer patients: Results of a multicenter study in Japan. *Cancer*. 2012 Jan 17.

67. Godey F, Leveque J, Tas P, Gandon G, Poree P, Mesbah H, et al. Sentinel lymph node analysis in breast cancer: contribution of one-step nucleic acid amplification (OSNA). *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Jan;131(2):509-16.
68. Osako T, Iwase T, Kimura K, Yamashita K, Horii R, Yanagisawa A, et al. Intraoperative molecular assay for sentinel lymph node metastases in early stage breast cancer: A comparative analysis between one-step nucleic acid amplification whole node assay and routine frozen section histology. *Cancer.* 2011 Oct 1;117(19):4365-74
69. Ansari B, Ogston SA, Purdie CA, Adamson DJ, Brown DC, Thompson AM. Meta-analysis of sentinel node biopsy in ductal carcinoma in situ of the breast. *Br J Surg.* 2008 May;95(5):547-54.
70. Wilkie C, White L, Dupont E, Cantor A, Cox CE. An update of sentinel lymph node mapping in patients with ductal carcinoma in situ. *Am J Surg.* 2005 Oct;190(4):563-6.
71. Intra M, Rotmensz N, Veronesi P, Colleoni M, Iodice S, Paganelli G, et al. Sentinel node biopsy is not a standard procedure in ductal carcinoma in situ of the breast: the experience of the European institute of oncology on 854 patients in 10 years. *Ann Surg.* 2008 Feb;247(2):315-9.
72. Lara JF, Young SM, Velilla RE, Santoro EJ, Templeton SF. The relevance of occult axillary micrometastasis in ductal carcinoma in situ: a clinicopathologic study with long-term follow-up. *Cancer.* 2003 Nov 15;98(10):2105-13.
73. Boler DE, Cabioglu N, Ince U, Uras C. Sentinel Lymph Node Biopsy in Pure DCIS: Is It Necessary? *ISRN Surg.* 2012;2012:394095.
74. Osako T, Iwase T, Kimura K, Masumura K, Horii R, Akiyama F. Incidence and possible pathogenesis of sentinel node micrometastases in ductal carcinoma in situ of the breast detected using molecular whole lymph node assay. *Br J Cancer.* 2012 Apr 24.
75. Rakha EA, Lee AH, Evans AJ, Menon S, Assad NY, Hodi Z, Macmillan D, Blamey RW, Ellis IO. Tubular carcinoma of the breast: further evidence to support its excellent prognosis. *J Clin Oncol.* 2010 Jan 1;28(1):99-104.
76. Papadatos G, Rangan AM, Psarianos T, Ung O, Taylor R, Boyages J. Probability of axillary node involvement in patients with tubular carcinoma of the breast. *Br J Surg.* 2001 Jun;88(6):860-4.
77. Cabral AH, Recine M, Paramo JC, McPhee MM, Poppiti R, Mesko TW. Tubular carcinoma of the breast: an institutional experience and review of the literature. *Breast J.* 2003 Jul-Aug;9(4):298-301.
78. Sullivan T, Raad RA, Goldberg S, Assaad SI, Gadd M, Smith BL, et al. Tubular carcinoma of the breast: a retrospective analysis and review of the literature. *Breast Cancer Res Treat.* 2005 Oct;93(3):199-205.
79. Livi L, Paiar F, Meldolesi E, Talamonti C, Simontacchi G, Detti B, et al. Tubular carcinoma of the breast: outcome and loco-regional recurrence in 307 patients. *Eur J Surg Oncol.* 2005 Feb;31(1):9-12.
80. Javid SH, Smith BL, Mayer E, Bellon J, Murphy CD, Lipsitz S, et al. Tubular carcinoma of the breast: results of a large contemporary series. *Am J Surg.* 2009 May;197(5):674-7.
81. Leikola J, Heikkilä P, Von Smitten K, Leidenius M. The prevalence of axillary lymph-node metastases in patients with pure tubular carcinoma of the breast and sentinel node biopsy. *Eur J Surg Oncol.* 2006 Jun;32(5):488-91.
82. Valla M, Gjertrud Mjølnes P, Knopp S. Implementation of step sectioning in the examination of sentinel lymph nodes to improve the detection of micrometastases in breast cancer patients. *APMIS.* 2012 Jul;120(7):521-8
83. Houvvenaeghel G, Nos C, Mignotte H, Classe JM, Giard S, Rouanet P, et al. Micrometastases in sentinel lymph node in a multicentric study: predictive factors of

