

UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

UFR DE MEDECINE

Année 2007

N°

THESE

Présentée en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Mention : Médecine

Spécialité : Gynécologie-Obstétrique

par

Pascal ABBOUD

**Valeur pronostique de la ploïdie et de l'index de prolifération par
double marquage MIB1-AgNORs dans le cancer du sein**

Soutenue publiquement le 28 mars 2007

JURY

Rapporteurs : F. SPYRATOS, Biologiste des Centres, Saint-Cloud
P. PUJOL, Professeur des Universités, Montpellier

Examineurs : P. BIREMBAUT, Professeur des Universités, Reims
J. GONDRY, Professeur des Universités, Amiens
C. QUEREUX, Professeur des Universités, Reims

Directeur de thèse : D. PLOTON, Professeur des Universités, Reims

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur le Professeur Jean Jacques ADNET
pour m’ avoir accueilli au Laboratoire Pol Bouin
et m’ avoir soutenu dans la phase initiale de ce travail.

J’ exprime toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Dominique PLOTON
qui a accepté de diriger ce travail et m’ a guidé tout au long de ces années
avec beaucoup de patience, de bienveillance et de rigueur.
Qu’ il soit assuré de ma profonde gratitude

J’ adresse tous mes remerciements à Monsieur le Professeur Philippe BIREMBAUT
qui, succédant au Pr Adnet, m’ a maintenu grandes ouvertes
les portes du Laboratoire Pol Bouin
et m’ a apporté à maintes reprises son soutien sans réserve

Je suis honoré par la présence de Madame le Docteur Frédérique SPYRATOS

Qui a accepté de juger ce travail en tant que rapporteur

Ses travaux en pathologie mammaire font référence en la matière
et constituent pour nous un exemple de rigueur et de pertinence scientifique

Je remercie vivement le Professeur Pascal PUJOL

qui me fait l'amitié de juger ce travail en tant que rapporteur

Son investissement en pathologie du sein, son enthousiasme, sa persévérance
sont largement reconnus et appréciés par la communauté médicale

Je remercie Monsieur le Professeur Christian QUEREUX

d'avoir accepté de juger ce travail que j'ai initié dans son Service

Qu'il trouve ici toute ma reconnaissance d'avoir participé à tous

les moments importants de ma vie professionnelle

J'adresse mes remerciements au Professeur Jean GONDRY

qui a accepté de juger ce travail

Des années de collaboration hospitalière, m'ont fait apprécier

son dynamisme, sa rigueur scientifique et sa convivialité

Un grand merci au Docteur Marianne LORENZATO
Qui a participé dès la première heure à ce travail
Elle m'a guidé et éclairé dans toutes les étapes, avec patience et rigueur

Tous mes remerciements à Christine LECHKI
Son aide a été précieuse dans ce travail

Le Professeur Damien JOLY, le Docteur Florence LEYMERIE
Nous ont apporté leur expertise et leur rigueur dans la méthodologie
et l'exploitation statistique de nos résultats
qu'ils en soient vivement remerciés

Merci au Docteur Christiane POURNY
Après de laquelle j'ai beaucoup appris dans le domaine de la sénologie
Son savoir, sa curiosité, son approche des patients sont exemplaires
Elle a eu la gentillesse de lire et de corriger ce travail

Je remercie Chantal DELVINCOURT pour ses nombreux et pertinents conseils

Mes remerciements vont également à

José DURIN et Laurence DUMAY pour leur aide dans l'impression de ce travail

Aux secrétaires des services de Gynécologie-Obstétrique de Reims et Soissons

Ainsi qu'à celles de l'Institut Jean Godinot et du Laboratoire Pol Bouin

A mes enfants Baptiste, Elise et Louis
qui m'ont témoigné de la bienveillance quand j'étais devant l'ordinateur
avec, de temps en temps, des regards de désapprobation

A mon épouse Floriane qui m'a toujours soutenu dans mes projets et mes réalisations
..... avec beaucoup de patience

A mes Parents, mes Frères et ma Belle Famille qui sont soulagés
..... de savoir que j'ai fini ce travail

je dédie cette Thèse

*Table
des matières*

Table des matières

I. Cancer du sein et facteurs pronostiques	p.1
1. Position du problème	p.2
2. Les facteurs pronostiques validés	p.3
2.1 La taille tumorale	p.4
2.2 Le statut ganglionnaire	p.5
2.3 L'histologie de la lésion	p.9
2.3.1 Le type histologique	p.9
2.3.2 Le grade histologique	p.12
2.3.3 Le compte mitotique	p.15
2.4 Les récepteurs hormonaux	p.15
2.5 Activateur du plasminogène type urokinase (uPA) et inhibiteur principal (PAI-1)	p.18
3. La cytométrie en image	p.19
3.1 Le principe	p.20
3.2 Les notions de base d'analyse d'images	p.20
3.2.1 la lumière	p.20
3.2.2 les différentes étapes	p.20
3.2.2.1 le pré-traitement	
3.2.2.2 la segmentation	
3.2.2.3 la paramétrisation et le traitement des données	
3.3 Absorption et fluorescence	p.24
3.3.1 l'absorption	p.24
3.3.2 la fluorescence	p.24

4. L'analyse statistique des études pronostiques	p.25
4.1 Les définitions	p.25
4.2 Les données indispensables pour l'analyse de survie	p.28
4.3 L'interprétation des courbes de survie	p.29
4.4 Comparaison des courbes de Survie – test de logrank	p.29
5. Les facteurs pronostiques biologiques en cours d'évaluation	p.31
5.1 La quantification de l'ADN	p.32
5.1.1 Les principes	p.32
5.1.2 Les différents étapes	p.33
5.2 Le Ki67 / MIB 1	p.36
5.3 Les protéines « Argyrophiles Nucleolar Organizer Regions » AgNOR	p.40
5.4 La prolifération cellulaire	p.46
5.5 Amplification du gène Her-2/neu	p.47
6. Nos hypothèses de travail	p.53
II. Valeur pronostique de la Ploïdie, étude préliminaire	p.55
1. Objectif	p.56
2. Méthodes	p.56
2.1 La technique de coloration de l'ADN	p.56
2.2 La cytométrie	p.56
2.3 Les patientes et matériel	p.57
2.4 L'analyse statistique	p.61
3. Résultats	p.61
3.1 la comparaison des deux analyses	p.61
3.2 l'évolution clinique	p.64
4. Conclusions	p.65

III. Valeur pronostique de l'index de prolifération par double marquage MIB1-AgNORs.	
Étude préliminaire	p.66
1- les patientes	p.67
2 - la technique de double marquage MIB1-AgNOR	p.67
3- les résultats	p.70
3.1 la quantification des MIB1, des AgNORs et de l'index de prolifération (IP)	p.70
3.2 Pronostic et MIB1	p.71
3.3 Pronostic et AgNORs	p.72
3.4 Pronostic et index de prolifération	p.73
3.5 Pronostic et distribution des faibles et fortes valeurs en AgNORs et MIB1	p.74
IV. Intérêt de la ploïdie et du double marquage MIB1-AgNORs pour les patientes sans atteinte ganglionnaire, n'ayant pas reçu de chimiothérapie.	p.76
1. Patientes et méthodes	p.77
1.1 Les patientes	p.77
1.2 Les méthodes biologiques	p.78
1.3 L'étude statistique	p.79
2. Résultats	p.79
2.1 Les résultats globaux	p.79
2.2 La taille tumorale et le pronostic	p.85
2.3 Le grade histopronostique de SBR et le pronostic	p.88
2.4 Les embolies lymphatiques et le pronostic	p.90
2.5 La ploïdie et le pronostic	p.91
2.6 L'index MIB1 et le pronostic	p.95
2.7 Les AgNORs et le pronostic	p.98
2.8 L'index de prolifération et le pronostic	p.102
2.9 La surexpression de HER2-neu et le pronostic	p.105

V. Discussion p.108

1. Intérêt pronostique de la ploïdie p.111
2. Intérêt pronostique de l'index MIB1 p.116
3. Intérêt pronostique des AgNORs p.123
4. Intérêt pronostique du double marquage MIB1-AgNORs p.128
5. Intérêt pronostique de surexpression de HER2-neu p.130
6. Intérêt pronostique des embolies vasculaires et lymphatiques p.133

VI. Conclusions p.134

Références bibliographiques p.138

Annexes

- **annexe 1** : LORENZATO M, ABOUD P, MASURE M, BOTTENS D, VISSEAU-COLETTO B, QUEREUX C, ADNET JJ. *Image cytometry detection of breast cancer with > 5C DNA content and minor DNA stemlines*. *Analyt Quant Cytol Histol* 2000 ; 22 : 199-205

- **annexe 2** : LORENZATO M, ABOUD P, LECHKI C, BROWARNY J O'DONOHUE MF, PLOTON D, ADNET JJ. *Proliferation assessment in breast cancer : a double staining technique for AgNOR quantification in MIB-1 positive cells especially adapted for image cytometry*. *Micron* 2000 ; 31 : 151-9

-**annexe 3** : ABOUD P , LORENZATO M, LECHKI C, JOLY D, QUEREUX C, BIREMBAUT P, PLOTON D. *Prognostic value of histological and biological markers in node negative breast cancer*. Soumis à *Am J Surgical Pathol* en décembre 2006

- **annexe 4** : procédure du double marquage

- **annexe 5** : la liste des tableaux

- **annexe 6** : liste des figures

Cancer du sein
et
facteurs pronostiques

1. Position du problème

Le cancer du sein a été diagnostiqué chez 1 151 298 personnes, à travers le monde en 2002, représentant ainsi plus de 10% des cancers (Ferlay 2004). Il représente un problème de santé publique dans les pays occidentaux. En Europe, en 2004, il a été estimé que 360 746 nouveaux cas ont été mis en évidence, et 129 010 décès lui sont directement imputables (Boyle 2005 a). En France, il existe une nette augmentation de l'incidence depuis 1975, passant de 19 250 à 40 000 nouveaux cas par an en 2000 (Espié 2001). Il représente 1/3 de l'ensemble des cancers de la femme et atteint une femme sur 9. Ceci s'explique partiellement par le vieillissement de la population et une politique de dépistage radiologique en plein essor. Par rapport aux autres pays européens, en 20 ans, la France est passée d'un pays à faible incidence à un pays à forte incidence de cancer du sein, se rapprochant ainsi des pays de l'Europe du Nord. Néanmoins les chiffres, à notre disposition en France, sont extrapolés à partir de registres départementaux de cancer du sein, faute d'un registre national, qui ne couvrent que 10% de la population. Le nombre de décès par an est estimé à 10 000 (Espié 2001).

Les axes de recherche dans ce domaine sont nombreux et la meilleure définition du pronostic de la maladie grâce à des paramètres biologiques ou anatomopathologiques plus pertinents, occupe une place de choix.

La recherche de facteurs pronostiques répond à la nécessité d'identifier les patientes à très faible risque de récurrence, pour lesquelles la probabilité de survie par le seul traitement locorégional, si possible conservateur, approche ou rejoint celle de la population saine, et auxquelles un traitement systémique et ses conséquences en terme d'effets secondaires et de coût pourra être épargné ou réduit au minimum. De même, il est indispensable de pouvoir identifier les patientes à haut risque de rechute, pour lesquelles le traitement locorégional ne suffira probablement pas à assurer la guérison et pour lesquelles un traitement systémique pourra influencer favorablement la survie.

A la fin des années 1990, nous avons assisté à une escalade thérapeutique notamment chez les patientes sans atteinte ganglionnaire, donc à plus faible risque de récurrence. Jusqu'en 1998 seules les patientes non ménopausées présentant une atteinte ganglionnaire axillaire bénéficiaient d'une chimiothérapie adjuvante. Depuis 1998, en l'absence de facteurs

pronostiques individuels parfaits, la grande majorité des patientes est considérée depuis 1998 comme à risque et reçoit un traitement systémique adjuvant cytotoxique. Selon les recommandations de la conférence de consensus de St Gallen de 1998, seules les patientes sans atteinte ganglionnaire (N-), de plus de 35 ans avec une lésion infiltrante de moins de 10 mm, Bloom 1 et exprimant des récepteurs hormonaux sont dans le groupe à faible risque et ne nécessitent pas de chimiothérapie adjuvante (Zujewski 1998). Si une de ces conditions n'est pas respectée, une chimiothérapie est recommandée. Cette escalade thérapeutique commence à avoir un impact avec un infléchissement de la mortalité de la maladie (Boyle 2005 b). Pourtant, in fine, 10% seulement des patientes sans atteinte ganglionnaire tireront un bénéfice réel de ces traitements adjuvants tandis que 70% auront été traitées inutilement et 20% auront reçu un traitement inefficace (Espié 2001).

Les facteurs cliniques et anatomopathologiques classiques, âge de la patiente, taille de la tumeur, envahissement ganglionnaire axillaire et grade histopronostique de Scarf-Bloom et Richardson, apportent une évaluation pronostique forte, considérée par certains comme suffisante (Zujewski 1998, Kaufman 2000). Cette évaluation est néanmoins incomplète pour la distinction des patientes à haut ou faible risque d'évolution métastatique, puisque près de 30% des patientes sans atteinte ganglionnaire (N-) rechuteront avant 5 ans et qu'au contraire, 20 à 25% des patientes avec atteinte ganglionnaire (N+) auront une espérance de vie comparable à celle d'une population saine. Des techniques récentes notamment en cytométrie d'images ont permis d'ouvrir de nouveaux axes de recherche avec une approche quantitative plus précise de la ploïdie et de la prolifération cellulaire.

2. Facteurs pronostiques validés

Il existe ainsi des facteurs pronostiques utilisés en pratique courante pour définir la meilleure stratégie thérapeutique quant à la place respective de la chimiothérapie, la radiothérapie et l'hormonothérapie. Ces facteurs sont représentés par la taille tumorale, le statut ganglionnaire, le grade histologique, le type histologique, le compte mitotique et l'expression des récepteurs hormonaux. Le Collège Américain des Pathologistes, lors d'une conférence de consensus, les a tous classés dans la catégorie 1, car leur intérêt pronostique est bien établi (Fitzgibbons 2000). Par contre d'autres facteurs pronostiques ont été classés dans les catégories 2 et 3, car leur impact sur la récurrence ou la survie n'a pas été suffisamment démontré.

2.1 La taille tumorale

La taille clinique de la lésion définit le T de la classification TNM. Cette mesure tient compte du plus grand axe. La réaction stromale périphérique importante, observée dans certaines lésions, est à l'origine d'une surestimation clinique de la tumeur par rapport à la taille histologique réelle. Elle est classée T1 pour les lésions jusqu'à 20 mm, T2 pour les lésions de 21 à 50 mm, T3 pour les lésions à partir de 51 mm et T4 quand une atteinte cutanée et/ou une costale sont observées.

Lorsque la lésion est non palpable, éventualité de plus en plus fréquente avec la généralisation du dépistage, la lésion est classée T0. Néanmoins la modification récente de la classification TNM, intègre la mammographie au même titre que l'examen clinique, dans la stadialisation. Ainsi, une lésion non palpable, stellaire, de 15 mm est classée T1 depuis 2003, au lieu de T0 précédemment.

L'étude histologique permet également d'obtenir la taille de la lésion. Celle-ci est déterminée à l'examen macroscopique et est vérifiée en microscopie. Il est recommandé d'avoir au moins deux dimensions du contingent infiltrant de la lésion et seule la plus importante est utilisée pour la stadialisation. Seule la taille de la composante infiltrante est nécessaire à la classification de la tumeur. La composante in situ est importante à connaître, car déterminante dans le contrôle local de la maladie, mais n'intervient pas dans la stadialisation. Les seuils retenus pour la classification histologique (pT) sont les mêmes que pour la classification clinique, permettant ainsi d'avoir des lésions pT1 à pT4.

Il existe des discordances dues à la réaction stromale périphérique, à la coexistence de carcinome intracanalair et à la multicentricité de certaines lésions.

Les lésions sont considérées comme multicentriques quand elles sont multiples et touchent des territoires situés dans des quadrants différents. Lorsqu'elles sont multiples mais regroupées dans le même quadrant, le terme multifocal est utilisé.

En présence d'une tumeur invasive multifocale ou multicentrique, chaque lésion est mesurée et rapportée séparément et ne peut pas faire l'objet d'une mesure globale unique (Fitzgibbons 2000). La taille histologique, le pT, est déterminée par la lésion la plus volumineuse.

La multifocalité est définie par la présence de localisations invasives ou in situ dans le même quadrant du sein. Des études de clonalité ont confirmé l'origine monoclonale de ces foyers multiples et séparés par du tissu sain (Noguchi 1994). L'extension pourrait s'effectuer par voie canalaire, expliquant la forme triangulaire à sommet mammelonnaire de ce type de lésions. La fréquence de la multifocalité croît avec la taille de la tumeur primitive, représentant 12 et 23% selon qu'elle est inférieure ou supérieure à 20 mm (Gump 1992).

La multicentricité est la présence dans le sein de tumeurs dans des quadrants différents. Il peut s'agir de cancers multiples, mais cette situation est rare (Cabarro 2000).

La tumeur est classée en fonction du foyer le plus volumineux, avec l'adjonction de la notification « multifocale ». Dans l'organigramme décisionnel, la multicentricité ou la multifocalité des lésions implique souvent un traitement local (chirurgical et de radiothérapie) plus étendu et plus agressif. Le pronostic et la décision de la chimiothérapie adjuvante dépendent de la taille histologique du foyer infiltrant le plus volumineux.

La taille tumorale est l'un des plus puissants facteurs pronostiques de la maladie néoplasique. La survie sans récurrence à 10 ans est de 90% pour les lésions de 10 mm, sans atteinte ganglionnaire. Elle est respectivement de 75%, 67% et 41% pour les lésions de moins de 20 mm, de 20 à 30 mm et de 40 à 50 mm

Depuis la conférence de consensus de St Gallen en 2003, la taille histologique de la lésion à partir de laquelle une chimiothérapie est recommandée a été portée de 10 à 20 mm. Les autres critères sont restés inchangés (Goldhirsch 2003).

2.2 Le statut ganglionnaire

L'examen clinique comporte systématiquement l'examen de la région axillaire. L'absence de ganglion palpable est notée N0, la palpation de ganglions souples mobiles est notée N1, alors que lorsqu'ils sont fixés, ils sont notés N2. Selon Fisher, le taux de faux négatif, examen clinique normal en présence de ganglions envahis, est de 40% des cas, alors que le taux de faux positif, ganglion palpable sans atteinte néoplasique, est de 30% (Fisher 1983).

Les cellules néoplasiques pénètrent dans le réseau lymphatique péri-tumoral, ou lorsque la tumeur atteint le plexus dermique. Après la traversée de la paroi vasculaire, les embolus de cellules suivent le courant lymphatique et s'arrêtent dans les sinus périphériques des ganglions. Les étapes de l'invasion des ganglions sont les suivantes (Cabarro 2000) :

- le stade de micrométastase sinusale sous forme d'un amas de moins de 2 mm de grand axe ; parfois la métastase se réduit à quelques cellules isolées détectées par immuno-histochimie.
- le stade de métastase parenchymateuse où la tumeur envahit toute la structure du ganglion sous forme massive ou multifocale.
- le stade de rupture capsulaire (RC) lorsque la métastase est volumineuse ; le risque de RC augmente avec le nombre de ganglions envahis..

Le drainage lymphatique de la glande mammaire se fait vers les ganglions du creux axillaire et ceux de la chaîne mammaire interne.

L'envahissement axillaire se fait de manière ordonnée et régulière, en commençant par les ganglions situés à la base de l'aisselle et en dehors du muscle petit pectoral. Il s'agit du niveau I de Berg. Quand ce groupe de ganglions est envahi, l'extension se fait vers les ganglions centraux, en arrière du muscle petit pectoral (niveau II), puis vers les ganglions du sommet de l'aisselle (niveau III). L'incidence des atteintes ganglionnaires axillaires augmente avec la taille de la tumeur primitive (Olivotto 1998) (tableau 1). De même selon la revue de Recht, l'incidence des ganglions axillaires atteints alors que la lésion mesure moins de 10 mm se situe entre 3 et 22% des séries et pour les tumeurs de moins de 5 mm entre 0 et 11% (Recht 1995).

L'envahissement de la chaîne mammaire interne (CMI). Ces ganglions sont situés autour du pédicule vasculaire mammaire interne, en arrière du deuxième, troisième et quatrième cartilages costaux, à 1,5 cm du bord latéral du sternum. Les atteintes ganglionnaires sont rares dans les cancers des quadrants externes de stade I. L'atteinte est plus fréquente en cas de lésion centrale ou atteignant les quadrants internes mais surtout en cas d'envahissement ganglionnaire axillaire : 12 à 21% si moins de quatre ganglions axillaires envahis, de 22 à 70% si plus de quatre ganglions atteints (Koscielny 1984).

Tableau 1. Taux d'envahissement ganglionnaire axillaire en fonction de la taille de la tumeur (Olivetto 1998)

Taille (mm)	Pourcentage de N+
0-5	10,2
6-10	16,6
11-15	25,0
16-20	33,6
21-25	48,9
26-30	52,3
31-50	59,1
51-100	80,1

Le curage de cette chaîne mammaire interne a été abandonné depuis des décennies car trop délabrant, alors que le curage axillaire (CA) est systématiquement réalisé en cas de lésions infiltrantes. Il doit comporter 8 à 10 ganglions pour être considéré comme significatif. Il est à l'origine d'un réel handicap pour 3% des patientes, par l'impotence fonctionnelle résiduelle et le lymphoedème induit. Compte tenu du nombre de plus en plus important de petites lésions diagnostiquées à la mammographie, une désescalade chirurgicale ganglionnaire est actuellement en cours d'évaluation : il s'agit de la technique du ganglion dit sentinelle. En effet il est admis que l'atteinte ganglionnaire axillaire se fait sans saut ganglionnaire dans 97% des cas. Ceci implique que si le premier ganglion est indemne de toute lésion néoplasique, les autres le seront également. Il devient inutile de les prélever, diminuant d'autant la morbidité du geste. La technique implique de la réserver aux petites lésions de moins de 20 mm (T1), sans ganglion palpable (N0), avec un double marquage au bleu et aux isotopes radioactifs. Chaque chirurgien doit avoir réalisé sa courbe d'apprentissage en réalisant à la fois la technique du ganglion sentinelle suivie chez la même patiente d'un curage classique. Par ailleurs les techniques histologiques et immuno-histologiques plus performantes pourront être réalisées sur ce nombre limité de ganglions dits sentinelles.

Le statut des ganglions lymphatiques axillaires est le facteur pronostique le plus important à ce jour, tant au niveau du taux de survie sans métastases qu'au niveau de la survie globale. Seules 20 à 30% des patientes sans atteinte ganglionnaire développeront une récurrence de la

maladie à 10 ans, comparées aux 70% des patientes en cas d'atteinte ganglionnaire. L'atteinte ganglionnaire implique la réalisation de la radiothérapie sur les aires ganglionnaires adjacentes, sus claviculaires et mammaires internes. Le nombre absolu de ganglions atteints a une valeur pronostique avec un seuil fixé à 4, permettant de diviser les patientes en deux groupes : moins de 4 ganglions envahis (pN1) et 4 ganglions ou plus envahis (pN2) dont le pronostic est plus sombre et pour lesquelles une radiothérapie sur le creux axillaire est également réalisée par certaines équipes.

A taille égale, le pronostic est d'autant plus défavorable que le nombre de ganglions envahis est plus important (tableau 2) (Carter 1989)

Tableau 2 . Survie à 5 ans en fonction de la taille tumorale et de l'envahissement ganglionnaire (Carter 1989)

Plus grand axe (mm)	p N0	p N1 (1-3)	p N2 (>3 N atteints)
< 5	99,2	95,3	59,0
5-9	98,3	94,0	54,2
10-19	85,8	86,6	67,2
20-29	92,3	83,4	63,4
30-39	86,2	79,0	56,9
40-49	84,6	69,8	52,6
>50	82,2	73,0	45,5

Les micrométastases se définissent par la détection d'un foyer néoplasique ganglionnaire, par méthode histologique classique, dont le plus grand axe est inférieur à 2 mm et sont classées pN1. Celles détectées uniquement par immunohistochimie, méthode non recommandée en routine, sont signalées, mais ne semblent pas avoir un impact pronostique et sont classées pN0 Mic.

La signification pronostique d'une extension néoplasique microscopique dans le tissu adipeux axillaire reste controversée, nécessitant des études complémentaires pour en affiner l'impact réel, même si très souvent une radiothérapie du creux axillaire est proposée.

2.3 L'histologie de la lésion

2.3.1 Le type histologique

Parmi les cancers infiltrants, il existe la forme commune et les formes particulières. Ces dernières sont de meilleur pronostic, mais uniquement quand elles sont de bas grade histologique (Roquancourt 2001).

Le carcinome canalaire infiltrant de forme commune (fig. 1).

Cette forme représente 80% des carcinomes infiltrants. Leur aspect histologique est très varié : les cellules carcinomateuses se disposent en lobules, en travées ou forment des tubes. Selon l'aspect réalisé, se définissent les formes très bien différenciées d'architecture papillaire ou tubulaire (10%), des formes atypiques (20%) où les cellules se disposent en massifs ou en travées sans différenciation tubuleuse et des formes polymorphes (70%) associant travées et tubes.

L'OMS reconnaît des *carcinomes canauxaires infiltrants avec composante intracanaulaire prédominante* : la composante intracanaulaire (fig. 2) y est très étendue, représentant 80% ou plus du volume tumoral. Les foyers d'infiltrations sont sans particularités.

Le carcinome lobulaire infiltrant (fig. 4).

Il représente 4% des carcinomes infiltrants. Macroscopiquement ces tumeurs mal limitées, difficilement mesurables, ne sont reconnues qu'à la palpation. Histologiquement, la forme typique est constituée de cellules rondes isolées ou disposées en «file indienne». Les cellules sont monomorphes à noyaux ronds presque dépourvus d'anisocaryose ; leur cytoplasme acidophile peu abondant est souvent creusé d'une vacuole de sécrétion PAS ou Bleu Alcilan positive, déjetant le noyau en périphérie. Une composante lobulaire in situ est retrouvée dans 70% des cas.

Le pronostic des carcinomes canauxaires et lobulaires ainsi que leur prise en charge, sont identiques. Néanmoins les carcinomes lobulaires sont plus fréquemment diffus, multicentriques et bilatéraux.

Certains carcinomes lobulaires sont moins typiques soit sur le plan architectural réalisant des cordons, des alvéoles parfois même des tubes, soit sur le plan cytologique avec des atypies

cytonucléaires. Ces formes seraient de moins bon pronostic que les formes lobulaires typiques (Simpson 1994).

Il existe des formes « mixtes » de classification difficile entre lobulaire et canalaire.

Carcinome mucineux ou colloïde muqueux (fig. 5).

Ces carcinomes surviennent plutôt chez la femme âgée et représentent 1% des carcinomes infiltrants. Macroscopiquement il s'agit d'une tumeur nodulaire, bien limitée et d'aspect translucide. Histologiquement, les cellules tumorales pauvres en atypies et en mitoses, sont disposées en lobules ou réalisent des tubes au sein de plages de substance mucoïde lobulée par de fins tractus de collagènes. L'importance de la cellularité est un facteur de mauvais pronostic. Seule la forme colloïde pure doit être classée à part car possède un pronostic relativement favorable.

Carcinome médullaire.

Seule la forme typique, répondant aux critères de Ridolfi, mérite d'être individualisée, du fait de son pronostic favorable avec 84% de survie à 10 ans (Ridolfi 1977). Macroscopiquement il s'agit d'un nodule bien limité de coloration beige de consistance non dure. Les cinq critères de Ridolfi sont : la bonne limitation histologique, une architecture syncytiale, l'absence de différenciation tubuleuse, le pléomorphisme nucléaire modéré ou élevé et un stroma inflammatoire diffus constitué essentiellement de lymphocytes B.

Carcinome tubuleux.

Il s'agit de carcinomes très différenciés représentant environ 4% des cancers infiltrants du sein. Macroscopiquement, il s'agit d'une tumeur stellaire de moins de 10 mm. Histologiquement, les cellules sont cylindriques ou cubiques, d'aspect monomorphe, presque dépourvues d'anisocaryose et de figures de mitoses. Ces structures tubuleuses sont dépourvues d'assises myo-épithéliales. Le carcinome tubuleux bénéficie d'un excellent pronostic, mais seules les tumeurs avec plus de 90% de tubes en font partie.

Carcinome cribriforme infiltrant (fig.6).

Cette variété tumorale partage le même pronostic que le carcinome tubuleux auquel il est souvent associé au sein de la même lésion

Les types histologiques des cancers mammaires.

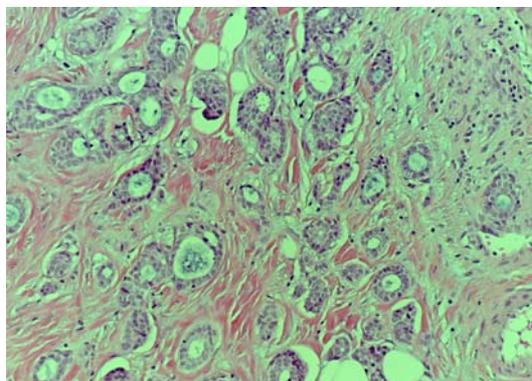


figure 1 : carcinome canalaire infiltrant (x20)

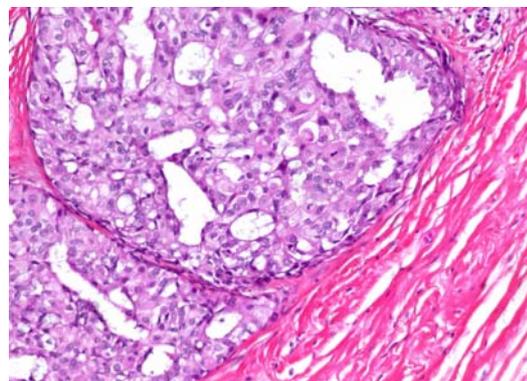


figure 2 : carcinome intra-canalaire (x20)

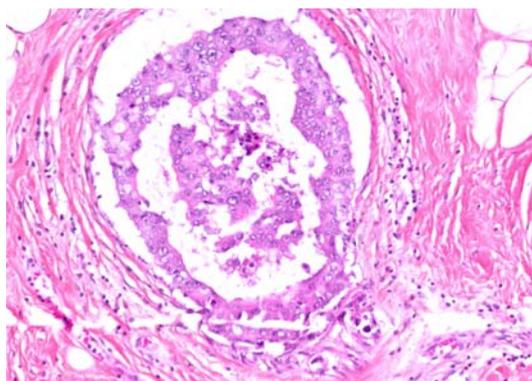


figure 3 : comédocarcinome (x20)

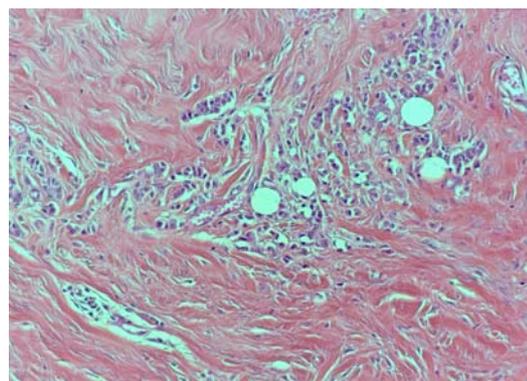


figure 4 : carcinome lobulaire infiltrant (x20)

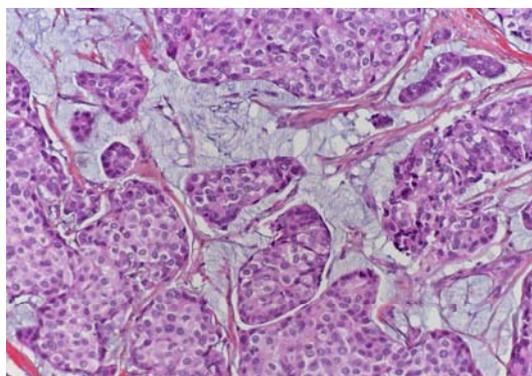


figure 5 : carcinome mucineux (x 20)

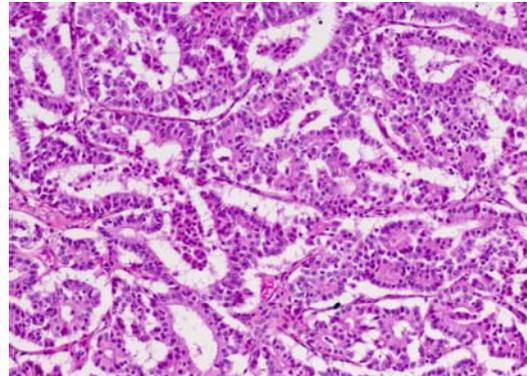


figure 6 : carcinome cribriforme (x20)

Les autres formes de carcinomes sont beaucoup plus rares : carcinomes papillaires, carcinomes adénoïdes kystiques, carcinomes apocrines, carcinomes sécrétants, carcinomes métaplasiques, carcinomes à cellules en bague à chatons, carcinomes neuroendocrines .

Les tumeurs malignes **en dehors des carcinomes** sont rares représentant moins de 1% des cas. Il s'agit essentiellement des sarcomes phyllodes, les sarcomes mésoenchymateux, les angiosarcomes et les lymphomes malins non hodgkinien.

2.3.2 Le grade histologique

Il permet d'apprécier le degré de différenciation cellulaire de la lésion tumorale.

Le grade histopronostique de Scarf-Bloom et Richardson est le plus utilisé en Europe (Bloom 1957), mais est considéré comme trop opératoire dépendant par les anglo-saxons. Les trois items pris en compte sont le degré de différenciation, le pléomorphisme nucléaire et l'index mitotique (fig. 7-10).

Des auteurs ont proposé une modification de ce grade afin de le rendre plus reproductible et permettre une meilleure discrimination pronostique. Il s'agit de SBR modifié (MSBR) proposé par Le Doussal (Le Doussal 1989) et le grade proposé par les auteurs anglais Elston et Ellis (Elston 1991) (tableau 3). Les carcinomes lobulaires infiltrants sont gradés de la même façon que tous les autres carcinomes infiltrants hormis les médullaires. Ce grade ne tient pas compte du degré de différenciation mais du pourcentage de tubules et du nombre de mitoses. Ce système de classification a une valeur pronostique équivalente à celle du SBR (Genestie 1998), mais sa reproductibilité intra et inter-observateur apparaît supérieure (Frierson 1995, Robbins 1995, Dalton 1994)

Tableau 3 : Grade histopronostique d'Elston-Ellis (Anon 1996)

critères	cote
Formations glandulaires :	
>75%	1
10-75%	2
<10%	3
Pléomorphisme nucléaire :	
Noyaux petits, réguliers, uniformes	1
Pléomorphisme modéré	2
Variation marquée de taille, de forme avec nucléoles proéminents	3
Nombre de mitoses sur 10 champs consécutifs au grossissement x400	
≤ 6 mitoses	1
7 à 14 mitoses	2
> 14 mitoses	3
Total	
Grade I	3-5
Grade II	6-7
Grade III	8-9

La conférence de Consensus des pathologistes du Collège Américain recommande l'étude du grade pour toutes les tumeurs invasives, à l'exception du carcinome médullaire, qui est toujours de meilleur pronostic. La classification doit être spécifiée et celle d'Elston-Ellis est recommandée (Fitzgibbons 2000).

Le grade histologique selon Scarf, Bloom et Richardson (SBR).

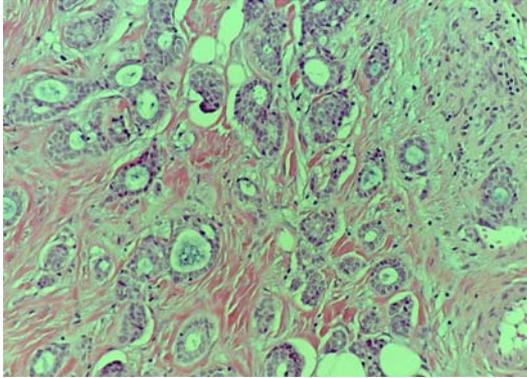


figure 7 : carcinome canalaire infiltrant, SBR 1 (X20)

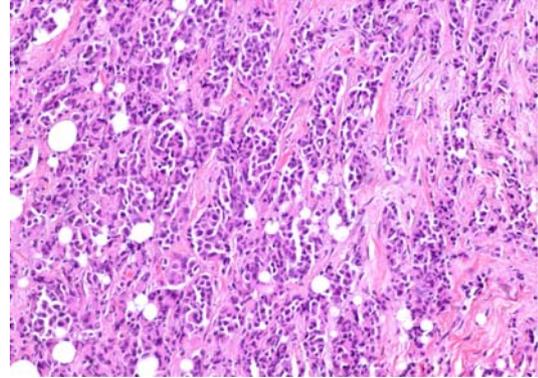


figure 8 : canalaire infiltrant, SBR 2 (X20)

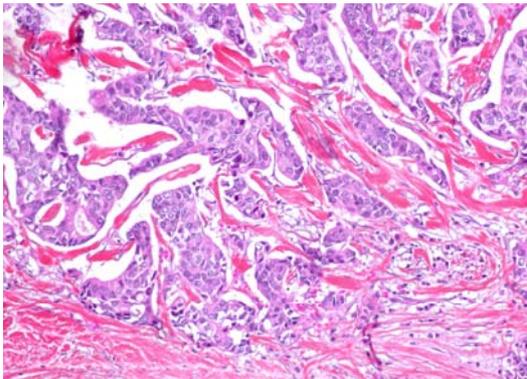


figure 9 : carcinome canalaire infiltrant, SBR 3 (X20)

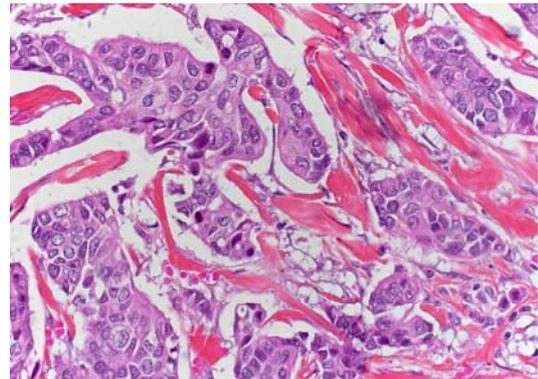


figure 10 : images de mitoses, SBR 3 (X 20)

2.3.3 Le compte mitotique

L'index mitotique reste le moyen le plus simple d'apprécier la prolifération cellulaire. Il est défini par le nombre d'images de mitose dans 10 champs consécutifs, dans la partie la plus active de la tumeur, avec un grossissement à 400. Il représente une part intégrale du grade histologique de SBR (Bloom 1957) et d'Elston-Ellis (1991). Un index mitotique élevé est corrélé à une évolution péjorative de la maladie (Clayton 1991) et représente le facteur pronostique le plus important du grading (Genestie 1998). Il est également plus reproductible (Frierson 1995, Robbins 1995, Dalton 1994). Il doit être spécifiquement notifié dans le compte-rendu anatomopathologique. En pathologie mammaire, il est considéré comme faible quand moins de 6 mitoses sont identifiées, moyen entre 6 et 14 mitoses, et élevé au delà de 14 mitoses.

2.4 Les récepteurs hormonaux exprimés par la tumeur

Les récepteurs d'hormones stéroïdes essentiellement les récepteurs d'estrogènes (RE) et de progestérone (RP) sont les protéines effectrices de la réponse biologique des hormones dans les cellules mammaires. Ces récepteurs font partie de la famille des récepteurs nucléaires qui regroupent des facteurs de transcription activés par leur liaison avec les ligands spécifiques de chaque classe. À ce jour, plus de 100 récepteurs nucléaires ont été identifiés. Ils se définissent en plusieurs classes de récepteurs nucléaires (NR) :

Classe I NR : regroupe les récepteurs stéroïdiens activés par la liaison des molécules hormonales stéroïdiennes et qui s'homodimérisent.

Classe II NR : regroupe les récepteurs nucléaires dont l'activation est ligand-indépendante et qui peuvent s'homo ou s'hétérodimériser.

Classe des récepteurs orphelins dont les ligands n'ont été qu'en partie, et que très récemment caractérisés

Le récepteur des estrogènes (RE) est le modèle classique des récepteurs nucléaires de classe I. Il n'interagit qu'avec les estrogènes (phytoestrogènes, xénoestrogènes) ou molécules à potentiel estrogénique SERM (Steroid Estrogen Receptor Modulators). ER est le modulateur d'un spectre très large d'activités biologiques cellulaires, tissus spécifiques, mais également sexe et âge dépendants. En l'absence d'estrogènes, ER est séquestré dans le noyau et maintenu dans une conformation inactive par son association à des protéines du choc thermique (Martin 1982). La pénétration et liaison des estrogènes ou molécules assimilées (ligands) dans le site de liaison des récepteurs nucléaires induit un changement

conformationnel tridimensionnel dont la conséquence est une modification de l'accessibilité à une reconnaissance d'épitopes. Cette transformation permet l'homodimérisation du récepteur et une liaison de haute affinité avec un site spécifique de l'ADN, l'élément de réponse estrogénique (ERE). Cette liaison au ERE est la première étape par laquelle le complexe associé au ER module l'expression de gènes spécifiques hormonorégulés. Les récepteurs de classe I, dont les ER font partie, se lient à l'ADN sur un motif palindromique répétitif avec un arrangement en épingle. Le motif consensus ERE minimal étant : 5'-GGTCAnnnTGACC-3' (n : nucléotide quel qu'il soit).

Depuis la description initiale, dans les années 1970, le mode d'action des ER s'est progressivement complexifié. Dans un premier temps, seule la reconnaissance des récepteurs, par leur fonction de liaison de molécules hormonales radiomarquées, était accessible. Le clonage du premier récepteur aux estrogènes où ER α a permis de démontrer que la plus grande partie des gènes hormonorégulés par les estrogènes chez les mammifères était associée à ce récepteur. En 1996, une seconde isoforme récepteur ER β a été clonée. Son rôle reste encore actuellement mal caractérisé, mais semblerait avoir en partie un rôle de modulation tissulaire de l'activation associée au ER α . ER α et ER β , génétiquement et fonctionnellement distincts apparaissent comme complémentaires et non redondants. Dans les domaines structurels et fonctionnels, les deux isoformes ER α et ER β présentent des pourcentages de forte homologie. Ils se lient avec une forte affinité avec les estrogènes naturels, et les éléments de réponse ERE de l'ADN. Néanmoins, il existe des différences dans leur structure, la répartition de leur expression tissulaire et des phénotypes observés expérimentalement dans les modèles de souris « knockout » pour les gènes ER α ou ER β (Martin 2004).

ER α a son gène localisé sur le bras long du chromosome 6, codant pour une protéine de 595 aminoacides présentant trois domaines essentiels :

- Un domaine N-terminal de modulation (AF1)
- Un domaine central ou domaine de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain, DBD)
- Un domaine C-terminal comportant le site de liaison des hormones (Ligand Binding Domain, LBD) et un domaine de modulation AF2.

ER β a son gène localisé en q22-24 du chromosome 14 codant pour un récepteur plus court de 530 aminoacides. ER β présente les mêmes domaines que ER α , mais diffère par la perte d'une portion du domaine C-terminal (Martin 2004).

Le récepteur à la progestérone (PR), comme l'ER, est un facteur de transcription ligand-dépendant qui stimule l'expression progestatif-dépendante des gènes cibles. Deux isoformes fonctionnelles du PR, le PRA et le PRB, sont exprimés dans les cellules sensibles à la progestérone. Ils possèdent des rôles distincts dans l'expression génétique et dans le développement de la glande mammaire. Le PRB semble être l'activateur transcriptionnel des gènes sensibles à la progestérone, tandis que le PRA inhibe le PRB ainsi que l'activation génétique dépendant des récepteurs estrogéniques (Mulac-Jericevic 2000). Bien que les PRA et PRB varient en fonction du statut hormonal, ils sont présents en quantité égale dans l'épithélium mammaire humain normal. Chez la femme atteinte du cancer du sein, le rapport qui pourrait définir la réponse physiologique et pharmacologique à la progestérone est modifié en faveur de PRA (Mote 2002). Les divers stéroïdes ovariens et leurs associations ont une incidence différente sur le PRA et le PRB, mais nous ignorons presque tout de l'effet des traitements hormonaux sur l'expression des deux isoformes du PR dans le tissu mammaire normal ou à haut risque de néoplasie.

Les récepteurs hormonaux sont plus fortement exprimés dans les adénocarcinomes lobulaires et canaux bien différenciés. Les récepteurs sont par contre peu exprimés ou absents dans environ 30% des cas pour les RE et 50% pour les RP, dans les carcinomes canaux mal différenciés, et pratiquement toujours absents dans les carcinomes médullaires.

La fréquence des tumeurs exprimant les RE, est plus élevée chez les patientes ménopausées que chez les non ménopausées (Romain 1995). La valeur pronostique des RE et RP a été initialement établie sur la base de dosages quantitatifs mesurant la liaison d'un stéroïde radioactif sur les récepteurs (RLA ou radioligand assay), puis de dosages immunoenzymatiques quantitatifs réalisés sur un homogénat tissulaire dans des conditions rigoureuses de contrôle de qualité. Actuellement, la méthode immunohistochimique (IHC) sur coupes histologiques est la plus fréquemment utilisée. Elle peut remplacer le dosage biochimique sous condition d'un contrôle de qualité. La valeur pronostique et prédictive à la réponse à l'hormonothérapie de l'approche immunohistochimique ont été confirmées (Macgrogan 1996, Harvey 1999).

L'expression de RE a, chez les patientes sans atteinte ganglionnaire, une valeur pronostique significative mais faible, avec un risque relatif de reprise évolutive à 5 ans inférieure à 1.5 et une différence de survie absolue entre les patientes dont la tumeur exprime ou n'exprime pas les RE qui ne dépasse pas 10% (Fisher 1988, Pichon 1996)

La valeur pronostique des RE ne résiste pas à l'analyse multivariée lorsque celle-ci inclut le grade histologique, la prolifération tumorale et la valeur pronostique des RE s'affaiblit avec le temps et disparaît au delà de 5 ans (Fisher 1988).

La valeur pronostique des tumeurs exprimant les RP a été beaucoup moins étudiée. Néanmoins, le pronostic est meilleur pour les patientes sans atteinte ganglionnaire, quand les RP sont positifs (Fisher 1988). Dans ce sous-groupe de patientes N-, la présence simultanée des RE et des RP, correspond à un pronostic meilleur que l'absence d'un des deux récepteurs (Fisher 1988, Pichon 1996)

Actuellement il est recommandé d'effectuer systématiquement l'analyse des récepteurs hormonaux pour tout cancer du sein diagnostiqué, en utilisant soit la méthode RLA ou IHC. Cette dernière est recommandée pour les petites tumeurs (Fitzgibbons 2000). Quand la lésion néoplasique mammaire et les ganglions envahis sont tous deux disponibles, il est préférable de faire l'étude sur le tissu mammaire.

2.5 Activateur du plasminogène type urokinase (uPA) et de son inhibiteur principal (PAI-1)

Il s'agit de deux biomarqueurs explorant les processus d'invasion et d'angiogénèse (Spiratos 2005). Le facteur uPA est le carrefour moléculaire d'activation d'un ensemble de protéases impliquées dans le phénomène invasif (métalloprotéases, cathepsines à l'exception de la cathepsine D) alors que PAI-1 est un marqueur indirect de la néo-angiogénèse, régulateur *in vitro* de la migration des cellules vasculaires, et *in vivo* de la néoangiogénèse et de la migration tumorale (Andreasen 1997, Rosenberg 2001, Spiratos 2005).

Dans l'analyse du « *Receptors and Biomarkers Group* » (RBG) de l'*European Organization for research and treatment of Cancer* (EORTC) incluant plus de 3000 patientes pN0, provenant de 17 institutions, le poids pronostique d'uPA et PAI-1 était indépendant et supérieur aux autres facteurs (âge, pT, pN, RH, grade SBR) (Look 2002). Le groupe à faible

risque défini par des taux faibles d'uPA et ou PAI-1, représentait environ 50% de cette population de cancers pN0.

Ces deux facteurs pronostiques ont été utilisés comme facteurs décisionnels dans un essai clinique allemand prospectif, multicentrique, randomisé, chez des patientes sans atteinte ganglionnaire (Janicke 2001). Seules les patientes avec un taux élevé d'uPA (> 3 ng/mg de protéine) et/ou PAI-1 (> 14 ng/mg de protéine) étaient randomisées entre chimiothérapie et observation. Les patientes avec un faible taux, ne recevaient pas de chimiothérapie. Il a été ainsi démontré une valeur pronostique de ces deux facteurs.

Selon les règles internationales de validation, uPA et PAI-1 ont atteint un niveau de preuve 1 sur la base (Hayes 1996, Spyrtos 2005) :

- un essai clinique publié où uPA et PAI-1 étaient décisionnels suivi d'un essai clinique en cours
- plusieurs études rétrospectives concordantes regroupées dans plusieurs méta-analyses
- des contrôles de qualité des analyses par le RBG de l'EORTC

Malgré ce haut niveau de preuve, la communauté médicale n'est pas parvenue à intégrer uPA et PAI-1 dans un consensus décisionnel en grande partie en raison des problèmes techniques de réalisation (Spyrtos 2005, Espié 2005, Hayes 2005). En effet, la détermination de uPA et PAI-1 implique l'utilisation d'un fragment > 300mg de tissu frais ou congelé et l'accès à un laboratoire capable de les doser sur un extrait tissulaire par une technique ELISA.

3- La cytométrie en image, principes généraux

Le but de cette technique est de visualiser et de quantifier des « mécanismes biologiques » au niveau cellulaire et/ou tissulaire et de rendre ces observations objectives, reproductibles et quantitatives. La cytométrie en image s'applique tant à la microscopie en transmission qu'en fluorescence. Pour obtenir ces données quantitatives, un analyseur d'image est utilisé. Il s'agit d'un microscope connecté à une caméra et à un ordinateur capable de traiter et d'analyser les images de cellules et de tissus. Les variantes sont nombreuses avec des logiciels aux applications multiples au sein d'un laboratoire. De plus en plus, la cytométrie en image a recours à un balayage automatique des lames et à la recherche automatique d'évènements bien

définis. L'application de ces techniques récentes dans le domaine de la recherche en cancérologie a été mise au point, notamment dans l'étude de la prolifération cellulaire avec un impact potentiel sur les facteurs pronostiques de la maladie.

3.1 Le principe

L'analyse d'image est basée sur la mesure en chaque point d'une cellule observée à travers un microscope, de la quantité de lumière émise ou transmise. Après acquisition de l'image, celle-ci est numérisée puis traitée par le système informatique, qui fournit des données quantitatives du ou des paramètres à étudier.

3.2- Les notions de base d'analyse d'images

Un programme d'analyse d'image commence par l'acquisition de l'image sous forme numérique. Chaque pixel prend une ou plusieurs valeurs numériques dérivées du signal envoyé par la caméra en fonction de sa couleur, de son intensité. Le signal analogique de la caméra est transformé en une image numérique. Avec une caméra noir et blanc, les signaux sont convertis en 256 niveaux de gris : 0 = noir, 255 = blanc. Une des techniques d'analyse est de transformer une image en niveaux de gris en une image binaire (0 ou 1) : 0 pour le fond, 1 pour l'objet. Néanmoins actuellement de plus en plus de caméras sont numériques effectuant une numérisation directement, ce qui n'était pas encore le cas lors de la réalisation de notre travail.

3.2.1- La lumière

Selon le type d'analyse que l'on veut effectuer, le choix de la longueur d'onde est primordial. Il devra donner le maximum de contraste pour le colorant utilisé pour la reconnaissance des événements cellulaires à mesurer, et à cette longueur d'onde, les autres colorants présents sur l'échantillon devront être le plus « transparent » possible.