nonsentinel lymph node involvement--Groupe des Chirurgiens de la Federation des Centres de Lutte Contre le Cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Apr 20;24(12):1814-22.

84. Lupe K, Truong PT, Alexander C, Speers C, Tyldesley S. Ten-Year Locoregional Recurrence Risks in Women With Nodal Micrometastatic Breast Cancer Staged With Axillary Dissection. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2011 Feb 5

85. Grabau D, Jensen MB, Rank F, Blichert-Toft M. Axillary lymph node micrometastases in invasive breast cancer: national figures on incidence and overall survival. *APMIS*. 2007 Jul;115(7):828-37.

86. Cortesi L, Proietto M, Cirilli C, Tazzioli G, Andreotti A, Federico M. Prognosis and treatment of micrometastatic breast cancer sentinel lymph node: A population-based study. *J Surg Oncol*. 2012 Apr 4

87. Viale G, Maiorano E, Pruner G, Mastropasqua MG, Valentini S, Galimberti V, et al. Predicting the risk for additional axillary metastases in patients with breast carcinoma and positive sentinel lymph node biopsy. *Ann Surg*. 2005 Feb;241(2):319-25.

88. Cserni G, Gregori D, Merletti F, Mano MP, Ponti A, Sandrucci S, et al. Meta-analysis of non-sentinel node metastases associated with micrometastatic sentinel nodes in breast cancer. *Br J Surg*. 2004 Oct;91(10):1245-52.

89. Menes TS, Tartter PI, Mizrahi H, Constantino J, Estabrook A, Smith SR. Breast cancer patients with pN0(i+) and pN1(mi) sentinel nodes have high rate of nonsentinel node metastases. *J Am Coll Surg*. 2005 Mar;200(3):323-7.

90. Van la Parra RF, Peer PG, Ernst MF, Bosscha K. Meta-analysis of predictive factors for non-sentinel lymph node metastases in breast cancer patients with a positive SLN. *Eur J Surg Oncol*. 2011 Apr;37(4):290-9.

91. Boler DE, Uras C, Ince U, Cabioglu N. Factors predicting the non-sentinel lymph node involvement in breast cancer patients with sentinel lymph node metastases. *Breast*. 2012 Mar 10.

92. Sanghani M, Balk EM, Cady B. Impact of axillary lymph node dissection on breast cancer outcome in clinically node negative patients: a systematic review and meta-analysis. *Cancer*. 2009 Apr 15;115(8):1613-20.

93. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Withworth PW, Blumencranz PW, et al. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2011 Feb 9;305(6):569-75.

94. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ, et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol*. 2011 Aug;22(8):1736-47.

95. Jatoi I, Chen BE, Anderson WF, Rosenberg PS. Breast cancer mortality trends in the United States according to estrogen receptor status and age at diagnosis. *J Clin Oncol*. 2007 May 1;25(13):1683-90.

96. Jeruss JS, Hunt KK, Xing Y, Krishnamurthy S, Meric-Bernstam F, Cantor SB, Ross MI, Cormier JN. Is intraoperative touch imprint cytology of sentinel lymph nodes in patients with breast cancer cost effective? *Cancer*. 2006 Nov 15;107(10):2328-36

97. Canavese G, Bruzzi P, Catturich A, Vecchio C, Tomei D, Carli F, Truini M, Andreoli GB, Priano V, Dozin B. Intra-operative evaluation of the sentinel lymph node for T1-N0 breast-cancer patients: always or never? A risk/benefit and cost/benefit analysis. *Eur J Surg Oncol*. 2010 Aug;36(8):737-44.

98. Holm M, Paaschburg B, Balslev E, Axelsson CK, Willemoe GL, Flyger HL. Intraoperative immunohistochemistry staining of sentinel nodes in breast cancer: clinical and economical implications. *Breast*. 2008 Aug;17(4):372-5.

99. Guillén-Paredes MP, Carrasco-Gonzales L, Chaves-Benito A, Campillo-Soto A, Carillo A, Aquayo-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 August - September;89(7):456-462
100. Parikh RR, Yang Q, Higgins SA, Haffty BG. Outcomes in young women with breast cancer of triple-negative phenotype: the prognostic significance of CK19 expression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2008 Jan 1;70(1):35-42.
101. Vilardell F, Novell A, Martin J, Santacana M, Velasco A, Diez-Castro MJ, et al. Importance of assessing CK19 immunostaining in core biopsies in patients subjected to sentinel node study by OSNA. *Virchows Arch*. 2012 Jun;460(6):569-75.
102. Cserni G, Amendoeira I, Apostolikas N, Bellocq JP, Bianchi S, Bussolati G, Boecker W, Borisch B, Connolly CE, Decker T, Dervan P, Drijkoningen M, Ellis IO, Elston CW, Eusebi V, Faverly D, Heikkila P, Holland R, Kerner H, Kulka J, Jacquemier J, Lacerda M, Martinez-Penuela J, De Miguel C, Peterse JL, Rank F, Regitnig P, Reiner A, Sapino A, Sigal-Zafrani B, Tanous AM, Thorstenson S, Zozaya E, Wells CA; European Working Group for Breast Screening Pathology. Pathological work-up of sentinel lymph nodes in breast cancer. Review of current data to be considered for the formulation of guidelines. *Eur J Cancer*. 2003 Aug;39(12):1654-67.

NOM : BOIFFARD

PRENOM : FLORENCE

**ANALYSE DU GANGLION SENTINELLE DANS LE CANCER DU SEIN PAR LA
BIOLOGIE MOLÉCULAIRE AVEC LA METHODE OSNA : PERFORMANCES
DIAGNOSTIQUES ET IMPLICATIONS CLINIQUES**

Résultats d'une étude prospective sur 400 patientes.

Objectif: L'analyse du ganglion sentinelle nécessite une technique d'analyse fiable. La procédure OSNA est une méthode innovante rapide, semi-quantitative et automatisée. L'objectif de cette étude est de comparer ses performances diagnostiques avec celles de l'histologie traditionnelle.

Matériels et méthode : Il s'agit d'une étude prospective portant sur 400 patientes ayant eu la réalisation d'un ganglion sentinelle analysé par la méthode OSNA. Les performances diagnostiques de la méthode pour 309 d'entre elles ont été comparées aux performances diagnostiques de l'histologie traditionnelle de 618 patientes. Ces dernières ont été appariées sur l'âge, le type tumoral, sa taille et son grade.

Résultats : Il est retrouvé un taux d'envahissement ganglionnaire global de 27,5% dont 13,5% de macrométastases, 8,75% de micrométastases et 5,25% de ganglions positifs par levée d'inhibition. Concernant l'étude comparative, il est mis en évidence une différence significative de performance diagnostique avec l'analyse extemporanée par empreinte cytologique ($p < 0,001$). Il n'est pas mis en évidence de différence de performance avec l'histologie définitive ($p = 0,21$). Il est retrouvé plus de métastases avec la méthode OSNA dans le carcinome canalaire in situ ($p = 0,038$).

Conclusion : Notre étude confirme que la méthode d'analyse OSNA est aussi performante que l'histologie traditionnelle et plus performante que l'analyse extemporanée par empreinte cytologique. De plus, elle semble intéressante pour certains types histologiques.

Mots-clés :

Cancer du sein ; ganglion sentinelle ; analyse moléculaire ; OSNA