3.2.2- Les différentes étapes

3.2.2.1- Le pré-traitement. Il est possible d'améliorer l'image numérique avant toute mesure, par des techniques de prétraitement des images, tel l'amélioration des contrastes, le calcul des paramètres photométriques de référence du fond ou la diminution du bruit de fond.

3.2.2.2 La segmentation. Il s'agit d'un procédé par lequel une valeur de niveau de gris ou une image couleur est convertie en une image binaire. C'est une étape critique qui conditionne la qualité des mesures effectuées ultérieurement. Elle permet d'isoler dans l'image les objets sur

lesquels doit porter l'analyse. Une image binaire est une image où chaque pixel peut prendre seulement deux valeurs : 0 ou 1. Si la valeur est 0, le pixel sera considéré comme faisant partie du fond. Si la valeur est de 1, il sera considéré comme étant un objet. Segmenter correspond donc à sélectionner parmi les points de l'image ceux qui appartiennent à la cellule ou aux organites à analyser.

Le seuil : une des étapes les plus importantes de la segmentation est le réglage du seuil. Le seuil est la valeur de partition à appliquer à l'image. Le seuillage est effectué en sélectionnant les niveaux de gris devant être assignés au fond et aux objets. Pour sélectionner des objets, il faut choisir des limites entre lesquelles les pixels devront être pris en compte.

Le seuillage noir et blanc (fig.11).

A chaque point de la ligne médiane traversant les objets correspond une valeur de niveau de gris (cf courbe). La ligne en pointillés correspond au seuil choisi pour prendre en compte les objets et rejeter le fond. Deux seuillages sont possibles :

Le seuillage simple : signifie que les pixels ayant une valeur de niveau de gris supérieure, ou inférieure selon le choix de l'utilisateur, au seuil fixé vont être codés 1 et les autres 0 (fond de l'image binaire).

Le seuillage avec borne inférieure et supérieure : dans ce cas deux valeurs de seuil doivent être définies S_1 et S_2 . Les pixels de valeur de niveau de gris supérieur à S_1 mais inférieur à S_2 seront codés 1, les autres 0.

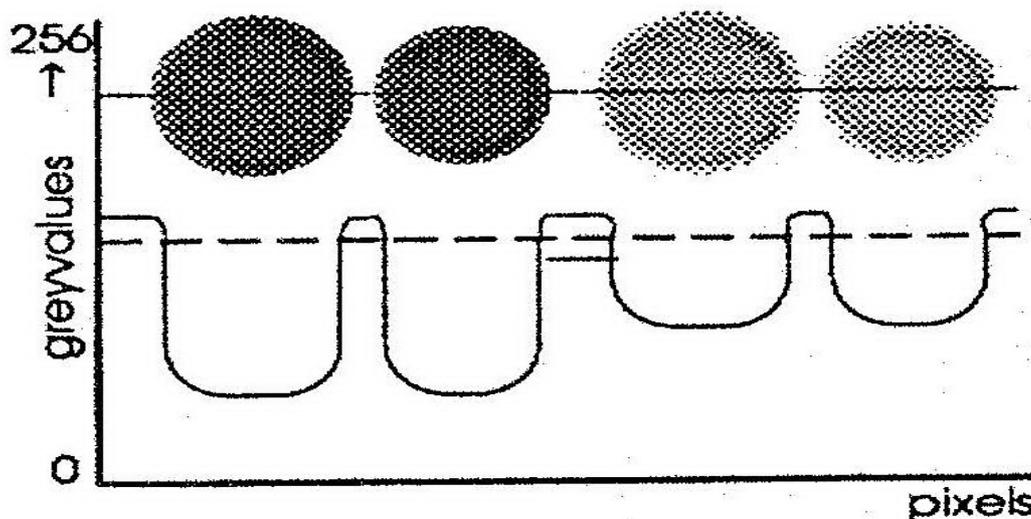


Figure 11 : seuillage noir et blanc

© 2000
A. D. B.

La séparation : quand les objets sont trop proches les uns des autres pour être reconnus comme des objets distincts, il est possible de les séparer manuellement ou par des techniques de traitement de l'image.

Les techniques de séparation automatique mettent en œuvre des étapes de dilatation et d'érosion. La dilatation « agrandit » l'objet en augmentant sa circonférence d'un pixel en chaque point. Une érosion « rétrécit » l'objet en diminuant sa circonférence d'un pixel en chaque point (fig 12).

Le nombre de dilatation ou d'érosion à effectuer est en général déterminé par l'opérateur. Puis les objets sont reconstitués automatiquement à leur taille initiale, moins un pixel au niveau des zones de chevauchement. Ces étapes de dilatation et d'érosion peuvent également être utilisées pour améliorer la forme des objets : lissage des contours , fermeture des trous.

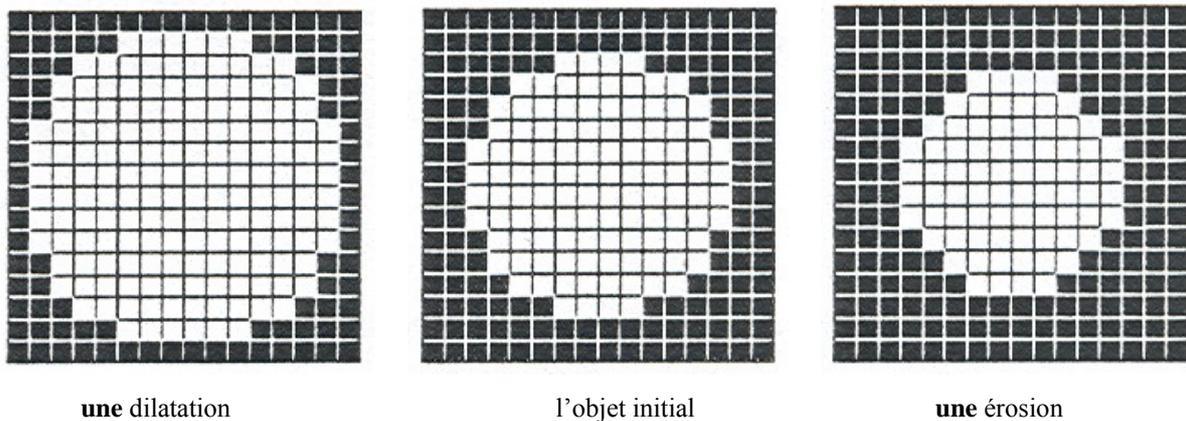


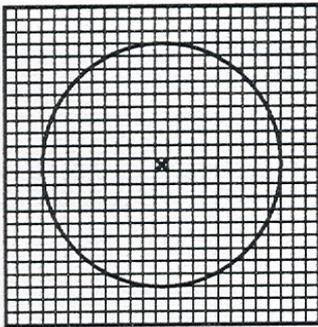
Figure 12 : images de dilatation (à gauche) et d'érosion (à droite) d'un objet (situé au centre).

La définition des objets à mesurer : cette étape est primordiale pour que le choix des objets lors de l'étape d'analyse soit le plus précis et le plus discriminant possible. Selon les analyseurs, les critères de choix peuvent varier, mais sont toujours basés sur des paramètres de morphologie, de densitométrie et éventuellement de texture ou squelette.

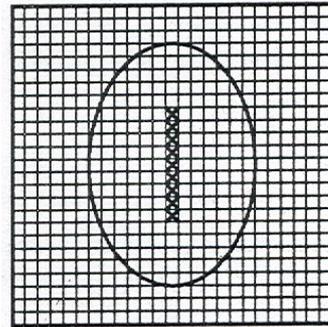
Les paramètres de morphologie sont très souvent basés sur des critères de surface, de périmètre, de contour. Le contour d'un objet est la déviation de la forme de cet objet par rapport à un cercle parfait. Un cercle parfait aura un contour, ou un contour ratio égal à 1 ou 1000. Ce contour ratio est calculé à partir de la surface et du périmètre. La plupart du temps, les contours ratios sont supérieurs à 1000 sauf pour les objets de très petite dimension.

Les paramètres de densitométrie sont détaillés dans le paragraphe absorption-fluorescence.

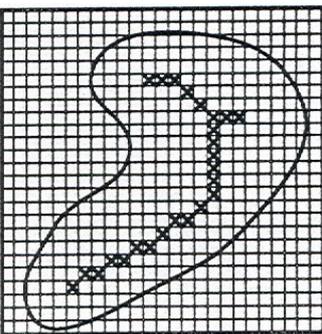
Les paramètres de texture peuvent être assimilés à des paramètres granulométriques. Lors des mesures de texture, l'image originale en 256 niveaux de gris est transformée en une image en 8 à 16 niveaux de gris. Après segmentation de l'objet, l'appareil calcule des paramètres de « granulométrie » plus ou moins complexes (petites ou longues sections, déviation standard de ces sections) destinés à caractériser l'homogénéité ou l'hétérogénéité de la répartition des niveaux de gris à l'intérieur d'un objet. Les paramètres de squelette sont un moyen d'aborder la forme d'un objet. La squelettisation est une érosion à maxima qui consiste en un rétrécissement maximal de l'objet. Les pixels sont éliminés jusqu'à ce que l'objet ait atteint une forme « épaisse » d'un pixel en tout point. Dans le squelette final, un pixel n'aura que deux pixels voisins sauf si c'est un point terminal ou un point triple. Les paramètres principaux de squelette permettant de sélectionner des objets en fonction de leur forme sont la longueur, le nombre de points terminaux et le nombre de points triples (fig.13).



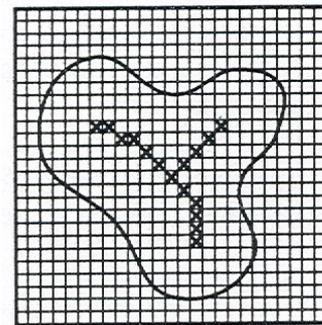
objet 1 : cercle parfait, squelette :
 taille : 1
 triple points : 0
 point terminal : 2



objet 2 : objet ovale, squelette
 taille 9
 triple point : 0
 point final : 2



objet 3 : irrégulier, squelette :
 taille : 25
 triple point : 1
 point terminal : 3



objet 4 : irrégulier, squelette :
 taille 16
 triple point : 1
 point terminal : 3

Figure 13 : exemples de squelettes

3.2.2.3 Paramétrisation et traitement des données.

La paramétrisation correspond au calcul d'un ou de plusieurs paramètres caractérisant chaque objet en fonction des besoins de l'analyse

Le traitement des données correspond à l'analyse statistique et expression des résultats sous forme de listes de données, d'histogramme et de nuages de points.

3.3 Absorption et fluorescence

3.3.1 l'absorption

La lumière est envoyée à travers un objet constitué de différents niveaux de matériel absorbant. La quantité de lumière qui passe à travers un objet est appelée lumière transmise. Les objets vont entièrement ou partiellement retenir la lumière. La quantité de lumière qu'un objet absorbe représente sa densité optique.

La quantité de lumière diminue après chaque niveau de matériel absorbant. Le signal de lumière transmise doit être traité de façon logarithmique.

La densité optique d'un pixel s'obtient par la relation : $DO = -\log T$. T = transmission.

$T = I/I_0$, I est l'intensité du pixel et I_0 est l'intensité du fond. Donc, la densité optique d'un pixel est $DO = -\log I/I_0$.

La densité optique moyenne DOM est la moyenne des DO de chaque pixel à l'intérieur d'un objet.

La densité optique intégrée DOI est la somme des DO de chaque pixel à l'intérieur d'un objet.

La densité optique intégrée calibrée cDOI est le rapport de la DOI de l'objet mesuré par rapport à la DOI de référence

3.3.2 la fluorescence

La lumière d'excitation irradie le matériel fluorescent des objets. Une molécule de matériel fluorescent irradiée par une lumière d'excitation d'une longueur d'onde donnée, va émettre de la lumière à une longueur d'onde supérieure. La lumière émise à chaque pixel lui donne une valeur d'intensité et donc un niveau de gris proportionnel de façon linéaire à la quantité de lumière émise.

Les paramètres de fluorescence équivalents à ceux de la densitométrie sont :

La fluorescence intégrée FI : la somme des valeurs de niveau de gris des pixels par objet

La fluorescence moyenne : la moyenne des valeurs de niveau de gris des pixels par objet.

La fluorescence intégrée calibrée : est le rapport de la fluorescence intégrée de l'objet mesuré sur celle de la population de référence

Tableau 4: exemples de longueur d'ondes d'excitation utilisables en fluorescence

longueur d'ondes d'excitation (nm)	fluorochrome	couleur
330	DAPI	Bleu
485	FITC	Vert
577	Texas red	rouge

4. L'analyse statistique des études pronostiques

4.1 Les définitions

Le pronostic de la maladie peut être décrit à la fois pour le cours clinique ou pour l'histoire naturelle de la maladie. Le terme de « cours clinique » a été utilisé afin de décrire l'évolution de la maladie qui a bénéficié de soins médicaux, alors que « l'histoire naturelle » correspond au pronostic de la maladie sans intervention médicale. Il est pratique de résumer le cours de la maladie à un nombre unique ou à un taux : la proportion de personnes rencontrant un événement. Les taux habituellement utilisés sont regroupés dans le tableau 5.

L'expression du pronostic en « taux » a la vertu de la simplicité. Les taux peuvent être mis en mémoire et communiqués succinctement. Leur inconvénient est que relativement peu d'informations sont transmises et que de grandes différences dans le pronostic peuvent être cachées dans des taux globaux semblables.

Tableau 5 : Les taux utilisés pour décrire le pronostic.

Le taux	La définition
La survie à 5 ans	Le pourcentage de patients vivant à 5 ans à partir d'un certain point du cours de la maladie
La létalité	Le pourcentage de patients décédés de la maladie
La mortalité spécifique	Le nombre de personnes décédées d'une maladie spécifique dans une population de 10 000
La réponse	Le pourcentage de patients montrant une amélioration suite à une intervention
La rémission	Le pourcentage de patients entrant dans une phase où la maladie est devenue indétectable
La récurrence	Le pourcentage de patients qui sont de nouveau malades après un intervalle libre

La méthode la plus directe pour connaître une survie est de rassembler une cohorte de patients atteints de la condition à un point du cours de la maladie et de les garder en observation jusqu'à ce qu'ils aient tous rencontré le résultat d'intérêt. La représentation graphique de la fonction de survie peut être réalisée avec, en ordonnée, la probabilité cumulée de survie entre 1 et 0 et, en abscisse, la durée du suivi en mois. Cette représentation en marches d'escalier est une fonction décroissante au cours du temps. Pour une petite cohorte, l'expérience pourra être représentée comme indiqué sur la figure ci-dessous. Le graphique de la survie en fonction du temps décrit des marches qui correspondent au décès de chacun des patients de la cohorte. Si le nombre de malades est plus important, la taille des marches est diminuée, avec un lissage de la courbe. La médiane de survie correspond au temps pour lequel la probabilité cumulée de survie est égale à 0,5 (Fletcher 1998).

En Médecine, l'analyse de la survie est longitudinale par l'étude de cohortes de sujets dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques ou d'essais cliniques. L'événement considéré par les fondateurs de l'analyse de la survie est le décès, raison pour laquelle cette expression est utilisée. L'analyse de la survie consiste à évaluer le délai de survenue du décès d'un individu. Cependant, le décès n'est pas le seul type d'événement analysable. Tout événement de nature binaire peut être utilisé comme critère de jugement : la survenue d'une hypertension artérielle, la rechute d'un cancer du sein ou la récurrence d'un infarctus du myocarde.

La figure ci-dessous (fig.14) montre une courbe de survie typique. La probabilité de survie est exprimée sur l'axe vertical, et la période de temps suivant le début de l'observation sur l'axe horizontal. Les nombres de malades à risque à des moments divers sont souvent montrés afin de donner une idée de la contribution de la chance dans les observés.

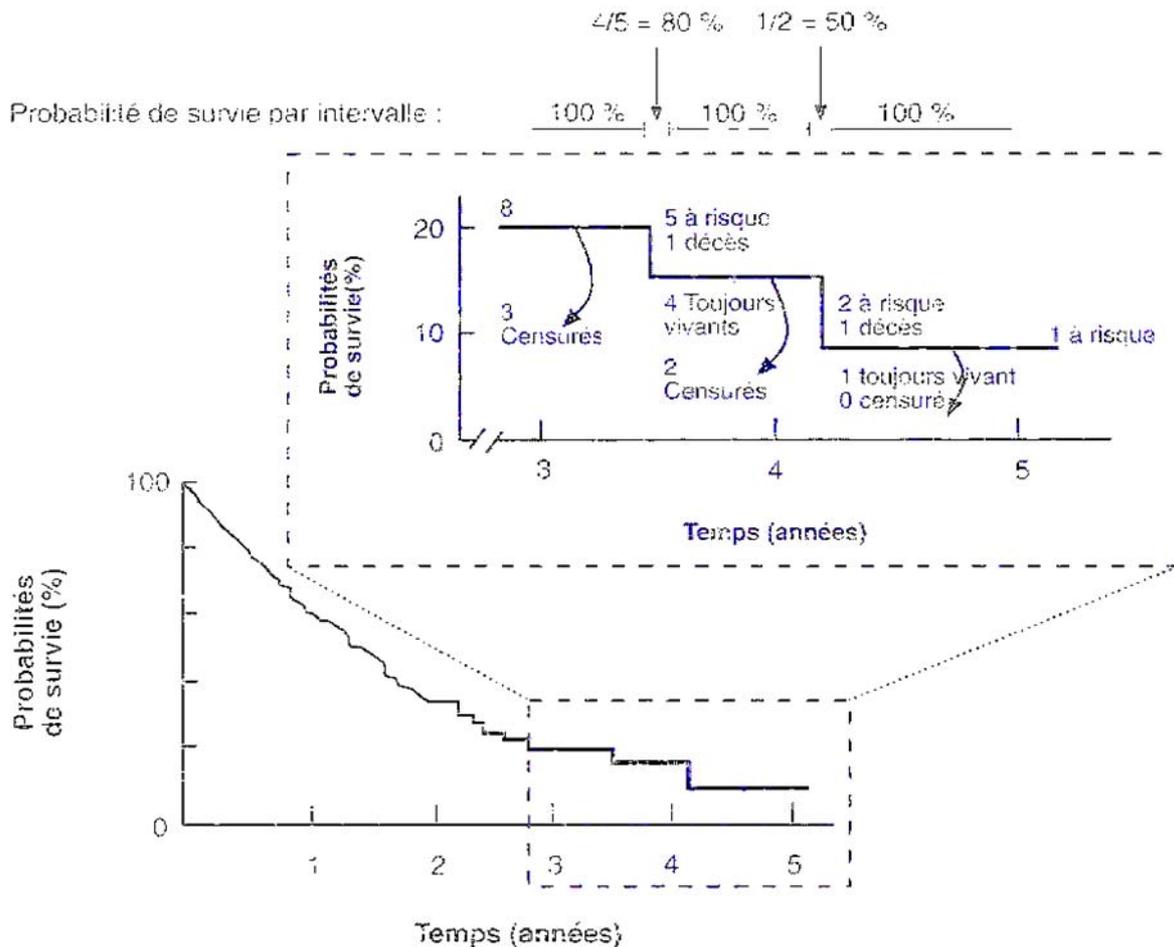


Figure 14 : Une courbe de survie typique, avec le détail d'une partie de la courbe (Fletcher,1998)

La probabilité de survie à tout moment est estimée à partir de la probabilité cumulée de survie de chaque intervalle de temps précédant ce moment. Les intervalles de temps peuvent être aussi petits que nécessaire ; dans l'analyse de Kaplan-Meier les intervalles sont entre chaque événement nouveau (décès) et le précédent.

4.2 Les données indispensables pour l'analyse de la survie

Quatre informations sont indispensables à cela :

- la date du début de l'observation, appelée *date d'origine*. C'est, par exemple, la date d'entrée dans une cohorte ou la date de randomisation dans un essai thérapeutique ;
- la *date des dernières nouvelles*. C'est soit la date de survenue de l'événement décès ou, pour les données censurées, la date pour laquelle on dispose des dernières données relatives au sujet sachant qu'il n'est pas décédé ;
- la date de fin d'observation, appelée *date de point*. Elle est commune à tous les sujets inclus dans l'étude ;
- la *variable d'état*. C'est l'état du sujet aux dernières nouvelles. Deux modalités sont possibles soit le décès, soit l'absence de décès. Ces modalités, nous l'avons vu plus haut, peuvent être représentées par toute situation d'état de nature binaire de type survenue/non survenue d'un événement, récurrence/non récurrence d'une affection.

Les dates permettent de calculer la durée du suivi pour chaque sujet ou le temps de participation à l'étude. On distingue deux situations :

- le décès est survenu au cours du suivi, c'est-à-dire avant la date de point (ou date de fin de suivi). La durée de suivi est calculée entre la date d'origine et la date du décès.
- le décès n'est pas observé au cours du suivi sa durée est alors censurée. Lorsqu'on analyse la durée de vie, on étudie le suivi jusqu'à la survenue de l'événement décès. Cependant, et heureusement, même si on travaille en oncologie, le décès peut ne pas survenir pendant la période de suivi. Si on analyse l'intérêt d'une nouvelle chimiothérapie sur la survie des femmes après un cancer du sein et que toutes les femmes ne décèdent pas pendant le suivi, les données de durée de survie pour lesquelles le décès n'est pas survenu sont appelées *données censurées*.

Dans ce dernier cas, deux situations peuvent se présenter :

- * soit le sujet n'est pas décédé à la date de point. Il est dit *exclu-vivant*. Sa durée de suivi est égale à la différence entre la date de point et la date d'origine. Mais, cela ne signifie pas qu'il est exclu de l'étude. Au contraire, on enrichit l'analyse par la prise en compte de son suivi sur toute la période pendant laquelle il n'a pas présenté l'événement décès,
- * soit le sujet est *perdu de vue*. Il ne vient plus aux visites de surveillance. Sa durée de suivi est égale à la différence entre la date des dernières nouvelles et la date d'origine. Les perdus de vue requièrent une analyse attentive car il faut s'assurer que le mécanisme par lequel ils

sont perdus de vue est *indépendant* du phénomène étudié, sinon un biais est introduit dans l'analyse.

4.3 L'interprétation des courbes de survie

Des interprétations erronées peuvent être liées à la lecture de la partie droite d'une courbe de survie. Il est habituel qu'une courbe s'aplanisse après un certain délai lorsque la survenue des événements est moins fréquente. Il n'est pas judicieux d'interpréter cet aplanissement comme porteur de sens sauf si le nombre de sujets encore à risque reste encore important. A l'inverse, si la dernière donnée est un décès, la courbe de survie plonge vers l'axe des abscisses. Ceci ne signifie pas qu'aucun sujet ne survivrait au delà de ce temps de suivi.

4.4 Comparaison de courbes de survie - Test du logrank

Une comparaison des études de pronostic s'impose dans deux situations particulières :

- dans les études analytiques par observation, de nombreuses associations peuvent être suivies : l'évolution du pronostic en fonction du progrès auxométrique de la maladie, le pronostic des différentes variantes histologiques d'un cancer, le pronostic selon diverses caractéristiques des sujets, autres que la maladie étudiée et le traitement instauré.
- l'étude des pronostics après divers traitements représente le fondement de la recherche d'évaluation des interventions thérapeutiques. Leur efficacité, en particulier, est un sujet d'intérêt majeur en épidémiologie clinique.

La comparaison des courbes de survie peut se faire avec de nombreux tests dont celui de logrank dont le principe a été suggéré par Mantel (1967). Il est utilisé principalement pour comparer des courbes de survie obtenues par la méthode de Kaplan-Meier, mais est également utilisable dans la comparaison de courbes de survie actuarielles. Supposons deux groupes de malades, A et B, ayant subi des traitements différents et suivis dans le temps. Avec l'hypothèse que les deux traitements sont également efficaces, les nombres attendus de décès dans les groupes devraient être proportionnels aux effectifs. Si dans une journée donnée, le groupe A représente le trois quart des malades, les trois quart des décès durant cette journée devraient survenir dans le groupe A. S'il ne survient aucun décès durant la journée, aucun calcul n'est nécessaire et cette journée ne contribue pas au test statistique. Pour comparer les deux courbes de survie (ou les deux traitements) pendant une certaine période, il faut calculer les nombres totaux O_A et O_B de décès observés dans les groupes A et B respectivement durant cette période, les nombres totaux E_A et E_B de décès attendus ainsi que la quantité

$$L = \frac{(|O_A - E_A| - 1/2)^2}{E_A} + \frac{(|O_B - E_B| - 1/2)^2}{E_B}$$

L'hypothèse selon laquelle les deux traitements sont également efficaces est rejetée si cette dernière quantité dépasse 3,84 région critique du test de Khi-deux avec un degré de liberté, au niveau 0,05 (Jenicek 1985).

Le test du logrank est fondé sur une statistique qui donne des poids égaux à toutes les observations. Le calcul se fait aujourd'hui à partir de logiciels de statistiques. Il existe d'autres tests : le test de Gehan (analogue au test de Wilcoxon généralisé), donne plus de poids aux observations initiales. Il est moins sensible aux événements tardifs en particulier lorsque le nombre de sujets restant dans l'étude est faible. La statistique de Tarone-Ware introduit une pondération intermédiaire entre les deux statistiques précédentes. L'interprétation des résultats des tests doit prendre en considération la taille de l'effectif étudié ainsi que le profil et la distribution des censures. Quand le nombre de sujets étudiés est faible, les résultats des tests doivent être interprétés avec prudence. La distribution et le nombre des données censurées peuvent affecter les résultats.

5. Les facteurs pronostiques biologiques en cours d'évaluation

De nombreux paramètres biologiques tissulaires ou circulants issus de la recherche sur la biologie des tumeurs, ont été décrits comme facteurs pronostiques du risque de rechute, mais pour nombre d'entre eux, cette valeur pronostique ne résiste pas à l'analyse multivariée, ils ne sont donc pas indépendants des facteurs cliniques ou anatomopathologiques classiques ou des autres facteurs biologiques et n'apportent pas une information suffisante pour pouvoir être utilisés en pratique.

Plusieurs conditions sont nécessaires pour considérer un paramètre biologique comme cliniquement utile (Spyratos 1995, Hayes 1998) :

- l'existence d'une hypothèse biologique étayant le rôle de ce facteur
- l'existence d'une méthode analytique standardisée, simple et reproductible, validée par un Contrôle de Qualité
- la validation doit être réalisée par des analyses statistiques multivariées sur des études cliniques prospectives menées sur des groupes homogènes de patients, en nombre suffisant
- la confirmation est basée sur des études cliniques prospectives multicentriques.

Le niveau d'évidence de la valeur d'un tel paramètre dépend de la qualité des études cliniques de validation (Hayes 1998). Les plus convaincantes (niveau 1) sont prospectives et randomisées, où l'objectif premier est l'étude du marqueur. Les moins convaincantes (niveau 3) restent au stade d'investigation d'hypothèses biologiques ou comportent de nombreux biais méthodologiques. Des essais cliniques prospectifs à visée thérapeutique, dans lesquels l'évaluation du marqueur constitue un objectif secondaire, se situent à un niveau intermédiaire (niveau 2). Une méta analyse de plusieurs études de niveau 2 peut atteindre le niveau 1, et autoriser l'utilisation du marqueur en pratique courante. A ce jour, très peu d'études de niveau 1 ont été menées, ce qui explique en grande partie que peu de paramètres biologiques aient sensiblement influencé la démarche thérapeutique.

Ainsi, dans la catégorie 2 de la conférence de consensus des pathologistes américains, ont été classés les facteurs ayant largement été étudié biologiquement et cliniquement, mais dont l'apport pronostique nécessite une validation par des études statistiquement robustes :

invasion vasculaire péritumorale, c-erbB-2, p53, MIB 1 et la phase S. La catégorie 3 inclut les facteurs insuffisamment étudiés pour monter un éventuel intérêt pronostique : l'analyse de la ploïdie, l'angiogénèse tumorale, l'expression des récepteurs à EGF, la cathepsine D.

Nous nous sommes intéressés aux facteurs pronostiques du cancer du sein, dans 3 axes : la ploïdie, la détermination d'un index de prolifération et l'expression de Her2 neu.

5.1. La quantification de l'ADN dans les cancers du sein a fait l'objet de nombreuses études essentiellement en cytométrie de flux puis par cytométrie en image.

5.1.1 Les principes

Au cours du cycle cellulaire le contenu en ADN d'une cellule passe de 2N en G0/G1 à 4N en phase G2. C'est au cours de la phase S, de synthèse, que le contenu en ADN change. La mesure du contenu en ADN d'une cellule a pour but de connaître d'une part sa position dans le cycle cellulaire et d'autre part de dire si une population cellulaire a un contenu en ADN identique à celui d'une population de référence.

Le cycle cellulaire se décompose en quatre grandes phases :

- la phase G0 : cellule différenciée qui, sous l'influence de signaux des cellules voisines, effectue les tâches spécifiques pour lesquelles elle a été programmée. Pendant cette période de synthèse protéique intense, le stock d'ADN reste stable à une quantité de 2N chromosomes
- la phase S : la cellule duplique son ADN qui passe de 2 à 4N en fin de phase
- la phase G2 : la cellule synthétise les protéines indispensables à la mitose telles les tubulines du fuseau mitotique
- la phase M : la phase de mitose pendant laquelle se déroulent l'hypercondensation de l'ADN en chromosomes mitotiques puis une répartition équitable du stock en deux lots de 2N chromosomes lors de la mise en place du fuseau mitotique et enfin la scission de la cellule initiale en 2 cellules filles.

Il existe une autre phase, la phase G0, par opposition aux quatre phases propres aux cellules cyclantes, pendant laquelle la cellule ne se divise pas, et possède les mêmes caractéristiques que celles en G1.

La quantité d'ADN peut être modifiée par différents mécanismes : réplication, polyploïdisation, gain ou délétion de chromosomes, amplification de gènes, infection virale, apoptose, chimiothérapie, radiothérapie et d'autres.

La quantification de l'ADN correspond à un « dosage » par une mesure densitométrique, après étalonnage de l'appareil par une population cellulaire de référence. Il existe une condition indispensable : disposer d'une coloration spécifique et stoechiométrique de l'ADN avec une intensité de coloration spécifique et proportionnelle à la quantité d'ADN, il s'agit de la coloration de Feulgen. Après numérisation et segmentation de l'image, la mesure de la quantité de lumière transmise, fonction de l'intensité de la coloration sera convertie en unités de densité optique. Cette mesure sera effectuée en tout point d'un noyau, et la densité optique intégrée qui en résulte correspond à la quantité d'ADN présente dans le noyau. Tout matériel cytologique, frottis, étalement, monocouche, cytospin, à l'exception des filtres, ou matériel histologique, coupe en congélation ou en paraffine, est utilisable.

5.1.2 Les différentes étapes de la quantification

Ces étapes sont : le réglage de l'intensité lumineuse, l'étalonnage, la segmentation, l'analyse, l'expression et le traitement des résultats.

Le réglage de l'intensité lumineuse. Celle-ci s'effectue sur un champ blanc au même grossissement que celui de l'analyse, après réglage de la mise au point.

La calibration. Celle-ci a pour but de déterminer la densité optique intégrée de cellules de référence. Cette étape est indispensable pour tout analyseur, mais la nature de l'échantillon de référence varie en fonction des appareils. Il s'agit toujours de cellules dont le contenu en ADN est connu et fixe. Les cellules de calibration les plus couramment utilisées sont les lymphocytes (peu recommandé), les fibroblastes, les cellules épithéliales normales comme standards internes et hépatocytes de rat comme standard externe. Ces lames de calibration doivent impérativement avoir été colorées dans les mêmes bains que les lames à analyser. La mesure d'un minimum de 20 noyaux de référence est indispensable. Le coefficient de variation de la densité optique doit être le plus faible possible (<3%).

L'analyse. Pour les prélèvements cytologiques dont les noyaux sont entiers la quantification peut directement être réalisée, impliquant obligatoirement un minimum de 20 noyaux.

Sur les coupes histologiques, les noyaux à mesurer ne sont pas entiers, rendant nécessaire une seconde calibration de façon interne pour chaque coupe à analyser et obligatoirement effectué sur des noyaux de cellules normales. Cette seconde étape d'étalonnage aboutira à un éventuel décalage du pic diploïde induit par le travail sur coupe.

Chaque étape de la quantification (calibration, analyse, histogramme de répartition des noyaux) peut être mise en mémoire à tout moment de l'analyse. Chaque noyau mesuré pour chaque échantillon peut être visualisé, éliminé et reclassé.

L'expression et le traitement des résultats. Les histogrammes obtenus comportent en abscisse la quantité d'ADN contenue dans les noyaux mesurés et en ordonnée le nombre de noyaux mesurés (fig.15). Le pic principal correspond aux cellules en phase G0 et G1. Une population cellulaire est caractérisée par son index ADN (ID) défini comme étant le rapport entre la quantité d'ADN en G0/G1 des cellules étudiées sur la quantité d'ADN des cellules de référence en G0/G1 (tableau 6).

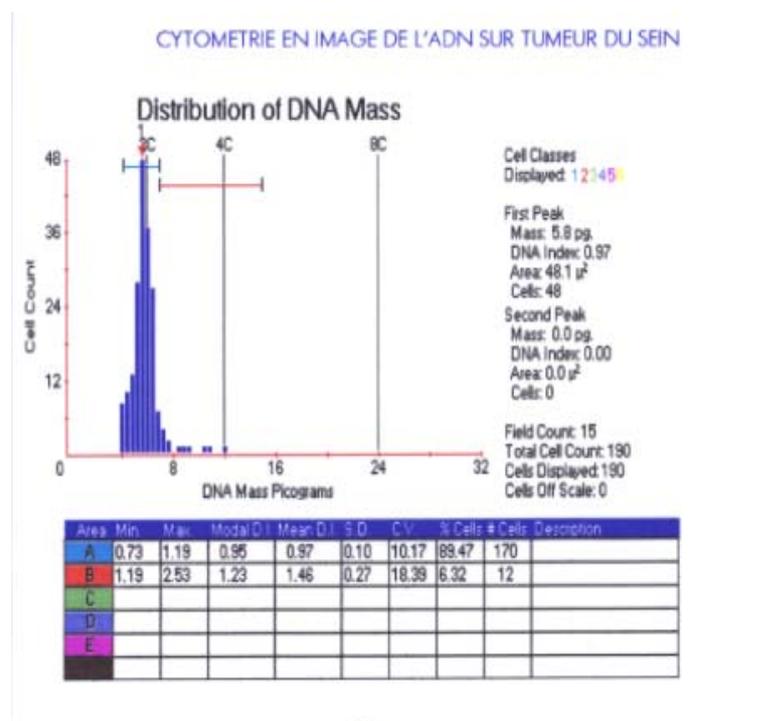


Figure 15 : histogramme du contenu en ADN

La cytométrie en flux est une autre technique utilisée pour quantifier l'ADN et qui consiste à faire défiler des cellules dissociées et préalablement marquées par un fluorochrome, l'iodure de propidium qui lié à l'ADN de façon stoechiométrique, devant un faisceau laser. Les signaux optiques sont captés par différents photomultiplicateurs puis convertis en signaux analogiques analysables en informatique. Plus de 10 000 cellules tumorales sont analysées, ce qui permet une étude quantitative de l'ADN. Des logiciels spécialement adaptés permettent un calcul précis du pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle et spécifiquement la phase S.

Tableau 6 : classification de la population tumorale

Dénomination	Valeur de l'index ADN (ID)
Diploïdie	$0.92 < ID < 1.08$
Périploïdie	$1.08 < ID < 1.2$
Hypodiploïdie	$ID < 0.92$
Aneuploïdie	$1.25 < ID < 1.9$
Tétraploïdie	$1.9 < ID < 2.5$
Hyperploïdie	$ID > 2.5$
Multiploïdie	Plusieurs pics aneuploïdes

L'intérêt de la cytométrie de flux dans les cancers du sein a fait l'objet d'une conférence de consensus (Hedley 1993). Ainsi, il apparaissait que les tumeurs à ADN aneuploïde étaient de plus mauvais pronostic. Néanmoins d'autres études, tout aussi importantes, n'ont retrouvé aucune corrélation entre le contenu en ADN et le pronostic de la maladie (Pfisterer 1995, Witzig 1994). Or, le cancer du sein comporte à l'intérieur du même foyer néoplasique des clones cellulaires différents en contenu en ADN, définissant ainsi l'hétérogénéité dite intra tumorale. La cytométrie en flux du fait qu'elle utilise du tissu homogénéisé est peu indiquée pour la détection de petits clones minoritaires, qui en revanche sont mis en valeur en cytométrie d'images. Ceci pourrait être en partie, responsable des résultats contradictoires retrouvés dans la littérature. Plusieurs auteurs avaient montré que l'étude de cette hétérogénéité avec la détection de rares cellules avec un fort contenu en ADN (supérieur à 5c) était d'une aide considérable pour la détermination du pronostic (Schvimer 1995, Sitonen 1993, Stipa 1993). Il s'agit là d'une hypothèse que nous avons exploré dans le travail que nous présentons.

5.2- Le Ki-67

La protéine Ki-67 a été initialement définie par l'anticorps monoclonal généré par l'immunisation de la souris avec des noyaux de cellules lymphomateuses hodgkiniennes de la lignée L428 (Gerdes, 1983). Le nom est dérivé de la ville d'origine, Kiel. Quand l'antigène, une protéine, fut découvert plus tard, et dont la structure primaire fut déduite à partir de la correspondance ADN, il s'est avéré qu'il n'existait aucune analogie avec des polypeptides déjà connus. Pour cette raison et parce que la fonction de cette protéine demeurait inconnue, la dénomination initiale Ki-67 a été conservée.

L'étude du marquage par l'anticorps Ki-67 a permis d'observer une interaction avec une structure nucléaire et ceci uniquement dans les cellules engagées dans le cycle. L'analyse détaillée du cycle cellulaire a révélé que l'antigène était présent dans les noyaux des cellules en phase G1, S, G2 ou en mitose. Les cellules quiescentes ou en phase G0 n'expriment pas l'antigène Ki-67 (Gerdes 1984). Ainsi la présence de cet antigène, dans les cellules normales et tumorales, est très vite apparue comme un excellent marqueur de croissance d'une population cellulaire donnée, débouchant sur l'utilisation de l'anticorps pour différents types de néoplasme. La structure primaire et complète de l'antigène ne fut identifiée qu'en 1993 (Schluter). Deux protéines isoformes sont synthétisées à partir du même gène avec des poids moléculaires de 320 et 359 KD. La partie centrale contient 16 éléments répétitifs et est codée par un unique exon, le 13, de 6845 paires de bases, ce qui en fait un des plus volumineux exons connus. Le séquençage complet du gène, avec 30 000 paires de base, a été obtenu en 1996 (Duchrow). Le rôle biologique exact de la protéine Ki-67 demeure inconnu à ce jour et constitue un axe de recherche pour bon nombre de pathologistes.

La protéine Ki 67 subit une phosphorylation et une déphosphorylation durant la mitose. Par ailleurs elle est sensible aux protéases et son expression est régulée par la voie protéolytique (Brown 2002). Cette protéine partage des similarités, notamment la FHA (forkhead-associated domain), avec d'autres protéines connues pour intervenir dans la régulation du cycle (Hofmann 1995). Elle a une localisation très complexe à l'intérieur du nucléole avec des modifications au cours du cycle cellulaire. La chorégraphie réalisée par la protéine Ki67 durant la mitose, en quittant le nucléole vers la région périchromosomique, a été parfaitement décrite (Scholtzen 2000, Endl 2000). Il est actuellement reconnu que la pKi67 est associée à la chromatine péri-nucléolaire (Ploton 2003). D'autres auteurs ont proposé son association au

compartiment fibrillaire dense (CFD) du nucléole (MacCallum 2000). La relation topographique de la pKi67 à 5 autres protéines localisées dans le CFD a ainsi récemment été décrite (MacCallum 2000). Cet auteur a utilisé les fonctions connues de ces 5 protéines pour spéculer sur les fonctions de la pKi67. Sa régulation semble être très contrôlée. Sa demi-vie est estimée à 60 - 90 minutes (Heidebrecht 1996). Il apparaît que la quantité de pKi67 présente à n'importe quel moment dans le cycle cellulaire est hautement régulée, probablement par un système précis de synthèse et de dégradation, incluant peut être un protéasome, un complexe de protéase qui a récemment été impliqué dans la dégradation rapide de la pKi67 (Wu 2000).

Il est tout à fait étonnant d'observer ce contraste entre la somme de connaissance accumulée concernant la structure, la localisation et la régulation de la pKi67 et le peu d'éléments connus sur sa fonction (Brown 2002). Nous savons que cette protéine est indispensable pour la prolifération, son extraction empêchant toute prolifération cellulaire. L'absence de progrès significatif dans ce domaine est probablement due en partie à l'absence d'homologie avec d'autres protéines (Scholzen 2000). L'équivalent de cette protéine n'a pas pu être encore identifié dans des modèles expérimentaux tels la Drosophile (Brown 2002).

La similitude entre une partie de la pKi67 (le FHA) avec d'autres protéines connues pour avoir un rôle dans la régulation du cycle cellulaire, tel le DUN1 et le RAD53, a fait suggérer à certains auteurs que la pKi67 aurait une fonction identique (Hofmann 1995). Néanmoins la situation reste confuse, car la fonction du FHA est toujours inconnue. Bridger a suggéré un rôle dans l'organisation de l'ADN, basé sur la localisation de la pKi67 sur le site nucléolaire durant le début de la phase G1 (Bridger 1998). Pour Mac Callum il existe un rôle structural de la pKi67 à l'intérieur du nucléole, basé sur la capacité de cette protéine d'interagir dans une voie complexe avec d'autres protéines et de se lier à l'ARN et à l'ADN. De même, il suggère, sur la base de sa localisation dans le CFD, que la pKi67 est un facteur essentiel dans la synthèse des ribosomes dans la division cellulaire (MacCallum 2000). Ceci s'appuie sur le constat que l'expression de la pKi67 est corrélée au taux de synthèse protéique, une fonction des ribosomes.

A l'échelle cellulaire, pour obtenir la qualification de marqueurs de la prolifération, deux conditions sont considérées comme nécessaires : l'antigène doit être présent pendant toute la durée du cycle et le passage au stade de quiescence doit s'accompagner par une rapide

disparition de l'antigène. Il est admis que l'antigène Ki-67 est exprimé tout au long des phases actives du cycle, même s'il peut être faible ou indétectable au tout début de la phase G1 (Gerdes 1983). En fait l'intensité de l'expression du Ki-67 est variable au cours du cycle. Pendant la phase S, le marquage est croissant. Il en est de même pendant la phase G2. L'intensité est maximale en métaphase (Staborg 1996). Pendant l'anaphase et la télophase, le marquage du Ki-67 commence à décroître. Par ailleurs, tous les tissus testés et possédant une population en prolifération, ont montré un marquage positif au Ki-67. La deuxième condition a été plus discutée. Van Oijen (1998) a montré que les cellules restaient positives au Ki-67 quand la synthèse de l'ADN était bloquée par l'hydroxyurée et concluait que l'expression du Ki-67 n'était pas obligatoirement liée à une phase proliférative active et mettait en garde contre son utilisation en pratique lorsqu'il existait une surexpression de p53 ou p21. Ces conclusions sont contestées par l'équipe de Gerdes qui considère que la positivité persistante du Ki-67 dans un cycle bloqué doit être considérée comme reflétant la capacité de la cellule à proliférer, dès que ce blocage est levé. Ces considérations n'ont aucun impact en pratique et ne remettent pas en cause la fiabilité des informations fournies par la fixation du Ki-67 (Scholzen 2000).

Le marquage du Ki-67 peut être aisément réalisé sur une variété de préparations histologiques et cytologiques tels les frottis, les préparations centrifugées et les coupes histologiques. Néanmoins, il existe un inconvénient majeur pour l'anticorps original du Ki-67, l'impossibilité de l'utiliser pour des coupes fixées à la paraffine. La mise au point de son anticorps monoclonal, le MIB1, a permis de lever cet obstacle (Cattoretti 1992) et la réalisation d'études rétrospectives utilisant du matériel histologique archivé (fig. 16-18). De même les études prospectives ont été également facilitées car l'obtention de matériel frais n'était plus devenu indispensable. Une des raisons expliquant la réticence de certains pathologistes à l'utilisation de l'index Ki-67 en pathologie tumorale, était l'existence d'un « marqueur de la prolifération » concurrent, le PCNA (Proliferating cell nuclear antigen). Avant la mise au point de l'anticorps MIB1, le prototype PCNA PC-10 avait l'avantage de pouvoir être utilisé sur des préparations fixées au formol et paraffinées. Néanmoins il a été démontré que le marquage au PC10 était très sensible et que la révélation de l'antigène par un traitement aux ultrasons aboutissait au marquage des cellules quiescentes (Schwartz 1993).

Marquage MIB1 (immuno histochimie)

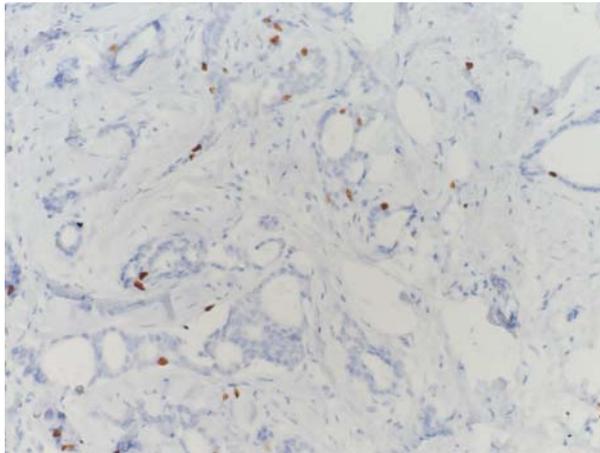


figure 16 : marquage MIB1 : 10% (x 20)

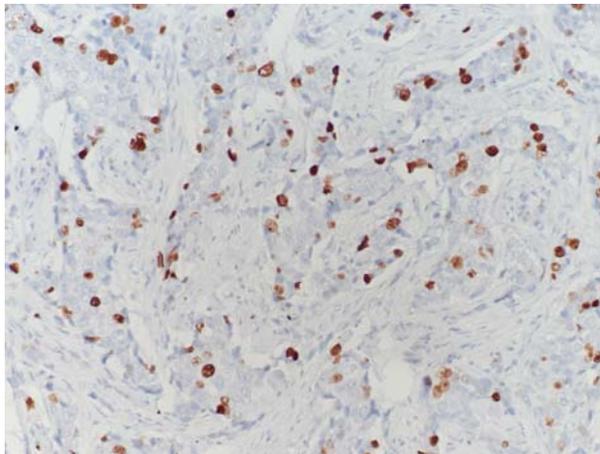


figure 17 : marquage MIB1 : 35% (x 20)

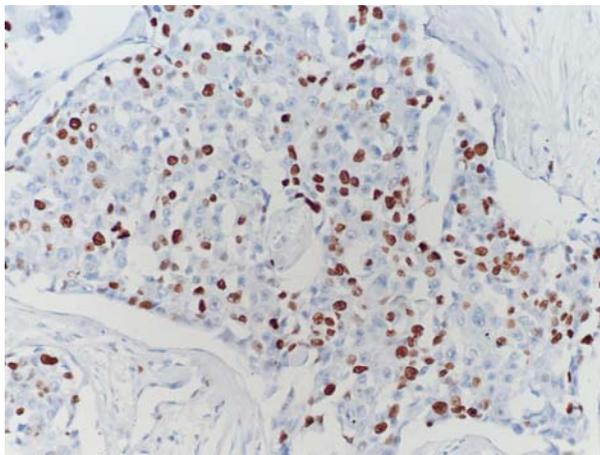


figure 18 : marquage MIB1 : 43% (x 20)

Ceci a été confirmé par la mise en évidence, non seulement de son rôle dans la réplication de l'ADN, mais également dans les phénomènes de réparation de l'ADN. Ces fonctions multiples de PCNA constituent de sérieux arguments contre son utilisation comme marqueur fiable des cellules en voie de prolifération (Prosperi 1997).

5.3- Les protéines « Argyrophiles Nucleolar Organizer Regions » : Ag NOR

Dans le noyau de la cellule eucaryote, il existe une organisation fonctionnelle, que l'on commence à caractériser par différentes approches. Il a été établi que chaque chromosome occupe un territoire défini pendant l'interphase sans dispersion de la chromatine dans tout le volume du noyau (Cremer 1993). La place des chromosomes est la résultante de multiples contraintes, encore mal définies, mais qui pourraient être liées à des interactions entre les régions des chromosomes eux-mêmes et entre ces régions chromosomiques et d'autres structures nucléaires tels la membrane nucléaire et le nucléosquelette. D'autre part, il existe des sites d'assemblage des machineries de réplication, transcription et maturation nécessaires au fonctionnement des gènes (Misteli 2000, Stein 2000)

Le nucléole est le modèle le plus évident de la compartimentation des fonctions nucléaires. Chaque noyau contient au moins un nucléole, qui en constitue la structure la plus proéminente. Il est le compartiment dans lequel se fabriquent les ribosomes. Il s'assemble autour des gènes ribosomiques (ADNr), assure la transcription et la maturation des ARN ribosomiques, et l'association de ces ARN avec les protéines ribosomiques, pour former les sous-unités des ribosomes. Sa fonction détermine sa taille et son organisation. Dans presque toutes les cellules eucaryotes, le nucléole est désassemblé pendant la mitose et rassemblé en fin de celle-ci. Ce domaine fonctionnel le plus actif du noyau, en terme de transcription, dans les cellules impliquées dans le cycle, est aussi celui qui est activé le plus précocement en fin de mitose. Il est admis que la fonction du nucléole est directement liée au cycle cellulaire. Les techniques classiques de microscopie électronique permettent de reconnaître 5 principaux composants, chacun caractérisé par une densité et une texture spécifique : les centres fibrillaires (CF), le composant fibrillaire dense (CFD) le composant granulaire (CG), les interstices et la chromatine (Derenzini 1990) (Fig 19).

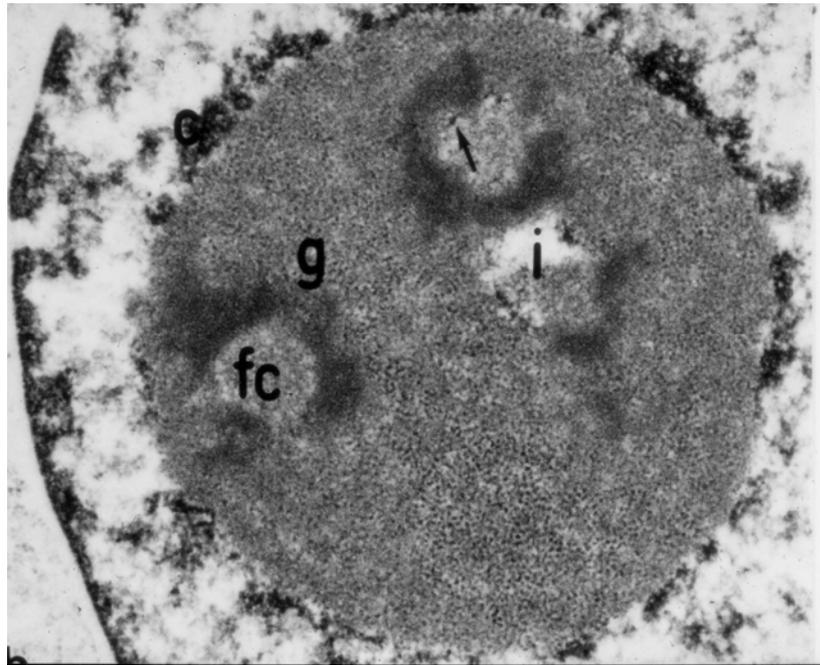


Figure 19 : Nucléole en microscopie électronique. Deux centres fibrillaires (fc) entourés par les composants fibrillaires denses sont visibles ; le composant granulaire est indiqué par la lettre g et l'interstice par la lettre i.

Les gènes ribosomiques et les facteurs de transcription sont localisés dans les CF, la transcription se déroule à l'interface entre les CF et le CFD, la maturation précoce s'effectue dans le CFD et la maturation tardive dans le CG. Les différents composants nucléolaires représentent ainsi les différentes étapes de la ribogénèse.

Au cours du cycle cellulaire, les gènes ribosomiques sont exprimés de la télophase à la fin de l'interphase et réprimés pendant la mitose. En prophase, de façon concomitante à la répression de la transcription ribosomique, les nucléoles disparaissent. Les gènes ribosomiques sont regroupés au niveau de régions chromosomiques particulières, les NORs (nucleolar organizer regions). Inversement, la formation des nucléoles commence en télophase au niveau des NORs et requiert le redémarrage de la transcription Pol I et l'activation de la machinerie de maturation des pré-ARN ribosomiques.

Le modèle actuellement admis fait intervenir le nucléole qui s'assemble en fin de mitose quand l'ARN polymérase I est activée, soit en anaphase (Fomproix 1998) ou en télophase (Roussel 1996) suivant les cellules.

Les protéines Ag-NORs sont des protéines nucléolaires. L'abréviation Ag NOR correspond à Nucleolar Organiser Régions (NORs) marquées par l'Argent (Ag). Les NORs sont les régions chromosomiques autour desquelles les nucléoles se réorganisent durant la télophase. Ces régions correspondent à la constriction secondaire des chromosomes en métaphase et sont localisées sur les chromosomes acrocentriques (chromosomes 13,14,15,21 et 22). Les NORs contiennent les gènes ribosomiaux. Pendant l'interphase, les NORs sont localisés dans le nucléole, où ils constituent le cœur fonctionnel de la synthèse ribosomale.

Les protéines AgNORs sont majoritairement composées de nucléoline et de protéine B23 pendant l'interphase, d'Upstream Binding Factor (UBF) et d'ARN polymérase I (RPI) dans la constriction secondaire pendant la mitose (Roussel 1996).

La nucléoline est une protéine de 100 kDa. Elle est la plus abondante protéine nucléolaire phosphorylée dans les cellules proliférantes. Elle contient plusieurs régions acides qui transportent et déplacent l'histone H1, induisant la décondensation de la chromatine, et sont responsables du marquage à l'argent de la nucléoline.

La protéine B23, ou Nutramine, est une protéine de 37-39 kDa. Elle a une activité ribonucléase et se lie à l'ARNr pendant la dernière phase du processus. Elle peut se déplacer entre le noyau et le cytoplasme et agir comme un transporteur moléculaire, en apportant les protéines ribosomales et non ribosomales du cytoplasme vers le noyau. La protéine B23 est localisée dans le composant granulaire du nucléole.

L'UBF est un co-facteur de transcription très abondant, 50 000 copies par cellule, avec un poids moléculaire de 94-97 kDa. Il a la possibilité de se lier au promoteur de l'ADNr et de modifier les gènes de l'ARNr dans le but de recruter d'autres facteurs d'activation.

La RPI est une enzyme dont le poids moléculaire est de 500 à 600 kDa. Elle est composée de 12 sous-unités et 3 facteurs associés. Environ 150 000 molécules de RPI sont engagées simultanément dans la synthèse de l'ARNr, dans une seule cellule. Il faut moins de 5 minutes

pour chaque molécule RPI pour transcrire un gène ARNr. La plus volumineuse sous-unité est une des protéines AgNORs (Derenzini, Ploton 2003)

Dans les années 1980, des études cytochimiques ont montré que durant l'interphase, les NORs sont localisés dans le CF et dans le CFD adjacent. Ces structures nucléolaires deviennent ainsi fortement marquées à l'argent et clairement visualisables en microscopie où elles apparaissent comme des points noirs bien définis. L'étude en microscopie confocale et la reconstruction en trois dimensions montrent que ces points donnent lieu à de nombreuses boucles à l'intérieur du nucléole (Ploton 1994). Les points marqués à l'argent sont définis comme étant les AgNORs de l'interphase afin de les distinguer des AgNORs de métaphase. Curieusement, dans leurs premières applications en pathologie tumorale, les AgNORs de l'interphase étaient plus simplement indiqués comme AgNORs, et depuis lors, en pathologie, le terme AgNORs indique les AgNORs de l'interphase. Tous les composants nécessaires à la transcription des ARNr sont localisés dans les AgNORs, lieu effectif de cette synthèse. Le nombre d'AgNORs est corrélé à l'importance de la synthèse ribosomale. Ceci varie de un à deux dans les lymphocytes quiescents à plusieurs dizaines dans les cellules néoplasiques proliférantes, caractérisant ainsi un haut niveau d'activité de transcription d'ARNr. La distribution des AgNORs peut être considérée comme représentative de l'expression morphologique du niveau de synthèse des ribosomes dans la cellule.

Le fait que la quantité des protéines AgNORs augmente en phase S-G2, explique leur rôle de marqueur de prolifération. Il existe une relation linéaire entre leur surface et le temps de doublement cellulaire. Pour être applicable en routine en histo-cytologie tumorale, la quantité d'AgNORs doit être strictement corrélée à la vitesse de croissance quelque soit le type de cellule. La même quantité d'AgNORs doit correspondre à la même vitesse de duplication des différents tissus néoplasiques, ce qui a déjà été démontré (Derenzini, Ploton 2003). Derenzini (1990) sur 12 lignées cellulaires et Tréré (1989) sur une série de lignées cellulaires de neuroblastome ont montré qu'il existait une corrélation inverse entre la quantité d'AgNORs et la durée du cycle. Ainsi, $IP = MIB1 / (1 / AgNOR\ MIB+)$ ou encore $IP = MIB1 \times AgNORs\ MIB+$ (Brugal 1995).

Le marquage à l'argent était initialement utilisé pour mettre en évidence les NORs en métaphase sur des préparations de cytogénétique. Ploton l'a utilisé dans une forme simplifiée pour visualiser en microscopie les NORs en interphase (Ploton 1986). En raison de sa

simplicité, de sa fiabilité et de sa spécificité, cette technique est devenue la plus fréquemment utilisée pour la visualisation en routine des AgNORs en cyto-histologie (fig.20).

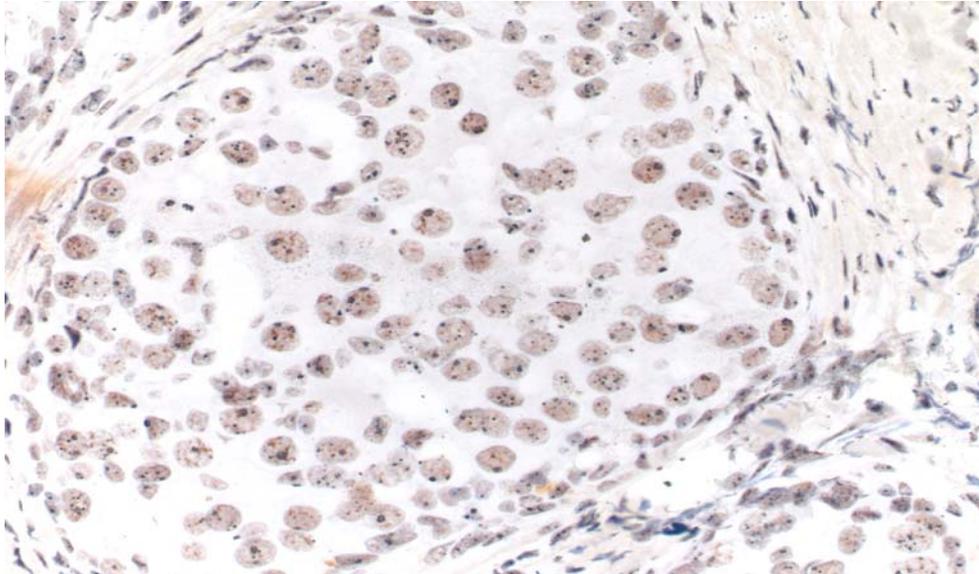


figure 20 : marquage des AgNORs : les points noirs (x40)

Le marquage à l'argent est influencé par plusieurs facteurs, notamment les fixateurs utilisés, la température et la durée de la réaction de marquage.

Les fixateurs à base d'alcool permettent une visualisation plus intense et spécifique des protéines AgNORs que les fixateurs à base de formol. D'ailleurs, dans les tissus fixés au formol, l'intensité du marquage à l'argent est extrêmement dépendante du temps de fixation. La faible qualité du marquage à l'argent obtenu sur les coupes histologiques fixées au formol, résulte de l'effet masquant du fixateur sur les protéines cellulaires (Derenzini, Ploton 2003). Dans le but d'éliminer cet effet et d'améliorer la qualité du marquage des AgNORs, Ofner a mis en place la technique du démasquage des antigènes utilisés par les pathologistes pour améliorer le marquage en immunohistochimie (Ofner 1994). Cette technique utilise l'exposition des lames dans une solution tampon citratée (10mM, PH 6.0), à de hautes températures (120°C) pendant 20 minutes. Le chauffage des lames peut être obtenu par l'autoclave ou micro-ondes. Ceci permet d'améliorer considérablement le marquage et est recommandé en pratique courante (Derenzini, Ploton 2003).

Le marquage à l'argent est, également, grandement influencé par la température et le temps de la réaction de marquage. Ces deux variables sont inversement reliées entre elles : de hautes températures et une courte durée de réaction sont nécessaires pour une visualisation sélective des NORs. Quand la réaction de marquage est prolongée au delà de la durée optimale, les autres composants nucléolaires sont progressivement marqués, allant jusqu'au marquage de l'ensemble du nucléole. Il a été ainsi rapporté des durées de réaction allant de 10 à 60 minutes (Derenzini, Ploton 2003). Il en est de même pour la température à laquelle ont été exposées les lames pendant la réaction de marquage, allant de la vague notion de température ambiante à 50°C. Le terme « AgNORs » a été attribué aussi bien à un point unique marqué, à un amas de NORs qui apparaît discrètement marqué, qu'à l'ensemble du nucléole qui a été « sur-marqué » à l'argent. Ceci a abouti à des résultats discordants portant sur le même type de tumeurs et a généré un grand scepticisme quant à l'intérêt des AgNORs (Derenzini, Ploton 2003).

En 1993, le Comité International de quantification des AgNORs a été créé et deux ans plus tard a émis ses recommandations en la matière. Le protocole proposé incluait le marquage dans une boîte noire, à une température constante de 37°C avec un temps de fixation en rapport avec le type de préparation (Derenzini, Ploton 2003).

L'analyse quantitative peut être effectuée soit par la méthode du comptage, la plus répandue en pratique courante, soit par méthode morphométrique.

La méthode du comptage consiste à compter directement, dans les cellules, les points marqués à l'argent, au microscope à fort grossissement (X100). Malgré son extrême simplicité et son faible coût, cette méthode a quelques inconvénients. Elle est consommatrice de temps et est subjective surtout lorsqu'il existe un amas de points marqués ou de chevauchements. Il a été ainsi rapporté une forte variation inter-observateur, pour la même lame histologique. Par ailleurs la taille du point marqué n'est pas prise en considération alors qu'elle est extrêmement variable, notamment en pathologie tumorale.

Pour éviter ces inconvénients et permettre d'obtenir une quantification des AgNORs objective et reproductible, la méthode morphométrique a été introduite. Cette technique consiste en une mesure automatique ou semi-automatique de la zone marquée à l'argent en utilisant la cytométrie d'images. Elle est plus rapide, plus précise et plus objective que la précédente. Il

s'agit de la méthode recommandée en routine par le Comité International de quantification des AgNORs. Les résultats obtenus sont exprimés en surface moyenne de NOR par noyau sur l'ensemble des noyaux mesurés (en pixel ou en μm^2).

5.4 - La prolifération cellulaire

L'intérêt de la mesure de la **prolifération cellulaire** en oncologie est triple : diagnostique dans certaines lésions frontières ou en aidant au « grading » des tumeurs, pronostique en permettant d'appréhender l'agressivité tumorale et thérapeutique en permettant de mieux adapter le traitement adjuvant.

L'information portant sur la cinétique des cellules tumorales peut être obtenue grâce à de nombreuses techniques comprenant le marquage à la thymidine tritiée, la mesure de la phase S et la quantification d'antigènes associés à l'activité de prolifération tels le PCNA et le Ki-67.

L'étude de la prolifération cellulaire en utilisant des anticorps dirigés contre des antigènes liés à cette activité a fait l'objet de nombreux travaux sur une grande variété de tumeurs. Deux marqueurs sont nécessaires et suffisants pour décrire la cinétique d'une population cellulaire (IP), l'un mesure la fraction en croissance (FC) tel le Ki67 ou le MIB1 et l'autre évalue la vitesse du cycle cellulaire ($1/T$, T étant la durée du cycle), $IP = FC / T$. La mesure des AgNORs dans les cellules proliférantes est la seule façon d'effectuer cette deuxième approche sur des tissus paraffinés.

L'index de prolifération (IP) représente la production de cellules par une tumeur et ne dépend que de la FC et du T par la relation : $IP = FC \times 1/T$. Une population tumorale ayant un grand nombre de cellules en cycle n'aura pas pour autant une fraction en croissance élevée si la vitesse du cycle est lente. De même une population cellulaire dont la durée du cycle est très courte, donc prolifère vite n'aura pas obligatoirement une fraction en croissance élevée si le nombre de cellules en cycle est faible (Brugal 1995).

Ainsi, la façon la plus précise d'évaluer l'index de prolifération d'une population consiste à mesurer les deux paramètres (Ki67 et AgNORs) simultanément avec la quantification des AgNORs dans les cellules Ki67 positives. Ceci impose le marquage simultané des antigènes

Ki67 et des AgNORs. Nous nous sommes intéressés dans ce travail à cette facette de la prolifération cellulaire.

5.5 - Amplification du gène Her-2/neu

Le gène de «human epidermal growth factor receptor 2» (HER-2)/neu (c-erb-2) est localisé sur le bras long du chromosome 17 (17q21) (Akiyama 1986, Bargmann 1986). Il code pour un récepteur membranaire faisant partie de la famille des récepteurs de croissance EGF (EGF : Epidermal Growth Factor). Il est retrouvé à l'état normal dans toutes les cellules épithéliales humaines. Il appartient à la famille HER, constituée de quatre récepteurs transmembranaires (fig.21), appelés HER1 (c-erb B1ou EGFR), HER2 (c-erb B2), HER3 (c-erb B3) et HER4 (c-erb B4) (Cornez 2000).

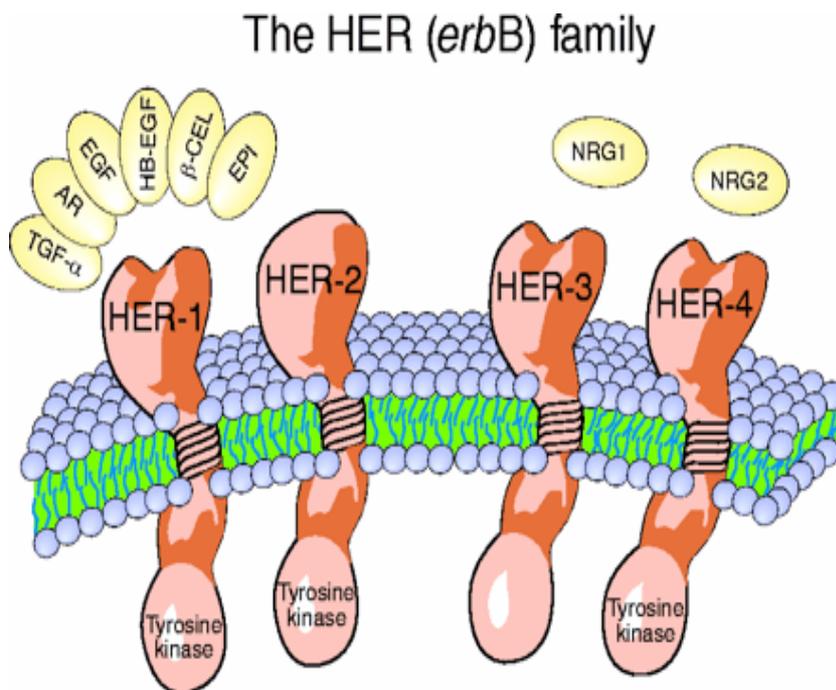


Figure 21 : La famille des gènes HER (erb).

Abréviations: TGF- = transforming growth factor alpha; AR = amphiregulin; EGF = epidermal growth factor; HB-EGF = heparin binding EGF; β -CEL = beta cellulin; EPI = epinephrine; NRG1 = neuregulin 1; NRG2 = neuregulin 2. (The oncologist, Ross 2003)

HER2 code pour une glycoprotéine de 185 kDa constituée de 1 255 acides aminés. Il possède un domaine de liaison extracellulaire riche en cystéine, un domaine trans-membranaire lipophile et un domaine intracellulaire possédant une activité tyrosine kinase (Akiyama 1986). HER2 est un récepteur particulier dans la mesure où il ne possède pas de ligand spécifique de grande affinité. Cette famille de récepteurs est impliquée dans la communication de cellules à cellules et de cellules au stroma par l'intermédiaire d'un processus connu comme un signal de transduction dans lequel le facteur de croissance extérieur, ou ligand, intervient dans la transcription d'une variété de gènes, par phosphorylation ou déphosphorylation d'une série de protéines trans-membranaires et intracellulaires, induisant la cascade complexe de signalisations intracellulaires. De nombreuses protéines et voies intermédiaires sont impliquées incluant le Ras/ activité mitogène par la voie d'une protéine kinase, la voie P13K/Akt, le Janus kinase/transduction du signal et activation de la voie de transcription, et la voie PLC qui finalement affecte la prolifération, la survie, la mortalité et l'adhésion cellulaire (Akiyama 1986, Schechter 1994, Pinkas 1996,1998).

L'activation du récepteur nécessite trois variables, un ligand, un récepteur et un partenaire de dimérisation (Yarden 2001). Les récepteurs de la famille HER peuvent exister sous forme de monomères inactifs, mais aussi sous forme de dimères actifs. La dimérisation peut avoir lieu entre récepteurs identiques (homodimères) ou entre différents récepteurs (hétérodimères) de cette famille (Alroy 1997).

L'activation de l'oncogène est observée dans 15 à 30% des cancers invasifs et dans 60 à 70% des carcinomes canaux in situ, principalement peu différenciés, de haut grade histologique, de type comédocarcinome, traduisant probablement le caractère plus agressif et le potentiel invasif accru de ces derniers (Allred 1992). Cette activation correspond pratiquement toujours à une amplification génique. Il n'a pas été observé de translocation ni de mutation impliquant ce gène. Le phénomène d'amplification est caractérisé par la répllication du gène en un grand nombre de copies dans le noyau des cellules tumorales. Quand il est présent dans un carcinome mammaire, ce phénomène intéresse la grande majorité des cellules néoplasiques. L'amplification du gène s'accompagne le plus souvent d'une surexpression des ARN messagers et de la protéine Her-2/neu qui après dimérisation et phosphorylation, induit le signal mitotique.

Différentes méthodes de détection, de sensibilité et de spécificité variables, peuvent être utilisées pour analyser le statut HER2 d'une tumeur, soit à l'échelle de la protéine (immunohistochimie, western-blot, Elisa) soit à l'échelle de l'ADN (FISH - Fluorescence in situ hybridisation – CISH – Chromogenic in situ hybridisation – PCR, Southern-blot), soit plus rarement, à l'échelle de l'ARN messager (northern-blot, RT-PCR) (Cornez 2000).

La protéine HER2 peut être détectée, sous la forme du récepteur intact au niveau de la surface membranaire, soit sous la forme de son domaine extracellulaire (shed antigen). Le choix de la technique de détection peut influencer les résultats de différentes études portant sur l'impact pronostique de HER2 (Mitchell 1999), de la corrélation de son expression avec d'autres facteurs pronostiques ou encore du bénéfice du traitement par l'Herceptin (St Paul de Vence 2005).

L'IHC constitue la méthode recommandée en Europe et la plus largement utilisée (St Paul de Vence 2005). De réalisation simple et rapide, elle est peu coûteuse, les lames fixées sont faciles à préserver et le microscope classique est suffisant rendant ainsi la technique accessible à la plupart des laboratoires. Les inconvénients de l'IHC comprennent la durée et le type de fixation, l'intensité du recouvrement antigénique, le type d'anticorps (monoclonal ou polyclonal), la nature des systèmes de contrôle des échantillons et les difficultés engendrées par l'attribution subjective d'un score. Pour mettre en évidence la surexpression d'une protéine, il faut la comparer à celle d'une tumeur témoin exprimant normalement Her-2/neu ou sur-exprimant la molécule. Des tests standardisés sont actuellement développés pour effectuer cette recherche. Ils reposent sur une technique d'immunohistochimie classique et les résultats sont comparés avec des lames témoins qui permettent d'établir quatre degrés de marquage : 0, +, ++, +++ (fig. 22-25). Une procédure standardisée IHC, existe avec un système de quantification dans lequel les cellules avec moins de 20 000 récepteurs ne montrent pas de marquage (0), les cellules contenant approximativement 100 000 récepteurs montrent un marquage partiel avec dans moins de 10% des cellules un marquage membranaire complet (1+), les cellules contenant environ 500 000 récepteurs sont le siège d'un marquage membranaire complet mais léger à modéré dans plus de 10% des cellules (2+) et les cellules contenant environ 2 300 000 récepteurs avec un marquage membranaire complet et intense dans plus de 10% des cellules (3+) (Ross 2003).

Marquage immunohistochimique de la surexpression de HER2-neu

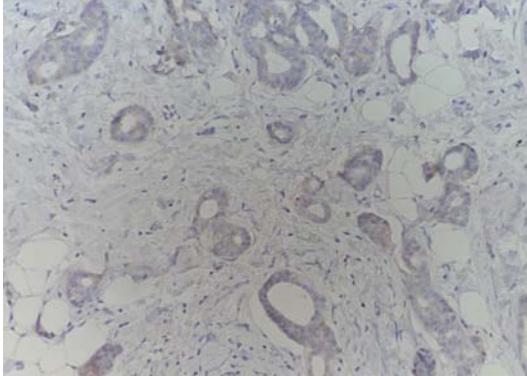


Figure 22 : HER2 : 0+ (X20)

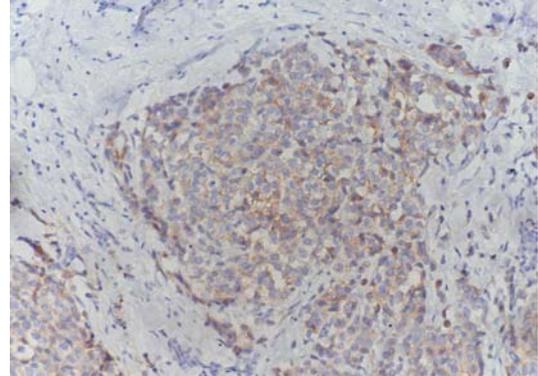


Figure 23 : HER2 : 1+ (X20)

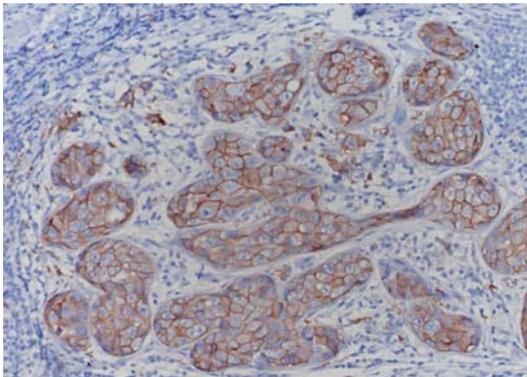


Figure 24 : HER2 : 2+ (X20)

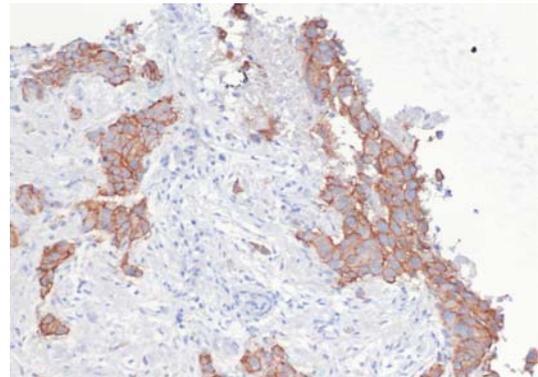


Figure 25 : HER2 : 3+ (X20)

Cette étude quantitative repose sur deux données fiables, le nombre de cellules marquées et la localisation membranaire du marquage alors qu'une autre donnée « technique dépendante » intervient, l'intensité du marquage. Les résultats provenant de "United Kingdom National External Quality Assessment Scheme for Immunohistochemistry" (UK NEQAS-ICC) a montré que le manque de reproductibilité dans la détermination du score parmi les laboratoires n'est pas le résultat d'une hétérogénéité tumorale ou de différence de fixation

mais plutôt de la façon même de procéder au calcul du score (Rhodes 2002). L'utilisation d'un système d'analyse d'image peut réduire la variabilité entre les pathologistes spécialement pour les 2+, mais l'analyse d'image pose des problèmes pour les marquages membranaires.

Aux Etats-Unis, la Food and Drug Administration a autorisé la mise sur le marché de deux kits commerciaux IHC : l'Hercep TestTM (Dako Corporation ; Glostrup, Denmark) et le Ventana PathwayTM (Ventana Medical Systems ; Tucson, AZ) pour déterminer l'éligibilité des patientes pour bénéficier de l'Herceptin.

Pour étudier l'amplification du gène, les techniques d'hybridation in situ sont utilisées (Tanner 2000, Wang 2000). La technique FISH a l'avantage, par rapport à l'IHC, d'avoir un système de détermination du score beaucoup plus objectif. Parmi les inconvénients se trouvent un coût plus élevé pour chaque test, un temps plus long pour déterminer le score, la nécessité d'un microscope à fluorescence et l'impossibilité de garder les lames pour le stockage ou la relecture. Ces techniques sont appliquées sur des coupes histologiques qui ont été fixées au formol et incluses en paraffine. Il existe des difficultés à ce niveau dues à la section et au chevauchement des noyaux. En effet, les coupes histologiques entraînent systématiquement la section des noyaux de la préparation, rendant la technique moins performante. Le chevauchement des noyaux est également un facteur limitant, dans les cellules tumorales de petites tailles. Par ailleurs, les techniques d'hybridation in situ posent des problèmes en cas de faible amplification. Il est ainsi difficile, en cas d'utilisation isolée d'une solution dirigée contre le gène Her-2/neu, de différencier une faible amplification réelle, d'une induite par une aneuploïdie avec la présence de plusieurs copies du chromosome 17. En effet, le gène HER2 est situé sur ce chromosome et pour éviter ce problème, l'utilisation d'un double marquage s'impose avec deux sondes pour Her-2/neu et le chromosome 17. Il existe deux versions de FISH approuvées par la FDA : le Ventana INFORMTM (Ventana Medical System) mesurant seulement le nombre de copies du gène de HER-2/neu et le Abbott-Vysis PathVysionTM (Abbott Laboratories ; Abbott Park, IL) qui inclut le marquage du chromosome 17.

La technique CISH présente les avantages des techniques IHC (faible coût, microscope classique, technique familière) et FISH (contrôle interne, cible ADN plus robuste, score plus objectif) mais n'a pas encore été approuvée par la FDA. Par ailleurs les techniques CISH et

IHC peuvent être couplées permettant ainsi d'évaluer le nombre de copies du gène et son expression protéinique.

La technique RT-PCR a été utilisée préférentiellement pour détecter HER-2/neu ARN messenger dans le sang périphérique et dans des prélèvements de moelle. L'arrivée de la microscopie par capture laser et l'acceptation de la technique RT-PCR comme technique de laboratoire de routine, en font un moyen prometteur pour la détermination du statut HER-2 (Ross 2003).

De nombreuses études ont comparé la sensibilité des deux techniques IHC et FISH (Jacobs 1999, Pauletti 2000, Wang 2000, Sartelet 2005). La grande majorité montre qu'il existe une bonne corrélation entre les deux techniques pour les tumeurs 3+. Une étude récente présentée par le NSABP (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) a montré que pour les laboratoires « labellisés », il existe une concordance de 98% entre les laboratoires quand des tumeurs considérées comme ayant un score de 3+ ont été analysées de nouveau par IHC et FISH dans le laboratoire du NSABP (Paik 2002). Par contre il existe une discordance au niveau des tumeurs 2+. La technique d'hybridation in situ semble être plus sensible et plus adaptée dans ce cas de figure. En Europe, l'IHC est utilisée comme technique de dépistage et la FISH est utilisée dans les cas douteux, notamment les patientes surexprimant HER2 à hauteur de 2+. Il est reprochée à l'IHC, l'hétérogénéité des méthodes avec des problèmes méthodologiques (type d'anticorps, fixation des prélèvements, utilisation inadéquate des kits) et d'interprétation (méthode semi-quantitative, prise en compte de l'intensité du marquage) (Penault-Llorca 2003). Néanmoins, une plus grande standardisation de la technique IHC a été réalisée ces dernières années, grâce à l'introduction de l'Herceptin* dans l'arsenal thérapeutique.

Les intérêts de la recherche de la surexpression ou de l'amplification de HER-2/neu sont triples : pouvoir mettre en route un traitement spécifique par immunothérapie, prévoir la sensibilité de la tumeur à certains traitements, établir une valeur pronostique de la tumeur.

L'intérêt majeur de la détermination du statut de Her-2/neu dans les tumeurs mammaires repose sur la l'impact thérapeutique avec l'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre la partie extra membranaire de Her-2/neu : le trastuzumab (Herceptin). L'Herceptin était indiqué initialement, uniquement, dans le traitement du cancer du sein métastatique avec surexpression tumorale de Her-2/neu (Baselga 2001, Eisenhauer 2001, Slamon 2001) mais

depuis peu ses indications se sont élargies dans le cadre du traitement adjuvant des formes non métastatiques. Par contre il a été démontré que ces tumeurs étaient plus résistantes au tamoxifène (Benz 1993, De Laurentiis 2005, De Placido 1998), au cisplatine (Benz 1993) et aux taxanes (Yu 1996). Le pronostic péjoratif de l'amplification de Her-2/neu a fait l'objet de nombreuses études (L'Allemain 2003) et a été validé surtout dans la population avec un envahissement ganglionnaire axillaire. Il reste plus controversé en l'absence d'envahissement ganglionnaire.

6- Nos hypothèses de travail

Notre travail a débuté en 1998 et a compris trois phases successives :

Notre premier axe de travail concernait l'intérêt pronostique de l'étude de la ploïdie avec pour hypothèse que le pronostic n'était pas uniquement déterminé par la ploïdie de la population majoritaire mais également et surtout par l'existence de populations minoritaires à fort contenu en ADN, non détectées en cytométrie classique. Nous avons focalisé notre travail sur la détection de ces événements mineurs et recherché leur corrélation au pronostic.

Notre deuxième axe a été l'étude de la prolifération cellulaire par la détermination de l'index de prolifération qui tenait compte du pourcentage de cellules dans le cycle et la durée de celui-ci. Un double marquage des MIB1 et des AgNORs, dans les lésions mammaires fixées au formol puis incluses en paraffine, était nécessaire. Nous avons souhaité vérifier la pertinence pronostique sur l'évolution métastatique de la maladie et sur la survie des patientes.

Au vu des résultats encourageants de nos deux études, que nous considérons comme préliminaires et qui nous avaient permis de vérifier nos hypothèses, nous avons décidé d'étendre ce travail à une population plus homogène. Nous avons retenu celle à faible risque de récurrence, sans atteinte ganglionnaire et pour laquelle aucune indication de chimiothérapie n'avait été retenue. L'objectif était de vérifier que les facteurs pronostiques que nous étudions se révéleraient finalement plus pertinents que ceux ayant servi à la stadialisation de la maladie des patientes, dont certaines ont eu une évolution métastatique et/ou fatale. Dans cette phase de notre travail, nous avons évalué l'intérêt pronostique d'un facteur supplémentaire, la

surexpression de HER2, qui était à l'époque une source de controverses pour les patientes sans atteinte ganglionnaire.

Chaque étude est présentée ici de façon séparée avec la méthodologie utilisée et les résultats observés. La discussion est menée en dernière partie de ce travail, en portant sur les 3 études en même temps.

*Valeur pronostique
de la ploïdie.
Étude préliminaire*

1. Objectif

Notre objectif lors de la réalisation de cette étude préliminaire était de vérifier une hypothèse de travail : les discordances observées dans la littérature concernant l'intérêt pronostique de la ploïdie sont dues à la non détection de clones minoritaires qui pourraient être déterminant dans l'évolution de la maladie, s'ils constituent des clones plus agressifs. Pour cela nous avons utilisé un analyseur automatisé d'images, Discovery (Becton Dickinson).

Alors que la ploïdie, des patientes avec un cancer du sein opéré, avait déjà été déterminée avec le système CAS 200, nous avons analysé de nouveau les lames avec Discovery, chez les patientes pour lesquelles nous disposions d'un suivi clinique. Nous avons recherché une éventuelle discordance entre les deux techniques de cytométrie.

Dans un deuxième temps, nous avons analysé l'intérêt pronostique de la ploïdie en focalisant notre attention sur l'impact des clones minoritaires agressifs avec plus de 5c ADN.

2. Méthodes

2.1 Technique de coloration de l'ADN : la coloration Feulgen

Les lames ont été obtenues par apposition, à l'état frais, à partir du tissu tumoral, lors de la réalisation de l'examen en extemporané. La coloration Feulgen a été réalisée suivant les recommandations du CAS 200 (Becton Dickinson, Leiden, the Netherlands) : après séchage à l'air, les lames ont été fixées 30 mn dans le formol, tamponné à 10%, puis soumises à une heure d'hydrolyse dans HCl 5N à température ambiante suivie d'une coloration d'une heure dans la thionine.

2.2 La cytométrie.

La cytométrie classique a été réalisée par l'analyseur d'images CAS 200 (Becton Dickinson, Leiden, the Netherlands). Environ 200 noyaux ont été mesurés après calibration avec les hépatocytes de rat, tel qu'il est recommandé par le CAS 200. Le coefficient de variation de la calibration a toujours été inférieur à 3%. Pour chaque cas, l'index ADN de chaque pic principal et du second, s'il existait, a été mesuré de même pour le pourcentage de cellules de plus de 5c ADN.

Pour chaque tumeur, la même lame a été analysée de nouveau par le système Discovery (Becton Dickinson), un analyseur d'images automatisé qui comprenait : un microscope complètement automatisé Leitz Autoplan (Wetzlar, Germany) avec un objectif sec 25x : 1 (ouverture numérique 0,7), une caméra Xillix Microimager (Xillix Technologies Corporation, Vancouver, B.C., Canada), un ordinateur (486 DX 33, Intel) et un microscope automatisé spécialement adapté au système Discovery. La lame histologique était sous le contrôle de l'ordinateur, avec un autofocus. La zone d'intérêt à étudier était définie par l'utilisateur.

La longueur d'onde de la lumière utilisée pour l'étude de l'ADN était de 620 nm, car offrait le meilleur contraste pour le marquage à la thionine. La calibration a été réalisée avec 50 noyaux de rein humain normal (coefficient de variation < 3%) utilisé comme standard externe. Pour chaque lame, la calibration a été vérifiée avec des lymphocytes et des cellules stromales.

Ce système a de nombreuses applications, en particulier la détection des sous-populations minoritaires, en utilisant un logiciel développé à cet effet au Laboratoire Pol Bouin. La lame était soumise à une étude rapide de 10 000 cellules avec une recherche cellulaire et une segmentation complètement automatisées. Le système débutait en mesurant 200 noyaux ayant une densité optique intégrée (DOI) d'au moins 40, ce qui correspond à un ADN diploïde ou plus. L'analyse changeait automatiquement pour la mesure de 50 cellules ayant un DOI > ou = 90 (ADN tétraploïde). Puis, le programme recherchait les rares noyaux contenant plus de 5c ADN (DOI > 120). Ceci continuait jusqu'à avoir réalisé l'analyse de 10 000 cellules ou jusqu'à avoir mesuré 300 cellules. La durée de l'analyse était de 10 à 30 minutes. Tous les événements mesurés étaient contrôlés sur une galerie d'images, permettant ainsi d'éliminer les artéfacts.

Les histogrammes ainsi obtenus permettaient de calculer l'index d'ADN de la population cellulaire étudiée, ainsi que de déterminer le nombre ou le pourcentage de cellules à contenu en ADN > 5C.

2.3 Patientes et matériel

Nous avons inclus 55 patientes, opérées dans le service de Gynécologie-Obstétrique du CHU de Reims (Pr Quéreux). Le geste a consisté en un traitement chirurgical conservateur, tumorectomie ou zonectomie dans 29 cas (52,7%). Un curage axillaire systématique a été réalisé chez toutes les patientes. En cas de découverte d'une lésion métastatique au cours du bilan d'extension, la patiente était exclue de l'étude.

La répartition histologique des lésions était la suivante : 41 carcinomes canaux (74.5%) dont 38 infiltrants et 3 intracanaux, 9 lobulaires (16.3%), 3 médullaires (5.5%), 2 mucineux (3.7%).

Le score de Scarff Bloom et Richardson (SBR) n'a été déterminé que pour les carcinomes canaux infiltrants, comme c'était la règle il y a encore quelques années. Les carcinomes lobulaires étaient considérés comme non éligibles pour une stadification SBR. Pour 5 patientes le score de SBR était de 1, pour 21 d'entre elles il était SBR2 et enfin 12 lésions étaient classées SBR3.

Une chimiothérapie a été réalisée chez 21 patientes (38.2%), la radiothérapie chez 39 (71%), l'hormonothérapie chez 18 d'entre elles (32.7%).

Le suivi moyen des patientes a été de 39 mois (5-69).

Les patientes ont été classées en deux groupes en fonction de l'évolution de leur maladie. Le groupe dit de « mauvaise évolution » comprenait 20 patientes qui ont développé des métastases ou sont décédées de la maladie. Les 35 autres patientes, ont été classées dans le groupe « bonne évolution ».

Dans le groupe de bonne évolution (tableaux 7 et 9), l'âge moyen était de 52.7 ans (extrêmes : 27-84), la lésion clinique était inférieure ou égale à 20 mm chez 18 patientes (51.4%), le traitement chirurgical conservateur avait été réalisé chez 22 patientes (62.8%), la chimiothérapie chez 10 patientes (28.5%), la radiothérapie chez 24 patientes (68.5%) et l'hormonothérapie chez 13 patientes (37.1%).

Dans le groupe de « mauvaise évolution » (tableaux 8 et 9), l'âge moyen des patientes était de 52 ans (extrêmes : 28-84), la lésion clinique était inférieure ou égale à 20 mm chez 5 patientes (20%), le traitement chirurgical conservateur avait été réalisé chez 7 patientes (35%), la chimiothérapie chez 11 patientes (55%), la radiothérapie chez 15 patientes (75%) et l'hormonothérapie chez 5 d'entre elles (25%).

Tableau 7. Sous population avec une bonne évolution

N° patiente	âge	type	grade	Stade (TNM)	chirurgie	Traitement adjuvant
1	27	C	1	T2N0M0	T/C	RX+CH
2	66	C	2	T1N0M0	T/C	RX+CH
3	40	C	2	T1N0M0	M/C	CH
4	64	C	2	T1N0M0	T/C	RX+H
5	45	C	2	T0N0M0	T/C	RX
6	33	C	2	T2N0M0	M/C	RX+CH
7	37	C	2	T2N0M0	T/C	RX+CH
8	37	C	2	T2N0M0	T/C	RX
9	58	C	2	T1N0M0	M/C	H
10	54	C	2	T1N0M0	T/C	RX+H
11	59	C	2	T2N0M0	M/C	RX+H
12	57	C	2	T2N0M0	T/C	RX+H
13	45	C	3	T2N1aM0	T/C	RX+CH
14	47	C	3	T2N0M0	T/C	RX+H
15	37	C	3	T2N0M0	M/C	CH
16	43	C	3	T2N0M0	T/C	RX+CH
17	51	C	3	T2N0M0	T/C	RX+CH
18	64	C	2	T1N0M0	T/C	RX
19	59	L		T2N0M0	M/C	RX+H
20	69	L		T0N0M0	T/C	RX
21	49	L		T1N0M0	M/C	RX+CH
22	31	L		T1N0M0	M/C	0
23	49	L		T2N0M0	M/C	H
24	68	ISC		T1N0M0	T/C	RX
25	49	ISC		T1N0M0	T/C	RX+H
26	52	L		TXN0M0	M/C	H
27	63	ISC		T0N0M0	T/C	RX+H
28	84	MED		T1N0M0	M/C	0
29	58	MED		T2N0M0	T/C	RX+H
30	53	MED		T1N0M0	T/C	RX
31	65	MUC		T0N0M0	T/C	RX+H
32	45	MUC		T2N0M0	M/C	0
33	55	L		T2N0M0	T/C	RX+H
34	70	C	2	T1N1aM0	T/C	RX
35	61	L		T0N0M0	M/C	H

Tableau 8 : sous population avec mauvaise évolution

N° patiente	âge	type	grade	Stade (TNM)	chirurgie	Traitement adjuvant
36	41	C	1	T2N0M0	T/C	RX
37	63	C	1	T1N0M0	T/C	RX+H
38	53	C	1	T2N0M0	M/C	RX+CH
39	42	C	1	T1N0M0	T/C	RX
40	35	C	2	T2N0M0	T/C	RX+CH
41	39	C	2	T3N0M0	M/C	RX+CH
42	77	C	2	T2N0M0	M/C	H
43	56	C	2	T1N0M0	T/C	-
44	56	C	2	T1N0M0	M/C	-
45	69	C	2	T1N0M0	M/C	-
46	84	C	2	T2N1aM0	T/C	RX+CH
47	45	C	2	T3N1M0	M/C	RX+CH
48	67	C	3	T2N1bM0	M/C	RX+H
49	43	C	3	T2N0M0	M/C	-
50	48	C	3	T2N0M0	T/C	RX+CH
51	34	C	3	T2N0M0	M/C	RX+CH
52	61	C	3	T2N0M0	M/C	RX+H
53	28	C	3	T3N0M0	M/C	RX+CH
54	62	C	3	T4N1M0	M/C	RX+CH+H
55	37	L		T3N0M0	M/C	RX+CH

Tableau 9 : synthèse des deux groupes

	Groupe avec bonne évolution	Groupe avec mauvaise évolution
Age moyen (ans)	52,7	52
Lésion clinique < 20 mm	51,4 %	20 %
Traitement conservateur	62,8%	35%
Chimiothérapie	28,5 %	55 %
Radiothérapie	68,5%	75 %
Hormonothérapie	37,7 %	25 %

2.4 Analyse statistique

Les patientes ont été séparées en deux groupes. L'un comprenant les patientes ayant eu une évolution défavorable comprenant les rechutes locales, les évolutions métastatiques et le décès. Les autres patientes ont été classées dans le second groupe de bonne évolution. Les paramètres analysés entre les deux groupes, ont été comparés avec le test χ^2 .

3. Résultats

3.1 Comparaison des deux analyses

Dans 29 / 55 cas (52.7%), les deux analyses d'ADN étaient totalement concordantes ; l'étude de l'ADN par Discovery, n'a détecté aucun élément rare ou clone minoritaire, supplémentaire. Dans 13 / 29 cas (44,8%), l'étude classique par CAS 200, avait déjà détecté les cellules hyperploïdes (fig. 26).

Néanmoins, dans 26 cas (47.3%) nous avons observé une discordance entre les deux analyses. Dans 12 cas, la présence d'un clone minoritaire n'a pu être détecté que par Discovery (fig. 27), et dans 14 cas, il s'agissait de cellules hyperploïdes, insuffisantes en nombre pour former un clone (fig. 28)

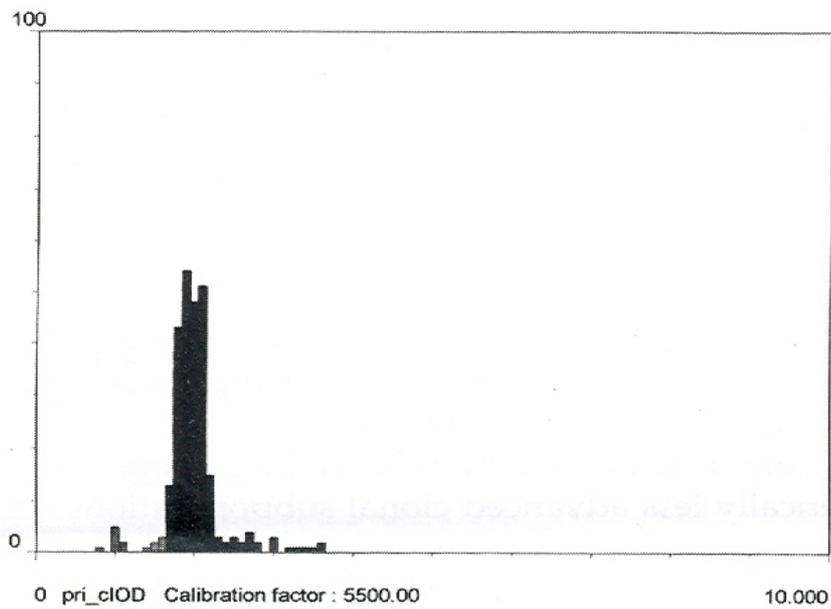
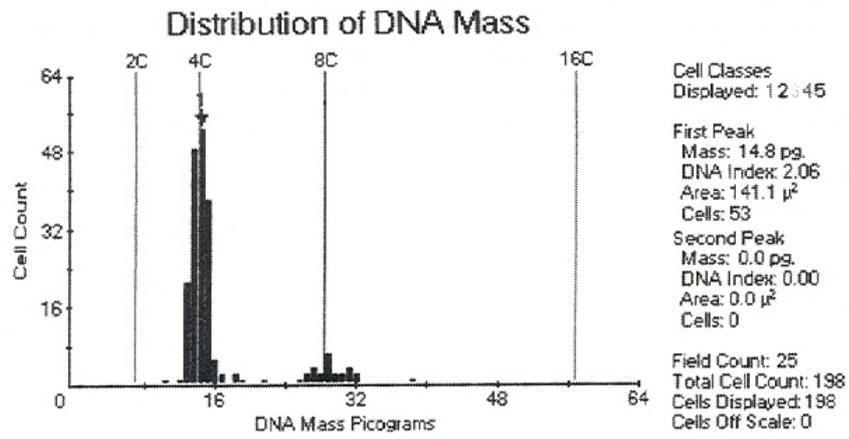


Fig 26. Distribution de l'ADN, concordance entre les deux analyses avec détection d'une population tétraploïde par les analyses CAS (haut) et Discovery (bas)

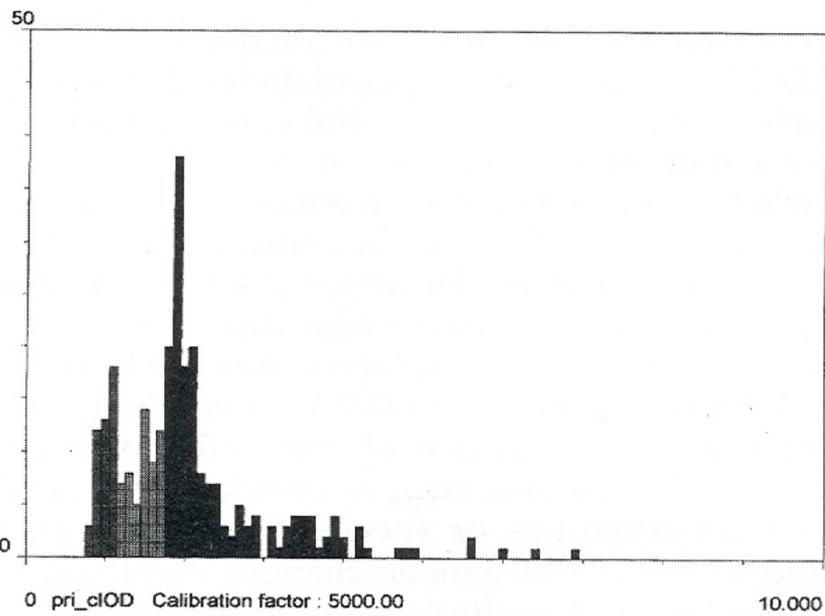
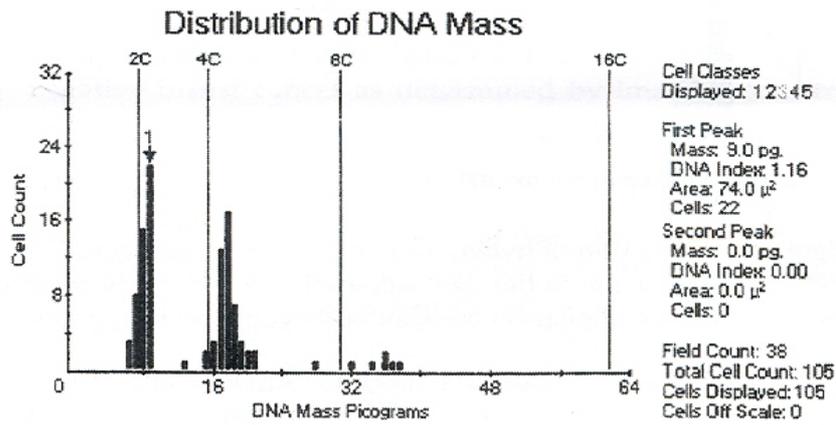


Fig 27. Distribution de l'ADN, détection d'un pic aneuploïde minoritaire par l'étude Discovery (bas), non mis en évidence avec l'étude CAS (en haut)

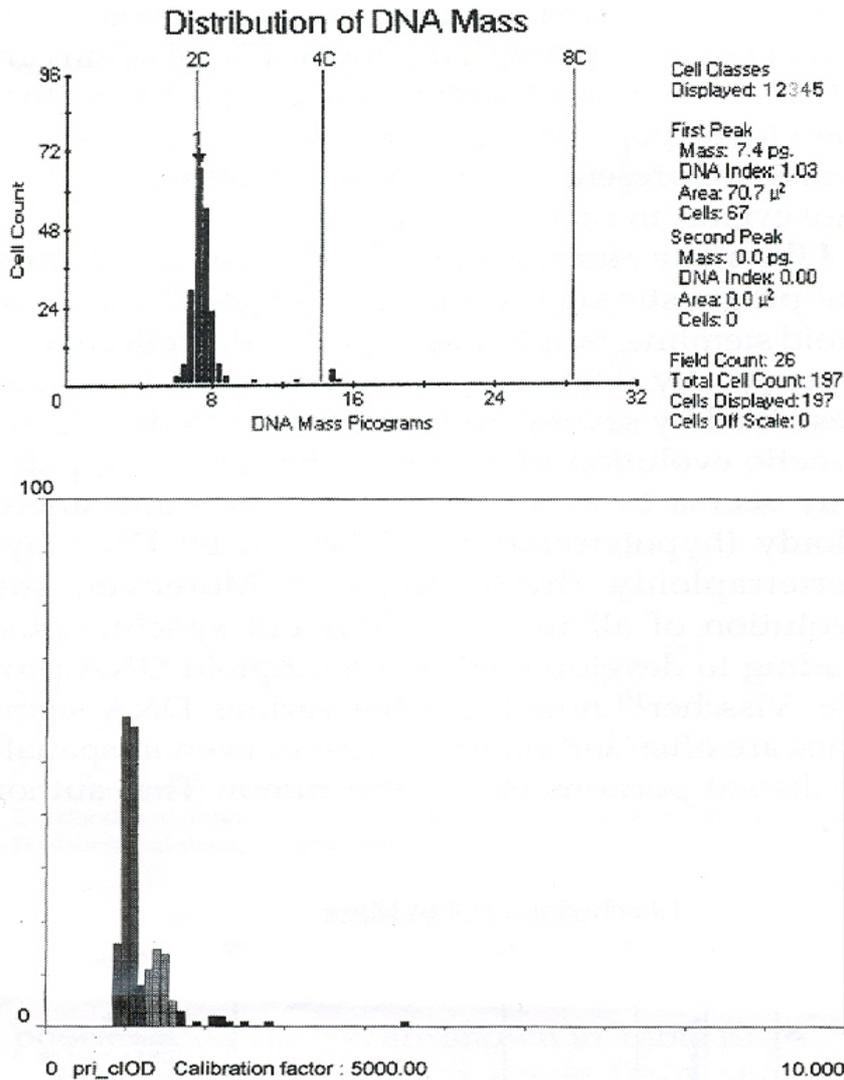


Fig 28. Distribution de l'ADN, détection de cellules hyperploïdes, sur le côté droit, par l'analyse Discovery (en bas) et non l'analyse CAS (en haut).

3.2 Evolution clinique

Les résultats en fonction de l'évolution de la maladie sont rapportés dans le tableau 10.

Dans notre série, l'hyperploïdie, l'aneuploïdie et la multiploïdie n'étaient pas corrélées à la présence de métastases ganglionnaires. L'hyperploïdie était faiblement corrélée à la taille tumorale ($p < 0.05$). La survie sans récurrence était corrélée à l'absence de métastases ganglionnaires ($p < 0.01$), à la taille tumorale ($p < 0.02$) et à l'absence d'embolies lymphatiques ($p < 0.001$).

Un pic unique d'ADN aneuploïde n'était pas corrélé au mauvais pronostic. Par contre, cette corrélation était retrouvée de façon significative, avec la présence de plusieurs pics d'ADN aneuploïdie (multiploïde), mais avec une faible spécificité. La présence, même minimale (<5% des cellules), de cellules hyperploïdes, était corrélée, de façon très significative, au mauvais pronostic. Le même constat a été observé au niveau de l'impact sur le pronostic avec la présence de clones hyperploïdes même minoritaires (au moins 20% des cellules mesurées avec une courbe gaussienne).

Tableau 10. Contenu en ADN et devenir des patientes

Ploïdie	Bon pronostic (%)	Mauvais pronostic (%)	X²	P
Diploïde	40	20		
Aneuploïde	60	80	1.75	NS
Multiploïde	20	60	7.71	<0.01
Monoploïde	80	40		
Cellules hyperploïdes				
>2 C	45	83	7.1	<0.01
<2 C	55	17		
Cellules hyperploïdes				
>5 C	25	70		
<5 C	75	30	10.27	<0.01
Clones hyperploïdes				
Présence	20	70	14.7	<0.001
absence	80	30		

4. Conclusions

A l'issue de ce travail, nous avons validé nos deux hypothèses :

- l'analyseur automatisé d'images Discovery peut détecter des clones minoritaires non révélés par le système CAS 200, dans un peu moins de la moitié des cas.
- l'existence de cellules ou de clones à fort contenu en ADN, hyperploïdes, même minoritaires peut avoir un impact péjoratif sur le pronostic.

Néanmoins, nous reconnaissons que le nombre limité de patientes, l'hétérogénéité dans les stades de la maladie et la durée brève du suivi pouvaient limiter la portée de ces conclusions.

Nous avons donc décidé de poursuivre ce travail avec une méthodologie différente sur un échantillon plus étendu.

*Valeur pronostique de l'index
de prolifération par double
marquage MIB1-AgNORs.
Étude préliminaire*

1. Patientes

Nous avons inclus 39 patientes opérées d'un cancer du sein dans le service de Gynécologie-Obstétrique du CHU de Reims (Pr Quéréux) et dont les pièces opératoires avaient été analysées au Laboratoire Pol Bouin du CHU de Reims (Pr Adnet). Nous n'avions retenu que les patientes dont le suivi était d'au moins 4 ans à partir du temps chirurgical.

La distribution de cette population selon la classification TNM était la suivante : T0N0 : 3 cas, T1N0 : 10 cas, T2N0 : 19 cas, T1N1 : 1 cas, T2N1 : 2 cas, T3N1 : 3 cas, T4N1 : 1 cas. Toutes les patientes étaient M0 au moment du diagnostic.

La distribution anatomopathologique était la suivante : 28 carcinomes canaux infiltrants (4 avec un score de SBR1, 15 SBR2, 9 SBR3), 7 lobulaires, 3 médullaires, 1 carcinome colloïde muqueux.

Les patientes ont été classées en deux groupes en fonction de l'évolution de leur maladie. Le groupe dit de mauvais pronostic comprenait celles qui ont développé des métastases ou sont décédées de la maladie. Toutes les autres ont été classées dans le groupe de bon pronostic.

2- La technique de double marquage KI 67 (MIB1) - AgNORs

Des coupes tissulaires de 3 microns ont été réalisées et étalées sur lames (Super frost plus, CML, France) avec de l'eau distillée. Elles ont été séchées à l'air pendant au moins une nuit à 37°C. Les lames ont été ensuite traitées au Xylène pendant au moins une demi-heure et réhydratées suivant la séquence suivante : alcool à 100° deux fois pendant 5 minutes ; alcool à 95°C deux fois pendant 5 minutes ; eau distillée pendant 5 minutes. Les lames ont été placées dans du tampon citrate à un PH = 6 dans un autoclave pendant 20 minutes à 120°C, refroidies à température ambiante, rincées pendant 5 minutes au PBS (Phosphate Buffered Saline) puis séchées délicatement et manuellement. Les lames étaient ainsi prêtes pour le marquage immuno-histochimique. Celui-ci s'est déroulé selon la séquence suivante :

- Le marquage des antigènes Ki-67 a débuté par le rinçage des lames avec du PBS,
- Les lames ont été fixées pendant 5 minutes dans une solution de paraformaldéhyde à 3%
- puis pendant 30 minutes dans une solution à 3% d'albumine sérique bovin (BSA).
- Les lames ont été mises en incubation 30 minutes à température ambiante, dans une boîte noire et humide après application des anticorps MIB1 (Immunotech, France) dilués à 1/50 avec du PBS.

- anticorps secondaires marqués à la biotine (anti-souris).
- Les lames ont été mises au contact avec FITC-streptavidine (Amersham, France) fraîchement dilué à 1/25 dans du PBS.
- Elles ont été rincées à deux reprises pendant 5 minutes avec du PBS et une fois à l'eau distillée.

Le marquage des AgNORs a été réalisé selon la technique décrite par Ploton (1986) et modifiée par Öfner (1994). Les lames ont été séchées à l'air et immergées dans une solution de nitrate d'argent fraîchement préparée contenant un volume de gélatine à 2% dans l'acide formique à 1% et deux volumes d'une solution aqueuse de nitrate d'argent à 25%. Après un rinçage à trois reprises dans de l'eau distillée, les lames ont été immergées pendant 2 minutes dans une solution de thiosulfate de sodium à 5% puis ont été rincées à l'eau distillée.

L'étude en cytométrie.

La quantification des AgNORs dans les cellules positives en MIB1 (NOR MIB+) a été effectuée grâce à l'analyseur d'images, le système DISCOVERY (Becton Dickinson, Leiden, The Netherlands).

La réalisation pratique de la quantification AgNORs-MIB1 a été mise au point dans notre Laboratoire et comprenait les étapes suivantes : le programme débutait par la visualisation d'une première image dans le but de détecter l'ensemble des noyaux (contre colorés par l'hématoxyline) en utilisant une longueur d'ondes de 580 nm. Après le seuillage, des critères de segmentation ont été définis pour séparer automatiquement les noyaux marqués. Le programme passait automatiquement à une seconde image comprenant des cellules MIB1 positives. Ceci nécessitait un passage en mode fluorescence avec un filtre d'excitation à 485 nm (fig. 29). Comme pour la première image, après seuillage, les noyaux marqués ont été automatiquement reconnus grâce aux paramètres de segmentation. La troisième partie du programme a consisté en un passage automatique en mode lumière transmise à 580 nm pour mesurer la surface des AgNORs. Le seuil était déterminé sur un grain AgNOR unique et au niveau d'un fibroblaste. Au total, au moins 20 champs ont été mesurés par lame.

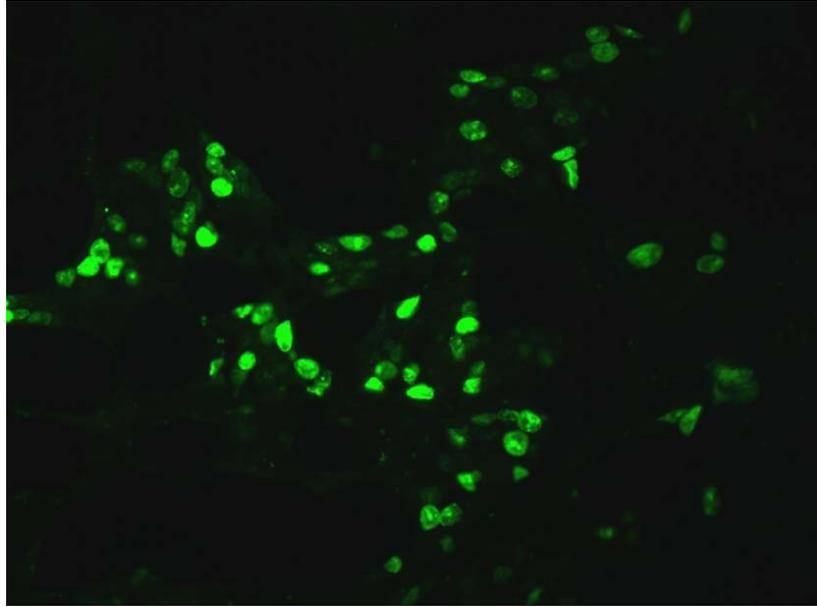


Fig 29 : marquage des cellules MIB1 positives au fluorochrome

La durée d'analyse par lame a varié entre 10 et 30 minutes et a permis l'étude de 300 à 500 noyaux. Tous les événements mesurés ont été contrôlés grâce à une galerie d'images qui permettait d'éliminer les artéfacts. Les éléments pris en compte étaient : le nombre total de noyaux mesurés, le pourcentage de cellules MIB1 positives (MIB1 index), la surface moyenne AgNORs dans les cellules MIB1 positives et MIB1 négatives, et la surface globale des AgNORs. L'activité proliférative ou index de prolifération, était obtenu en multipliant le pourcentage de cellules MIB1 positives par la valeur moyenne de la surface AgNORs qu'elles contiennent : $IP = MIB1 \times NOR\ MIB+$ (Brugal 1995).

3. Résultats

3.1 Quantification des MIB1, des AgNORs et de l'index de prolifération (IP).

Les résultats de la quantification des MIB1, AgNORs et de l'activité de prolifération ainsi que les valeurs seuils retenues dans notre étude sont résumées dans le tableau 11 .

Tableau 11 : résultats des paramètres étudiés

	Surface AgNORs μm^2	Index MIB1	Index de Prolifération (IP)
Moyenne	9,59	13,97	197,58
Déviat ion standard	3,88	8,61	118,37
Valeur seuil	10	15	200

L'index moyen MIB1 était de 13,97% (compris entre 3,25 et 20,53) et la valeur moyenne de IP était de 197,58 (10,54 – 637,18). Ces valeurs ont été déterminées afin de définir des seuils permettant de classer les lésions de façon binaire, aussi bien pour l'index MIB1 que pour l'IP. Ainsi nous avons retenu le seuil de 15% pour le MIB1 et de 200 pour l'IP.

La classification des tumeurs en fonction des AgNORs totaux (dans les cellules proliférantes et quiescentes) et de l'index MIB1, a été la suivante : 37% des tumeurs sont classées comme « faible AgNORs - faible MIB1 » (moyenne de IP = 82,8), 21% comme « faible AgNORs - fort MIB1 » (moyenne de IP = 196), 19% comme « fort AgNORs - faible MIB1 » (moyenne de IP = 168,8) et 23% comme fort « AgNORs – fort MIB1 » (moyenne de IP = 334,64).

Lorsque la distribution tenait compte des AgNORs dans les cellules MIB1 positives, elle devenait différente : 21% des tumeurs ont été classées comme « faible AgNORs – faible MIB1 », 15,8% comme « faible AgNORs – fort MIB1 », 34,1% comme « fort AgNORs – faible MIB1 » et 29% comme « fort AgNORs – fort MIB1 ».

La valeur globale des AgNORs n'était pas corrélée à l'index MIB1 ($p = 0,08$), ni à la valeur des AgNORs dans les cellules MIB1 positives ($p = 0,39$) ou MIB1 négatives ($p = 0,14$). Néanmoins il existait une forte corrélation entre les valeurs des AgNORs dans les cellules

MIB1 positives et négatives ($r = 0,88$, $p < 0.0001$). La valeur moyenne des AgNORs dans les cellules en cycle était significativement plus élevée que dans les cellules quiescentes (11,54 vs 9,26) avec un $p < 0,001$.

3.2 Pronostic et MIB1.

Le taux de cellules MIB1+ n'était pas corrélé à la taille tumorale, ni à l'existence d'une atteinte ganglionnaire axillaire. L'index MIB1 n'était pas significativement différent entre les deux groupes de patientes, bonne et mauvaise évolution (tableau 12). Il n'était pas lié à la survie sans récurrence. Les courbes de survie concernant les patientes avec un faible ou un fort index MIB1 ont été rapportées sur la figure 30. La moyenne de survie sans métastase était de 55,5 mois dans le groupe MIB1 $<$ à 15% et de 51,2 mois dans le groupe MIB1 $>$ à 15% ($p = 0,8$).

MIB 1

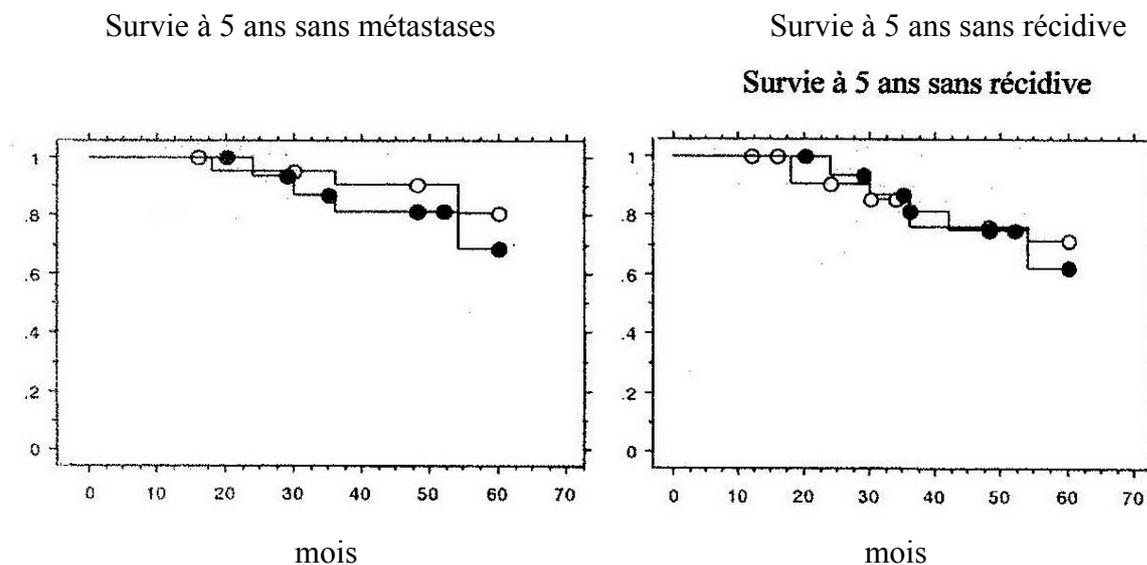


Fig 30 : Courbes de survie actuarielles : survie sans métastases (à gauche), sans récurrences (à droite), pour les patientes avec un index MIB1 élevé (points noirs) ou faible index MIB1 (points blancs). Valeur seuil 15%.

Tableau 12: Valeurs moyennes des paramètres analysés dans les groupes de bon et mauvais pronostic

	Mauvais pronostic moyenne (écart-type)	Bon pronostic moyenne (écart-type)	t	p
MIB1	19,11 (6,55)	13,03 (8,91)	1,57	= 0,12
AgNORs	15,11 (4,41)	8,59 (3,11)	4,42	< 0,0001
AgNORs /MIB1+	19,28 (5,6)	10,55 (4,10)	3,07	= 0,004
AgNORs /MIB1-	14,5 (4,46)	8,33 (3,02)	4,2	= 0,0002
IP	339,72 (170,6)	125,33 (103,6)	3,67	=0,0002

3.3 Pronostic et AgNORs.

La quantité d'AgNORs n'était pas corrélée à la taille tumorale, ni à l'existence d'une atteinte ganglionnaire axillaire. La quantité d'AgNORs totaux était significativement plus importante dans le groupe de mauvais pronostic ($p < 0.0001$) (tableau 12). La courbe de survie des patientes avec des AgNORs élevés est représentée par la figure 31. La survie moyenne sans métastase était de 57,8 mois dans le groupe de faible AgNORs et de 47,75 mois dans celui des AgNORs élevés ($p = 0.01$). La durée de survie sans récurrence de la maladie était de 53,6 mois pour le premier groupe et de 46,12 mois pour le second ($p = 0.13$). La quantité d'AgNORs totaux était fortement corrélée à la durée de survie sans métastase ($p = 0.0004$) et sans récurrence ($p = 0.0006$).

Il existait une différence significative entre les groupes de bon et mauvais pronostic, concernant les AgNORs dans les cellules MIB1 positives mais également pour les AgNORs dans les cellules MIB1 négatives (tableau 12).

AgNORs

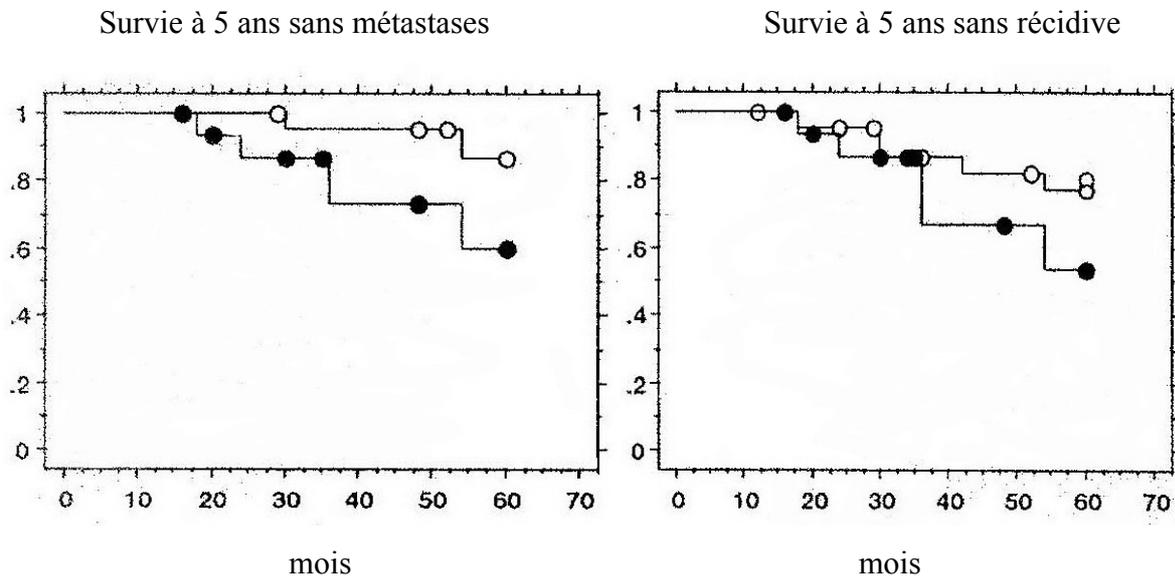


Fig 31 : Courbes de survie actuarielles : survie sans métastases (à gauche), sans récurrences (à droite), pour les patientes avec un index AgNORs élevé (points noirs) ou faible index AgNORs (points blancs). Valeur seuil $10\mu\text{m}^2$.

3.4 Pronostic et index de prolifération (IP).

IP correspond au produit : nombre de cellules dans le cycle (MIB1 positif) x quantité d'AgNORs dans ces mêmes cellules (NORMIB+). Cet index n'était pas corrélé à la taille tumorale, ni à l'existence d'une atteinte ganglionnaire axillaire. Il était significativement plus élevée dans le groupe de mauvais pronostic que dans celui de bon pronostic ($p=0.0002$). Les courbes de survie à 5 ans sans métastase et sans récurrence, représentées sur la figure 32, ont montré que IP était un bon facteur pronostique, avec une valeur seuil à 200. La durée moyenne de survie sans métastase a été de 57,38 mois pour les IP faible et de 43,78 mois pour les forts IP ($p=0.0024$). La durée moyenne de survie sans récurrence a été de 53,69 mois pour les faibles IP et 41,92 mois pour les fortes P ($p<0,002$). Ainsi les patientes qui ont présenté une métastase ou une récurrence locale auraient pu être détectées par l'importance de la quantité d'AgNORs, mais les rechutes ont été plus précoces pour les patientes avec une forte activité de prolifération (IP).

INDEX DE PROLIFERATION

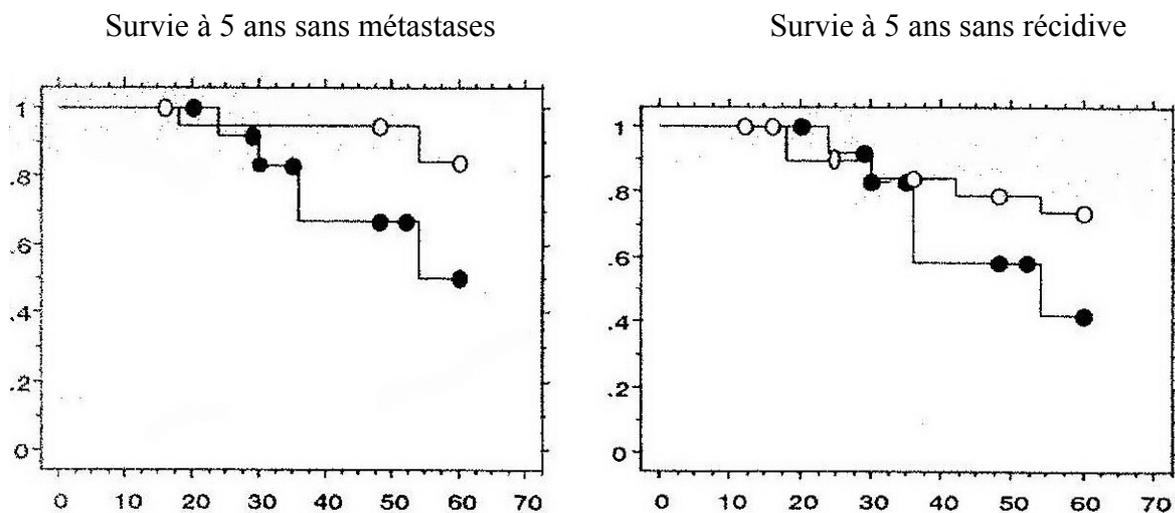


Fig 32 : Courbes de survie actuarielles : survie sans métastases (à gauche), sans récurrences (à droite), pour les patientes avec un index de prolifération élevé (points noirs) ou faible index de prolifération (points blancs). Valeur seuil à 200.

3.5 Pronostic et distribution des faibles et fortes valeurs en AgNORs et MIB1.

La figure 33 représente les courbes de survie à 5 ans sans métastase des 4 groupes prédéfinis. en fonction des AgNORs totaux et des AgNORs dans les cellules MIB1.

Il apparaissait qu'une forte quantité d'AgNORs diminuait nettement la survie sans métastases. Néanmoins, une valeur élevée d'AgNORs dans les tumeurs avec un fort index MIB1 semblait plus discriminante avec une courbe de survie nettement décalée (fig 33)

SURVIE SANS METASTASE

- faible AgNORs faible MIB1
- _____ faible AgNORs fort MIB1
- _____ fort AgNORs faible MIB1
- _____ fort AgNORs fort MIB1

AgNORs totaux

AgNORs dans les cellules MIB+

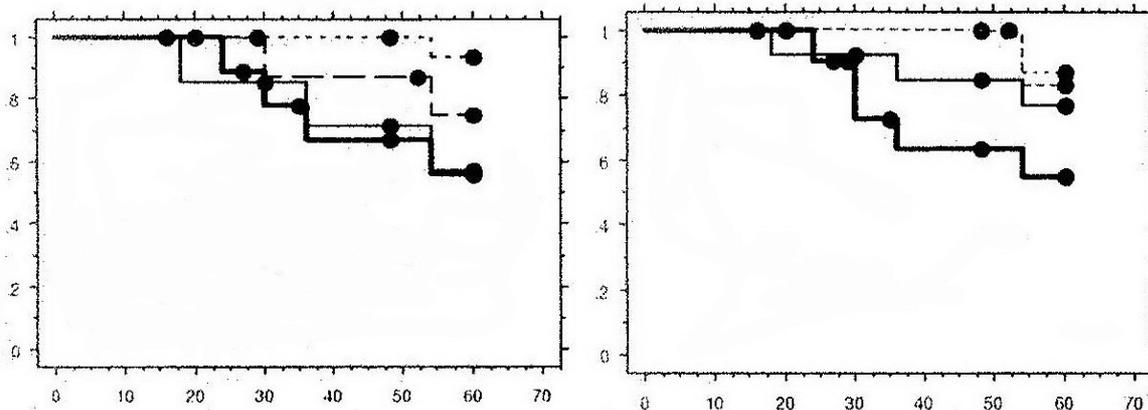


Fig 33 : Courbes de survie actuarielle sans métastases dans les 4 groupes pour les AgNORs totaux (à gauche) et pour les AgNORs dans les cellules MIB1 positives (à droite). Les valeurs seuils : AgNORs = $10\mu\text{m}^2$, index MIB1= 15%.

*Intérêt de la ploïdie et du double
marquage MIB1-AgNORs
pour les patientes sans atteinte
ganglionnaire, n'ayant pas reçu de
chimiothérapie.*

1. Patientes et méthodes.

1.1 Les patientes.

Dans la troisième phase de ce travail, nous avons souhaité étendre l'étude à un plus grand nombre de patientes, avec un recul dans le suivi plus important. Nous nous sommes intéressés aux patientes porteuses d'un cancer du sein et prises en charge dans les services de Gynécologie Obstétrique du CHU de Reims et du CH de Soissons.

Le temps chirurgical était la première étape de la prise en charge thérapeutique et était en tout point superposable entre les deux équipes. Le diagnostic histologique a été porté dans tous les cas par l'équipe du Laboratoire Pol Bouin dont le fichier informatique a servi de source afin de référencer les patientes.

L'équipe d'oncologie médicale référente était celle de l'Institut Jean Godinot qui définissait les modalités du traitement adjuvant, tant pour la chimiothérapie, l'hormonothérapie et la radiothérapie ainsi que le protocole de surveillance des patientes. Le suivi pouvait être assuré complètement ou partiellement par le médecin traitant en coordination avec l'équipe de l'institut.

Nous avons souhaité avoir un recul d'au moins 5 ans et n'avons retenu que les patientes opérées entre 1986 et 1995.

Nous nous sommes intéressés à une population à bas risque d'évolution métastatique. Ont été incluses les patientes ayant bénéficié d'un traitement chirurgical complet, tumorectomie ou mastectomie avec un curage axillaire, sans atteinte ganglionnaire (N-) et pour lesquelles il n'a pas été retenu l'indication d'une chimiothérapie, compte tenu du stade du cancer. Les patientes pouvaient avoir reçu un traitement complémentaire par radiothérapie ou hormonothérapie. Une partie seulement des populations étudiées lors des deux premières phases étaient incluses.

Nous avons consulté l'ensemble des dossiers médicaux dans ces 3 structures hospitalières, CHU de Reims, CH de Soissons et Institut Godinot. Quand le suivi a été assuré par le médecin généraliste, sans informations transmises, celui-ci était contacté par courrier dans un

premier temps, puis par téléphone en l'absence de réponse. Nous avons retenu le 1^{er} janvier 2001 comme date de point, date à laquelle le devenir de chaque patiente est analysé.

Parmi les 283 dossiers consultés et dont devenir a été examiné, 114 patients répondaient à nos critères. Pour 6 d'entre elles nous n'avions plus au Laboratoire de tissu tumoral résiduel, pour réaliser l'étude. La population étudiée comprenait 108 patientes.

Nos premiers résultats ont fait apparaître que le traitement chirurgical était un élément pronostique majeur avec une plus mauvaise évolution dans le groupe des patientes ayant subi une mastectomie. Un biais de recrutement a ainsi été décelé, nous obligeant à analyser les indications des mastectomies. Elles ont été divisées en deux groupes. Le premier comprenait les patientes avec une lésion infiltrante unique ($n = 21$) qui auraient pu bénéficier d'une tumorectomie compte tenu de la taille mais pour lesquelles une mastectomie a été retenue en raison du petit volume du sein, rendant le résultat esthétique aléatoire, la localisation centrale de la lésion, considérée pendant de nombreuses années comme justifiant d'un geste radical, ou l'âge de la patiente dans l'optique de lui éviter la radiothérapie complémentaire sur le sein restant. Le second groupe incluait les patientes pour lesquelles la mastectomie était réalisée en raison du caractère plurifocal des lésions ($n = 18$), ce qui les plaçait dans un sous-groupe à risque plus élevé de récurrence ou d'évolution métastatique. Une nouvelle étude statistique a été réalisée sur la population comprenant les tumorectomies et les mastectomies pour lésions uniques, incluant ainsi 90 patientes. Nous avons décidé de présenter dans ce travail les résultats concernant ce dernier sous groupe.

1.2 Les méthodes biologiques.

La quantification de l'ADN a été réalisée par cytométrie d'images. La détermination de l'index MIB1, des AgNORs et de l'index de prolifération a été réalisée suivant les techniques décrites plus haut, dans les deux phases préliminaires. Au cours de cette étape nous avons relu les lames afin de déterminer le score de SBR dans les carcinomes lobulaires, ce qui ne se faisait pas encore lors de nos deux premières phases. Nous avons également recherché, rétrospectivement, la surexpression de HER2 par la méthode immunohistochimique.

1.3 L'étude statistique.

Elle a été réalisée avec l'aide de l'Equipe du Département d'Informatique Médicale du Centre Hospitalo-Universitaire de Reims (Pr Jolly). Le point zéro retenu ou date d'inclusion dans l'étude, était la date d'intervention. Nous avons fixé la date de point au 1^{er} janvier 2001.

Les paramètres pronostiques ont été analysés en fonction de la survie globale et la survie sans métastase. L'analyse univariée a été effectuée avec le test de Logrank.

Les seuils retenus pour analyser les facteurs pronostiques l'ont été en fonction des données de la littérature et de notre propre expérience. Pour la taille tumorale histologique (pT) nous avons retenu deux seuils classiques 15 et 20 mm qui correspondent dans la classification TNM respectivement au pT1 a et b et au pT1c. Le seuil de l'index MIB1 a été fixé à 15%, celui des AgNORs totaux à 15 et pour l'index de prolifération (IP) , les deux seuils retenus 100 et 200, nous ont semblé pertinents au vu de notre étude préliminaire.

L'analyse multivariée a été réalisée avec le modèle de Cox. Nous avons inclus dans cette analyse les variables qui étaient corrélées au pronostic lors de l'analyse univariée, avec $p > \text{ou} = 0,10$. Nous avons décidé de tester plusieurs hypothèses, si le nombre de variables le permettait, en modifiant les critères d'inclusion dans le modèle de Cox.

2. Résultats

2.1 Les résultats globaux.

Notre étude a finalement inclus 90 patientes. Les résultats sont présentés dans le tableau 13. La moyenne d'âge était de 57.3 +/- 11.4 avec une médiane à 57.1. La chirurgie a consisté en une tumorectomie pour 69 patientes (76.7%), en une mastectomie dans 21 cas (23.3%). La moyenne, pour la taille histologique de la composante infiltrante, était de 16.3 +/- 7.3 mm avec une médiane à 15 mm. Pour 18 patientes (20%), il existait une composante carcinomateuse intracanalair au contact de la lésion infiltrante. La répartition histologique était la suivante : canalaire 63 cas (70%), lobulaires 17 cas (18.9%), lobulo-canalaire 4 cas (4.4%), médullaires 5 cas (5.5%) et tubuleux 1 cas (1.1%). Il s'agissait d'un Bloom 1 pour 19 lésions (23.7%), d'un bloom 2 pour 39 (48.7%) et d'un bloom 3 pour 22 (27.5%). Pour 12 d'entre elles, il existait des embolus lymphatiques autour de la tumeur. Les récepteurs

hormonaux ont été déterminés chez 76 patientes (84.4%). Ils étaient positifs pour les oestrogènes et/ou la progestérone pour 66 patientes (86.8%). Toutes les patientes ont bénéficié d'un curage axillaire. Pour le nombre de ganglions examinés, la moyenne est de 12.3 +/- 5.0 avec une médiane à 12, tous étaient indemnes de toute lésion néoplasique. Aucune patiente n'a bénéficié d'une chimiothérapie. Une radiothérapie a été réalisée chez 75 patientes (83.3%). Une hormonothérapie a été instituée chez 36 patientes (40%).

Parmi nos patientes, 10 (11.1%) ont eu une récurrence locale après traitement, 14 (15.5%) ont eu une évolution métastatique de la maladie et 8 (8.9%) sont décédées avec une cause directement liée à la maladie. Les décès globaux, quelle que soit la cause, ont été de 14 (15.5%). De plus 4 dossiers de décès ont été censurés.

Tableau 13 : Résultats descriptifs. Population globale (n=90)

Variabiles	Moyenne +/- ET Médiane (Q1 – Q3)	N (%)
Age	57.3 +/- 11.4 57.1 (49.3 - 66.1)	
< 50 ans		27 (30.0)
≥ 50 ans		63 (70.0)
< 60 ans		52 (57.8)
≥ 60 ans		38 (42.2)
pT mm (taille histologique de la composante infiltrante)	16.3 +/- 7.3 15 (10 - 20)	
< 15 mm		38 (42.2)
≥ 15 mm		52 (57.8)
< 20 mm		61 (67.8)
≥ 20 mm		29 (32.2)
Nbggl (nb de ganglions examinés, tous négatifs)	12.3 +/- 5.0 12 (9 - 15)	
< 10		31 (34.4)
≥ 10		59 (65.6)
MIBplus (% de cellules fixant MIB1)	9.1 +/- 6.4 7.7 (4 - 13.7)	
< 15		72 (80.0)
≥ 15		18 (20.0)
NORMIBPlus	20.4 +/- 9.9 17.8 (12.8 - 28.2)	
< 15		31 (34.4)
≥ 15		59 (65.6)
NORMIBmoins	18.8 +/- 7.7 16.8 (13.3 - 23.7)	

< 15		32 (35.6)
≥ 15		58 (64.4)
NORTOT	18.9 +/- 7.7 16.8 (13.3 - 24.0)	
< 15		37 (41.1)
≥ 15		53 (58.9)
IP (Index de Prolifération : MIBplus x NOR MIBplus)	185.2 +/- 166.2 132.9 (64.8 - 273.0)	
< 100		40 (44.4)
≥ 100		50 (55.6)
< 200		57 (63.3)
≥ 200		33 (36.7)
Survie globale (en mois)	98.7 +/- 32.4 95 (75 - 125)	
Survie décès cancer (en mois)	98.9 +/- 32.5 95 (75 - 126)	
Survie sans métastases (en mois)	94.3 +/- 35.0 93 (71 - 125)	
chirurgie		
1 : tumorectomie + curage		69 (76.7)
2 : mastectomie + curage		21 (23.3)
histologie		
1 : canalaire		63 (70.0)
2 : lobulaire		17 (18.9)
3 : canalaire et lobulaire		4 (4.4)
4 : médullaire		5 (5.5)
5 : tubuleux		1 (1.1)
Emboles lymphatiques		
0 : absence		78 (86.7)
1 : présence		12 (13.3)
Score de Bloom		
1 : bien différencié		19 (23.7)
2 : moyennement différencié		39 (48.7)
3 : peu différencié		22 (27.5)
Récepteurs Hormonaux (RE et/ou RP)		
0 : absence		10 (13.1)
1 : présence		66 (86.8)
ADN ploïdie		
1 : diploïde		40 (46.5)
2 : aneuploïde		24 (27.9)
3 : multiploïde		22 (25.6)
ADN ploïdie		
0 : diploïde		40 (46.5)
1 : aneuploïde et multiploïde		46 (53.5)
Clones Sup5C ADN		
0 : absence		63 (70.8)
1 : présence		26 (29.2)

Her2 (% de cellules exprimant l'oncoprotéine - résultats en intensité de marquage)	
0	54 (60.0)
1	16 (17.8)
2	11 (12.2)
3	9 (10.0)
<hr/>	
Her2b	
0 : 0	54 (60.0)
1 : 1, 2 et 3	36 (40.0)
<hr/>	
Radiothérapie	
0 : absence	15 (16.7)
1 : présence	75 (83.3)
<hr/>	
Chimiothérapie	
0 : absence	90 (100)
1 : présence	0 (0)
<hr/>	
Hormonothérapie	
0 : absence	54 (60.0)
1 : présence	36 (40.0)
<hr/>	
Récidive locale	
0 : absence	80 (88.9)
1 : présence	10 (11.1)

La survie globale moyenne, exprimée en mois, était de 98.7 +/- 32.4, avec une médiane à 95 mois. La survie moyenne sans métastase était de 94.3 +/- 35, avec une médiane à 93 mois. Les décès s'étaient produits en moyenne à 98.9 +/- 32.5 mois avec une médiane à 95 mois.

Les facteurs pronostiques classiques ont été analysés, taille tumorale, le score de SBR, l'expression des récepteurs hormonaux.

Les résultats des analyses univariées sont présentés, ci dessous, dans le tableau 14 pour la survie globale et dans le tableau 15 pour la survie sans métastases.

Tableau 14 : Survie globale quelle que soit la cause de décès. Analyse univariée (Test du Logrank)

Variables	Seuil	p
Bloom	1, 2, 3	0.08
	1, 2+3	<u>0.03</u>
Age	< 50, ≥ 50	ns
	< 60, ≥ 60	ns
Index de Prolifération	< 100, ≥ 100	0.02
	< 200, ≥ 200	<u>< 0.0001</u>
Récepteurs hormonaux		<u>< 0.004</u>
Sup5c		ns
Taille histologique pT (mm)	< 15, ≥ 15	0.04
	< 20, ≥ 20	<u>0.01</u>
Type chirurgie		<u>0.06</u>
Type histologique	1, 2, 3, 4, 5	ns
	1, 2+3+4+5	ns
In situ		ns
Embole lymphatique		<u>0.02</u>
Nombre ganglions analysés	< 10, ≥ 10	<u>0.06</u>
ADN	1, 2, 3	ns
	1, 2+3	ns
Mibplus15	< 15, ≥ 15	<u>0.01</u>
Normibplus15	< 15, ≥ 15	<u>0.02</u>
Normibm15	< 16, ≥ 16	0.06
	< 15, ≥ 15	ns
Nortot15	< 15, ≥ 15	0.11
Her2	0, 1, 2, 3	<u>0.05</u>
	< 2, ≥ 2	ns
Radiothérapie		<u>0.02</u>
Hormonothérapie		ns

Tableau 15: Survie sans métastases. Analyse univariée (Test du Logrank)

Variables	Seuil	p
Bloom	1, 2, 3	ns
	1, 2+3	ns
Age	< 50, ≥ 50	ns
	< 60, ≥ 60	ns
Index de Prolifération	< 100, ≥ 100	0.05
	< 200, ≥ 200	0.0001
Récepteurs hormonaux		0.10
Sup5c		ns
Taille histologique pT (mm)	< 15, ≥ 15	0.09
	< 20, ≥ 20	ns
Type chirurgie		ns
Type histologique	1, 2, 3, 4, 5	ns
Composante in situ associée		ns
Embole lymphatique		0.008
Nbr ganglions	< 10, ≥ 10	ns
ADN	1, 2, 3	Ns
	1, 2+3	0.04
Mibplus15	< 15, ≥ 15	ns
Normibplus15	< 15, ≥ 15	0.02
Normibm15	< 15, ≥ 15	0.02
Nortot15	< 15, ≥ 15	0.006
Her2	0, 1, 2, 3	0.06
	< 2, ≥ 2	ns
Radiothérapie		ns
Hormonothérapie		ns

L'étude multivariée concernant la survie globale a été réalisée en testant 4 modèles (tableau 16). Le modèle 1 a inclus l'ensemble des variables qui se sont révélées corrélées au pronostic, en analyse univariée. Dans la variante 2, l'index de prolifération a été maintenu mais ses deux composantes, le MIB+ et les AgNORs dans les cellules MIB+, ont été exclues. Dans la variante 3, l'index de prolifération a été remplacé par la quantité globale des AgNORs. Dans la variante 4, c'est le MIB1+ qui a été testé en remplacement de l'IP. Toutes les analyses ont été réalisées avec un seuil de 0,05, alors que certaines l'ont été également avec un seuil de 0,10.

L'étude multivariée portant sur la survie sans métastases a finalement inclus 3 modèles de calcul (tableau 17). Dans la variante 1 toutes les variables significatives dans l'étude univariée ont été incluses. Dans le modèle 2, seul l'index de prolifération a été intégré alors que les autres facteurs AgNORs et MIB ont été laissés de côté. Dans la dernière version, l'IP a été remplacé par le MIB1. Les analyses ont été réalisées avec un seuil de 0,05, alors que certaines l'ont été en plus, avec un seuil de 0,10.

2.2 La taille tumorale et pronostic

Parmi les patientes incluses dans l'étude, 52 (57.8%) présentaient une lésion dont la taille histologique (pT) était ≥ 15 mm et 29 (32.2%) ≥ 20 mm.

Dans le groupe de patientes décédées, la taille moyenne était de 19.4 +/- 8.2 mm. Elle était ≥ 15 mm pour 13 patientes (72.2%) et ≥ 20 mm pour 10 patientes (55.6%).

Dans le groupe des patientes avec une évolution métastatique, la taille moyenne était de 19.2 +/- 5.8 mm. Elle était ≥ 15 mm pour 11 patientes (78.6%) et ≥ 20 mm pour 7 patientes (50%).

La taille tumorale, avec un seuil à 20 mm, est corrélée au grading de Bloom (1, 2+3) ($p = 0.01$), à l'expression de récepteurs hormonaux ($p = 0.009$) et à l'existence d'embolies lymphatiques ($p = 0.04$). Par contre, la taille n'est pas corrélée à l'index MIB1, ni à la quantité d'AgNORs, ni à l'index de prolifération, ni à la surexpression de HER2.

Lors de l'analyse univariée portant sur :

- la mortalité globale, la taille tumorale s'est révélée être corrélée au pronostic, avec un seuil à 15 mm ($p = 0.04$) (fig. 34) et un seuil à 20 mm ($p = 0.01$) (fig. 35)
- la survie sans métastase, la taille tumorale avec des seuils à 15 mm (fig. 36) et à 20 mm (fig. 37) n'ont pas atteint le degré de significativité.

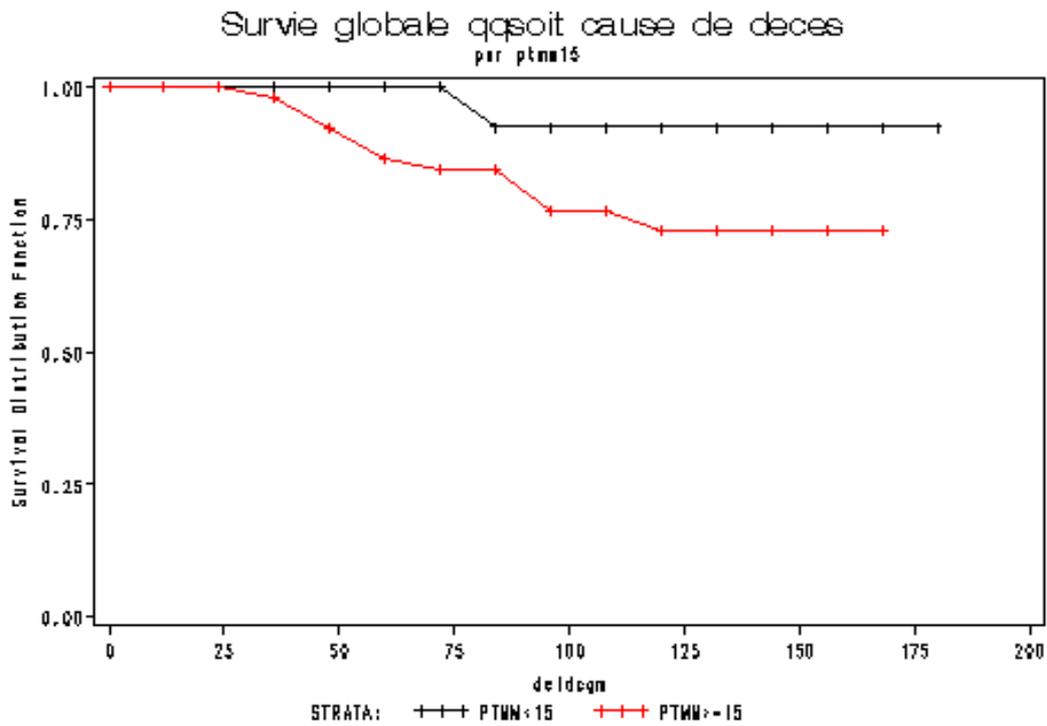


Fig 34 : **Survie globale** en fonction de la taille tumorale (pT) avec **un seuil à 15 mm** (courbe noire : inférieure à 15 mm, **courbe rouge** : supérieure ou égale à 15 mm)

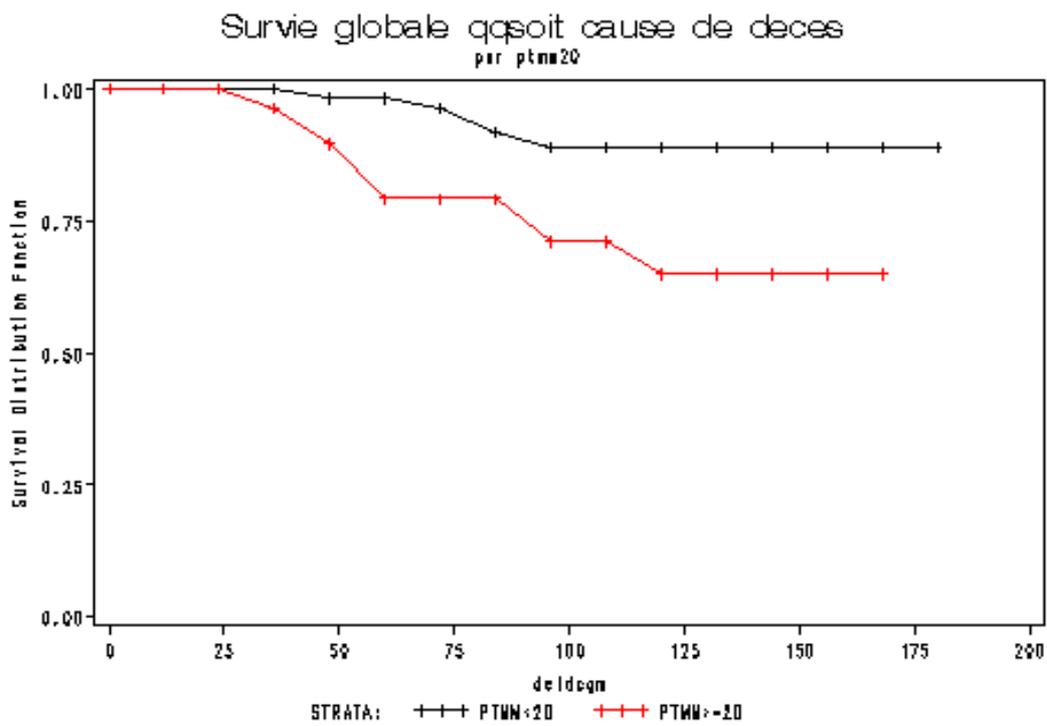


Fig 35 : **Survie globale** en fonction de la taille tumorale (pT) avec **un seuil à 20 mm** (courbe noire : inférieure à 20 mm, **courbe rouge** : supérieure ou égale à 20 mm)

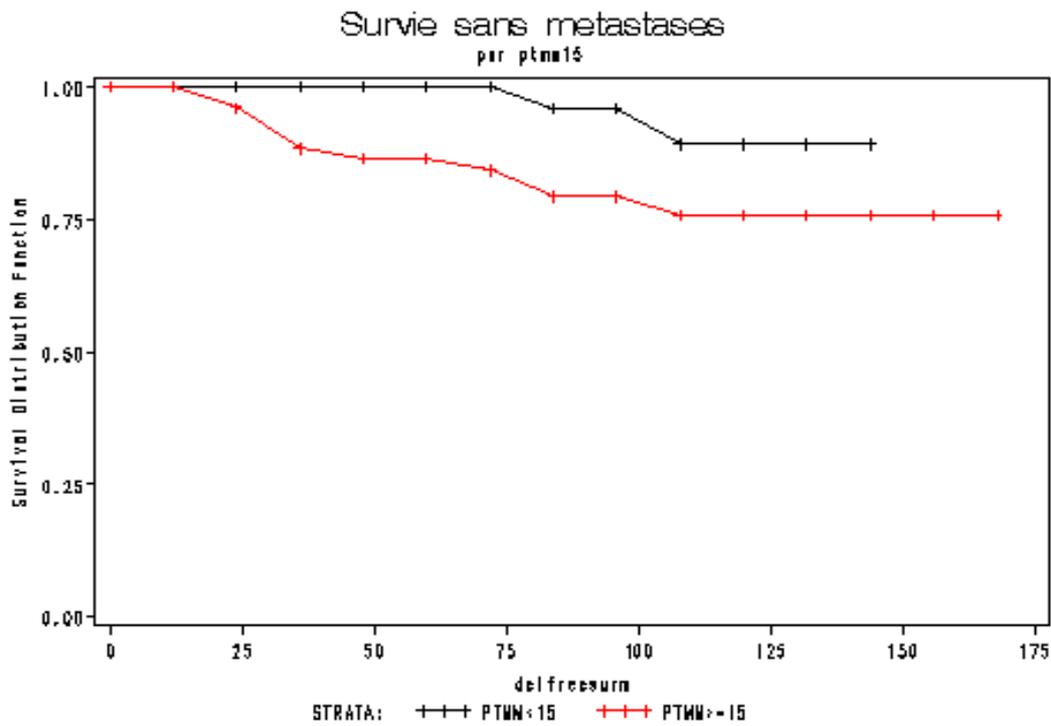


Fig 36 : **Survie sans métastases** en fonction de la taille tumorale (pT) avec un seuil à **15 mm** (courbe noire : inférieure à 15 mm, courbe rouge : supérieure ou égale à 15 mm)

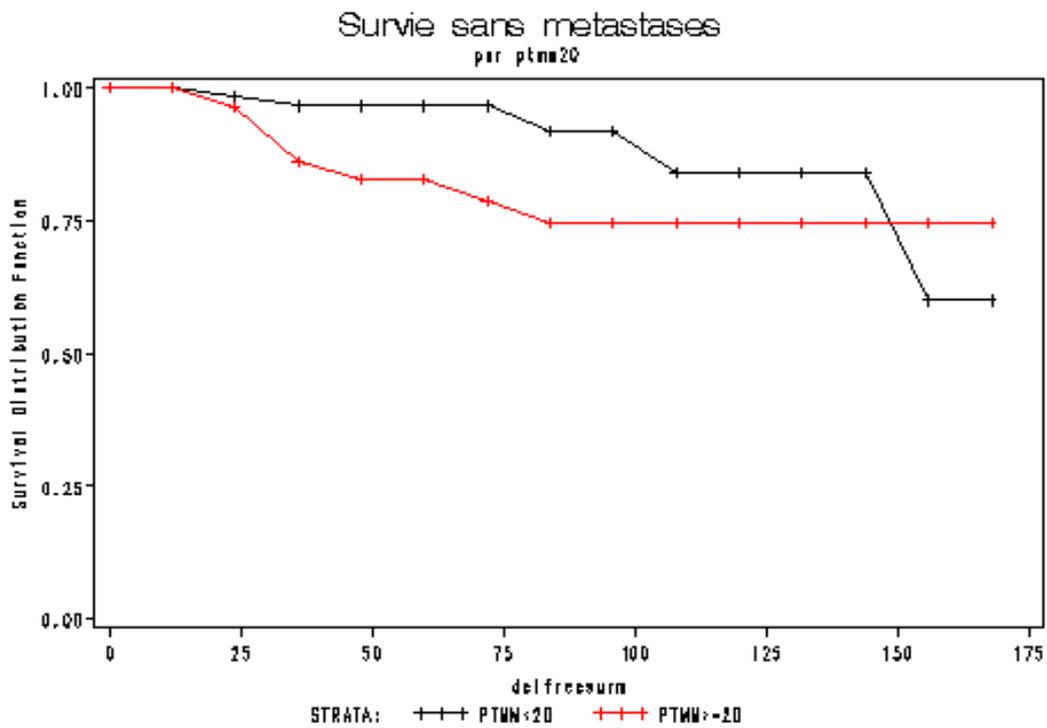


Fig 37 : **Survie sans métastases** en fonction de la taille tumorale (pT) avec un seuil à **20 mm** (courbe noire : inférieure à 20 mm, courbe rouge : supérieure ou égale à 20 mm)

En analyse multivariée, incluant les variables cliniques et biologiques (tableaux 16 et 17), avec des seuils d'entrée-sortie : 0.05, la variable taille tumorale avec un seuil à 20 mm, était liée de façon significative à la survie globale avec un risque relatif à 3.5, un intervalle de confiance compris entre [1.0 – 12.5], et un $p = 0.03$ (tableau 16). Par contre la taille tumorale n'était pas significativement corrélée à la survie sans métastase (tableau 17).

2.3 Le grade histoprostique de SBR et le pronostic

Nous avons analysé le devenir des patientes en fonction de 3 sous-groupes, Bloom 1, 2 et 3 (fig. 38, 39), mais également en regroupant les 2 derniers (Bloom 2+3) versus Bloom 1.

Seule une patiente était décédée alors que sa lésion était classée Bloom 1, soit 6.7% des décès. De même, seule une patiente a présenté une évolution métastatique avec une lésion Bloom 1, soit 7.7% des patientes métastatiques.

Le grade de Bloom (1, 2+3) était corrélé à la taille tumorale à 20 mm ($p = 0.01$), au type de chirurgie ($p = 0.008$), l'index de prolifération (IP200) ($p = 0.02$) et à la variété histologique ($p = 0.01$).

Par contre il n'est pas corrélé à l'existence d'emboles lymphatiques, ni à l'expression des récepteurs hormonaux ($p = 0,10$), ni à l'index MIB1, ni aux AgNORs, ni à la surexpression de HER2 .

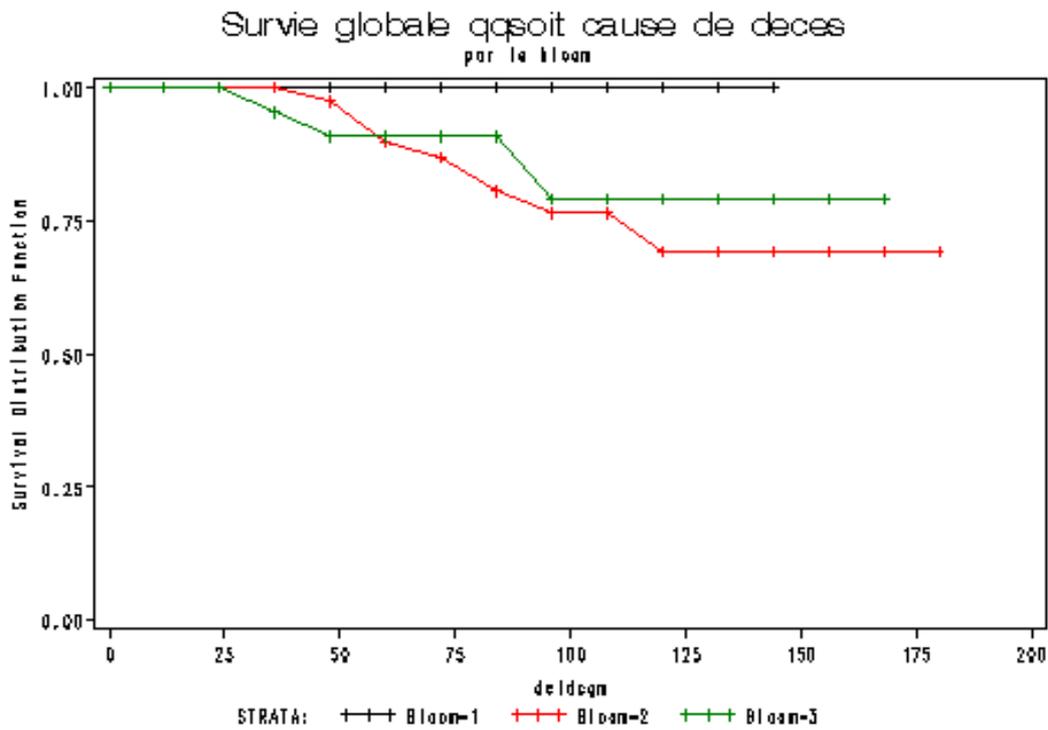


Fig 38: Survie globale en fonction du score de SBR
(courbe noire : SBR 1, courbe rouge : SBR 2, courbe verte : SBR 3)

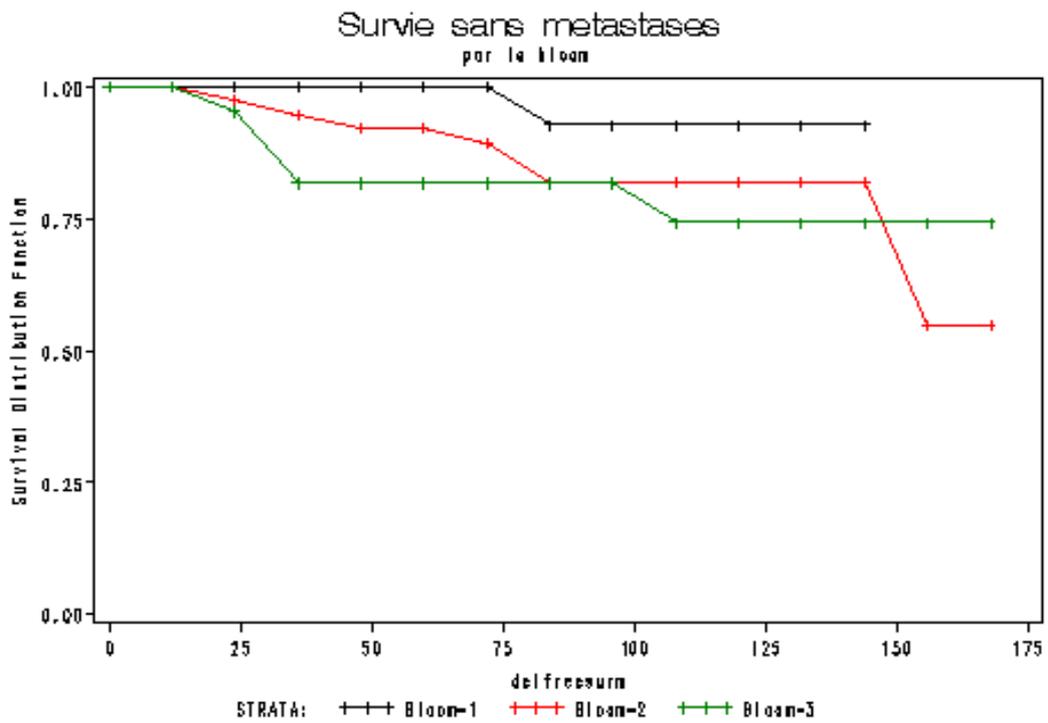


Fig 39 : Survie sans métastases en fonction du SBR
(courbe noire : SBR 1, courbe rouge : SBR 2, courbe verte : SBR 3)

2.4 Les embolies lymphatiques et pronostic

Parmi les 90 patientes, 12 (13,3%) avaient des embolies lymphatiques présents dans la pièce opératoire, à l'extérieur de la composante infiltrante de la tumeur. Ce critère, absence ou présence d'embolies lymphatique, était systématiquement mentionné dans le compte rendu histologique. Il n'était pas corrélé au score de SBR, ni à l'expression des récepteurs hormonaux, ni au type de chirurgie, ni à la variété histologique, ni à l'index MIB1, ni aux AgNORs MIB+, ni aux AgNORs totaux, ni à la surexpression de HER2. Par contre la présence d'embolies était positivement corrélée à l'index IP200 ainsi qu'à la taille tumorale avec un seuil à 20 mm.

En analyse univariée, ce paramètre s'est révélé être un facteur pronostique aussi bien pour la survie sans métastases ($p=0,008$) (fig. 40) que pour la survie globale ($p=0,02$).

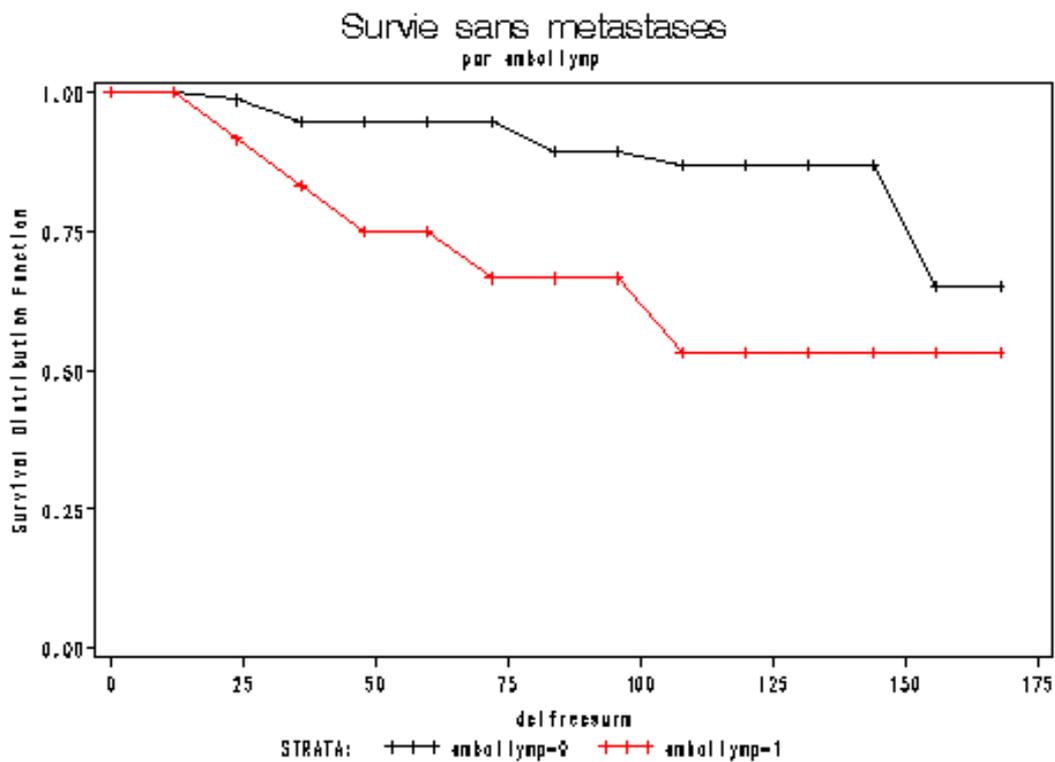


Fig 40 : Survie sans métastases en fonction de la présence d'embolies lymphatiques (courbe noire : pas d'embolies, courbe rouge : présence d'embolies)

En analyse multivariée, la variable « embolies lymphatiques » était corrélée de façon significative à la survie globale ($p < 0,01$, RR = 6,5), à condition de ne pas inclure l'index de prolifération (IP200) dans le modèle de calcul (tableau 16)

Par contre pour la survie sans métastase, la variable « embolies lymphatiques » y était corrélée de façon significative ($p < 0,01$, RR5,1) avec ou sans intégration de l'index IP200 dans le modèle de calcul (tableau 17).

2.5 La ploïdie et le pronostic

Les lésions étaient diploïdes chez 40 patientes (46.5%), aneuploïdes chez 24 (27.9%) et multiploïdes chez 22 (25.6%). Nous avons analysé l'évolution de la maladie dans chacun de ces sous-groupes, mais également en regroupant les deux dernières populations (aneuploïde et multiploïde) et en les comparant au devenir du sous-groupe avec des lésions diploïdes.

Les lésions comportaient un clone minoritaire de plus de 5C ADN chez 26 patientes (29.2%).

Parmi les patientes décédées, quelle que soit la cause, 6 (35.3 %) étaient porteuses d'une lésion diploïde.

Parmi les patientes avec une évolution métastatique, 3 (23.1%) avait une lésion diploïde et 3 (23.1%) avaient un clone de plus de 5C ADN.

Lors de l'analyse univariée portant sur :

- La survie globale, le critère ploïdie n'était pas corrélé au pronostic. Ceci a été observé en analysant séparément les sous-groupes diploïde, aneuploïde et multiploïde (fig.42), mais également en regroupant les deux derniers. Il en était de même pour le critère des clones de plus de 5C ADN, qui n'était pas corrélé au pronostic.
- la survie sans métastase, le critère ploïdie devenait significatif lors de la comparaison « diploïdie » versus « aneuploïdie-multiploïdie », avec un risque accru d'évolution métastatique dans le second groupe. Par contre, lorsque les 3 groupes étaient analysés séparément, ce critère était non significatif (fig.41). Les lésions avec des clones de plus de 5C ADN n'étaient pas pourvoyeuses d'un moins bon pronostic (fig.43-44).

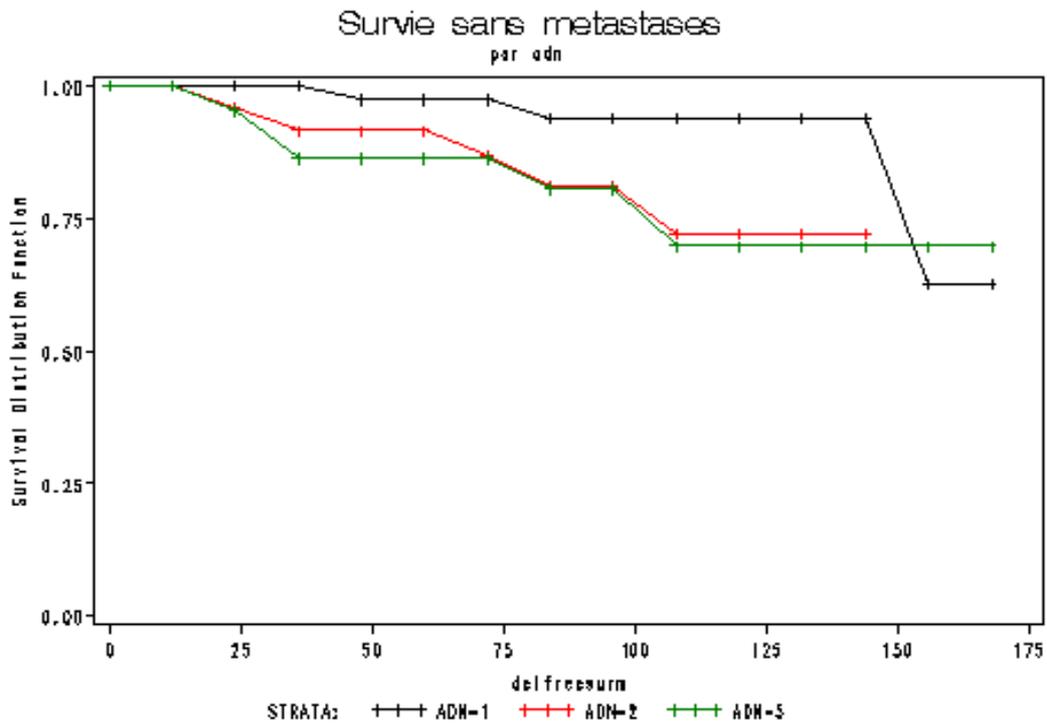


Fig 41 : Survie sans métastases en fonction de la ploïdie
 Courbe noire : diploïde, courbe rouge : aneuploïde, courbe verte multiploïde)

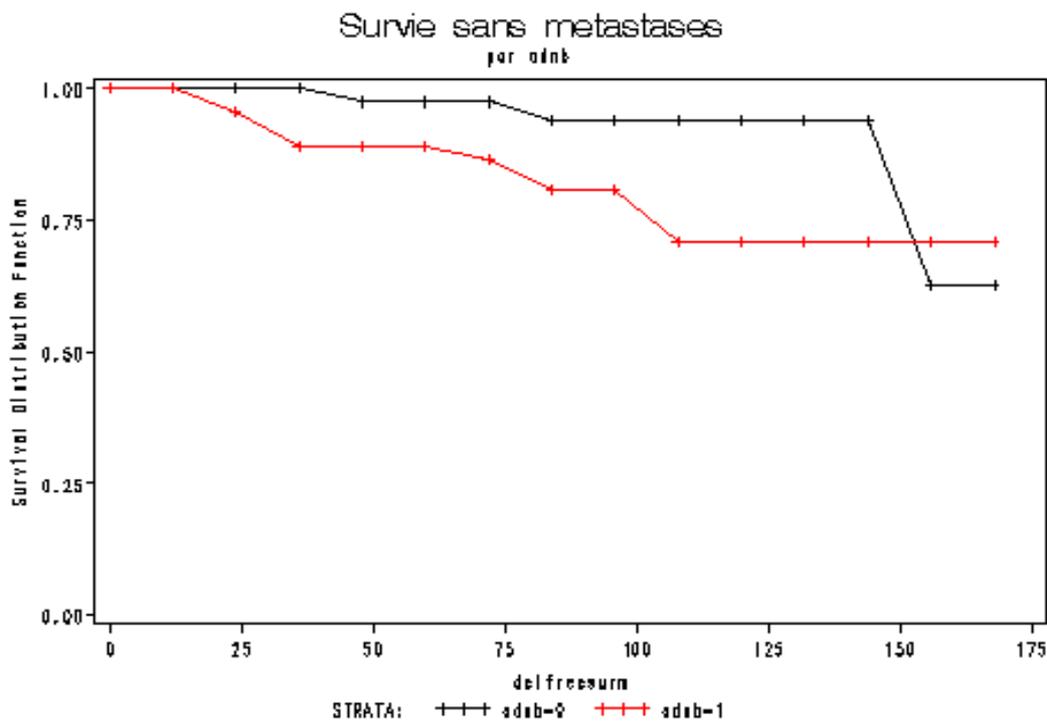


Fig 42 : Survie sans métastases en fonction de la ploïdie
 Courbe noire : diploïde, courbe rouge : aneuploïde et multiploïde)

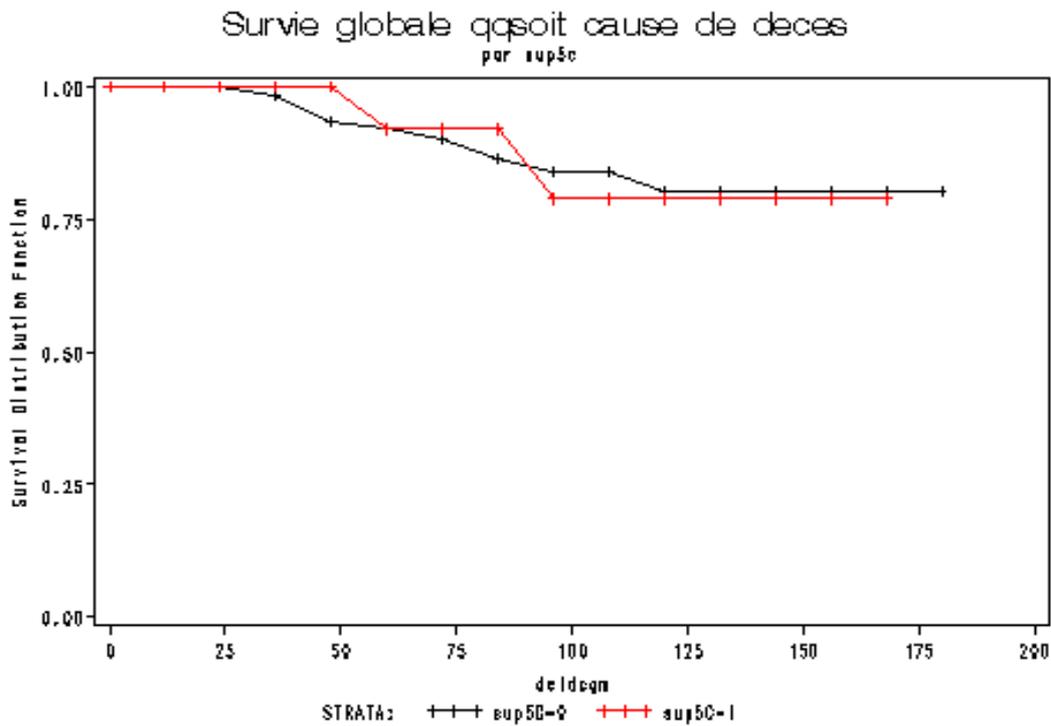


Fig 43 : Survie globale en fonction de la présence de clones tumoraux avec > 5c ADN
(courbe noire : pas de clones > 5c ADN, courbe rouge : présence de clone > 5c)

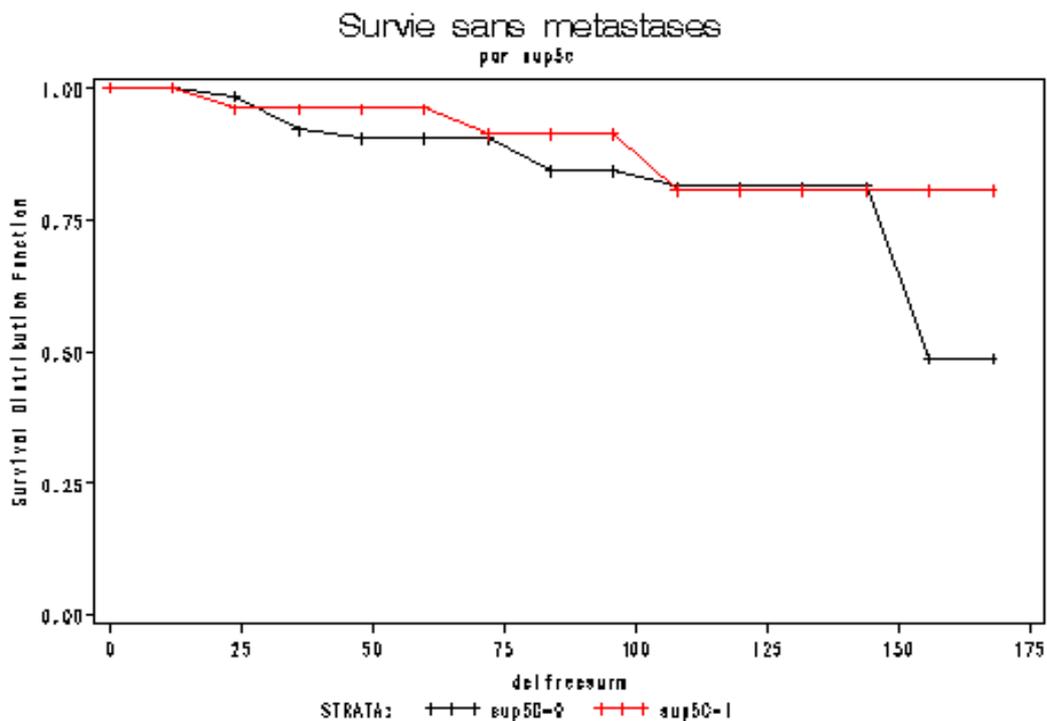


Fig 44 : Survie sans métastases en fonction de la présence de clones tumoraux avec > 5c ADN
(courbe noire : pas de clones > 5c ADN, courbe rouge : présence de clone > 5c)

En analyse multivariée, avec des seuils à 0.05, la variable ploïdie n'était pas corrélée de façon significative à la survie globale (tableau 14) ni à la survie sans métastase (tableau 16).

Tableau 16 : Survie globale, Analyse multivariée (Modèle de Cox)

Variabiles	RR	IC 95%	p
Variables incluses dans le modèle : bloom b, IP200, RH, PTMM20, chirurgie, embole lymphatiques, nb ggl 10, mibplus15, normibplus15, her2, radio.			
. Seuils entrée – sortie : 0.05			
IP200	16.4	[2.0 – 129.9]	< 0.001
PTMM20	3.5	[1.0 – 12.5]	0.03
Variables incluses dans le modèle : bloom b, IP200, RH, PTMM20, chir, embolymph, nb ggl10, her2, radio.			
. Seuils entrée – sortie : 0.05			
IP200	16.4	[2.0 – 129.9]	< 0.001
PTMM20	3.5	[1.0 – 12.5]	0.03
Variables incluses dans le modèle : bloom b, nortot15, RH, PTMM20, chir, embole lymph, nb ggl 10, her2, radio.			
. Seuils entrée – sortie : 0.05			
Nortot15	15.0	[1.5 – 149.9]	0.01
RH	0.08	[0.02 – 0.3]	< 0.01
Embol lymphatique	6.5	[1.5 – 28.8]	< 0.01
Variables incluses dans le modèle : bloom b, mibplus15, RH, PTMM20, chir, embolymph, nb ggl10, her2, radio.			
Seuils entrée – sortie : 0.05			
RH	0.1	[0.02 – 0.41]	< 0.01
Embole lymphatique	5.8	[1.5 – 22.4]	< 0.05
Her2	1.9	[1.1 – 3.4]	< 0.05
radio	0.1	[0.03 – 0.7]	< 0.05

2.6 L'index MIB1 et le pronostic

Le pourcentage moyen de cellules marquées était de 9.1 +/- 6.4, avec une médiane à 7.7. Nous avons utilisé le seuil de 15% permettant de distinguer notre population en deux groupes : MIB1 < 15% comprenant 72 patientes (80%) et MIB1 ≥ 15% comptant 18 patientes (20%).

Dans le groupe des patientes décédées, quelque soit la cause, la valeur moyenne de l'index MIB1 était de 12,8 (+/- 5,3). Dans le groupe des patientes avec une évolution métastatique la valeur moyenne de cet index était de 11,3 (+/- 5,6).

Lorsque nous avons comparé les variables deux à deux, nous avons retrouvé que l'index MIB1 n'était pas corrélé au traitement chirurgical, ni à la taille tumorale, ni au type histologique, ni à l'existence d'embolies lymphatiques, ni au score de SBR, ni à l'expression des récepteurs hormonaux, ni à la surexpression de HER2 ni à la quantité d'AgNORs.

En analyse univariée, la variable MIB1 était corrélée de façon significative à la survie globale (fig. 45) mais pas à la survie sans métastase (fig. 46). Un index MIB1 ≥ 15 indiquait un risque accru d'évolution fatale.

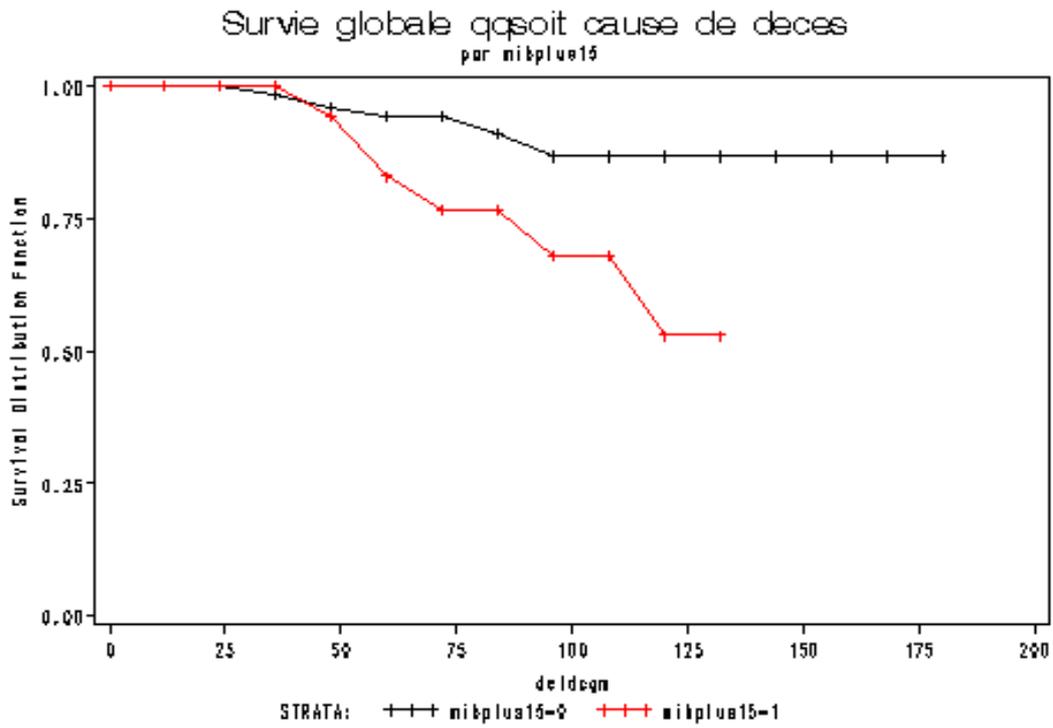


Fig 45 : Survie globale avec un seuil à 15% de l'index MIB1
(courbe noire MIB1 < 15%, courbe rouge MIB1 > ou = 15%)

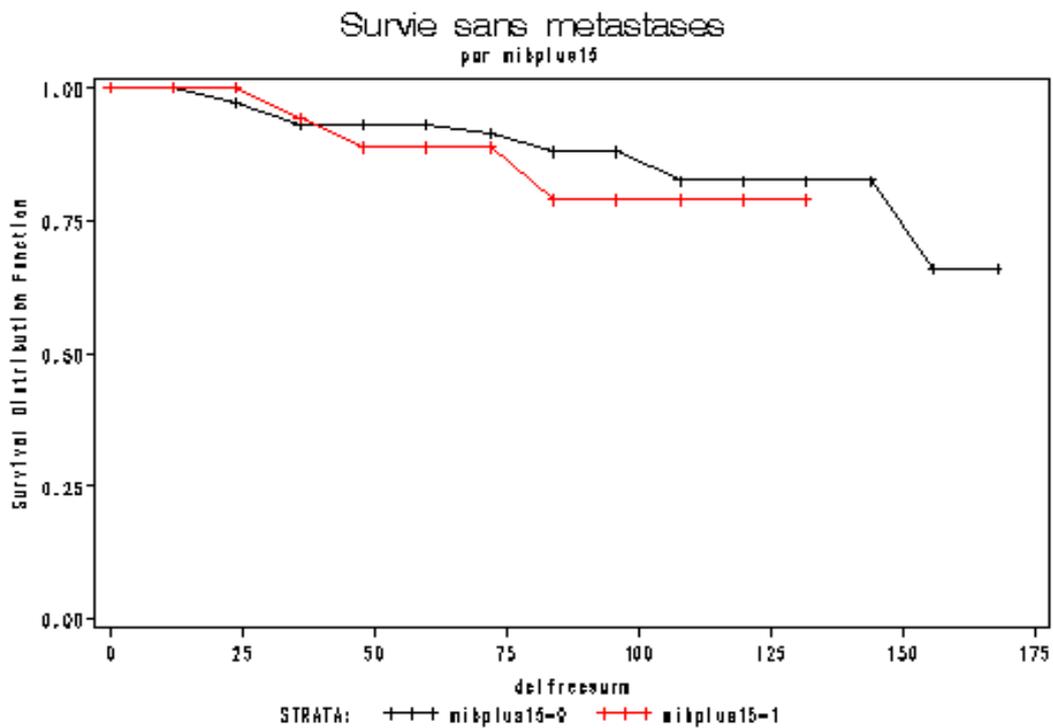


Fig 46 : Survie sans métastases avec un seuil à 15% de l'index MIB1
(courbe noire MIB1 < 15%, courbe rouge MIB1 > ou = 15%)

En analyse multivariée, incluant les variables cliniques et biologiques et/ou les variables biologiques, avec des seuils d'entrée-sortie : 0.05, la variable MIB1 n'était pas corrélée de façon significative à la survie globale (tableau 16) ni à la survie sans métastase (tableau 17).

Tableau 17: survie sans métastase. Analyse multivariée (Modèle de Cox)

Variables	RR	IC 95%	p
Variables incluses dans le modèle : IP200, RH, PTMM15, embole lymphatique, adn b, normibplus15, normibm15, nortot15, her2.			
. Seuils entrée - sortie : 0.05			
RH			0.03
EMBOLE LYMPHATIQUE			< 0.01
NORTOT15			0.01
Variables incluses dans le modèle : IP200, RH, PTMM15, embole lymphatique, adn b, her2.			
. Seuils entrée - sortie : 0.05			
IP200	5.0	[1.0 - 25.0]	0.09
EMBOLE LYMPHATIQUE	3.1	[0.8 - 11.7]	0.08
Variables incluses dans le modèle : mibplus15, RH, PTMM15, embole lymphatique, adn b, her2.			
. Seuils entrée - sortie : 0.10			
EMBOLE LYMPHATIQUE	5.1	[1.4 - 18.2]	< 0.01
Her2	1.5	[0.9 - 2.5]	0.08
. Seuils entrée - sortie : 0.05			
EMBOLE LYMPHATIQUE	5.1	[1.4 - 18.4]	< 0.01

2.7 Les AgNORs et le pronostic

Les AgNORs étaient analysés dans leurs trois composantes (tableau 18):

- la quantité d'AgNORs dans les cellules proliférantes, marquées par les MIB1, que nous avons appelé NORMIB+. La valeur moyenne était de 20,4 μm^2 et la médiane de 17,8 μm^2 . Le seuil retenu était celui de 15 μm^2 , permettant de diviser cette population en 2 groupes.
- la quantité d'AgNORs dans les cellules quiescentes, non marquées par les MIB1, que nous avons appelé NORMIB-. La valeur moyenne était de 18,8 μm^2 et la médiane de 16,8 μm^2 . Le seuil retenu était également de 15 μm^2 .
- la quantité totale d'AgNORs dans l'ensemble des cellules proliférantes et quiescentes, que nous avons appelé NORtot. La valeur moyenne était de 18,9 μm^2 et la médiane de 16,8 μm^2 . Le seuil retenu était également de 15 μm^2 .

Tableau 18 : récapitulatif de la quantité d'AgNORs exprimée en μm^2 (n = 90)

	NOR MIB+	NOR MIB-	NOR TOT
Moyenne	20,4	18,8	18,9
Médiane	17,8	16,8	16,8
Seuil	15	15	15

Ainsi, 59 patientes (65.6%) avaient un index NORMIB+ $\geq 15 \mu\text{m}^2$, alors que 58 patientes (64.4%) avaient un index NORMIB- $\geq 15 \mu\text{m}^2$, et 53 patientes (58.9%) un index NORtot $\geq 15\mu\text{m}^2$.

Dans le groupe des patientes décédées, quelque soit la cause :

- la moyenne des NORMIB+ était de 24.8 +/- 11.3 μm^2 , la médiane était de 16 avec 88.9% des patientes dont l'index était $\geq 15 \mu\text{m}^2$
- la moyenne des NORMIB- était de 22.6 +/- 8.9 μm^2 , la médiane était de 14 avec 77.8% des patientes dont l'index était $\geq 15 \mu\text{m}^2$

- la moyenne des NORtot était de $22.9 \pm 8.9 \mu\text{m}^2$, la médiane était de 14 avec 77.8% des patientes dont l'index était $\geq 15 \mu\text{m}^2$

Dans le groupe des patientes avec une évolution métastatique :

- la quantité de NORMIB+ était de $27.4 \pm 8.4 \mu\text{m}^2$, avec 92.8% des patientes dont l'index était $\geq 15 \mu\text{m}^2$
- la quantité de NORMIB- était de $27.5 \pm 7.9 \mu\text{m}^2$, avec 92.8% des patientes dont l'index était $\geq 15 \mu\text{m}^2$
- la quantité de NORtot était de $27.5 \pm 7.8 \mu\text{m}^2$, avec 92.8% des patientes dont l'index était $\geq 15 \mu\text{m}^2$

Lorsque nous avons comparé les variables deux à deux, les NORMIB+, NORMIB- et les NORtot étaient tous apparus indépendants du type de chirurgie, de la taille tumorale (pT) avec un seuil retenu à 20 mm, de la présence de récepteurs hormonaux, du type histologique, de la présence d'embolies lymphatiques, de HER2 et de l'index MIB1 avec un seuil à 15%.

Lors de l'analyse univariée portant sur :

- la survie globale, les NORMIB+ s'étaient révélés être corrélés au pronostic ($p = 0.02$) (fig. 47) ce qui n'était pas le cas des NORMIB- et des NORtot ($p = 0.11$) (fig. 49).
- la survie sans métastase, les 3 index AgNORs s'étaient révélés être corrélés à cette survie : les NORMIB+ ($p = 0.02$) (fig. 48), les NORMIB- ($p = 0.02$) et les NORtot ($p = 0.006$) (fig.50). Ainsi, des valeurs au delà du seuil de $15 \mu\text{m}^2$, ont été prédictives d'un risque accru d'évolution métastatique.

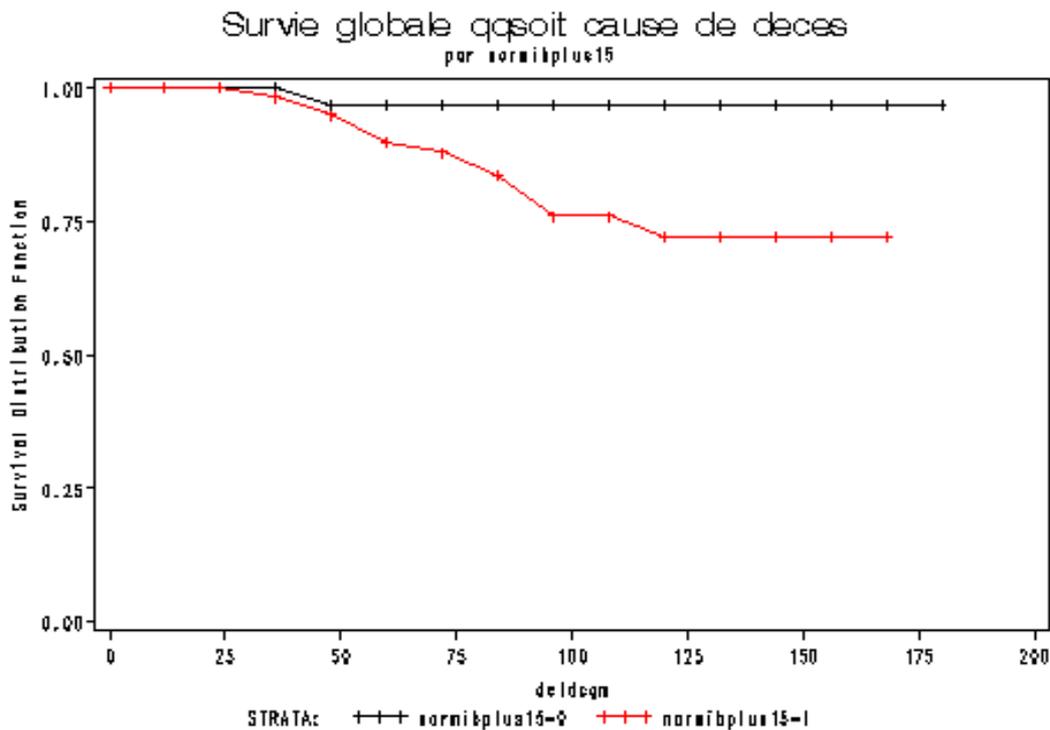


Fig 47 : Survie globale en fonction de la quantité d'AgNORs dans les cellules MIB+ (Seuil à $15 \mu\text{m}^2$)
 Courbe noire : quantité des AgNORs dans les cellules MIB+ $< 15 \mu\text{m}^2$,
 Courbe rouge : quantité des AgNORs dans les cellules MIB+ $> 15 \mu\text{m}^2$

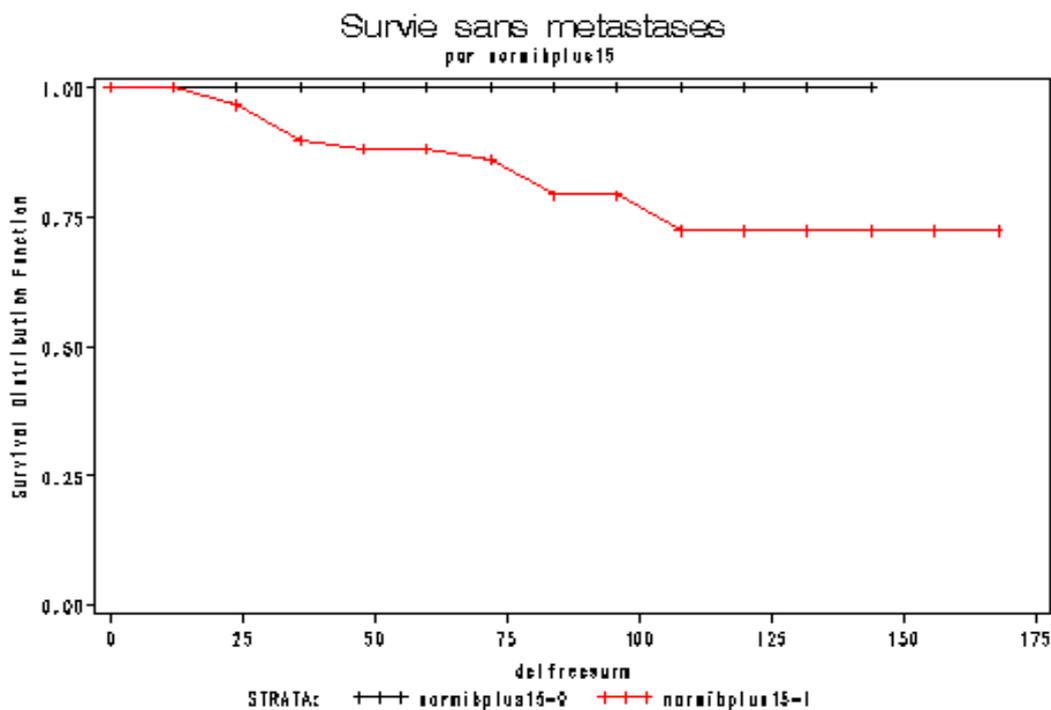


Fig 48 : Survie sans métastases en fonction de la quantité d'AgNORs dans les cellules MIB+ (Seuil à $15 \mu\text{m}^2$). Courbe noire : quantité des AgNORs dans les cellules MIB+ $< 15 \mu\text{m}^2$,
 Courbe rouge : quantité des AgNORs dans les cellules MIB+ $> 15 \mu\text{m}^2$

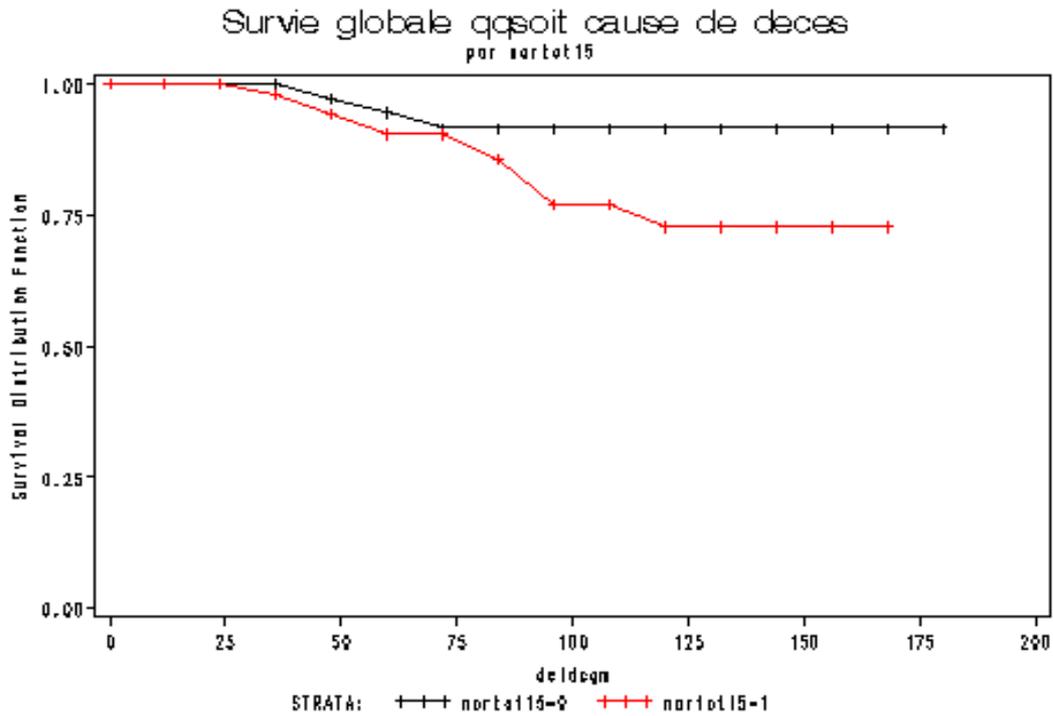


Fig 49 : Survie globale en fonction de la quantité totale d'AgNORs (Seuil à $15 \mu\text{m}^2$)
 Courbe noire : AgNORs totaux $< 15 \mu\text{m}^2$ Courbe rouge : AgNORs totaux $> \text{ou} = 15 \mu\text{m}^2$

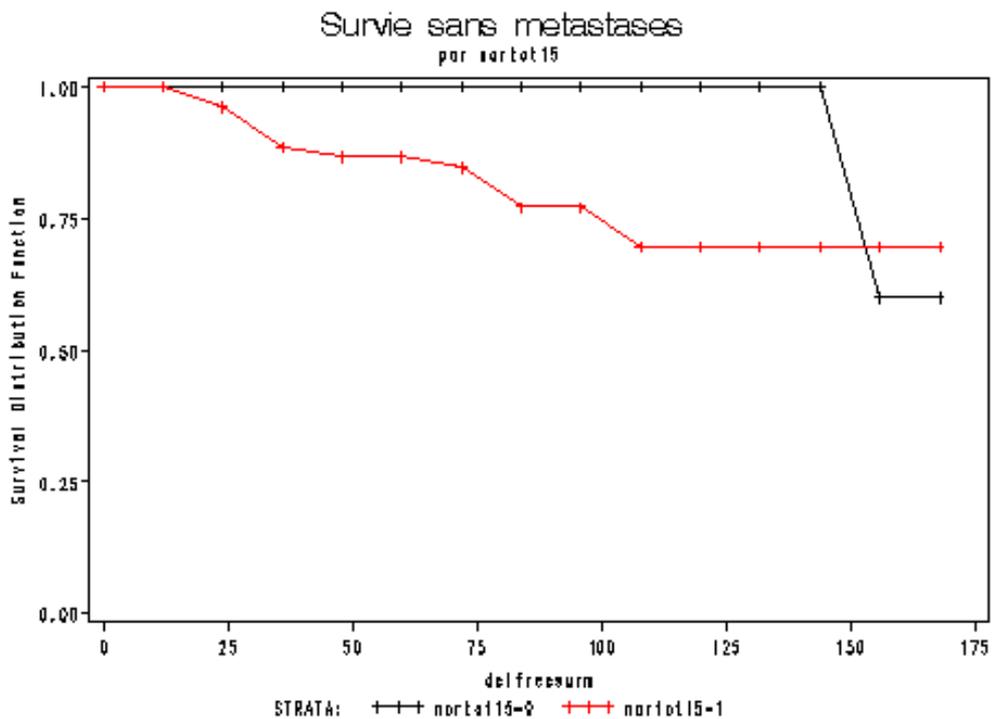


Fig 50 : Survie sans métastases en fonction de la quantité totale d'AgNORs (Seuil à $15 \mu\text{m}^2$)
 Courbe noire : AgNORs $< 15 \mu\text{m}^2$ Courbe rouge : quantité des AgNORs $> \text{ou} = 15 \mu\text{m}^2$

En analyse multivariée, les AgNORs totaux se sont révélés être les seuls à avoir eu un impact sur la SSM.

2.8 L'index de prolifération (IP) et le pronostic

L'index de prolifération a été calculé avec la formule $IP = \text{pourcentage de cellules marquées par le MIB1} \times \text{quantité d'AgNORs dans les cellules marquées par le MIB1}$, $IP = MIB1+ \times NORMIB+$.

La valeur moyenne de l'IP était de 185.2 +/- 166.2 et une médiane à 132.9.

Nous avons effectué l'étude statistique avec deux seuils pour l'IP, l'un à 100, nommé IP100, l'autre à 200, nommé IP200.

Ainsi, 50 patientes (55.6%) avaient une lésion avec un $IP \geq 100$, alors que 33 patientes (36.7%) avaient une lésion avec un $IP \geq 200$.

Dans le groupe des patientes décédées, quelle que soit la cause, 15 (83.3%) avaient un $IP \geq 100$ et 14 (77.8%) un $IP \geq 200$.

Dans le groupe des patientes avec une évolution métastatique, 11 (78.6%) avaient un $IP \geq 100$ et 11 (78.6%) un $IP \geq 200$.

Lors de l'analyse univariée portant sur :

- la mortalité globale, l'IP100 (fig. 51) et l'IP200 (fig.53) se sont révélés être corrélés au pronostic avec respectivement $p = 0.02$ et 0.0001 . Un $IP \geq 100$ et à 200 indiquait un risque accru de décès.
- la survie sans métastase, l'IP100 (fig. 52) et l'IP200 (fig. 54) se sont également révélés corrélés au pronostic avec respectivement $p = 0.05$ et 0.0001 . Un $IP \geq 100$ et à 200 indiquait un risque accru de survenue de métastases.

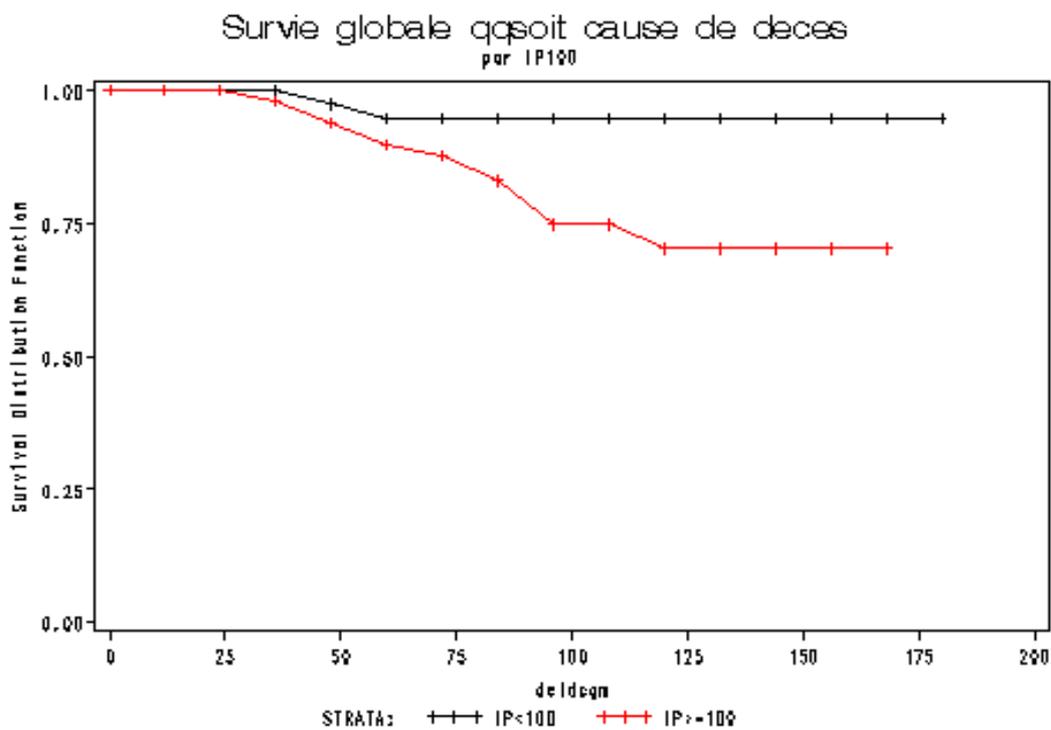


Fig 51 : Survie globale en fonction de l'index de prolifération (un seuil à 100)
 Courbe noire : IP < 100, Courbe rouge IP > ou = 100

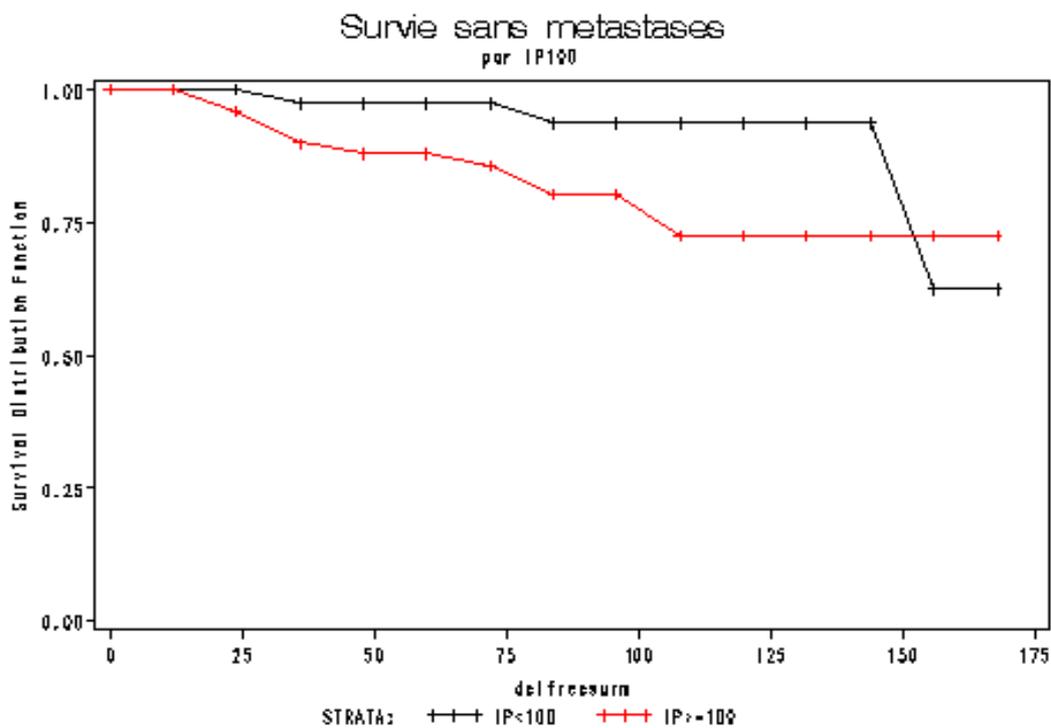


Fig. 52 : Survie sans métastases en fonction de l'index de prolifération (un seuil à 100)
 Courbe noire IP < 100, Courbe rouge IP > ou = 100

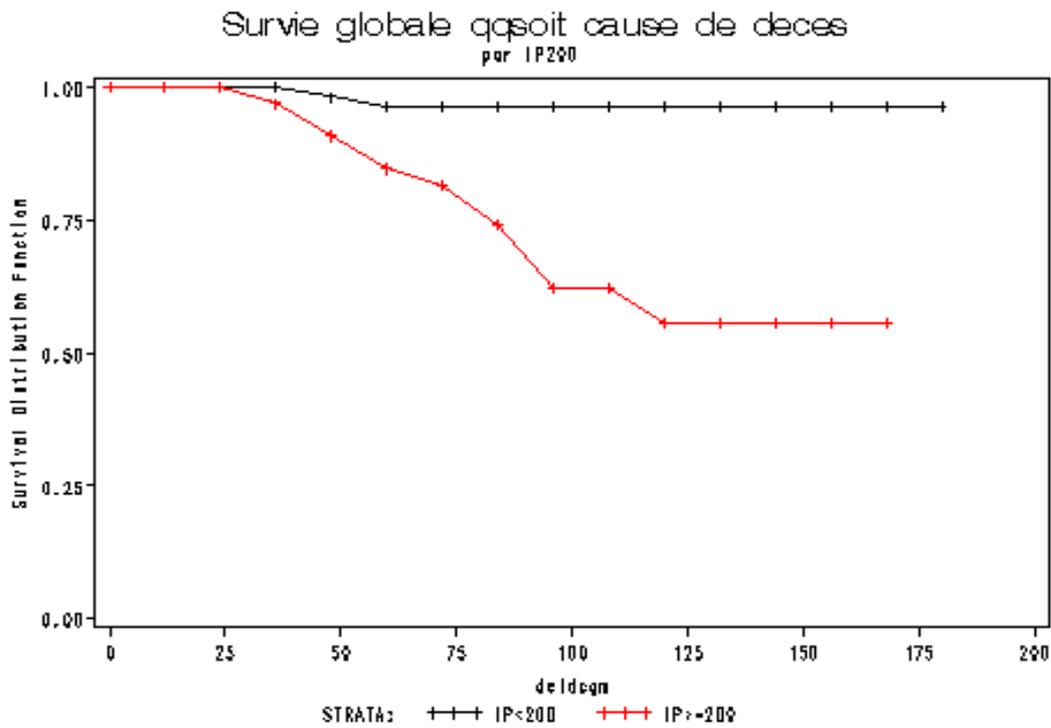


Fig 53 : Survie globale en fonction de l'index de prolifération (un seuil à 200)

Courbe noire IP < 200, Courbe rouge IP > ou = 200

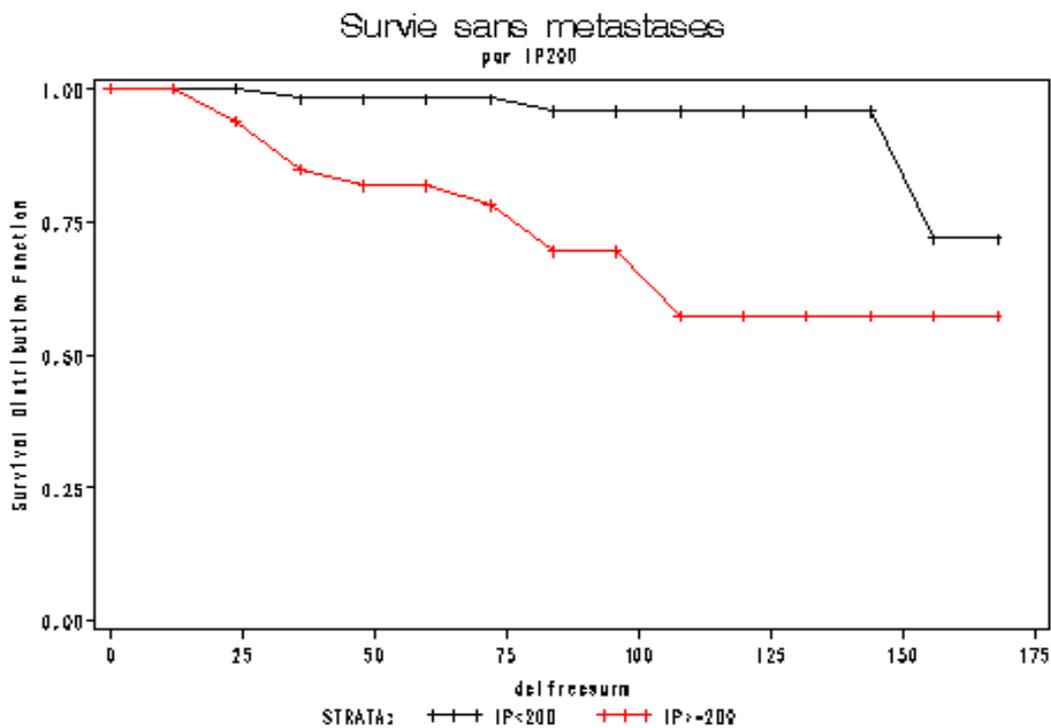


Fig 54 : Survie sans métastase en fonction de l'index de prolifération (un seuil à 200)

Courbe noire IP < 200, courbe rouge IP > ou = 200

En analyse multivariée, incluant les variables cliniques et biologiques (tableau 16), avec des seuils à 0.05, seul l'IP200 était corrélé à la survie globale avec un risque relatif (RR) de 16.4, un intervalle de confiance compris entre [2.0 – 129.9] et $p < 0.001$.

2.9 La surexpression de HER 2-neu et le pronostic

Dans notre population de 90 patientes, nous avons observé que 10% des patientes étaient porteuses de tumeurs sur exprimant HER2 à 3+, alors que pour 12,2% cette surexpression se faisait à hauteur de 2+ et pour 60% aucune surexpression n'était retrouvée.

Nous avons retrouvé que la surexpression de HER2 à 3+ était un facteur de plus mauvais pronostic mais avec des valeurs à la limite de la significativité aussi bien pour la survie globale ($p = 0,05$) (fig. 55) que pour la survie sans métastase ($p = 0,06$) (fig.56) par rapport aux trois autres groupes de patientes exprimant HER2 avec 0+, 1+ ou 2+.

Lorsque le pronostic des patientes dont les tumeurs sur exprimant HER2 à 2+ et 3+ était analysé et comparé au pronostic groupe de patientes avec 0+ et 1+, aucune corrélation pronostique n'était retrouvée. Il n'existait pas de différence significative au niveau du pronostic de ces deux groupes.

Nous avons pris le parti d'intégrer dans le modèle multivarié tous les paramètres pronostiques qui s'individualisaient lors de l'étude univariée avec un seuil $p < \text{ou} = 0,10$.

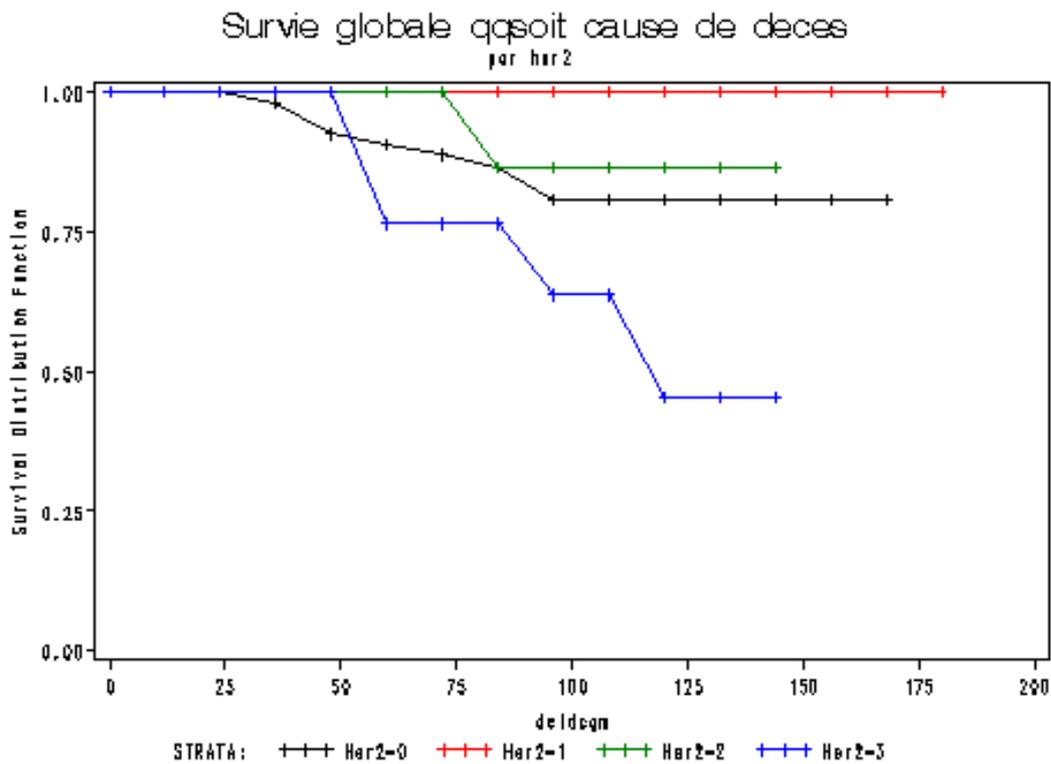


Fig 55 : Survie globale en fonction de la surexpression de HER2/neu (courbe noire : pas de surexpression, courbe rouge : surexpression 1+, courbe verte : 2+, courbe bleue : 3+)

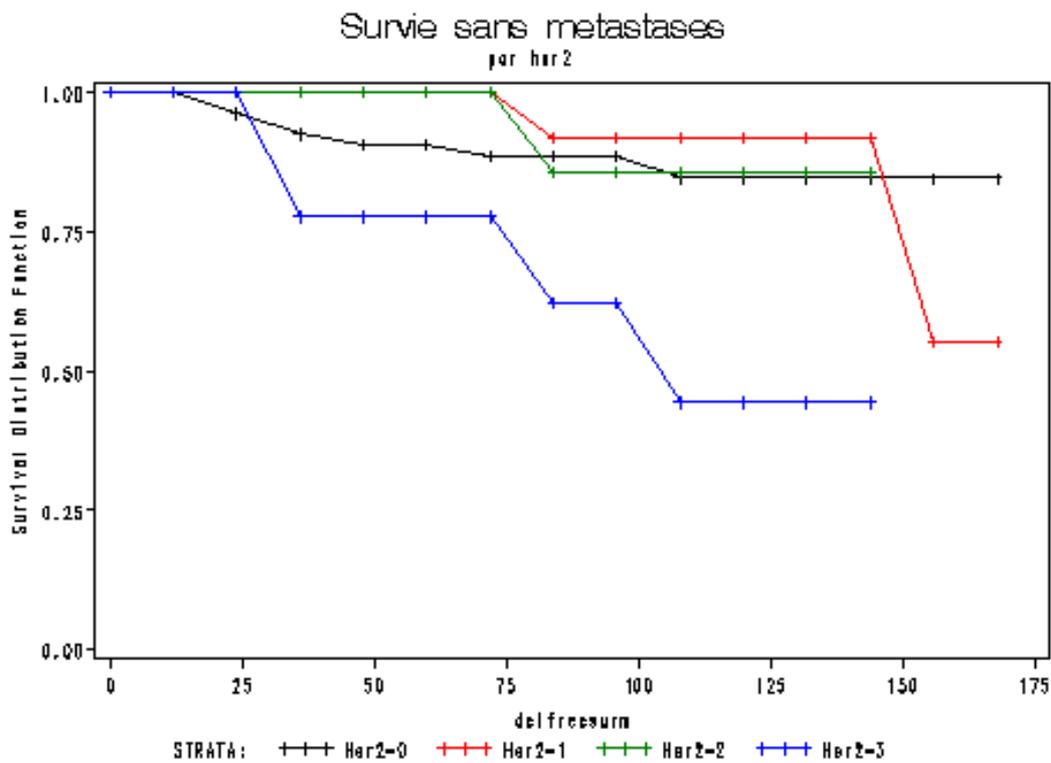


Fig 56 : Survie sans métastase en fonction de la surexpression de HER2/neu (courbe noire : pas de surexpression, courbe rouge : surexpression 1+, courbe verte : 2+, courbe bleue : 3+)

En analyse multivariée, lorsque nous nous sommes intéressés à la survie globale, la surexpression HER2 3+ apparaissait comme un élément de mauvais pronostic, avec un $p < 0,05$, indépendant du bloom, de la taille de la tumeur, de l'index MIB1, de l'expression des récepteurs hormonaux, de l'existence d'embolies lymphatiques qui étaient inclus dans le modèle pour le calcul. Lors de l'intégration de l'index de prolifération IP200 ou des AgNORs totaux, dans le modèle de calcul, HER2 perdait son caractère indépendant.

En analyse multivariée, pour la survie sans métastase, la surexpression 3+ de HER2 n'apparaissait pas constituer un élément pronostique indépendant ($p = 0,08$), même lorsque les index de prolifération étaient exclus du modèle.

Nous avons regroupé les principaux résultats, ci dessous, de l'analyse univariée (tableau 19) et de l'analyse multivariée (tableau 20)

Tableau 19 : récapitulatif de l'analyse univariée

univariée	Ploïdie	MIB1	AgNOR tot	AgNOR MIB+	IP 200	HER2	Emboles lymphatiques
SSM	0,04	> 0,10	0,006	0,02	0,0001	0,06	0,008
SG	> 0,05	0,01	0,11	0,02	< 0,0001	0,05	0,02

Tableau 20 : récapitulatif de l'analyse multivariée

multivariée	Ploïdie	MIB1	AgNOR tot	AgNOR MIB+	IP 200	HER2	Emboles lymphatiques
SSM	non	non	0,01	non	0,09	0,08	< 0,01
SG	non	non	0,01	non	< 0,001	< 0,05	< 0,05

SSM : survie sans métastase, **SG** : survie globale

Discussion

Ce travail s'est déroulé en plusieurs étapes. Il est centré sur la prolifération cellulaire dans le cancer du sein et son impact sur le pronostic de la maladie. La prolifération cellulaire est mesurable par différentes approches méthodologiques : index de marquage à la thymidine tritiée (Silvestrini 1997), pourcentage de cellules en phase S mesurée par cytométrie de flux (Bryant 1998, Wenger 1998, Simpson 2000), expression d'antigènes exprimés au cours du cycle cellulaire (PCNA, Ki67/MIB1) (Thor 1999). Ces méthodes ne sont pas superposables, mais quelque soit la méthode utilisée, une prolifération élevée est associée à une évolution défavorable (SOR 2001). Tous ces marqueurs de la prolifération sont liés fortement au grade histologique et à l'index mitotique (Thor 1999).

Les méthodes de validation des facteurs pronostiques sont de plus en plus standardisées (Spyratos 1995). La validation comprend deux niveaux, technique et clinique. La validation technique a pour objet de définir des options satisfaisant aux critères habituels de qualité. Elle doit aboutir à une méthode analytique standardisée, à une valeur univoque des valeurs seuils et à un contrôle de qualité. La validation clinique a pour but de définir les analyses biologiques susceptibles de guider, voire de modifier l'attitude médicale devant un problème clinique spécifique (SOR 2001). La démarche habituelle comprend les études pilotes portant en général sur une petite population de patientes, de façon souvent rétrospective, éventuellement sous forme d'étude cas-témoin. Elles sont suivies d'études confirmatives, rétrospectives ou prospectives de taille limitée. La démarche ne sera complète qu'à l'issue d'études prospectives multicentriques, sur de larges populations, à l'aide d'une méthode standardisée soumise à un contrôle de qualité (SOR 2001).

Dans ce travail, les 3 études ont été rétrospectives avec un nombre modeste de patientes ayant pour objet l'évaluation de deux hypothèses portant sur des facteurs pronostiques potentiels. La première reposait sur l'absence de détection de clones minoritaires par la technique classique, ce qui pouvait avoir un impact réel mais méconnu sur le pronostic. La seconde portait sur la prolifération cellulaire avec la détermination d'un index faisant intervenir le pourcentage de cellules dans le cycle (Ki67/MIB1) et la durée de celui-ci (AgNORs dans les cellules MIB1+). Dans les deux cas, nous avons fait appel à des techniques peu utilisées : étude de la ploïdie grâce à un analyseur d'images automatisé et le double marquage des mêmes lames pour la détermination de la quantité d'AgNORs dans les cellules MIB1 positives.

Nos deux premières études ont porté sur un groupe hétérogène de patientes avec des stades différents de la maladie et des thérapeutiques différentes, avec pour seul critère d'inclusion la

prise en charge chirurgicale, au sein du même service, de patientes non métastatiques. L'expression des résultats s'était faite dans ces deux études en divisant les patientes en groupe en fonction de l'évolution de la maladie. Nous avons comparé la fréquence de chacun des paramètres pronostiques que nous souhaitons évaluer, dans chacune de ces sous-populations.

Nous avons considéré que les résultats de ces deux premières études, qui ont fait l'objet de publications (annexes 2 et 3), étaient suffisamment probants et encourageants pour tenter de les appliquer à une population plus importante. Nous avons sensiblement modifié notre méthodologie au cours de cette dernière phase par rapport aux deux précédentes. Nous avons considéré la taille histologique de la seule composante infiltrante (pT) et non la taille clinique de la lésion comme précédemment. Nous avons exclu les lésions non infiltrantes. Nous avons travaillé sur un groupe homogène de malades quant au stade de la maladie et au traitement adjuvant. Nous avons décidé de limiter notre travail à la population à bas risque métastatique, les patientes sans atteinte ganglionnaire et pour lesquelles aucune chimiothérapie n'avait été administrée. Nous avons relu les lames des carcinomes lobulaires pour déterminer le score de SBR, qui ne se faisait pas à l'époque de la prise en charge chirurgicale des patientes. Nous avons fixé une date de point, le 1^{er} janvier 2001, pour évaluer le devenir des patientes. Nous n'avons pas exclu les patientes perdues de vue. Nous avons différencié la récurrence locale, de la maladie métastatique et du décès par cancer. Nous avons effectué une analyse univariée puis multivariée. La première, univariée, examine individuellement la relation de chaque variable avec la survenue d'un événement carcinologique. L'analyse multivariée permet ensuite de dégager les variables ayant les poids les plus importants dans la survenue de l'événement. Elle est indispensable car peu de marqueurs pronostiques en cours d'évaluation ont une signification indépendante des facteurs déjà connus (SOR 2001). Le modèle de Cox est le plus utilisé afin d'établir l'apport extrinsèque du nouveau facteur par rapport aux facteurs classiques.

Les modalités du traitement chirurgical ont peu évolué lors des deux dernières décennies, hormis depuis peu avec la procédure du ganglion sentinelle, et il reste admis qu'un traitement conservateur associé à la radiothérapie a le même impact sur le pronostic que la mastectomie, à taille tumorale équivalente. Les indications de la radiothérapie n'ont pas été modifiées ces dernières années. Pour les modalités, nous avons assisté à l'abandon du surdosage du lit tumoral par la mise en place de gaines en per-opératoire, remplacé par le complément de dose en radiothérapie externe. En revanche, les indications de la chimiothérapie ont beaucoup

évolué au cours de la dernière décennie avec une nette escalade thérapeutique. Les dernières patientes incluses dans cette étude, ont été prises en charge chirurgicalement en 1995. A cette époque, seules les patientes avec une atteinte ganglionnaire se voyaient proposer une chimiothérapie adjuvante à but curatif. En 1998, nous avons assisté à un tournant thérapeutique avec un élargissement des indications, selon les recommandations de la conférence de consensus de St Gallen. Seules les patientes de plus de 35 ans, sans atteinte ganglionnaire, avec une lésion de moins de 10 mm, un score de SBR à 1 et exprimant les récepteurs hormonaux ne relevaient pas d'une chimiothérapie (Zujewski 1998). Toutes les autres étaient considérées à risque modéré ou élevé d'évolution métastatique et une proposition de chimiothérapie leur était formulée. L'application des critères de St Gallen 1998, aux patientes de notre étude, aurait impliqué une chimiothérapie pour 82 sur les 90, alors que seules 14 ont eu une évolution métastatique. La conférence de consensus de St Gallen 2003 a abouti à la modification du seuil retenu de la taille histologique tumorale, passant de 10 mm précédemment, à 20 mm, à partir duquel une chimiothérapie pouvait être proposée (Goldhirsch 2003). Les autres critères étaient maintenus. L'application de ces critères à notre population aurait impliqué une chimiothérapie pour 77 patientes. Beaucoup d'auteurs reconnaissent qu'il existe un sur-traitement des patientes en l'absence de facteurs pronostiques plus discriminatifs (Hayes 2005).

Les indications de l'hormonothérapie ont également évolué. Pendant la période de notre étude, seules les patientes ménopausées, avec des facteurs de mauvais pronostic et des récepteurs hormonaux positifs se voyaient proposer une hormonothérapie. Actuellement toute patiente dont la tumeur exprime des récepteurs hormonaux, bénéficie de cette thérapeutique, quelque soit son statut ménopausique et l'avancement de la maladie. Ceci explique que seules 40% des patientes de notre étude aient bénéficié de ce traitement alors que 73,3% des tumeurs exprimaient ces récepteurs.

1. Intérêt pronostique de la ploïdie

La technique de cytométrie est exploitée dans le cancer du sein pour la détermination du pourcentage de cellules en phase S et l'étude de la ploïdie (Trudeau 2005). Nous nous sommes intéressés à la valeur pronostique de la ploïdie, en utilisant la cytométrie d'images, dans deux grands axes : la détection des clones minoritaires dont le contenu en ADN était > 5C et la valeur de l'aneuploïdie.

Toutes les lésions avaient bénéficié d'une cytométrie classique et nous les avons analysées de nouveau grâce à l'analyseur automatisé d'images. En effet, les cancers du sein présentent très fréquemment une hétérogénéité en contenu en ADN et la sous-estimation de ce facteur a été évoquée comme étant une cause des résultats discordants obtenus dans la littérature quant à sa valeur pronostique (Pfisterer 1995, Witzig 1994). La cytométrie classique est limitée, du fait du faible nombre de noyaux mesurés, 200 à 300, pour détecter les événements rares ou les clones minoritaires.

Notre objectif était d'analyser la variabilité au sein d'une lésion en mesurant le contenu en ADN par cytométrie d'images avec l'aide d'un logiciel spécialement adapté à la détection de ces événements rares. Cette méthode avait des avantages : une seule empreinte fraîche était suffisante pour l'analyse de la ploïdie et pour la variabilité intra tumorale ; l'étude rapide d'un grand nombre de cellules permettait de déterminer le clone prédominant et de détecter les cellules plus rares. En pratique, cette technique permettait de combiner les aspects de la cytométrie de flux (rapide, grand nombre de cellules) et la cytométrie d'image (permettant de revoir chaque élément mesuré). En fait, la plupart des études portant sur cette hétérogénéité, s'étaient efforcées d'analyser la ploïdie dans différentes zones d'une même tumeur par cytométrie d'image (Visscher 1993) ou de flux (Bergers 1996). Ces dernières études avaient montré que six échantillons devaient être préparés et mesurés pour s'assurer de l'exhaustivité de la détection des cellules aneuploïdes. La multiplicité des échantillons était probablement le meilleur moyen pour analyser cette hétérogénéité, mais leur préparation et leur étude étaient de grandes consommatrices de temps. Au quotidien dans un secteur de cytométrie d'un laboratoire d'anatomopathologie, la multiplication par quatre ou par six du nombre d'échantillons à analyser devenait rapidement ingérable (Bergers 1996).

La comparaison entre les deux méthodes a été réalisée pour 55 patientes lors de notre première étude. L'analyse par Discovery a permis la détection d'un taux de discordance de 47,3%. Ainsi, dans la moitié des cas, les cellules ou les clones rares n'ont pas été détectés par la cytométrie d'image classique. Notre taux de détection d'une hétérogénéité méconnue était superposable à ceux rapportés par les auteurs travaillant sur des échantillons intra tumoraux multiples : 43% pour Schvimer (1995), 56% pour Visscher (1993), 36% pour Kute (2004). Pour ce dernier, la survie sans métastase était plus longue ($p=0,02$) quand il existait une concordance entre les deux techniques concernant le caractère diploïde de la tumeur, par rapport aux patientes dont la tumeur était diploïde en CMF et aneuploïde en analyse d'images

(Kute 2004). En étudiant de multiples variétés de cancers, Stipa (1993) avait détecté une hétérogénéité du contenu en ADN dans 50% des carcinomes pulmonaires, dans 47% des coliques et dans 34% des gastriques.

Dans notre première étude nous avons montré que le pronostic était d'autant plus mauvais que le pourcentage de cellules de plus de **5c ADN** était plus élevé. Ceci confortait notre hypothèse selon laquelle le pronostic n'est pas tributaire de la population cellulaire majoritaire, mais dépendait des clones les plus agressifs même s'ils étaient minoritaires. Contrairement à Sitonen, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre la présence de cette sous population et le grade histologique de la tumeur. Notre logiciel spécialement adapté à la détection des événements rares nous a permis d'analyser et de retrouver un plus grand nombre de cellules, pouvant ainsi expliquer cette discordance.

Dans notre deuxième étude, 29,2% des lésions comportaient une population tumorale avec un contenu en ADN > 5C. Nous n'avons pas trouvé de valeur pronostique à ce facteur, dans notre groupe de patientes à bas risque, sans atteinte ganglionnaire.

Dans notre première étude, **l'aneuploïdie** n'était pas retrouvée de façon significativement différente entre nos deux populations, d'évolution favorable et défavorable. Par contre, la multiploïdie, correspondant à plusieurs pics aneuploïdes distincts, était corrélée au pronostic.

Dans notre deuxième étude, nous avons observé un taux de 27,9% pour les tumeurs aneuploïdes et de 25,6% pour les multiploïdes. Dans la littérature, les tumeurs non diploïdes ont été regroupés au sein d'un même groupe, souvent appelé groupe de tumeurs aneuploïdes. Notre taux de tumeurs non diploïdes était de 53,5% et était superposable à celui rapporté par la plupart des auteurs : 50% pour Dettmar (1997), 57% pour Dressler (1988), 58% pour Sigurdsson (1990), 52,8% pour Rudolph (1999), 60% pour Spyrtos (2002), 52% pour Moreau-Zabotto (2005) et 50,8% pour Trudeau (2005). Certains rares auteurs ont retrouvé des chiffres plus importants tels que Clark avec 68% (1989) et Gonzalez-Vela avec 64,7% (2001).

Pour Dettmar (1997), l'aneuploïdie était plus fréquemment observée chez les patientes ménopausées. Les tumeurs n'exprimant pas les récepteurs hormonaux étaient plus fréquentes parmi les tumeurs aneuploïdes. Rudolph (1999) avait montré, dans une population sans atteinte ganglionnaire, une corrélation entre l'aneuploïdie et un plus haut grade tumoral ($p =$

0,0005), un plus haut compte mitotique ($p < 0,00006$) mais pas avec la taille tumorale, le statut ménopausique ou l'âge de la patiente ($p > 0,15$). Il n'existait pas de corrélation entre la ploïdie et l'expression des récepteurs hormonaux ($p > 0,25$).

Dettmar n'avait pas retrouvé d'intérêt pronostique de la ploïdie sur la survie sans récurrence. Il avait noté que dans la littérature les résultats étaient contradictoires (Dettmar 1997). Certains auteurs n'avaient pas trouvé d'informations supplémentaires sur la survie (Sigursson 1990) alors que d'autres avaient montré un pronostic plus sombre en cas d'aneuploïdie (Clark 1989).

Rudolph avait pour sa part, montré que le contenu en ADN, diploïde/aneuploïde, avait une valeur pronostique aussi bien au niveau de la survie globale ($p=0,015$), qu'au niveau de la survie sans récurrence ($p=0,004$), en analyse univariée. Par contre, la ploïdie perdait sa valeur pronostique indépendante, dès que des index de prolifération étaient inclus dans l'analyse multivariée (Rudolph 1999).

De même Kute avait montré une valeur pronostique au paramètre diploïde/non diploïde à condition que le paramètre « phase S », un index de prolifération, soit exclu de l'étude multivariée. Ainsi, l'âge et le statut diploïde devenaient les deux paramètres les plus pertinents pour la survie sans récurrence (Kute 2004).

Trudeau a rapporté les résultats d'une série de 415 patientes opérées entre 1977 et 1986, dont 93% des patientes n'avaient pas eu de traitement adjuvant. Elle avait montré que la ploïdie avait un impact sur la récurrence ($p = 0,04$) en analyse univariée, mais pas sur le décès par cancer ($p = 0,13$) avec un plus mauvais pronostic en cas d'aneuploïdie (Trudeau 2005)

Pour Moureau-Zabotto, la survie sans récurrence était plus importante en cas de diploïdie ($p = 0,01$) pour les patientes sans atteinte ganglionnaire. Pour la population avec atteinte ganglionnaire, il n'existait pas de différence entre les tumeurs diploïdes et aneuploïdes. Pour l'auteur, la combinaison de l'étude de la ploïdie et de la phase S correspondait à une approche pertinente du pronostic des patientes (Moureau-Zabotto 2005).

Nous avons trouvé également qu'il existait une différence significative au niveau de la survie sans métastase entre les tumeurs diploïdes et non diploïdes ($p = 0,04$), en analyse univariée. Le pronostic était meilleur pour les patientes avec des tumeurs diploïdes. Par contre nous

n'avons pas trouvé de différence entre les tumeurs diploïdes, aneuploïdes et multiploïdes, quand ces deux dernières étaient individualisées, aussi bien pour la survie sans métastase que pour la survie globale. D'ailleurs pratiquement dans toutes les études, l'analyse avait été réalisée en regroupant les tumeurs aneuploïdes et multiploïdes au sein d'un seul groupe.

Par contre, nous n'avons pas retrouvé de différence au niveau de la survie globale entre les tumeurs diploïdes et non diploïdes.

De même, en analyse multivariée, nous n'avons pas isolé l'étude de la ploïdie comme un facteur pronostique indépendant, les index de prolifération ayant été inclus dans le modèle, comme dans la série de Rudolph (1999) et de Kute (2004).

Comme d'autres équipes (Pfisterer 1995, Witzig 1994) nous ne sommes pas arrivés à retrouver de valeur pronostique indépendante à la présence d'une population aneuploïde isolée. Malgré sa réalisation dans de nombreuses institutions, l'étude de la ploïdie n'a pas été recommandée par l'American Society of Clinical Oncology (ASCO) (Bast 2001) ni par la conférence de consensus des pathologistes américains qui l'a classé dans la catégorie III, regroupant les facteurs insuffisamment étudiés pour démontrer leur valeur pronostique (Fitzgibbons 2000).

L'aneuploïdie isolée témoigne d'une tumeur peu évoluée génétiquement, comme l'ont rapporté plusieurs auteurs (Schackney 1995, Witzig 1994). Il semblerait que dans l'évolution génétique de la tumeur, la diploïdie et l'aneuploïdie (hypotetraploïdie) précèdent l'hypertetraploïdie (hyperploïdie) (Witzig 1994). Le plus souvent, l'évolution des cellules tumorales n'est pas synchrone, aboutissant au développement d'un profil d'ADN multiploïde. Visscher avait noté que les différents clones étaient souvent intriqués, même dans des portions distantes d'un cancer du sein. Il avait conclu que l'interaction entre les populations tumorales génétiquement différentes aboutissait à une codominance stable des clones durant la progression d'un même cancer du sein (Visscher 1993).

Pour Shackney (2004), l'aneuploïdie n'était pas à elle seule suffisante pour apporter une valeur pronostique pertinente, mais constituait un très bon critère-candidat pour analyser d'éventuelles associations à d'autres anomalies moléculaires. Dans son étude prospective portant sur 189 patientes, il avait recherché au niveau des mêmes cellules néoplasiques, 3 anomalies : l'aneuploïdie, la surexpression de HER2 et la surexpression de ras. Le « triple

test » était considéré comme positif quand au moins 5% des cellules de la tumeur présentaient ces trois anomalies de façon concomitante. Il avait ainsi montré que les patientes dont le cancer présentait un « triple test » positif, avaient un pronostic plus sombre. La différence au niveau de la DFS était surtout significative pour les patientes sans atteinte ganglionnaire ($p = 0,0077$). L'hypothèse émise par l'auteur avait été que l'existence de plusieurs anomalies moléculaires dans les mêmes cellules était responsable d'un phénomène de synergie, de potentialisation, avec des conséquences sur l'évolution de la maladie (Shakney 2004).

2. Intérêt pronostique de l'index MIB1

Au cours de ces dix dernières années nous avons assisté à la publication de milliers de travaux portant sur l'intérêt de l'index Ki67 en pathologie carcinologique. La mise au point de l'anticorps MIB1 (Molecular Immunology Borstel) dirigé contre un épitope du Ki67 a grandement facilité ces travaux en permettant la détermination de cet index sur des tissus fixés au formol. Des études rétrospectives et prospectives, à partir d'un matériel histologique archivé, ont pu alors être réalisées. Le marquage histochimique des cellules par le Ki67/MIB1 est aisé, reproductible. Il fournit une information majeure sur le comportement des cellules composant la tumeur en indiquant le pourcentage de cellules engagées dans le cycle cellulaire. Néanmoins le Ki67 et le MIB1 ne sont pas synonymes et ne doivent pas être considérés comme interchangeables.

Notre étude préliminaire a porté sur un faible effectif de 39 patientes, dont 7 avaient une atteinte ganglionnaire (17,9%). Le pourcentage de cellules impliquées dans le cycle a été déterminé par l'index MIB1. Le taux moyen a été de 13,9% et nous a servi à déterminer le seuil de 15% pour différencier dans notre population deux groupes. Nous n'avons pas retrouvé de corrélation entre l'apparition de métastase et le taux de cellules MIB1 positives.

Dans notre deuxième étude qui a porté sur 90 patientes sans atteinte ganglionnaire et sans chimiothérapie, la valeur moyenne de l'index MIB1 a été de 9,1%. Il était ainsi plus bas que lors de notre étude préliminaire. Nous avons quand même retenu le seuil de 15% précédemment défini.

En analyse univariée, la variable MIB1 était corrélée à la survie globale (SG) ($p=0,01$). Ainsi, un index MIB1 $\geq 15\%$ indiquait un risque accru d'évolution fatale. Ces résultats ont été conformes à ceux qui sont rapportés par d'autres équipes (tableau 21). Par contre, nous n'avons pas retrouvé de corrélation entre l'index MIB1 et l'évolution métastatique, venant ainsi confirmer nos résultats obtenus dans l'étude préliminaire.

En analyse multivariée, incluant les variables cliniques et biologiques puis les variables biologiques seules, la variable MIB1 n'était pas corrélée, pour nous, de façon indépendante à la survie globale ni à la survie sans métastase. D'autres auteurs étaient arrivés à des conclusions opposées (tableau 21).

L'élément marquant dans la littérature concernant l'index Ki67/MIB1 a été la grande hétérogénéité des résultats, même s'ils restaient en faveur d'une réelle valeur pronostique de cet index comme l'a souligné Gerdes (Scholzen 2000). Ceci a été retrouvé dans des analyses univariées, mais également dans certaines des analyses multivariées quand elles ont été réalisées (Scholzen 2000).

Les plus récentes études, résumées dans le tableau 19, ont porté sur plus de 4800 patientes, et ont affirmé le caractère pronostique et indépendant de l'index Ki-67. Ainsi, une étude comme la nôtre se trouverait classée, à juste titre, comme apportant une valeur pronostique pertinente pour la survie globale en analyse univariée, comme c'est le cas pour les études d'Archer (1995) et de Haerslev (1996). Mais l'absence de valeur pronostique, pour la survie sans métastase et lors de l'analyse multivariée pour les deux paramètres, ne serait pas mis en exergue.

Tableau 21 : Valeur pronostique de l'index Ki67 dans la littérature.

Auteur (année)	Nombre de cas	Facteur pronostique pour	Type analyse	anticorps	Caractéristiques des patientes
Archer (1995)	92	Survie globale	Univariée	Ki67	
Molino (1997)	322	Survie globale, survie sans récurrence	Uni, multivariée	Ki67	
Weikel (1995)	549	Survie globale, survie sans récurrence	Univariée	Ki67	N0, N+
Rudolph (1999)	356	Survie globale, survie sans récurrence	Uni, multivariée	KiS5	N0
Clahsen (1998)	441	survie sans récurrence	Uni, multivariée	MIB1	Préménopause N0
Dettmar (1997)	90	survie sans récurrence	Univariée	MIB1	N0
Domagala (1996)	186	Survie globale	Uni, multivariée	MIB1	
Haerslev (1996)	487	Survie globale	Univariée	MIB1	
Jansen (1998)	341	Survie globale	Uni, multivariée	MIB1	
Jensen (1995)	118	Survie globale	Uni, multivariée	MIB1	T1, T2, N0
Keshgegian (1995)	135	survie sans récurrence	Univariée	MIB1	
Pinder (1995)	177	Survie globale	Uni, multivariée	MIB1	T1, T2
Rozan (1998)	326	Survie globale, survie sans récurrence	Uni, multivariée Univariée	MIB1	
Seshadri (1996)	740	Survie globale, survie sans récurrence	Uni, multivariée	MIB1	N0, N+
Veronese (1996)	246	Survie globale, survie sans récurrence	Univariée	MIB1	
Biesterfeld (2001)	67	Survie globale	Uni, multivariée	MIB1	N0, N+
Caly (2004)	257	Survie globale, Survie sans récurrence	Uni, multivariée univariée	MIB1	N0, N+

Néanmoins, certains auteurs ont retrouvé une corrélation significative entre la variable Ki67/MIB1 et la survie sans métastase (SSM), en analyse univariée (Weikel 1995, Dettmar 1997, Haersley 1996, Keschegian 1995) ce que nous ne sommes pas arrivés à démontrer, comme d'autres d'ailleurs (Pinder 1995).

Ceci est vrai pour Weikel lorsqu'il a étudié l'ensemble de sa population qui comprenait les patientes avec et sans atteinte ganglionnaire avec pour la SG, $p = 0,0001$ et pour la SSM, $p = 0,0016$. De même, lorsqu'il s'est intéressé au sous groupe avec atteinte ganglionnaire ($n=315$) il a retrouvé une valeur pronostique à l'index Ki67, en analyse univariée, aussi bien pour la SG ($p = 0,0001$), que pour la SSM. Par contre lorsqu'il a voulu analyser le sous groupe sans atteinte ganglionnaire ($n=234$), avec un seuil de Ki67 à 20%, aucune valeur pronostique n'a été retrouvée pour la SG ($p = 0,171$) et pour la SSM ($p = 0,191$). Pour Weikel, ceci s'expliquait par le manque de recul dans son étude, avec une moyenne de 3,4 ans, surtout préjudiciable dans la population à bas risque pN0 qui a tendance à rechuter plus tardivement (Weikel 1995)

Pour Kröger (2006) qui s'est intéressé uniquement aux patientes à haut risque métastatique ($n = 157$) avec plus de 10 ganglions axillaires atteints, le Ki67 n'a pas de valeur pronostique. Il avait retenu le seuil de 10% et avait rapporté que 43% de ces patientes avaient un $Ki67 \leq 10\%$. Dans son étude il avait dans les facteurs pronostiques étudiés, les récepteurs aux oestrogènes, à la progestérone, HER2, Ki67, p53, p16, Maspin et Bcl-2 (Kröger 2006).

Pour Caly, lors de l'analyse univariée de la survie globale, plusieurs facteurs se sont révélés avoir un impact pronostique : l'index MIB-1 ($p < 0,005$), atteinte des ganglions axillaires ($p = 0,003$) et l'expression des récepteurs à la progestérone ($p = 0,001$) (Caly 2004). Lorsque cette analyse a porté sur la survie sans récurrence, les paramètres pronostiques ont été l'index MIB1 ($p = 0,02$), statut ganglionnaire ($p = 0,001$), expression des récepteurs aux estrogènes ($p = 0,02$) à la progestérone ($p = 0,01$) et la phase S ($p = 0,003$). En analyse multivariée, l'index MIB1 a gardé sa valeur pronostique quant à la survie globale seulement (Caly 2004).

Cette hétérogénéité des résultats a été retrouvée à toutes les étapes de l'analyse. Ainsi, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre la taille tumorale et l'index MIB1. Ceci était en accord avec les résultats de certains (Weikel 1995, Léonardi 1992), mais en désaccord avec d'autres

qui avaient retrouvé une telle corrélation (Ostrowski 1995, Molino 1997, Gonzalez-Vela 2001).

Nous n'avons pas retrouvé de corrélation entre le statut ganglionnaire et l'index Ki67/MIB1. Pour certains auteurs cet index Ki67/MIB1 était plus bas dans les tumeurs sans atteinte ganglionnaire (Léonardi 1992, Molino 1997, Gonzalez-Vela 2001) et pas pour d'autres (Weikel 1995, Keshgegian 1995, Ostrowski 1995, Aranda 1997).

Des résultats tout aussi discordants ont été retrouvés lorsqu'une corrélation a été recherchée entre l'index Ki67/MIB1 et l'expression de récepteurs hormonaux. Pour certains, l'index Ki67/MIB1 était d'autant plus faible que le taux de récepteurs hormonaux était élevé (Molino 1997, Leonardi 1992). Nous ne sommes pas arrivés, comme d'autres, à cette conclusion, aucune association entre ces deux paramètres n'ayant été retrouvée (Pinder 1995, Gonzalez-Vela 2001).

Pour Caly, il existait une corrélation positive entre l'index MIB1 et l'index mitotique d'une part ($r=0,61$; $p<0,001$) et l'index MIB1 et la phase S d'autre part ($r=0,58$; $p<0,001$) (Caly 2004).

Plusieurs causes peuvent expliquer ces discordances. Les séries étaient très hétérogènes avec des protocoles thérapeutiques différents, des durées de suivi différentes et lors des analyses multivariées, des critères biologiques et cliniques très variables, intégrés dans le modèle de calcul (Spyratos 2002). Enfin, le seuil de l'index MIB1 retenu pour en évaluer l'intérêt pronostique a été très variable selon les études, variant de 1% (Haerslev 1996) à 32% (Caly 2004). Certains auteurs ont retenu un seuil voisin de la valeur moyenne observée (Keshgegian 1995, Pinder 1995, Rudolph 1999, Caly 2004, Biesterfeld 2001) comme rapporté dans le tableau 22. Ceci a également été notre cas. Néanmoins, cette attitude ne disposait pas de fondements scientifiques. Cette disparité dans les seuils utilisés a été probablement due à l'absence d'un programme de qualité publié et appliqué, comparable à ceux qui sont utilisés pour la surexpression d'HER2 et pour les récepteurs hormonaux (Spyratos 2002). Cette opinion a été également partagée par Caly qui a souligné le manque de standardisation au niveau des conditions techniques de réalisation et au niveau de l'évaluation microscopique (Caly 2004).

Nous avons testé le seuil de 10% pour l'index MIB1 dans notre population initiale de 108 patientes de la « phase2 », avant l'exclusion des patientes avec mastectomie pour lésions multifocales et nous avons obtenu des résultats tout à fait superposables à ceux que nous avons rapporté avec le seuil de 15%.

Tableau 22 : valeur pronostique : seuil retenu et valeur moyenne du MIB1

Auteur (année)	Valeur seuil (%)	Valeur moyenne (%)
Keshgegian (1995)	10	10,2
Weikel (1995)	Groupe I : <10 Groupe II : 10-20 Groupe III : > 20	NP
Pinder (1995)	17	27,3
Dettmar (1995)	25	18
Haerslev (1996)	1	NP
Seshadri (1996)	10	NP
Rozan (1998)	10	NP
Clahsen (1998)	20	NP
Rudolph (1999)	25	24,7
Biesterfeld (2001)	8,1	8,1
Gonzales-Vela (2001)		29,4
Spyratos (2002)	10,15,17,20,25	17
Caly (2004)	32	34
Kröger (2006)	10	NP

Le seuil le plus élevé, 32%, a été celui récemment rapporté par l'équipe de l'Institut Curie, dans leur série de 257 patientes avec une valeur moyenne de l'index MIB1 de 34% (Caly 2004). Dans cette étude, 26% des patientes avaient une atteinte ganglionnaire (0% dans notre série), 16% correspondaient à des tumeurs de plus de 50 mm (0% dans notre série) et 34% avaient un grade histologique SBR III (27,5% dans notre série).

Des études similaires à la nôtre, tant au niveau de l'effectif qu'au niveau du profil des patientes, avaient objectivé des taux moyens de MIB1 plus élevés que le nôtre. Dettmar a rapporté un taux moyen de 18% (extrême variant de 1 à 81%) dans une série de 90 patientes

sans atteinte ganglionnaire (Dettmar 1997). Les pourcentages de tumeurs SBR3 étaient voisins, 27,5% pour nous et 26,6% pour eux. Par contre, la taille moyenne des lésions était de 22 mm dans leur série alors qu'elle n'était que de 16,3 mm dans la nôtre et le taux de tumeurs sans expression des récepteurs hormonaux était de 23,3% pour Dettmar et n'était que de 13,1% pour nous.

Toutefois, comme nous l'avons vu plus haut, il n'existait pas de consensus, loin s'en faut, sur la corrélation entre ces marqueurs de mauvais pronostiques et l'index Ki67/MIB1.

Des auteurs ont focalisé leur travail sur la notion de seuil pour l'index MIB1 (Molino 1997) en testant plusieurs valeurs. Les récurrences ont été plus importantes au delà d'un seuil de 40% mais finalement avec un risque relatif voisin de celui observé avec un taux à 15% (tableau 23).

Tableau 23 : Estimation du risque relatif de rechute et de décès selon les différents seuils de Ki67 n = 322, avec le modèle de Cox (Molino 1997)

Seuils de Ki67	Risque relatif rechutes	Risque relatif décès
> 5 vs ≤ 5	2,268	3,912
>10 vs ≤ 10	2,837	3,909
>15 vs ≤ 15	2,874	3,785
> 20 vs ≤ 20	2,662	4,319
> 25 vs ≤ 25	2,141	3,893
>30 vs ≤ 30	2,458	3,951
> 35 vs ≤ 35	2,930	4,464
> 40 vs ≤ 40	2,993	3,882

Weikel avait eu une approche semblable, en utilisant des intervalles avec trois catégories : groupe I : KI67 < 10% ; groupe II : 10-20%, groupe III : > 20%

Pour Spyratos, qui a utilisé les seuils de 10, 15, 17, 20 et 25, le seuil de 10% était le plus pertinent pour exclure les patientes avec des tumeurs à faible prolifération et leur éviter un sur-traitement avec une chimiothérapie. Par contre le seuil de 25% était le plus intéressant pour définir les tumeurs sensibles à la chimiothérapie (Spyratos 2002). Cette étude avait porté sur 185 patientes avec 53% des lésions de plus de 20 mm, 33% de lésions SBR3 et 64% d'absence d'atteinte ganglionnaire. Elle a comparé l'index MIB1 aux autres index de prolifération : phase S, compte mitotique, ploïdie et thymidine kinase index.

Ainsi ce facteur a été très largement étudié sans avoir pu s'imposer comme facteur pronostique en pratique courante (Gradishar 2005). Son intégration en clinique dans une stratégie thérapeutique, ne s'est pas faite à ce jour, comme en témoigne son absence dans les critères retenus par les conférences de consensus de St Gallen 2003 (Goldhirsch 2003) et 2005 (Goldhirsch 2005). Finalement, cet index se retrouve toujours dans la catégorie 2 des facteurs pronostiques, définie par la conférence de consensus des pathologistes américains en 1999, nécessitant des études robustes pour être validé (Fitzgibbons 2000). Les éléments limitant sont l'absence de notion de seuil clairement défini et l'absence de standardisation avec un programme de qualité validé. Mais l'index MIB1 n'indique finalement que le pourcentage de cellules dans le cycle et ne reflète qu'une donnée de la prolifération cellulaire, l'autre donnée, tout aussi essentielle, étant la durée du cycle cellulaire.

3. Intérêt pronostique des AgNORs

Nous avons montré que la quantification globale des AgNORs (NORtot), des cellules quiescentes et dans le cycle, correspondait à un facteur pronostique pour la SSM. Ceci avait été observé lors de notre étude préliminaire et a été ainsi confirmé dans notre étude principale aussi bien lors des études univariée ($p = 0,006$) et multivariée ($p = 0,01$).

Nous avons également montré que la quantification des AgNORs des cellules impliquées dans le cycle (NORMIB+) était un élément déterminant dans la SSM ($p = 0,02$). Il en était de même pour les AgNORs des cellules quiescentes (NORMIB-) ($p = 0,02$). D'ailleurs ces deux paramètres ont été intimement corrélés ($p < 0,0001$), sachant que la quantité moyenne d'AgNORs était plus importante dans les cellules en cycle que dans les cellules quiescentes (20,4 versus 18,8 μm^2), notion déjà mise en évidence dans notre première étude.

La quantité des AgNORs des cellules dans le cycle avait également une valeur pronostique pour la survie globale, en analyse univariée. Pour Biesterfeld, il n'était pas utile de s'intéresser aux AgNORs dans les cellules MIB1-, car ils sont déjà inclus dans la quantification des AgNORs totaux (Biesterfeld 2001).

Nous n'avons pas retrouvé de corrélation entre les AgNORs et la taille histologique ni le grade histologique, contrairement à certains auteurs (Derenzini 2004). Par ailleurs, nous avons montré dans nos deux études que la valeur globale en AgNORs était indépendante de l'index MIB1. Ceci a également été rapportée par d'autres auteurs (Bigras 1996, Biesterfeld 2001, Surowiak 2004).

La relation entre les valeurs des AgNORs et le pronostic de la maladie néoplasique est expliquée par le rôle et le fonctionnement des NORs. Dans les études in vivo et in vitro il a été démontré que la quantité d'AgNORs était directement liée au taux de biogénèse ribosomale, qui reflète dans les cellules proliférantes la durée du cycle cellulaire. Plus le cycle est court, plus grande est la synthèse d'ARN par unité de temps et ainsi la quantité d'AgNORs présents dans le nucléole (Derenzini 2004)

Le premier travail sur les AgNORs dans la pathologie néoplasique a été mené en 1986, au sein de notre Laboratoire, par Dominique Ploton (1986). L'auteur avait démontré que, sur une série de tumeurs prostatiques, les cellules malignes étaient caractérisées par un plus grand nombre d'AgNORs pendant l'interphase, que les cellules bénignes. Cette étude a généré un grand enthousiasme chez les pathologistes. Une série d'études a débuté afin de démontrer la possibilité de distinguer les cancers des lésions bénignes, sur la base des quantités d'AgNORs par nucléole. Puis la valeur pronostique des AgNORs a été évaluée dans la plupart des cancers et ce de façon répétée. Les résultats obtenus étaient quelque peu contradictoires, aboutissant à une scission de la communauté des pathologistes en deux groupes. Ceux, minoritaires, accordant une valeur pronostique aux AgNORs et les autres contestant cet intérêt. Ainsi, l'utilisation des AgNORs en routine dans la pathologie tumorale est resté à un stade confidentiel.

Ce scepticisme résulte de la méconnaissance de la signification biologique des AgNORs. En fait, beaucoup de pathologistes se servaient de la méthode pour obtenir une information, qui ne pouvait être obtenue. Ainsi la quantification des AgNORs a été initialement utilisée pour différencier les cellules bénignes et malignes. Si dans la grande majorité des cas, la quantité d'AgNORs est supérieure dans les cellules néoplasiques en raison de la forte activité de synthèse, il existe une zone de chevauchement des valeurs rendant inutilisables les AgNORs pour le diagnostic de malignité. Cette distorsion comme paramètre diagnostique a entraîné un rejet de la technique par les pathologistes, y compris sur le versant pronostique. De plus, les méthodes inadaptées de visualisation et de quantification des AgNORs ont été largement utilisées (Derenzini, Ploton 2003).

Plus de 400 études ont été publiées sur l'intérêt pronostique des AgNORs, dans pratiquement toutes les pathologies néoplasiques. Les résultats de la plupart de ces études ont confirmé cet intérêt en montrant que plus la quantité d'AgNORs était importante et plus le pronostic de la maladie était sombre (Derenzini, Ploton 2003). Son impact sur la survie a été comparée en analyse multivariée avec les autres facteurs validés, montrant ainsi son caractère indépendant. Les études n'ayant pas retrouvé cette valeur pronostique, présentaient des erreurs de méthodologie (Derenzini, Ploton 2003), soit au niveau du marquage, l'erreur la plus fréquente était de considérer l'ensemble du nucléole marqué comme un seul point AgNORs soit au niveau de la quantification des AgNORs sans utilisation d'un analyseur d'images (Nogushi 1993, Toikkanen 1993). Ceux qui se sont servis de ce système ont souvent trouvé une relation entre la surface AgNOR et le pronostic des patients (Aubele 1994, Gimenez-Mas 1996, Siri 1995).

Si ces errements initiaux ont porté préjudice au développement de la technique, il faut bien reconnaître que celle-ci reste aujourd'hui marginale en pathologie mammaire malgré des améliorations techniques remarquables avec une standardisation, une rapidité de réalisation et un faible coût. Il en est de même au sein de notre Laboratoire, pourtant à l'origine de la mise au point de cette quantification des AgNORs, où elle n'est pas réalisée en pratique quotidienne pour la pathologie néoplasique mammaire. Rares sont les équipes qui continuent à travailler sur la valeur pronostique des AgNORs.

Parmi les paramètres AgNORs, la quantification des AgNORs totaux nous a semblé être la plus pertinente, au niveau du pronostic. Nos résultats vont dans le même sens que ceux rapportés par d'autres. Ainsi, pour Kruger la quantification des AgNORs totaux était mieux corrélée à l'Index Pronostique de Nottingham que la quantification des AgNORs dans les cellules dans le cycle, révélées par marquage au MIB1 (Kruger 2000). Cette quantification a été réalisée tout comme nous, par une analyse morphométrique. Il a également retrouvé une quantité AgNORs plus importante dans les cellules impliquées dans le cycle que dans les cellules quiescentes, mais sans atteindre le seuil de significativité (5,95 versus 5,62) (Kruger 2000). Ainsi, au niveau du pronostic, c'est l'ensemble des AgNORs qui doit être pris en compte, aussi bien ceux dans les cellules proliférantes que quiescentes, reflétant ainsi les caractéristiques globales de la tumeur.

Pour Derenzini, il existait une corrélation entre ce paramètre, AgNORs totaux, et la survie sans récurrence, pour l'ensemble des 335 patientes (Derenzini 2004). Lorsqu'il a scindé cette population en fonction de l'atteinte ganglionnaire axillaire, il n'a retrouvé cette valeur pronostique des AgNORs totaux, que dans le groupe avec atteinte ganglionnaire.

Néanmoins, certains auteurs n'ont pas trouvé de valeur pronostique pour les AgNORs totaux, mais pour les AgNORs dans les cellules MIB1 positives. C'était le cas de Biesterfeld (2001) qui retrouvait cette valeur pronostique pour l'index MIB1 aussi bien en univariée ($p = 0,0018$) que multivariée ($p = 0,0025$) et pour le paramètre AgNORs MIB+ en univariée ($p = 0,0340$) et multivariée ($p = 0,0775$). D'ailleurs cet auteur s'étonnait des résultats que nous rapportions concernant la pertinence des AgNORs totaux. Dans sa série initiale de 89 cas de cancers du sein, seules 67 lésions (75%) ont pu avoir le double marquage MIB1 et AgNORs, 40 patientes (44,9%) étaient décédées après 3 ans +/- 2 ans et l'étude multivariée n'a inclus que très peu de paramètres (MIB1 et AgNORs seuls) qui s'étaient révélés pertinents en analyse univariée. Ainsi, le stade, le grade et l'expression des récepteurs hormonaux n'avaient pas été inclus ($p > 0,01$). D'ailleurs, l'auteur a appelé à la prudence dans l'interprétation des données de son analyse multivariée, dans laquelle il avait fixé le seuil de significativité à 0,01.

Pour Tomobe, dans la pathologie néoplasique vésicale, ce sont les AgNORs dans les cellules quiescentes qui semblent être le meilleur indicateur d'une évolution métastatique (Tomobe 2001).

Derenzini a considéré que la quantification des AgNORs s'était révélée insuffisante pour définir finement le pronostic (Derenzini 2004). Il a suggéré que les protéines pRb et p53, qui sont capables de réprimer la transcription de l'ARNr en affectant l'activité ARN polymérase I UBF, étaient des facteurs déterminant du pronostic. Dans la plupart des cancers, les mécanismes qui contrôlent la progression des cellules dans le cycle sont perturbés et les modifications dans les voies de pRb et p53 sont souvent responsables d'un passage incontrôlé des cellules au niveau de la phase charnière G1/S. Ainsi, pour Derenzini, les tumeurs mammaires qui présentaient une délétion ou une hyperphosphorylation du pRb (seuil à 25%) et une mutation du p53 (seuil à 10%), avaient un plus mauvais pronostic que les autres, à quantité égale d'AgNORs (Derenzini 2004).

Pour les AgNORs, comme précédemment pour les MIB1, l'absence de seuil clairement identifié, induit un manque de clarté et participe également au manque d'intérêt observé dans le cancer du sein. Dans notre étude principale, le seuil retenu a été de $15 \mu\text{m}^2$ aussi bien pour les AgNORs dans les cellules MIB1 positives, que dans les cellules MIB1 négatives et les AgNORs totaux. Ce seuil a été choisi à partir des valeurs moyennes calculées, qui se sont révélées être respectivement de $20,4 \mu\text{m}^2$, $18,8 \mu\text{m}^2$ et $18,9 \mu\text{m}^2$. Ce seuil est supérieur à celui retenu lors de notre étude préliminaire ($10 \mu\text{m}^2$) et aux seuils rapportés par d'autres (Derenzini 2004). Derenzini a retenu le seuil de $5 \mu\text{m}^2$, défini par rapport à la valeur moyenne des AgNORs de $4,12 \mu\text{m}^2$ dans son étude. Néanmoins, nous avons quand même réalisé l'analyse univariée avec le seuil de $10 \mu\text{m}^2$, avec des résultats tout à fait superposables à ceux obtenus avec le seuil de $15 \mu\text{m}^2$.

Dans notre population (n = 90), 52 patientes avaient des AgNORs totaux $> 15 \mu\text{m}^2$, parmi lesquelles se trouvaient 13 avec une évolution métastatique, (toutes avec des NORtotaux supérieurs à $19 \mu\text{m}^2$), sur un total de 14 patientes métastatiques.

4. Intérêt pronostique du double marquage MIB1-AgNORs

Estimer uniquement le pourcentage de cellules dans le cycle cellulaire, par l'index MIB1, est insuffisant pour décrire la croissance tumorale car elle ne donne aucune information sur le temps d'un cycle inter-mitotique nécessaire pour définir le taux de prolifération. Un marqueur supplémentaire est nécessaire pour obtenir cette information (Scholzen 2000) telle la quantification des AgNORs (Brugal 1995).

Nous proposons ici une nouvelle technique de double marquage AgNOR-MIB1, qui peut être utilisée sur des cultures cellulaires et des tissus inclus en paraffine. Cette méthode est relativement simple à réaliser et particulièrement adaptée aux mesures de différents paramètres en cytométrie d'images. De plus le marquage fluorescent pour le MIB1 règle les problèmes rencontrés de segmentation lors des doubles marquages basés sur la peroxydase ou les phosphatases alcalines. Les préparations sont très stables à -20°C et nous avons obtenu des résultats identiques, lors de l'étude des lames, à deux ans d'intervalle.

Des études ont déjà été réalisées avec un double marquage des AgNORs et du Ki67 (Munakata 1994) ou des AgNORs associés au PCNA (Smith 1993). Ils ont montré une relation directe entre la quantité globale d'AgNORs et la quantité d'AgNORs dans les cellules impliquées dans le cycle. Néanmoins ces études n'ont pas recherché de corrélation entre ces constatations et le devenir des patientes. Bigras (1996) a été le premier à réaliser ce type d'études, en s'intéressant au devenir de 30 patients présentant un cancer du poumon chez qui ont été déterminés la quantité d'AgNORs dans les cellules Ki67+. Tomobe a réalisé un travail similaire portant sur 50 patients avec un cancer de vessie et a montré que la quantification des AgNORs dans les cellules MIB1+ était le facteur pronostic le plus pertinent en analyse multivariée (Tomobe 1999).

Nous avons été les premiers à publier les résultats sur l'intérêt clinique dans le cancer du sein (annexe 2), du double marquage AgNORs-MIB1 et de la détermination de l'index IP tel que l'avait défini Brugal déterminé par le pourcentage de cellules MIB1 + x par la quantité d'AgNOR dans les cellules MIB1 positives (MIB1+ x AgNORMIB1+) (Brugal 1995). Il s'agissait de notre étude préliminaire d'une population hétérogène, au cours de laquelle nous avons évalué l'intérêt pronostique de l'index MIB1, les AgNORs et la combinaison des deux paramètres.

Nos résultats ont principalement montré que l'index MIB1 n'était pas corrélé au pronostic, alors que les AgNORs totaux, les AgNORs dans les cellules MIB1+ et MIB1-, et l'index de prolifération étaient fortement corrélés au pronostic. Les plus pertinents ont été les AgNORs totaux et le l'index de prolifération.

Les résultats de notre deuxième étude avec double marquage MIB1-AgNORs sont venus confirmer ces résultats préliminaires, malgré une méthodologie, une étude statistique et une population tout à fait différentes. En effet, l'index MIB1 s'est révélé significatif uniquement en analyse univariée pour la survie globale. Les AgNORs totaux et l'index de prolifération IP ont vu leur statut de facteur pronostique indépendant, confirmé par l'analyse multivariée, pour la SG et la SSM pour les AgNORs et pour la SG pour l'index IP200. Par ailleurs, il existait une corrélation entre l'IP 200 et la quantité totale d'Ag NORs ($p < 0,001$). Il en était de même avec la quantité d'AgNORs dans les cellules quiescentes ($p = 0,002$)

Sirri avait montré que les cellules en phase S ou G2 voyaient leur quantité d'AgNOR multiplié par 3.04 par rapport aux cellules en G1 (Sirri 1995). Il devenait donc logique de supposer que les tumeurs avec une fraction de croissance importante associée à une grande vitesse de cycle peuvent avoir une tendance marquée à développer des métastases. Nous avons pu valider cette hypothèse au cours de ce travail

Biesterfeld (2001) a abouti aux mêmes conclusions avec une valeur pronostique sur la survie globale de l'IP, mais également de ses deux composantes, l'index MIB1 et les AgNORs dans les cellules MIB+, en analyse univariée avec un seuil de significativité $p < 0,05$, et multivariée avec un $p < 0,10$. Les valeurs rapportées pour l'IP, par Biesterfeld, sont bien en deçà des nôtres, dû aux AgNORs MIB+, puisque la moyenne de l'index MIB1 est légèrement supérieure dans sa série à la nôtre, 10,8 *versus* 9,1. Pour nous, la moyenne de l'IP était de 185,2 et la médiane de 132,9, alors que pour cet auteur, les chiffres étaient respectivement de 89,9 et de 67,8. Biesterfeld a préconisé la détermination des AgNORs uniquement dans les cellules MIB+ afin de déterminer l'index IP. Par contre il n'a pas défini de seuil pour cet index préférant la combinaison de ses deux composantes pour définir 4 sous groupes à l'évolution différente, comme nous l'avons fait dans notre première étude.

Nous avons montré dans notre deuxième étude que l'IP avec des seuils à 100 et 200 étaient tous deux discriminants pour la survie globale ($p = 0,02$ et $p < 0,0001$) et pour la survie sans métastase ($p = 0,05$ et $0,0001$) mais avec une performance nettement plus marquée pour l'IP200. Dans notre analyse multivariée, nous n'avons inclus que l'IP avec le seuil 200.

Dans notre population, 33 patientes (36,6%) avaient un $IP > 200$, parmi lesquelles 11 ont développé des métastases. Les 3 autres patientes métastatiques avaient toutes un $IP < 100$.

5. Intérêt pronostique de HER2

En 1987, Slamon a identifié pour la première fois HER2 comme facteur de mauvais pronostic dans le cancer du sein (Slamon 1987). Dans une population présentant des ganglions axillaires envahis, l'amplification d'HER2 était corrélée de manière significative à une diminution de la survie sans récidive et de la survie globale, aussi bien en analyse univariée que multivariée. La survie médiane était doublée chez les patientes au statut HER2 négatif par rapport à celles présentant un statut HER2 positif, respectivement 6 ans et 3 ans.

Par la suite, d'autres auteurs ont montré une association entre le statut HER2 positif et une progression tumorale plus rapide, une augmentation du potentiel métastatique, un taux de récidive plus élevé, un temps de rechute plus court et une diminution de la survie (Benz 1993).

Des bases rationnelles biologiques ont été fournies pour étayer ce concept. Des études réalisées *in vitro* ont montré que la modification du génotype apportée par l'amplification HER2 jouait un rôle clé dans la carcinogenèse et le potentiel métastatique. La transfection de copies multiples du gène HER2 au niveau des cellules de cancer du sein MCF7 exprimant de faibles taux d'HER2 ont entraîné une sur expression d'HER2 et des caractéristiques de croissance plus agressives. Ces effets ont été reproduits et démontrés au niveau de plusieurs types de lignées cellulaires (Benz 1993).

Ainsi, l'oncoprotéine HER2 a fait l'objet de nombreux travaux au niveau des 3 versants : comme facteur pronostique, pour sa valeur prédictive de l'efficacité des traitements

systémiques hormonaux ou chimiques et comme guide à la thérapeutique spécifique. Pour Volpi, seul ce dernier paramètre est déjà validé (Volpi 2003).

Pour Denoux, bien que son caractère pronostique soit bien établi, surtout dans les N+, c'est le rôle prédictif de la surexpression d'HER2 qui semble être le plus utile au clinicien pour ses choix thérapeutiques (Denoux, 2003). Le tamoxifène rencontrerait des résistances chez les patientes présentant une surexpression d'HER2, les chimiothérapies à base d'anthracycline seraient plus efficaces que les traitements avec cyclophosphamide, méthotrexate et fluorouracile, taxane plutôt qu'anthracycline chez ces mêmes patientes et surtout le trastuzumab qui ne peut être efficace qu'en cas de surexpression 3+ par IHC ou d'amplification recherchée du gène par FISH ou CISH (Schmidt 2005).

Dans la troisième partie de notre travail, nous avons ainsi souhaité inclure le statut HER2 comme paramètre pronostique, pour en évaluer l'impact. Nous avons donc recherché rétrospectivement la surexpression d'HER2 par IHC uniquement. La particularité de notre population était l'absence d'atteinte ganglionnaire, ce qui n'avait pas été souvent étudié.

Notre taux de tumeurs surexprimant HER2 à 3+ a été de 10%, ce qui est légèrement en deçà des taux habituellement rapportés et qui variaient entre 15 et 30% (St Paul de Vence 2005). Il est néanmoins proche du taux de 10,9% rapporté par Huang, chez les 1362 patientes (Huang 2005) et de 14% rapporté par Trudeau chez 425 patientes, avec et sans atteinte ganglionnaire dans les deux études (Trudeau 2005). Le taux de surexpression à 2+, considéré comme un indicateur de dérive technique a été pour nous de 12,2%, conforme aux recommandations internationales de bonnes pratiques qui fixaient ce taux aux alentours de 10 à 20% (St Paul de Vence 2005).

Nous sommes arrivés à montrer que la surexpression à 3+ d'HER2 était un élément pronostique à la limite de la significativité, lors de l'étude univariée. En étude multivariée, cette surexpression apparaissait comme un paramètre pertinent et indépendant, au niveau de la survie globale. Lorsque l'analyse multivariée incluait un index de prolifération tels les AgNORs totaux ou IP 200, la surexpression d'HER-2 perdait son caractère indépendant.

Nos résultats ont été ainsi conformes à ceux rapportés, dans la littérature, par la majorité des études. Parmi les 81 études répertoriées par Ross (2003), incluant 27 161 patientes, 73 (90%)

représentant 25 166 patientes (92%) ont montré un plus mauvais pronostic en cas de surexpression d'HER2, en analyse univariée ou multivariée. Dans 52 études parmi les 73 (71%), la surexpression d'HER2 était un facteur pronostic indépendant des autres, lors de l'analyse multivariée. Dans 13 études (16%), ce n'était pas le cas, la valeur pronostique n'était retrouvée qu'en étude univariée. Dans 8 études, l'analyse multivariée n'a pas été réalisée (Ross 2003). Dans 8 études (10%), comprenant 1995 patientes, il n'existait aucune corrélation entre le statut HER2 et le pronostic. Parmi elles, 5 études (63%) ont utilisé l'IHC pour détecter la surexpression d'HER2 sur des tissus inclus en paraffine, 2 (25%) ont utilisé l'analyse par Southern Blot, et une (13%) a utilisé la RT-PCR.

Volpi dans une vaste étude incluant uniquement des patientes sans atteinte ganglionnaire (n = 529) et sans traitement systémique, ni hormonal ni chimiothérapie, a trouvé que la surexpression d'HER-2, déterminée par IHC comme dans la grande majorité des études, n'était pas corrélée au pronostic. Pour Volpi, ce facteur devenait pertinent lorsqu'il était appliqué à une population avec un haut index de prolifération, l'index de la Thymidine marquée dans son étude, permettant ainsi de définir un sous-groupe à haut risque de rechute et pour lequel un traitement systémique pourrait être retenu (Volpi 2003).

Certains auteurs, pour expliquer les résultats contradictoires rapportés, ont estimé que la valeur pronostique de la surexpression d'HER2 était dépendante de la méthode utilisée pour mettre en évidence cette surexpression, la méthode FISH se révélant supérieure à IHC, pour les patientes sans atteinte ganglionnaire.

Ainsi, Schmidt (2005) a réalisé une étude rétrospective sur une population de 101 patientes, sans atteinte ganglionnaire, ni traitement systémique adjuvant, chimiothérapie ou hormonothérapie. Il a recherché la surexpression d'HER2 par IHC et par FISH, qui était présente dans respectivement 20% et 17%. Cet élément recherché par IHC ne s'était révélé pertinent qu'en étude univariée et de façon un peu limitée ($p = 0,059$ pour la DFS). En étude multivariée, la surexpression d'HER2 uniquement déterminée par FISH s'était montrée comme étant un facteur pronostic indépendant, aussi bien pour la survie sans récurrence que pour la mortalité par cancer. Schmidt a également réalisé ses calculs en intégrant les patientes 2+ en IHC / FISH+, sans arriver à retrouver un intérêt pronostic lors de l'analyse multivariée. Pour cet auteur, la méthode FISH était la méthode de référence malgré son caractère plus coûteux en argent et en temps, ce qui est déjà le cas aux Etats-Unis.

6. Intérêt pronostique des embolies vasculaires péri-tumorales

De nombreuses études ont montré une valeur péjorative à l'invasion vasculaire constatée dans la pièce opératoire, notamment chez les patientes sans atteinte ganglionnaire (De Mascarel 1998, Hansen 2000, Colpaert 2001, Westenend 2005, Trudeau 2005). Cette invasion vasculaire doit être à distance de la tumeur principale et son évaluation reste encore très opérateur dépendant (Fitzgibbons 2000). Néanmoins Trudeau a rapporté une concordance de 90% entre les pathologistes de leur structure (2005). Hayes (2005) a considéré que la reproductibilité était faible, et constituait le principal frein à son utilisation en pratique quotidienne. Dans certaines études, ce critère n'a jamais été retenu comme facteur pronostique (Neville 1992) ou n'a pas été intégré dans l'analyse multivariée (Colpaert 2001).

Nous avons observé un taux de 13,3% de lésions avec des embolies lymphatiques alors que Trudeau a rapporté un taux de 26% dans le sous groupe sans atteinte ganglionnaire (2005), sans différencier les embolies sanguines et lymphatiques.

Nous avons montré dans notre étude principale, qu'il s'agissait d'un facteur pronostique pertinent aussi bien en étude univariée et multivariée que sur la survie sans métastases et la survie globale. Nos résultats viennent confirmer ceux rapportés par Westenend (2005) pour les patientes sans atteinte ganglionnaire et par Trudeau (2005) pour une population avec et sans atteinte ganglionnaire. Pour cette dernière équipe, la présence d'embolies a été associée à une récurrence plus rapide ($p < 0,001$) et à une mortalité par cancer plus importante ($p = 0,0046$) aussi bien pour l'analyse univariée que multivariée (Trudeau 2005).

L'invasion lymphatique fait déjà partie des indications de chimiothérapie pour cette population au Canada (The steering committee 1998). A la conférence de Consensus de St Gallen 2005, l'existence d'embolies vasculaires péri-tumorales, a été retenue comme facteur imposant une chimiothérapie, classant ainsi les patientes dans le groupe à risque intermédiaire (Goldhirsch 2005).

Conclusions

Une meilleure appréciation de l'agressivité des tumeurs mammaires est encore nécessaire afin de réserver l'administration des drogues cytotoxiques aux patientes qui en tireront un bénéfice certain. Actuellement nous sommes tout à fait conscients que nous sur-traitons les patientes, faute de marqueurs pronostiques performants.

Une homogénéisation des pratiques est recommandée, avec notamment l'instauration de « réunions de concertation pluridisciplinaire » réunissant les différentes compétences afin de décider de la stratégie thérapeutique à mettre en place. La rédaction d'un thésaurus commun par les acteurs régionaux est également recommandée.

Dans le cancer du sein, les éléments utilisés en pratique courante pour décider d'une chimiothérapie adjuvante, sont ceux définis lors de la conférence de consensus de St Gallen de 2003 : l'âge inférieur à 35 ans, la taille histologique de la lésion infiltrante de plus de 20 mm, le score de SBR au delà de 1, l'absence d'expression des récepteurs hormonaux aux estrogènes et/ou à la progestérone et l'atteinte ganglionnaire axillaire (Goldhirsch 2003). Depuis peu les conclusions de la conférence de St-Gallen 2005 ont été publiées intégrant les emboles lymphatiques et la surexpression d'HER2 dans les critères pronostiques (Goldhirsch 2005).

D'autres analyses sur la tumeur sont réalisées systématiquement dans notre Laboratoire : la recherche d'emboles lymphatiques et d'une surexpression de HER2, la détermination du pourcentage de cellules marqués par le MIB1 et de la ploïdie avec la recherche de clones minoritaires. Néanmoins, toutes ces informations restent inexploitées et orphelines, sans impact sur la stratégie thérapeutique. Elles sont parfois utilisées dans des cas un peu limite, afin de décider d'une éventuelle chimiothérapie. Dans notre travail, nous nous y sommes intéressés avec deux fils conducteurs : d'une part, l'intérêt pronostique de la ploïdie et plus particulièrement la détection de clones minoritaires par cytométrie d'images et d'autre part, le double marquage par le MIB1 et les AgNORs permettant ainsi de définir un nouvel index de prolifération.

Au cours de la dernière décennie, l'étude de la ploïdie a connu d'importants développements avec l'utilisation d'analyseurs d'images automatisés, permettant aux pathologistes d'étudier sur un seul échantillon, de façon rapide, l'hétérogénéité intra-tumorale. L'utilisation de la

cytométrie d'images a permis de réaliser une analyse plus étendue des cellules, de déterminer l'existence de clones minoritaires et d'éviter les artéfacts. Cette étude a gagné en précision.

Nous avons ainsi montré que la détection de clones minoritaires n'était possible dans plus de la moitié des cas que grâce à cette technologie. Nous avons également montré que l'aneuploïdie au sens large (non diploïde) était un facteur de mauvais pronostic, au niveau de la survenue de métastases. Néanmoins, nous avons constaté comme d'autres équipes, que la détermination concomitante d'index de prolifération et leur inclusion dans l'analyse multivariée, occultait complètement ce facteur « aneuploïdie ».

La détection des rares cellules ou clones à contenu de plus de 5c ADN qui nous avait semblé être pertinente lors de notre étude préliminaire, s'est finalement révélée sans impact pronostique dans notre population sans atteinte ganglionnaire.

La recherche d'une combinaison de plusieurs paramètres au niveau cellulaire, notamment dans les cellules aneuploïdes, comme proposé par Shackney (2004), pourrait être un axe de recherche intéressant.

L'index MIB1 indique le pourcentage de cellules impliquées dans le cycle. Sa détermination isolée apporte une information intéressante mais sans réelle application dans la stratégie thérapeutique. Sa place dans l'avenir, pourrait être de remplacer, le compte mitotique en fournissant une donnée fiable et reproductible, plus facilement contrôlable par les indicateurs de qualité, et incorporable dans un score pronostique. Cet index a une place de choix dans l'étude des prélèvements biopsiques de petite taille, qui ne permettent pas de déterminer un index mitotique ou une phase S fiables (Caly 2004).

En revanche il s'agit d'un index essentiel pour le calcul de l'index de prolifération tel que l'a défini Brugal et que nous avons repris et appliqué dans notre travail. Ceci implique la détermination de l'index MIB1 pour l'ensemble de la population cellulaire et la quantification des AgNORs dans les cellules MIB1 positives.

Les AgNORs ont bénéficié ces dernières années d'améliorations techniques importantes en devenant applicables sur des préparations formolées et en permettant le calcul de leur surface plutôt que le compte de points, grâce à des analyseurs d'images. Nous avons montré l'intérêt

pronostique de la détermination des AgNORs totaux. Pourtant cette technique mise au point dans notre Laboratoire, n'est plus réalisée en pratique courante dans la pathologie néoplasique mammaire. Sa réintroduction nous semble pertinente, même s'il reste à définir le seuil pronostique optimal.

Dans ce travail, nous avons décrit une nouvelle technique permettant de quantifier les AgNORs dans les cellules MIB1 positives. Il s'agit d'une méthode adaptée à l'étude cytométrique par analyseur d'images. Ceci nous a permis de déterminer l'index de prolifération $IP = MIB1+ \times AgNORsMIB+$. Nous avons montré qu'il était corrélé à la survie globale en analyse multivariée et que le seuil à 200 était le plus pertinent. Pour la survie sans métastase, l'IP 200 garde une très forte valeur pronostique ($p = 0,0001$) en analyse univariée. Mais ce facteur n'est pas indépendant des autres facteurs ($p=0,09$), notamment par rapport à la quantité totale d'AgNORs qui semble être plus pertinent lors de l'analyse multivariée ($p = 0,01$).

La quantification des AgNORs totaux et la détermination de l'index de prolifération fournissent chez les patientes sans atteinte ganglionnaire, une information pronostique supplémentaire, pouvant être intégré dans un schéma décisionnel de chimiothérapie adjuvante.

Références
Bibliographiques

- 1- AKIMAYA T, SUDO C, OGAWARA H, TOYOSHIMA K, YAMAMOTO T.
The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity.
Science 1986 ; 232 :1644-6
- 2- ALLRED DC, CLARK GM, MOLINA R.
Overexpression of HER2/neu and its relationship with order prognostic factors change during the progression of in situ to invasive breast cancer.
Human Pathol 1992 ; 23 : 974-9
- 3- ALROY I, YARDEN Y.
The erbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis : signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions.
FEBS Letters 1997 ; 410 : 83-6
- 4- ANDREASEN PA, KJOLLER L, CHRISTENSEN L, DUFFY MJ.
The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis : a review
Int J Cancer 1997; 72 : 1-22
- 5- ANON.
Recommandations européennes pour l'assurance de qualité dans le cadre du dépistage mammographique du cancer du sein. Rapport des anatomopathologistes du groupe de travail "dépistage du cancer du sein" de l'Union européenne.
Ann Pathol 1996 ; 16 : 315-33
- 6- ARANDA FI, LAFORGA JB
Cellular proliferation in breast ductal infiltrating carcinoma. Correlation with clinical and histopathological variables
Pathol Res Pract 1997 ; 163 : 683-8
- 7- ARCHER SG, ELIOPOULOS A, SPANDIDOS D, BARNES D, ELLIS IO, BLAMEY RW et al.
Expression of ras p21, p53 and c-erbB-2 in advanced breast cancer and response to first line hormonal therapy.
Br J Cancer 1995; 72 : 1259-66

- 8- AUBELE M, AUER G, GRAIS P, JUTTING U, RODENAKCKER K, VOSS A.
Nucleolus organiser regions (AgNOR) in ductal mammary carcinoma. Comparison with classification and prognosis.
Path Res Pract 1994 ; 90 : 127-37

- 9- BARGMANN CI, HUNG MC, WEINBERG RA.
The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein.
Nature 1986; 319 : 226-30

- 10- BASELGA J.
Clinical trials of Herceptin (trastuzumab).
Eur J Cancer 2001 ; 37 : S18-S24

- 11- BAST RC Jr, RAVADIN P, HAYES DF et al.
2000 update of recommendations for the use of tumors markers in breast and colorectal cancer : clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology .
J Clin Oncol 2001 ; 19 : 1865-78

- 12- BENZ CC, SCOTT GK, SARUP JC, JOHNSON RM, TRIPATHY D, CORONADO E et al.
Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transferred with Her-2/neu.
Breast Cancer Res Treat 1993 ;24 : 85-95

- 13- BERGERS E, VAN DIEST PJ, BAAK JPA.
Tumor heterogeneity of DNA cell cycle variables in breast cancer measured by flow cytometry.
J Clin Pathol 1996 ; 49: 931-7

- 14- BIESTERFELD S, FAROKHZAD F, KLUPPEL D, SCHNEIDER S, HUFNAGL P.
Improvement of breast cancer prognostication using cell kinetic-based silver-stainable Nucleolar organizer region quantification of the MIB1 positive tumor cell compartment
Virchows Arch 2001 ; 438 : 478-84

- 15- BIGRAS G, MARCELPOIL R, BRAMBILLA E, BRUGAL G.
Interest of targeting AgNOR measurement in cycling cells : in vivo cell kinetic evaluation of non-small cell lung cancer.
Anal Cell Pathol 1996 ; 11 : 183-98

16- BLOOM HJG, RICHARDSON WW.

Histologic grading and prognosis in breast cancer : a study of 1409 cases of which 539 have been followed for 15 years.

Br J Cancer 1957 ; 11: 359-77

17- BOYLE P, FERLAY J (a).

Cancer incidence and mortality in Europe in 2004.

Ann Oncol 2005 ; 16 : 481-8

18- BOYLE P (b).

Breast cancer control : sign of progress but more work required.

The breast 2005 ; 14 : 429-38

19- BRIDGER JM, KILL IR, LICHTER P.

Association of pKi-67 with satellite DNA of the human genome in early G1 cells.

Chromosome Res 1998 ; 6 : 13-24

20- BROWN DC, GATTER KC.

Ki67 protein : the immaculate deception ?

Histopathol 2002 ; 40 : 2-11

21- BRUGAL G.

Quantitative microscopy and tumor cell proliferation.

Bull Cancer 1995 ; 82 (suppl 5) : 511s-517s

22- BRYANT J, FISCHER B, GÜNDÜZ N, COSTANTINO JP, EMIR B.

S-phase fraction combined with other patient and tumor characteristics for the prognosis of node-negative, estrogen-receptor-positive breast cancer.

Breast Cancer Res Treat 1998 ; 51 : 239-53

23- CABARROT E.

Histoire naturelle des cancers du sein.

Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris), Gynécologie, 865-A-10, 2000, 17p

- 24- CALY M, GENIN P, AL GHUZLAN A, ELIE C, FRENEAUX P, KLIJANIENKO J et al.
Analysis of correlation between mitotic index, MIB1 score and S-phase fraction as proliferating markers in invasive breast carcinoma. Methodological aspects and prognostic value in a series of 257 cases.
Anticancer Research 2004 ; 24 : 3283-8
- 25- CARTER CL, ALLEN C, HENSON DE.
Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24 740 breast cancer cases. Cancer 1989, 63 : 181-7
- 26- CLAHSSEN PC, VAN DE VELDE CJ, DUVAL C, PALLUD C, MANDARD AM, DELOBELLE-DE ROIDE A et al.
P53 protein accumulation and response to adjuvant chemotherapy in premenopausal women with node-negative early breast cancer.
J Clin Oncol 1998 ; 16 : 470-9
- 27- CATTORETTI G, BECKER MH, KEY G, DUCHROW M, SCHLUTER C, GALLE J et al.
Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB1 and MIB3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections.
J Pathol 1992; 168 : 357-63
- 28- CLARK GM, DRESSLER LG, OWEN MA, POUNDS G, OLDAKER T, MCGUIRE WL
Prediction of relapse and survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry.
N Engl J Med 1989 ; 320 : 627-33
- 29- CLAYTON F.
Pathologic correlates of survival in 378 lymph node-negative infiltrating ductal breast carcinomas : mitotic count is the best single predictor.
Cancer 1991 ; 68 : 1309-17
- 30- COLPAERT C, VERMEULEN P, JEURIS W, VAN BEEST P, GOOVAERTS G, WEYLER J et al.
Early distant relapse in “ node negative” breast cancer patients is not predicted by occult axillary lymph node metastases, but by the features of the primary tumour.
J Pathol 2001; 193 : 442-9

- 31- CORNEZ N, PICCART MJ.
Cancer du sein et Herceptin.
Bull Cancer 2000 ; 87 : 847-58
- 32- CREMER T, KURZ A, ZIRBEL R, DIETZEL S, RINKE B, SCHROCK E et al.
Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus.
Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1993 ; 58 : 777-92
- 33- DALTON LW, PAGE DL, DUPONT WD.
Histologic grading of breast carcinoma. A reproductibility study.
Cancer 1994 ; 73 : 2765-70
- 34- DE LAURENTIIS M, APRNIO G, MASSARELLI E, RUGGIERO A, CARLOMAGNIO C,
CIARDIELLO F et al.
A metaanalysis of the interaction between Her-2/neu and the reponse to endocrine therapy (ET) in
metastatic breast cancer.
Clin Cancer Res 2005 ; 11 : 4741-8
- 35- DE MASCAREL I, BONICHON F, DURAND M, MAURIAC L, MAC GROGAN G,
SOUBEYRAN I et al.
Obvious peritumoral emboli : an elusive prognostic factor reappraised. Multivariate analysis of
1320 node-negative breast cancers
Eur J Cancer 1998 ; 34 : 58-65
- 36- DE PLACIDO S, CARLOMAGNO C, DE LAURENTIIS M, BIANCO AR.
Breast c-erbB2 expression predicts tamoxifen efficacy in breast cancer patients.
Cancer Res Treat 1998 ; 52 : 55-64
- 37- DENOUX Y.
Marqueurs biologiques pronostiques et/ou prédictifs
La Lettre du Sénologue 2003 ; 19 : 14-6
- 38- DERENZINI M, THIRY M, GOESSENS G.
Ultrastructural cytochemistry of the mammalian cell nucleolus.
J Histochem Cytochem 1990; 38 : 1237-56

- 39- DERENZINI M, TRERE D, O'DONOHUE MF, PLOTON D.
Interphase nucleolar organiser regions in tumour pathology.
In :
Molecular Biology in Cellular Pathology .
John Crocker, Paul G Murray.
Clinchester : Wiley ; 2003
- 40- DERENZINI M, CECCARELLI C, SANTINI D, TAFFURELLI M, TRERE D.
The prognostic value of the AgNOR parameter in human breast cancer depends on the pRb and p53 status.
J Clin Pathol 2004 ; 57: 755-61
- 41- DETTMAR P, HARBECK N, THOMSEN C, PACHE L, ZIFFER P, JANICKE F et al.
Prognostic impact of proliferation-associated factors MIB1 (Ki 67) and S phase in node -negative breast cancer.
Br J Cancer 1997; 75 : 1525-33
- 42- DOMAGALA W, MARKIEWSKI M, HAREZGA B, DUKOWICZ A, OSBORN M.
Prognostic significance of tumor cell proliferation rate as determined by the MIB1 antibody in breast carcinoma : its relationship with vimentin and p53 protein.
Clin Cancer Res 1996 ; 2 : 147-54
- 43- DRESSLER LG, SEAMER LC, OWENS MA, CLARK GM, MCGUIRE WL
DNA flow cytometry and prognosis factor in 1331 frozen breast cancer specimens
Cancer 1988 ; 61 : 420-7
- 44- DUCHROW M, SCHLÜTER C, WOHLBERG C, FLAD H-D, GERDES J.
Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67.
Cell Prolif 1996 ; 29 : 1-12
- 45- EISENHAUER EA.
From the molecule to the clinic. Inhibiting HER2 to treat breast cancer.
N Engl J Med 2001 ; 334 : 841-42

46- ELSTON CW, ELLIS IO.

Pathological prognostic factors in breast cancer : experience from a large study with long-term follow up.

Histopathology 1991; 19 : 403-10

47- ENDL E, GERDES J.

The Ki-67 protein : fascinating forms and an unknown function

Exp.Cell Res 2000 ; 257 : 231- 7

48- ESPIE M, GORINS A.

Le sein. Du normal au pathologique : état de l'Art.

Paris : ESKA ; 2001

49- ESPIE M.

Facteurs pronostiques et cancer du sein sans envahissement ganglionnaire : dépassera-t-on le TNM ?

In :

Dogmes et doutes. Revue critique des standards en sénologie

Dir. Par Hubert Crouet et Thierry Delozier

Courbevoie : Da Te Be SAS ; 2005 : 176-9

50- FERLAY J, BRAY F, PISANI P, PARKIN DM.

Globocan 2002. Cancer incidence, mortality, and prevalence worldwild. IARC CancerBase N°.5, version 2.0 Lyon : IARC Press 2004

51- FISHER B, BAUER M, WICKERHAM CK et al.

Relation of number of positives axillary nodes to prognosis of patients with primary breast cancer.

Cancer 1983 ; 52 : 1551-7

52- FISHER B, REDMOND C, FISHER ER.

Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differenciation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients : findings from National Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06.

J Clin Oncol 1988 ; 25 : 1076-87

- 53- FITZGIBBONS PL, PAGE DL, WEAVER D, THOR AD, ALLRED DC, CLARK GM et al
Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus statement 1999.
Arch Pathol Lab Med 2000 ; 124 : 966-78
- 54- FLETCHER RH, FLETCHER SW, WAGNER EH.
Epidémiologie clinique.
Paris, Pradel, Paris ; 1998
- 55- FOMPROIX N, GEBRANE-YOUNES J, HERNANDEZ-VERDUN D.
Effects of anti-fibrillarin antibodies on building of functional nucleoli at the end of mitosis.
J Cell Sci 1998 ; 11 : 359-72.
- 56- FRIERSON HF, WOLBER RA, BEREAN KW, FRANQUEMONT DW, GAFFEY MJ, BOYD
JC.
Interobserver reproductibility of the Nottingham modifications of Bloom and Richardson
histologic grading scheme for infiltrating ductal carcinoma.
Am J Clin Pathol 1995 ; 103 : 195-8
- 57- GENESTIE C, ZAFRANI B, ASSELAIN B, FOURQUET A, ROZAN S, VALIDIRE P et al
Comparison of the prognostic value of Scarff-Bloom-Richardson and Nottingham histological
grades in a series of 825 cases of breast cancer : major importance of the mitotic count as a
component of both grading systems.
Anticancer Res 1998; 18 : 571-6
- 58- GERDES J, SCHWAB U, LEMKE H, STEIN H.
Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated
with cell proliferation.
Int J Cancer 1983 ; 31 : 13-20
- 59- GERDES J, LEMKE H, BAISCH H, WACKER H-H, SCHWAB U, STEIN H.
Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the
monoclonal antibody Ki-67.
J Immunol 1984 ; 133 : 1710-5

- 60- GOLDHIRSCH A, WOOD WC, GELBER RD, COATES AS, THURLIMANN B, SENN HJ.
Meeting highlights : updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer
J Clin Oncol 2003 ; 21 : 3357-65
- 61- GOLDHIRSCH A, GLICK JH, GELBER RD, COATES AS, THURLIMANN B, SENN HJ,
Panel members.
Meeting highlights : international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005.
Ann Oncol 2005; 16 : 1569-83
- 62- GONZALEZ-VELA MC, GARIJO MF, FERNANDEZ F, VAL-BERNAL JF
MIB1 proliferation index in breast infiltrating carcinoma : Comparison with other proliferative markers and association with new biological prognostic factors
Histol Histopathol 2001 ; 16 : 339-406
- 63- GIMENEZ-MAS J, GALLEGO-CALVO P, SANZ-MONCASI P, RIOS-MITCHELL J, VALLERO I, SANZ-ANQUELA M et al.
AgNOR evaluation by image processing methods. Staining modifications and results in 126 invasive ductal breast carcinomas.
Analyt Quant Cytol Histol 1996 ; 18 : 9-18
- 64- GRADISHAR WJ.
The future of breast cancer : the role of prognostic factors
Breast Cancer Res Treat 2005 ; 89 : S17-S26
- 65- GUMP FE.
Multicentricity in early breast cancer.
Semin Surg Oncol 1992 ; 8 : 117-21
- 66- HAERSLEV T, JACOBSEN GK, ZEDELER K.
Correlation of growth fraction by Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry with histopathological parameters and prognosis in primary breast carcinomas.
Breast Cancer Res Treat 1996 ; 37 : 101-13

- 67- HANSEN S, GRABAU DA, SORENSEN FB, BAK M, VACH W, ROSE C.
The prognostic value of angiogenesis by Chalkey counting in a confirmatory study design in 836 breast cancer patients.
Clin Cancer Res 2000 ; 6 : 139-46
- 68- HARVEY JM, CLARK GM, OSBORNE CK, ALLRED DC.
Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer.
J Clin Oncol 1999 ; 17 : 1474-81
- 69- HAYES DF, BAST RC, DESCH CE, FRITSCHE H, KEMENY NE, JESSUP JM et al.
Tumor marker utility grading system : a framework to evaluate clinical utility of tumor markers.
J Natl Cancer Inst 1996 ; 88 : 1456-66
- 70- HAYES DF, TROCK B, HARRIS AL.
Assessing the clinical impact of prognosis factor : When is “statistically significant” clinically usefull ?
Breast Cancer Res Treat 1998 ; 52 : 305-19
- 71- HAYES DF.
Prognostic and predictive factors revisited.
The breast 2005 ; 14 : 493-9
- 72- HEDLEY DM, CLARK GM, CORNELISSE C, KILLANDER D, KUTE T, MERKEL D.
Consensus revue of the clinical utility of DNA cytometry in carcinoma of the breast. Breast Cancer Res Treat 1993 ; 28 : 55-9
- 73- HEIDEBRECHT HJ, BUCK F, HAAS K, WACKER HH, PARWARESCH R.
Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on ‘Ki-67’ proteins
Cell Prolif 1996; 29 : 413-25
- 74- HOFMANN K, BUCHER P.
The FHA domain : a putative nuclear signalling domain found in protein kinases and transcription factors.
Trends Biochem.Sci. 1995 ; 20 : 347-9

- 75- HUANG HJ, NEVEN P, DRIJKONINGEN M, PARIDAENS R, WILDIERS H, VAN LIMBERGEN E et al.
Association between tumour characteristics and HER-2/neu by immunohistochemistry in 1362 women with primary operable breast cancer.
J Clin Pathol 2005 ; 58 : 611-6
- 76- JACOBS TW, GOWN AM, YAZIJI H, BARNES MJ, SCHMITT S J.
Specificity of HerceptTest in determining Her-2/neu status of breast cancers using the United States Food and drug Administration-approved system scoring system.
J Clin Oncol 1999 ; 17 : 1983-7
- 77- JANICKE F, PRECHTL A, THOMSEN, HARBECK N, MEISNER C, UNTCH M et al.
Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type1.
J Natl Cancer Inst 2001 ; 93 : 913-20
- 78- JANSEN RL, HUPPERETS PS, ARENDS JW, JOOSTEN-ACHJANIE SR, VOLOVICS A, SCHOUTEN HC et al.
MIB-1 labelling index is an independent prognostic marker in primary breast cancer.
Br J Cancer 1998 ; 78 : 460-5
- 79- JENICEK M, CLEROUX R.
Epidémiologie clinique.
Paris : Maloine ; 1985
- 80- JENSEN V, LADEKARL M, HOLM-NIELSEN P, MELSEN F, SOERENSEN FB.
The prognostic value of oncogenic antigen 519 (OA-519) expression and proliferative activity detected by antibody MIB-1 in node-negative breast cancer.
J Pathol 1995 ; 176 : 343-52
- 81- KAUFMAN M, SCHARL A.
Do we need better prognosis factors in node negative breast cancer ?
Eur J Cancer 2000 ; 36 : 298-301

82- KESHGEGIAN AA, CANAAN A.

Proliferation markers in breast carcinoma. Mitotic figure count, S-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and MIB1.

Am J Clin Pathol 1995 ; 104 : 42-9

83- KOSCIELNY S, TUBIANA M, LE MG, VALLERON AJ, MOURIESSE H, CONTESSO G et al.

Breast cancer. Relationship between the size of the primary tumor and the probability of metastatic dissemination.

Br J Cancer 1984 ; 49 : 709-15

84- KROGER N, MILDE-LANGOSCH K, RIETHDORF S, SCHMOOR C, SCHUMACHER M, ZANDER AX et al.

Prognosis and predictive effects of immunohistochemical factors in high-risk primary breast cancer patients.

Clin Cancer Res 2006 ; 12 : 159-68

85- KRUGER S, STAHLHUT M, MULLER H.

Cell cycle-dependant AgNOR analysis in invasive breast cancer.

Anal Quant Cytol Histol 2000 ; 22 : 358-63

86- KUTE TE, RUSSELL GB, ZBIERANSKI N, LONG R, JOHNSTON S, WILLIAMS H et al.

Prognostic markers in node-negative breast cancer : a prospective study.

Cytometry 2004 ; 59 B : 24-31

87- L'ALLEMAIN G.

La famille des récepteurs HER-ErbB et ses ligands : mécanismes d'activation, signalisations et dérégulations dans le cancer

Bull Cancer 2003 ; 90 : S179-85

88- LE DOUSSAL V, TUBIANA HULIN M, FRIEDMAN S, HACENE K, SPYRATOS F, BRUNET M.

Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR). An improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas.

Cancer 1989 ; 64 : 1914-21

- 89- LEONARDI E, GIRLANDO S, SERIO G, MAURI FA, PERRONE F, SCAMPI S et al.
PCNA and Ki67 expression in breast carcinoma : correlation with clinical and biological variables
J Clin Pathol 1992, 45 : 416-19
- 90- LEONG ASY, VINYUVAT S, SUTHIPINTAWONG C, MILIOS J.
A comparative study of cell proliferation markers in breast carcinomas.
J Clin Pathol Mol Pathol 1995 ; 48 : 83-7
- 91- LOOK MP, VAN PUTTEN WL, DUFFY MJ, HARBECK N, CHRISTENSEN IJ, THOMSEN C et al.
Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients
J Natl Cancer Inst 2002 ; 94 : 116-28
- 92- MACCALLUM DE, HALL PA.
The location of pKi-67 in the outer dense fibrillary compartment of the nucleolus points to a role in ribosome biogenesis during the cell division cycle.
J Pathol 2000 ; 190 : 537-44
- 93- MACGROGAN G, MAURIAC L, DURAND M, BONICHON F, TROJANI M, de MASCAREL I et al.
Primary chemotherapy in breast invasive carcinoma: predictive value of immunohistochemical detection of hormonal receptors, p53, c-erb B-2, MIB1, Ps2 and GST pi.
Br J Cancer 1996 ; 74 : 1458-65
- 94- MANTEL N.
Ranking procedures for arbitrarily restricted observation.
Biometrics 1967 ; 21 : 65-78
- 95- MARTIN PM, SHERIDAN PJ.
Towards a new model for mechanism of action of steroids.
J Steroid Biochem 1982 ; 16 : 215-30

96- MARTIN PM.

"25 ans d'évolution" : Récepteurs hormonaux et pathologie mammaire (Marseille, 1980), hormones et sein (Paris, 1990), sein , hormones et antihormones (Nancy, 2004).

In :

Sein, hormones et antihormones

Dir. Par Anne Lesur, Yves Kessler et Jean-Luc Verhaeghe

Puteaux : Da Te Be SAS ; 2004 : 22-45

97- MC SHANE IM, DOUGLAS GA, SAUERBREI W.

Identification of clinically useful cancer prognostic factors : what are we missing ?

J Natl Cancer Inst 2005 ; 97 : 1023-5

98- MISTELI T.

Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing : nuclear architecture meets nuclear function.

J Cell Sci 2000 ; 113 : 1841-9

99- MITCHELL MS, PRESS MF

The role of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization for HER-2/neu in assessing the prognosis of breast cancer.

Semin Oncol 1999 ; 26 (S12) : 108-16

100- MOLINO A, MICCIOLO R, TURAZZA M, BONETTI F, PIUBELLO Q, BONETTI A, et al.

Ki-67 immunostaining in 322 primary breast cancers : association with clinical and pathological variables and prognosis.

Int J Cancer 1997 ; 74 : 433-7

101- MOTE PA, BARTOW N, TRAN N, CLARKE CL.

Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis.

Breast cancer Res Treat 2002 ; 72 : 163-72

102- MOUREAU-ZABOTTO L, BOUCHET C, CESARI D, UZAN S, LEFRANC JP, ANTOINE M et al.

Combined flow cytometry determination S-phase fraction and DNA ploidy is an independent prognostic factor in node-negative invasive breast cancer : analysis of a series of 271 patients with stage I and II breast cancer.

Breast cancer Res Treat 2005 ; 91 : 61-71

- 103- MULAC-JERICEVIC B, MULLINAX RA, DE MAYO FJ, LYDON JP, CONEELY OM.
Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform.
Science 2000 ; 289 : 1751-4
- 104- MUNAKATA S, HENDRICKS JB.
A multilabeling technique for simultaneous demonstration and quantitation of Ki-67 and nucleolar organizer regions (AgNORs) in paraffin-embedded tissue.
J Histochem Cytochem. 1994 ; 42 :789-3
- 105- NEVILLE AM, BETTELHEIM R, GELBER RD, SAVE-SODERBERGH J, DAVIS BW, REED R et al.
Factors predicting treatment responsiveness and prognosis in node-negative breast cancer. The international (Ludwig) breast cancer study group
J Clin Oncol 1992 ; 10 : 696-705
- 106- NOGUSHI M, THOMAS M, KITAGAWA H, KINOSHITA K, OHTA N, MIYAZALI I et al.
Argyrophilic nucleolar organiser regions in breast carcinoma : correlation with clinicopathological and biological variables and prognostic value.
Int J Oncol 1993 ; 2 : 203-7
- 107- NOGUCHI S, AIHARA T, KOYAMA H, MOTOMURA K, INAJI H, IMAOKA S.
Discrimination between multicentric and multifocal carcinomas of the breast through clonal analysis.
Cancer 1994 ; 74 : 872-7
- 108- ÖFNER D, BANKFALVI A, RIEHEMAN K, BIER B, BÖCKER W, SCHMID K.
Wet autoclave pretreatment improves the visualization of silver stained nucleolar organizer region associated proteins in routinely formalin fixed and paraffin embedded tissues.
Mod Pathol 1994 ; 7 : 946-50
- 109- OLIVOTTO IA, JACKSON JS, MATES D, ANDERSEN S, DAVIDSON W, BRYCE CJ et al.
Prediction of axillary lymph node involvement of women with invasive breast carcinoma : a multivariate analysis.
Cancer 1998 ; 83 : 948-55

- 110- OSTROWSKI ML, CHAKRABORTY S, LAURICIA R, BROWN R, GREENBERG SD.
Quantitative image analysis of MIB1 immunoreactivity. A comparison with flow cytometric assessment of proliferative activity in invasive carcinoma of the breast.
Anal Quant Cytol Histol 1995 ; 17 : 15-24
- 111- PAIK S, TCHAN-CHIU E, BRYAN J.
Successful quality assurance program for HER-2 testing in the NSABP trial for Herceptin.
Breast Cancer Res Treat 2002 ; 76 : S31
- 112- PARADISO A, SCHITTULLI F, CELLAMARE G, MANGIA A, MARZULLO F, LORUSSO V et al.
Randomized clinical trial of adjuvant Fluouracil, Epirubicin and Cyclophosphamide chemotherapy for patients with fast-proliferating, node-negative breast cancer.
J Clin Oncol 2001 ; 19 : 3929-37
- 113- PAULETTI G, DANDEKAR S, RONG H, RAMOS L, PENG H, SESHARDI S et al.
Assessment of methods for tissue-based detection of HER-2/neu alteration in human breast cancer : a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunochemistry.
J Clin Oncol 2000 ; 18 : 3651-64
- 114- PENAULT-LLORCA F.
Récepteur du facteur de croissance épidermique : méthodes d'évaluation du statut et expression tumorale.
Bull Cancer 2003 ; 90 : S186-S191
- 115- PFISTERER J, KOMMOS F, SAUERBREI W, MENZEL D, KIECHLE M, GIESE E et al.
DNA flow cytometry in node-positive breast cancer: Prognostic value and correlation with morphologic and clinical factors.
Anal Quant Cytol Histol 1995 ; 17 : 406-12
- 116- PICHON MF, BROET P, MAGDELENAT H, DELARUE JC, SPYRATOS F, BASUYAU JP et al.
Prognostic value of steroid receptors after long term follow up of 2257 operable breast cancers.
B J Cancer 1996 ; 73 : 1545-51

- 117- PINDER SE, WENCYK, SIBBERING DM, BELL JA, ELSTON CW, NICHOLSON R et al.
Assessment of the new proliferation marker MIB1 in breast carcinoma using image analysis :
association with other prognostic factors and survival
Br J Cancer 1995 ; 71 : 146-9
- 118- PINKAS-KRAMARSKI R, SOUSSAN L, WATERMAN H.
Diversification of neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by
combinatorial receptor interactions
EMBO J 1996 ; 15 : 2452-67
- 119- PINKAS-KRAMARSKI R, SHELLY M, GUARINO BC.
ErbB tyrosine kinases and the two neuregulin families constitute a ligand-receptor network.
Mol Cell Biol 1998 ; 18 : 6090-101
- 120- PLOTON D, MENAGER M, JEANNESSEON P, HIMBER G, PIGEON F, ADNET JJ.
Improvement of the staining and the visualisation of argyrophilic proteins of nucleolar organizer
regions at the optical level.
Histochem J 1986; 18 : 5-14
- 121- PLOTON D, GILBERT N, MENAGER M, KAPLAN H, ADNET JJ.
Three-dimensional co-localization of nucleolar argyrophilic components and DNA in cell nuclei
by confocal microscopy.
J Histochem Cytochem 1994 ; 42 : 137-48
- 122- PROSPERI E.
Multiple roles of the proliferating cell nuclear antigen : DNA replication, repair and cell cycle
control.
Prog Cell Cycle Res 1997 ; 3 : 193-210
- 123- RECHT A, HOULIHAN MJ.
Axillary lymph nodes and breast cancer. A review.
Cancer 1995 ; 76 : 1491-511

- 124- RHODES A, JASANI B, ANDERSON E.
Evaluation of HER-2/neu immunohistochemical assay sensitivity and scoring on formalin-fixed and paraffin-processed cell lines and breast tumors : a comparative study involving results from laboratories in 21 countries.
Am J Clin Pathol 2002 ; 118 : 408-17
- 125- RIDOLFI RL, ROSEN RR, POR A, KINNE D, MIKE V.
Medullary carcinoma of the breast. A clinico-pathologic study with 10 years follow-up.
Cancer 1977 ; 40 : 1365-85
- 126- ROBBINS P, PINDER S, de KLERK N, DAWKINS H, HARVEY J, STERRETT G et al.
Histological grading of breast carcinomas : a study of interobserver agreement.
Human Pathol 1995 ; 26 : 873-9
- 127- ROMAIN S, LAINE-BIDRON C, MARTIN PM, MAGDELENAT H.
Steroid receptor distribution in 48892 breast cancers. A collaborative study of 7 European Laboratories. The EORTC Receptor Study Group.
Eur J Cancer 1995 ; 31 : 411-7
- 128- ROQUANCOURT A, BERTEAU P.
Tumeurs malignes du sein. Anatomopathologie.
In :
Le sein. Du normal au pathologique : état de l'art.
Dir. Par Marc Espié et André Gorins
Paris : ESKA ; 2001 : 378-87
- 129- ROSENBERG S
New developments in the urokinase-type plasminogen activator system
Expert Opin Ther Targets 2001 ; 5 : 711-22
- 130- ROSS JS, FLETCHER JA, LINETTE GP, STEC J, CLARK E, AYERS M et al.
The HER-2:neu gene and protein in breast cancer 2003 : biomarker and target of therapy.
The Oncologist 2003 ; 8 : 307-25

- 131- ROUSSEL P, ANDRE C, COMAI L, HERNANDEZ-VERDUN D.
The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs.
J Cell Biol 1996; 133 : 235-46
- 132- ROZAN S, VINCENT-SALOMON A, ZAFRANI B, VALIDIRE P, DE CREMOUX P, BERNOUX A et al.
No significant predictive value of c-erb-2 or p53 expression regarding sensitivity to primary chemotherapy or radiotherapy in breast cancer .
Int J Cancer 1998 ; 79 : 27-33
- 133- RUDOLPH P, OLSSON H, BONATZ G, RATJEN V, BOLTE H, BALDETORP B, et al.
Correlation between p53, c-erbB-2, and topoisomerase II alpha expression, DNA ploidy, hormonal receptor status and proliferation in 356 node-negative breast carcinomas : prognostic implications.
J Pathol 1999 ; 187 : 207-16
- 134- SAINT PAUL DE VENCE. RECOMMANDATIONS POUR LA PRATIQUE CLINIQUE.
Oncologie 2005 ; 7 : 342-79
- 135- SARTELET H, LAGONOTTE E, LORENZATO M, DUVAL I, LECHKI C, RIGAUD C et al.
Comparison of liquid based cytology and histology for the evaluation of HER2 status using immunostaining and CISH in breast carcinoma.
J Clin Pathol 2005 ; 58 : 864-71
- 136- SCHECHTER AL, STERN DF, VAIDYANATHAN L.
The neu oncogene : an erb-B-related gene encoding a 185 000-Mr tumour antigen.
Nature 1994 ; 312 : 513-6
- 137- SCHMIDT M, LEWARK B, KOHLSCHMIDT N, GLAWATZ C, STEINER E, TANNER B et al.
Long-term prognostic significance of HER-2/neu in untreated node-negative breast cancer depends on the method of testing.
Breast Cancer Res 2005 ; 7 : R 256-R 266

- 138- SCHOLZEN T, GERDES J.
The Ki-67 protein : from the known and the unknown.
J Cell Physiol 2000 ; 182 : 311-22
- 139- SCHLUTER C, DUCHROW M, WOHLLENBERG C, BECKER MH, KEY G, FLAD H-D et al.
The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67 : a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins.
J Cell Biol 1993 ; 123 : 513-22
- 140- SCHVIMER M, LASH RH, KATZIN WE.
Intratumoral heterogeneity of DNA ploidy in breast carcinomas. A flow cytometric assessment of sampling techniques.
Cytometry 1995 ; 22 : 292-6
- 141- SCHWARTING R.
Little missed markers and Ki67.
Lab Invest 1993 ; 68 : 597-9
- 142- SESHADRI R, LEONG AS, MC CAUL K, FIRGAIRA FA, SETLUR V, HORSFALL DJ.
Relationship between p53 gene abnormalities and other tumour characteristics in breast-cancer prognosis.
Int J Cancer 1996 ; 69 : 135-41
- 143- SHACKNEY SE, BERG G, SIMON SR, COHEN J, AMINA S, POMMERSHEIM W et al.
Origins and clinical implications of aneuploidy in early bladder cancer.
Cytometry 1995 ; 22 :307-16
- 144- SHACKNEY SE, SMITH CA, POLLICE A, BROWN K, DAY R, JULIAN T et al.
Intracellular patterns of HER-2/neu, ras and ploidy abnormalities in primary human breast cancers predict postoperative clinical disease-free survival.
Clin Cancer Res 2004 ; 10 : 3042-52

- 145- SIGURDSSON H, BALDETROP B, BORG A, DALBERG M, FERNO M, KILLANDER D
et al.
Indicators of prognosis in node-negative breast cancer.
N Engl J Med 1990 ; 322 : 1045-53
- 146- SILVESTRINI R, DAIDONE MG, LUISI A, MASTORE M, LEUTNER M, SALVADORI B.
Cell proliferation in 3,800 node-negative breast cancers: consistency over time of biological and
clinical information provided by 3H-thymidine labelling index.
Int J Cancer 1997 ; 74 :122-7
- 147- SIMPSON JF, PAGE DL.
Status of breast cancer prognostication based on histopathologic date.
Am J Clin Pathol 1994 ; 102 (S1): 3-8
- 148- SIMPSON JF, GRAY R, DRESSLER LG, COBAU CD, FALKSON CI, GILCHRIST KW et
al.
Prognostic value of histologic grade and proliferative activity in axillary node-positive breast
cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Companion Study, EST 4189.
J Clin Oncol 2000 ; 10 : 2059-69
- 149- SIRRI V, ROUSSEL P, TRERE D, DERENZINI M, HERNANDEZ-VERDUN D.
Amount variability of total and individual AgNOR proteins in cells stimulated to proliferate.
J Histochem Cytochem 1995 ; 43 : 887-93
- 150- SITONEN SM, KALLIONIEMI OP, HELIN HJ, ISOLA JJ.
Prognostic value of cells with more than 5c DNA content in node negative breast cancer as
determined by image cytometry from tissue sections.
Human Pathol 1993 ; 24 :1348-53
- 151- SLAMON DJ, CLARK GM, WONG SG.
Human breast cancer : correlation of relapse and survival with amplification of HER2/neu
oncogene.
Science 1987 ; 235 : 177-82

- 152- SLAMON DJ, LEYLAND-JONES B, SHAK S, FUCHS H, PATON V, BAJAMONDE A et al.
Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2.
N Engl J Med 2001 ; 344 : 783-92
- 153- SMITH FG, MURRAY PG, CROCKER J.
Correlation between PCNA and AgNOR scores in non-Hodgkin's lymphomas using sequential staining technique.
J Clin Pathol. 1993 ; 46 : 28-31
- 154- SOR Standards, Options et Recommandations : cancers du sein infiltrants non métastatiques
Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer
Paris, 2001 ; p49
- 155- SPYRATOS F, ROMAIN S.
Facteurs pronostiques tissulaires en cancérologie : modalités d'évaluation et de validation.
Bull Cancer (Paris) 1995 ; 82 : 22-8
- 156- SPYRATOS F, FERRERO-POUS M, TRASSARD M, HACENE K, PHILIPS E, TUBIANA-HULIN M, et al.
Correlation between MIB-1 and other proliferation markers : clinical implications of the mib-1 cutoff value.
Cancer 2002 ; 94 : 2151-9
- 157- SPYRATOS F
Les facteurs biologiques de demain sont-ils valables aujourd'hui ?
In :
Dogmes et doutes. Revue critique des standards en sénologie
Dir. Par Hubert Crouet et Thierry Delozier
Courbevoie : Da Te Be SAS ; 2005 : 156-63
- 158- STABORG M, GELL K, BRUNDELL E, HÖÖG C.
The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression.
J Cell Sci 1996 ; 109 : 143-53

- 159- STANDARTS, OPTIONS ET RECOMMANDATIONS.
Cancers du sein infiltrants non métastatiques. 2ème édition, 2001.
Adresse du site Web : <http://www.fnclcc.fr/sor.htm>
Consulté le 10 avril 2006
FNCLCC, Paris, 2001
- 160- STEIN GS, VAN WIJNEN AJ, STEIN JC, LIAN JB, MONTECINO M, ZAIDI K et al.
Subnuclear organization and trafficking of regulatory proteins : implications for biological control and cancer.
J Cell Biochem Suppl 2000 ; Suppl 35 : 84-92
- 161- STIPA S, TIRINDELLI DANESI D, MODINI C, CICCONETTI F, MAURO F, SCHILLACI A et al.
The importance of heterogeneity and multiple site sampling in the prospective determination of deoxyribonucleic acid flow cytometry.
Surg Gynecol Obstet 1993 ; 176: 427-34
- 162- SUROWIAK P, PALUCHOWSKI P, WYSOCKA T, WOJNAR A, ZABEL M.
Steroid receptor status, proliferation and metallothionein expression in primary invasive ductal breast cancers.
Pathology Oncology Research 2004 ; 10 : 207-11
- 163- TANNER M, GANCBERG D, DI LEO A, LARSIMONT D, ROUAS G, PICCART MJ et al.
Chromographic in situ hybridization : a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples.
Am J Pathol 2000 ; 157 : 1467-72
- 164- THE STEERING COMMITTEE ON CLINICAL PRACTICE GUIDELINES FOR THE CARE AND TREATMENT OF BREAST CANCER.
Adjuvant systemic therapy for women with node-negative breast cancer.
Can Med Assoc J 1998 ; 158 S3 : 43-51
- 165- THOR AD, LIU S, MOORE DH, EDGERTON SM.
Comparison of mitotic index, in vitro bromodeoxyuridine labelling, and MIB-1 assays to quantitate proliferation in breast cancer.
J Clin Oncol 1999 ; 17 : 470-7

- 166- TOIKKANEN S, JOENSUU H.
AgNOR counts have no prognostic value in breast cancer.
J Pathol 1993 ; 169 : 251-4
- 167- TOMOBE M, SHIMAZUI T, UCHIDA K, HINOTSU S, AKAZA H.
Argyrophilic nucleolar organizer region in proliferating cell has a predictive value for local recurrence in superficial bladder tumor
J Urol 1999 ; 162 : 63-8
- 168- TOMOBE M, SHIMAZUI T, UCHIDA K, AKAZA H.
AgNOR count in resting cells (resting NOR) is a new prognostic marker in invasive bladder tumor.
Anal Cell Pathol 2001 ; 22 : 193-9
- 169- TRERE D, PESSION A, DERENZINI M.
The silver-stained proteins of interphasic nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate
Exp Cell Res 1989 ; 184 :131-7
- 170- TRUDEAU ME, PRITCHARD KI, CHAPMAN J-A W, HANNA WM, KAHN HJ, MURRAY D et al.
Prognostic factors affecting the natural history of node-negative breast cancer.
Breast Cancer Res Treat 2005 ; 89 : 35-45
- 171- VAN OIJEN MG, MEDEMA RH, SLOOTWEG PJ, RIJKSEN G.
Positivity of the proliferation marker Ki-67 in noncycling cells
Am J Clin Pathol 1998 ; 110 : 24-31
- 172- VERONESE SM, MAISANO C, SCIBILIA J.
Comparative prognostic value of KI 67 and MIB1 proliferation indices in breast cancer.
Anticancer Res 1996 ; 16 : 2717-22
- 173- VISSCHER DW, SHAHEEN C, DROZDOWICZ S, CRISSMAN JD.
Image cytophotometric DNA histogram heterogeneity in adenocarcinoma of the breast.
Analyt Quant Cytol Histol 1993 ; 15 : 206-12

- 174- VOLPI A, NANNI O, DE PAOLA F, GRANATO AM, MANGIA A, MONTI F et al.
HER-2 expression and cell proliferation : prognostic markers in patients with node-negative breast cancer.
J Clin Oncol 2003 ; 21 : 2708-12
- 175- WANG S, SABOORIAN MH, FRENKEL E, HYNAN L, GOKASLAN ST, SHFAQ R.
Laboratory assessment of the status of HER-2/neu protein and oncogene in breast cancer specimens : comparison of immunohistochemistry assay with fluorescence in situ hybridisation assays.
J Clin Pathol 2000 ; 53 : 374-81
- 176- WEIKEL W, BRUMM C, WILKENS C, BECK T, KNAPSTEIN PG.
Growth fractions (Ki-67) in primary breast cancers, with particular reference to node-negative tumors.
Cancer Detect Prev 1995 ; 19 : 446-50
- 177- WENGER CR, CLARK GM.
S-phase fraction and breast cancer – a decade of experience.
Breast Cancer Res Treat 1998 ; 51 : 255-65
- 178- WESTENEND PJ, MEURS CJC, DAMHUIS RAM.
Tumour size and vascular invasion predict distant metastasis in stage I breast cancer. Grade distinguishes early and late metastasis.
J Clin Pathol 2005 ; 58 : 196-201
- 179- WITZIG TE, INGLE JN, CHA SS, SCHAID DJ, TABERY RL, WOLD LE, et al.
DNA ploidy and the percentage of cells in S-Phase as prognostic factors for women with lymph node negative breast cancer.
Cancer 1994 ; 74 : 1752-61
- 180- WU Y, LUO H, KANAAN N, WY J.
The proteasome controls the expression of a proliferation-associated nuclear antigen Ki-67.
J Cell Biochem. 2000 ; 76: 596-604
- 181- YARDEN Y. SLIWKOWSKI MX.
Untangling the ErbB signalling network.
Nat Rev Mol Cell Biol 2001; 2: 127-37

182- YU D, LIU B, TAN M, LI J, WANG SS, HUNG MC.

Overexpression of c-erbB-2/neu in breast cancer cells confers increased resistance to Taxol via mdr-1-independent mechanisms.

Oncogene 1996 ; 13 : 1359-65

183- ZUJEWSKI J, LIU ET.

The 1998 St Gallen's Consensus Conference : an assessment.

J Natl Cancer Inst 1998 ; 90 : 1587-9

ANNEXE

Annexe 1 : LORENZATO M, ABBOUD P, MASURE M, BOTTENS D, VISSEAU-COLETTO B, QUEREUX C, ADNET JJ. *Image cytometry detection of breast cancer with > 5C DNA content and minor DNA stemlines.* *Analyt Quant Cytol Histol* 2000 ; 22 : 199-205

Annexe 2 : LORENZATO M, ABBOUD P, LECHKI C, BROWARNY J O'DONOHUE MF, PLOTON D, ADNET JJ. *Proliferation assessment in breast cancer : a double staining technique for AgNOR quantification in MIB-1 positive cells especially adapted for image cytometry.* *Micron* 2000 ; 31 : 151-9

Annexe 3 : ABBOUD P , LORENZATO M, LECHKI C, JOLY D, QUEREUX C, BIREMBAUT P, PLOTON D. *Prognostic value of histological and biological markers in node negative breast cancer.* Soumis à *Am J Surgical Pathol* en décembre 2006

Annexe 4 : procédure du double marquage

Annexe 5 : liste des tableaux

Annexe 6 : listes des figures

Image Cytometry Detection of Breast Cancer Cells with $>5C$ DNA Content and Minor DNA Stemlines

Marianne Lorenzato, Ph.D., Pascal Abboud, M.D., Marie Masure, M.D.,
Dominique Bouttens, Bernadette Visseaux-Coletto, M.D., Christian Quereux, Ph.D.,
and Jean-Jacques Adnet, Ph.D.

OBJECTIVE: To determine if the presence of cells having a DNA content $>5c$ and occurring at very low frequency is related to breast cancer outcome.

STUDY DESIGN: Feulgen-stained imprints of fresh tumors used for routine standard DNA image cytometry were reanalyzed, with the aim of detecting hyperploid ($>5c$) cells or minor stemlines. Specially adapted software was used.

RESULTS: The new DNA analysis showed discordance of 47.3% with standard DNA cytometry. Minor stemline or rarely occurring $5c$ exceeding cells were found. These were not detected by the first DNA analysis. The presence of both DNA hyperploid cells occurring as rare events and a DNA hyperploid stemline was related to outcome.

CONCLUSION: The detection of DNA hyperploid cells, even in very small numbers, appears essential to outcome, particularly in diploid or single DNA aneuploid

breast cancers. (Analyt Quant Cytol Histol 2000; 22:199-205).

Keywords: breast neoplasms, image cytometry, DNA, ploidy.

DNA cytometry of breast cancer has been extensively studied, especially by flow cytometry and increasingly by image cytometry. The results of the most important studies were analyzed in a consensus review⁹ of the clinical utility of DNA cytometry in carcinoma of the breast. Generally, DNA aneuploidy appears to be related to poor clinical outcome. However, conflicting results have been reported with regard to the prognostic value of DNA cytometry in breast cancer. In fact, many studies have not reached the same conclusions, failing to find any prognostic value in DNA ploidy.^{1,11,12,21}

From the Laboratoire Pol Bouin and Service de Gynécologie Obstétrique, Centre Hospitalier Universitaire Maison-Blanche, Reims, France.

Drs. Lorenzato, Masure and Visseaux-Coletto are Residents, Histology and Cytology, Laboratoire Pol Bouin.

Dr. Abboud is Resident, Service de Gynécologie Obstétrique, Centre Hospitalier Universitaire Maison-Blanche.

Ms. Bouttens is Technician, Histology and Cytology, Laboratoire Pol Bouin.

Dr. Quereux is Professor, Service de Gynécologie Obstétrique, Centre Hospitalier Universitaire Maison-Blanche.

Dr. Adnet is Professor, Histology and Cytology, Laboratoire Pol Bouin.

Address reprint requests to: Marianne Lorenzato, Ph.D., Laboratoire Pol Bouin, Centre Hospitalier Universitaire Maison-Blanche, 51100 Reims, France.

Financial Disclosure: The authors have no connection to any companies or products mentioned in this article.

Received for publication December 22, 1997.

Accepted for publication September 24, 1999.

0884-6812/00/2203-0199/\$15.00/0 © The International Academy of Cytology
Analytical and Quantitative Cytology and Histology

199

Breast cancer is a geographically heterogeneous disease that can contain various stemlines with different DNA content. An underestimation of this factor may account for the disagreement in the literature about the prognostic value of DNA ploidy determinations. Several reports have shown that measurement of DNA heterogeneity, with detection of rarely occurring cells with high DNA content (5c exceeding rate),⁴⁻⁷ is of considerable help in predicting prognosis.^{2,10,13,14,17,18}

We suggest that the discrepancies existing between the different studies could be linked to the fact that classical cytometry fails to detect abnormal cells occurring at very low frequency (rare cells with high DNA content or minor stemlines). Therefore, we tried to detect minor stemlines or rarely occurring events on a single Feulgen-stained imprint using specially adapted software.

Materials and Methods

Biologic Material

We quantified DNA on 55 Feulgen-stained breast cancer imprints. The Feulgen staining procedure was as recommended by Cell Analysis Systems (Becton Dickinson, Leiden, the Netherlands) (air dried, 30 minutes of fixation in 10% buffered formaldehyde, one-hour 5N HCl hydrolysis at room temperature, staining with thionin). The imprints were taken during extemporaneous analysis on a fresh section of the tumor. These imprints, which were routinely analyzed in our laboratory before 1993, were reanalyzed with adapted software. This second analysis was performed in order to detect rare events (hyperploidy >5c cells) by rapid screening of a large cell population (about 10,000 cells).

The average follow-up of patients was 39 months (5-69). The distribution of the tumors was as follows: 41 ductal carcinomas (6 Scarf, Bloom and Richardson (SBR) grade 1, 20 SBR grade 2, 11 SBR grade 3, 5 *in situ*), 9 lobular, 3 medullary, and 2 mucinous carcinomas.

Details of age, staging, surgery and therapy are given in Tables I and II.

Image Cytometry

Classical DNA image cytometry was performed by interactive measurement using the CAS 200 image analyzer (Becton Dickinson, Leiden, the Netherlands). About 200 nuclei were measured after calibration with rat hepatocytes, as recommended by Cell Analysis Systems. (The correction factor used

between rat and human cells was 1.07.) The coefficient of variation of the calibration was always <3%. For each case, the DNA index of the main peak and of the second, if present, was measured, as was the percentage of 5c exceeding cells.

Then, for each tumor, the same slide was reanalyzed by the Discovery system (Becton Dickinson). The Discovery system is an automated image analyzer consisting of: a fully automated Leitz Autoplan Microscope (Wetzlar, Germany) with a 25:1 dry objective (numerical aperture 0.7), Xillix Microimager camera (Xillix Technologies Corporation, Vancouver, B.C., Canada), Matrox Image series architecture, consisting of a base board (8-Mb memory), a color frame grabber, black-and-white frame grabber and real-time processing module, PC (486 DX 33, Intel) and fully automated microscope especially adapted to the Discovery system. The stage is always under computer control with an autofocus. The area of interest on the slide is defined by the user.

The light wavelength used for DNA measurement was 620 nm (half value with 12-15 nm), which offers the best contrast for thionin staining. Calibration was done with 50 nuclei of fresh normal human kidney imprints (coefficient of variation <3%) used as an external standard. For each slide, the calibration was verified with lymphocytes or stromal cells.

This system has many applications, in particular the detection of minor subpopulations using specially adapted software. The slide is subjected to rapid screening of about 10,000 cells, and cell detection and segmentation are fully automated. The program starts by measuring 200 nuclei having an integrated optical density (IOD) of at least 40, which corresponds to DNA diploidy or higher. The analysis then automatically shifts to the measurement of 50 cells having an IOD ≥ 90 (DNA tetraploidy). Finally, the program searches the remaining microscopic fields for rarely occurring nuclei with DNA content >5c (IOD > 120). This continues until about 10,000 cells have been examined, or until 300 cells have been measured. The duration of the analysis is 10-30 minutes. All measured events are controlled on an image gallery at completion of the analysis to eliminate artifacts and cell clumping.

The histograms obtained were considered DNA diploid if the DNA index (DNA content of the studied population/DNA content of the reference cells in the G0G1 phases) of the peak of the greatest stemline fell into the 0.9-1.1 interval. Between the interval 1.9-2.1, the cell population was classified as

Table 1 Data on Low-Risk Group

Patient no.	Age (yr)	Type	Grade	Stage	Surgery	Adjuvant therapy
1	27	D	1	T2N0M0	T	CH
2	66	D	2	T1N0M0	T	RX+CH
3	40	D	2	T1N0M0	M	CH
4	64	D	2	T1N0M0	T	RX+H
5	45	D	2	T0N0M0	T	RX
6	33	D	2	T2N0M0	M	RX+CH
7	37	D	2	T2N0M0	T	CH
8	37	D	2	T2N0M0	T	RX
9	58	D	2	T1N0M0	M	H
10	54	D	2	T1N0M0	T	RX+H
11	59	D	2	T2N0M0	M	RX+H
12	57	D	2	T2N0M0	T	RX+H
13	45	D	3	T2N1AM0	T	RX+CH
14	47	D	3	T2N0M0	T	RX+H
15	37	D	3	T2N0M0	M	CH
16	43	D	3	T2N0M0	T	RX+CH
17	51	D	3	T2N0M0	T	RX+CH
18	64	D	2	T1N0M0	T	RX
19	59	L		T2N0M0	M	RX+H
20	69	L		T0N0M0	T	RX
21	49	L		T1N0M0	M	RX+CH
22	31	L		T1N0M0	M	—
23	49	L		T2N0M0	M	H
24	68	ISC		T1N0M0	T	RX
25	49	ISC		T1N0M0	T	RX+H
26	52	L	2	TXN0M0	M	H
27	63	ISC		T0N0M0	T	RX+H
28	84	MED		T1N0M0	M	—
29	58	MED		T2N0M0	T	RX+H
30	53	MED		T1N0M0	T	RX
31	65	MUC		T0N0M0	T	RX+H
32	45	MUC		T2N0M0	M	—
33	55	L		T2N0M0	T	RX+H
34	70	D		T1N1AM0	T	RX
35	61	L		T0N0M0	M	H

D=ductal carcinoma, L=lobular carcinoma, ISC=*in situ* carcinoma, MED=medullary carcinoma, MUC=mucinous carcinoma, SBR=Scarff, Bloom and Richardson pathologic grade, T=tumorectomy, m=mammectomy, RX=radiotherapy, H=hormone therapy, CH=chemotherapy.

DNA tetraploid. A histogram was classified as DNA aneuploid if there was a unique stemline having a DNA index of 1.1–1.9 or if such a stemline was associated with a diploid one. If > 1 DNA aneuploid peak was present, the histogram was classified as DNA multiploid. DNA hyperploidy was determined by a stemline with a DNA index > 2.25.

Statistical Analysis

The patient cohort was separated into two groups. Those with a poor prognosis, in which the patients showed relapse, metastasis or death within four years, were in one group. All other patients with a good prognosis were classified in the second group. The different features analyzed between the two groups were compared with the χ^2 test.

Results

First we compared the results of both DNA cytometric analyses in order to estimate the similarity in their rates of results.

In 29 cases (52.7%), both analyses were entirely concordant; the Discovery study did not detect any rare event or minor stemline. In 13 cases, the classical DNA measurement (CAS 200) had already detected 5c exceeding cells (Figure 1). However, in 26 cases (47.3%) we observed discordance between the analyses. In 12 cases, the heterogeneity analysis detected a minor stemline (Figure 2), and in 14 cases rarely occurring DNA hyperploidy cells were observed that the classical DNA cytometric analysis had failed to detect (Figure 3).

The results of patient follow-up, separated into

Table II Data on High-risk Group

Patient no.	Age (yr)	Type	Grade	Stage	Surgery	Adjuvant therapy
36	41	D	1	T2N0M0	T	RX
37	63	D	1	T1N0M0	T	RX+H
38	53	D	1	T2N0M0	M	RX+CH
39	42	D	1	T1N0M0	T	RX
40	35	D	2	T2N0M0	T	RX+RCH
41	39	D	2	T3N0M0	M	RX+CH
42	77	D	2	T2N0M0	M	H
43	56	D	2	T1N0M0	T	—
44	56	D	2	T1N0M0	M	—
45	69	D	2	T1N0M0	M	—
46	84	D	2	T2N1AM0	T	RX+CH
47	45	D	2	T3N1M0	M	RX+CH
48	67	D	3	T2N1BM0	M	RX+H
49	43	D	3	T2N0M0	M	—
50	48	D	3	T2N0M0	T	RX+CH
51	34	D	B3	T2N0M0	M	RX+CH
52	61	D	3	T2N0M0	M	RX+H
53	28	D	3	T3N0M0	M	RX+CH
54	62	D	3	T4N1M0	M	RX+CH+H
55	37	L		T3N1M0	M	RX+CH

D = ductal carcinoma, L = lobular carcinoma, SBR = Scarf, Bloom and Richardson pathologic grade, T = tumorectomy, M = mastectomy, RX = radiotherapy, H = hormonal therapy, CH = chemotherapy.

poor or good course, are shown in Table III.

In our investigations, a single DNA aneuploid peak was not related to a poor prognosis. However, the presence of DNA multiploidy was significantly linked to a poor prognosis, but the specificity was too low. The same conclusions could be made for the presence of 5c exceeding cells if their occurrence rate was very low (<5% of measured cells). This represents 0.12% of the 10,000 observed cells.

The presence of a DNA hyperploid stemline, even if in a minority (at least 20% of measured cells with a gaussian distribution), was highly significantly linked to a poor prognosis.

DNA hyperploidy, aneuploidy and multiploidy and DNA profiles were not linked to the presence of lymph node metastasis. DNA hyperploidy correlated slightly with tumor size ($P < .05$).

Discussion

Breast cancer shows high intratumoral variability in the DNA content of tumoral cells, and the underestimation of its heterogeneity might account for the conflicting results reported in the literature.^{12,21} The reason for them could be that classical cytometry is unable to detect rare events or minor stemlines by measuring 200–300 nuclei.

Our aim here was to analyze this variability with-

in a tumor sample by measuring DNA content using image cytometry with the help of software specially adapted to detecting rare events or minor stemlines. In fact, most of the studies giving data about tumor heterogeneity concern determination of the ploidy status of different areas of a tumor by image²⁰ or flow³ cytometry. This last type of study demonstrated that six samples may have to be prepared and measured separately to detect DNA aneuploid cells. Multisampling is probably the best way to analyze tumor heterogeneity, but the preparation of the samples and the cytometric measurements are highly time consuming. In the cytometric section of a routine pathology laboratory, it is impractical to multiply fourfold or sixfold^{2,3} the number of samples that have to be analyzed.

That is why we chose a different way to try to detect cells that pass unnoticed with classical image cytometry. Our method has advantages: first, a single, fresh tumor imprint is sufficient and can be used for image cytometry and for the determination of variability within a tumor-sample. Second, rapid screening of a large number of cells is possible in the first instance with determination of the main stemlines and then measurement of only rarely occurring cells. Therefore, this new method of analysis offers the combined features of flow cytometry

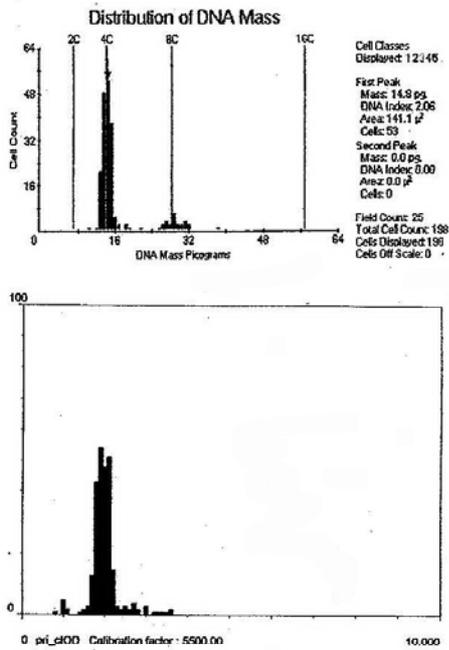


Figure 1 Concordance between the two analyses. The CAS (top) and the Discovery (bottom) analyses showed a tetraploid population.

(rapid, great number of cells) and image cytometry (reviewing each measured object).

By the very large number of screened cells, the instrumentation used can detect minor aneuploid subpopulations that otherwise escape detection. However, this method of analysis does not tackle the effects of tumor spatial heterogeneity since just one tumor imprint is analyzed.

Discovery analysis allows detection of a discordance rate of 47.3% within the 55 analyzed tumors. It indicates that in almost half the cases, rarely occurring cells or minor stemlines are not detected by classical image cytometry.

Our rate of detecting tumors with heterogeneous DNA stemlines is not very different from those observed by authors working on different samples of tumors. For example, Schvimer¹³ showed a discordance rate of 43%, Visscher²⁰ of 56% and Meyer¹⁰ of 26%. By studying multiple fresh specimens of vari-

ous cancers, Stipa¹⁸ found heterogeneous DNA content in 50% of lung carcinoma, 47% of colon carcinoma and 34% of gastric cancer. It appears that the clonal populations in the different sites of a tumor are present in a minority, sometimes even in rare events, in each part of a tumor.

Like many other authors,^{1,11,12,21} we failed to find the prognostic significance of a single DNA aneuploid stemline. Single aneuploidy is the reflection of a genetically relatively poorly advanced tumor, as described by several authors.^{8,16} In fact, during the genetic evolution of a tumor, the following pathway seems to be preferred: diploidy and aneuploidy (hypotetraploidy), followed by DNA hypertetraploidy (hyperploidy).¹⁶ Moreover, the evolution of all tumor cells is not synchronous, leading to development of a multiploid DNA profile. Visscher¹⁹ noted that the various DNA stemlines are often intimately admixed, even in spatially distant portions of a breast tumor. That author

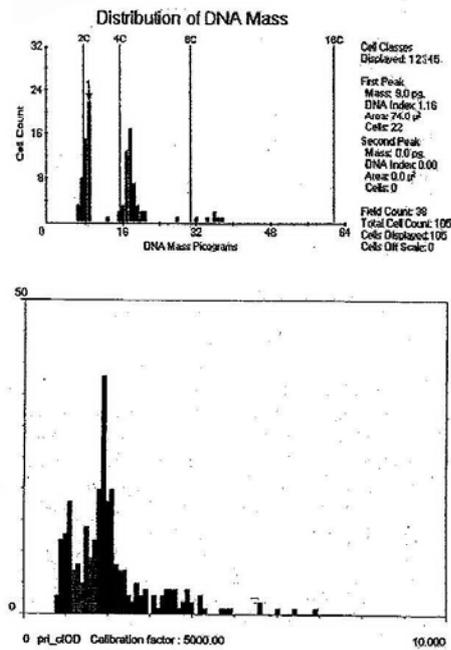


Figure 2 Detection of a minor aneuploid stemline by the heterogeneity software (bottom). The aneuploid peak is absent from the standard analysis histogram (top).

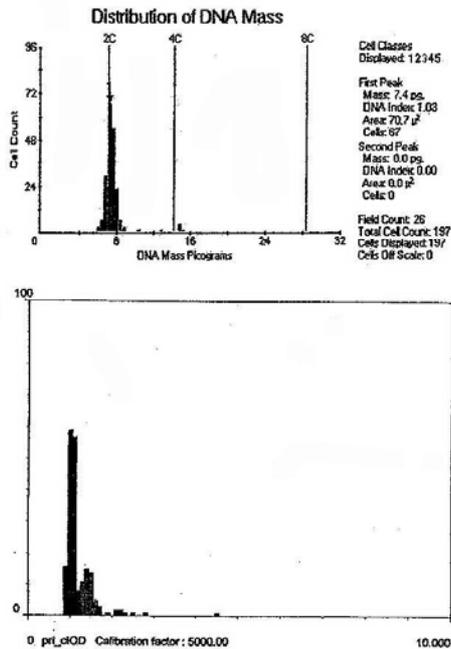


Figure 3 Detection of hyperloid cells by the heterogeneity software. The nuclei in the right side of the Discovery histogram (bottom) did not appear on the standard cytometry histogram (top).

concluded that productive interaction between genetically distinct tumor populations may lead to stable codominance of ancestral clones during progression of the same breast carcinoma.

DNA aneuploid tumors in which we failed to detect any heterogeneity can be considered genetically weakly developed. However, they already have progressed from diploid or near-diploid status and have entered into a development process that, in the long term, can lead to DNA multiploidy or hyperploidy status. This evolution will depend on several other factors, such as development of p53 gene abnormalities or specific post-DNA aneuploid sequences of genetic changes involving the accumulation of multiple mutations that promote growth and tissue invasiveness.¹⁵

However, oncocytic metaplasia of ductal breast epithelia can present euploid polyploidization,

Table III DNA Content and Patient Outcome

Ploidy	Good prognosis (%)	Poor prognosis (%)	χ^2	P
Aneuploid	60	80	1.75	NS
Diploid	40	20		
Multiploid	20	60	7.71	<.01
Monoploid	80	40		
Hyperloid cell				<.01
> 2%	45	83	7.1	
≤ 2%	55	17		
Hyperloid cells				<.01
> 5	25	70	10.27	
≤ 5%	75	30		
Hyperloid Stemline				<.001
Presence	20	70	14.7	
Absence	80	30		

leading to the presence of 5c exceeding cells. Thus, the presence of such cells cannot represent a one-and-only prognostic criterion.

Tumor heterogeneity reflects the presence of genetically less advanced clonal subpopulations concomitant with more advanced stemlines in each specimen. According to Shackney,¹⁵ the genetic evolutionary sequence is linked to clinical progression. Our study, based on a completely different approach to tumor heterogeneity, led to the same conclusions. Large tumor sampling could be unnecessary if the image cytometric measurement were able to screen a sufficient number of cells. According to the present study, the higher the percentage of 5c exceeding cells, the worse the prognosis. However, we failed to find any association between the rate of 5c exceeding cells and the histologic grade of the tumor, as Sitonen¹⁷ and coworkers did. They determined the 5c exceeding rate with the same image analyzer that we used to determine DNA ploidy. This kind of cytometric DNA measurement is able to detect 5c exceeding cells if their rate of occurrence is not too low. With our specially adapted software, the number of tumors examined containing such rare events was considerably increased. The only difference was the number of cells analyzed.

The detection of rarely occurring 5c exceeding cells and minor stemlines must be considered a very important way to estimate genetic instability and tumor progression. The development of image analysis software will permit pathologists to deter-

mine genetic instability on only one tumor sample and with a rapid and reliable method of analysis.

Acknowledgments

We are very grateful to M. Jondreville and M. Bouariche for the English translation of this paper.

References

- Babiak J, Hugh J, Poppema S: Significance of *c-erbB-2* amplification and DNA aneuploidy: Analysis in 78 patients with node negative breast cancer. *Cancer* 1992;70:770-776
- Beerman H, Smit VT, Kluin PM, Bonsing BA, Hermans J, Cornelisse CJ: Flow cytometric analysis of DNA stemline heterogeneity in primary and metastatic breast cancer. *Cytometry* 1991;12:147-154
- Bergers E, van Diest PJ, Baak JPA: Tumor heterogeneity of DNA cell cycle variables in breast cancer measured by flow cytometry. *J Clin Pathol* 1996;49:931-937
- Böcking A, Adler CP, Common H, Hilgarth M, Granzen B, Auffermann W: Algorithm for a DNA-cytophotometric diagnosis and grading of malignancy. *Analyt Quant Cytol* 1984;6:1-7
- Böcking A, Auffermann W, Vogel H, Schlöndorff G, Goebels R: Diagnosis and grading of malignancy in squamous epithelial lesions of the larynx with DNA cytophotometry. *Cancer* 1985;56:1600-1604
- Böcking A, Chatelain R, Biesterfels S, Noll E, Biesterfeld D, Wohltmann D, Goecke C: DNA grading of malignancy in breast cancer: Prognostic validity, reproducibility and comparison with other classifications. *Analyt Quant Cytol Histol* 1989;11:73-80
- Böcking A, Hilgarth M, Auffermann W, Hack-Werdier C, Fischer-Becker D, von Kalkreuth G: DNA-cytometric diagnosis of prospective malignancy in borderline lesions of the uterine cervix. *Acta Cytol* 1986;30:608-615
- Dutrillaux B, Gerbault-Seureau M, Remvikos Y, Zafrani B, Prieur M: Breast cancer genetic evolution: I. Data from cytogenetics and DNA content. *Breast Cancer Res Treat* 1991;19:245-255
- Hedley DW, Clark GM, Cornelisse CJ, Killander D, Kute T, Merkel D: Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 1993;28:55-59
- Meyer JS, Wittliff JL: Regional heterogeneity in breast carcinoma: Thymidine labeling index, steroid hormone receptors, DNA ploidy. *Int J Cancer* 1991;47:213-220
- Noguchi M, Taniya T, Ohta N, Koyasaki N, Miyazaki I, Mizukami Y: Lymph node metastases versus DNA ploidy as prognostic factors for invasive ductal carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 1991;19:23-31
- Pfisterer J, Kommos F, Sauerbrei W, Menzel D, Kiechle M, Giese E, Hilgarth M, Pfeleiderer A: DNA flow cytometry in node-positive breast cancer: Prognostic value and correlation with morphologic and clinical factors. *Analyt Quant Cytol Histol* 1995;17:406-412
- Schvimer M, Lash RH, Katzin WE: Intratumoral heterogeneity of DNA ploidy in breast carcinomas: A flow cytometric assessment of sampling techniques. *Cytometry* 1995;22:292-296
- Shackney SE, Berg G, Simon SR, Cohen J, Amina S, Pommersheim W, Yakulis R, Wang S, Uhl M, Smith CA, Pollice AA, Hartsock RJ: Origins and clinical implications of aneuploidy in early bladder cancer. *Cytometry* 1995;22:307-316
- Shackney SE, Shankey TV: Common patterns of genetic evolution in human solid tumors. *Cytometry* 1997;29:1-27
- Shackney SE, Smith CA, Pollice AA, Janocko LE, Singh SG, Groft DW, Brown KA, Hartsock RJ: Preferred genetic evolutionary sequences in human breast cancer: A case study. *Cytometry* 1995;21:6-13
- Sitonen SM, Kallioniemi OP, Helin HJ, Isola JJ: Prognostic value of cells with more than 5c DNA content in node-negative breast cancer as determined by image cytometry from tissue sections. *Hum Pathol* 1993;24:1348-1353
- Stipa S, Tirindelli Danesi D, Modiri C, Cicconetti F, Mauro F, Schillaci A, Mecozzi A, Nicolanti V, Stipa F, Mancini M, Bangrazi C, Botti C: The importance of heterogeneity and multiple site sampling in the prospective determination of deoxyribonucleic acid flow cytometry. *Surg Gynecol Obstet* 1993;176:427-434
- Visscher D, Dolan P, Ottosen S, Crissman J: Geographic distribution of co-dominant DNA stemlines in breast carcinoma. *Cytometry* 1995;21:14-17
- Visscher DW, Shaheen C, Drozdowicz S, Crissman JD: Image cytophotometric DNA histogram heterogeneity in adenocarcinoma of the breast. *Analyt Quant Cytol Histol* 1993;15:206-212
- Witzig TE, Ingle JN, Cha SS, Schaid DJ, Tabery RL, Wold LE, Grant C, Gonchoroff NJ, Katzmann JA: DNA ploidy and the percentage of cells in S-Phase as prognostic factors for women with lymph node negative breast cancer. *Cancer* 1994;74:1752-1761



PERGAMON

Micron 31 (2000) 151–159

micron

www.elsevier.com/locate/micron

Proliferation assessment in breast cancer: a double-staining technique for AgNOR quantification in MIB-1 positive cells especially adapted for image cytometry

M. Lorenzato^{a,*}, P. Abboud^a, C. Lechki^a, F. Browarnyj, M.F. O'Donohue^b, D. Ploton^b, J.J. Adnet^a

^aLaboratoire Pol Bouin, CHU Maison Blanche, 45 rue Cognacq-Jay, 51092 Reims Cédex, France

^bEA 2063, IFR 53, CHU Maison Blanche, 45 rue Cognacq-Jay, 51092 Reims Cédex, France

Abstract

There are two ways of measuring the cell proliferation. The first one consists of quantifying the number of cycling cells with the help of antibodies directed against cells either in G1, S, G2 or M phase. The second way is to assess the cell cycle duration by the quantification of AgNOR proteins. Measuring both the features on the same slide represents an attractive way to tackle the proliferating activity of a cell culture or a tumor. Here, we propose a MIB-1 and AgNOR double staining method especially adapted to image cytometry measurement, using MIB-1 antibody coupled to FITC in order to avoid the thresholding problems encountered with such a multilabeling technique. We have applied this new method on a series of 39 breast cancer cases, with at least 4 years follow-up, in order to determine the prognosis significance of this measurement. MIB-1 alone is not linked to prognosis, while the global mean AgNOR area is significantly linked to prognosis in terms of development of visceral metastasis or death. However, the global mean AgNOR area is insufficient to determine the time limit of appearance of metastasis or relapse. Our results clearly demonstrate that a high mean AgNOR area within a cell population having a high MIB-1 index can discern tumors with a high metastatic potential. By multiplying AgNOR area by the percentage of MIB-1 positive cells we calculate the proliferative activity, *P*, which brings very important information concerning the time limit of relapse. © 1999 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: MIB-1; AgNOR; Cell proliferation; Image cytometry; Cancer prognosis

1. Introduction

In the last decade, there has been great interest in tumor proliferation and its relationship to clinical outcome. Information about tumor cell kinetics can be obtained by measuring the growth fraction (number of cycling cells) with the help of a variety of methods including tritiated thymidine labeling, S-phase fraction measurement, and quantification of various proliferation-associated antigens, such as PCNA or KI-67. The KI-67 antibody is a widely used marker of proliferating cells, because this antigen is expressed throughout the cell cycle with the exception of quiescent cells (Gerdes et al., 1983). The major drawback of this antibody is that it is immuno-reactive only in frozen sections and cell preparation. To overcome this problem, Gerdes et al. (1992) have generated a monoclonal antibody (MIB-1) directed against a formalin resistant epitope of the KI-67 antigen, which is immuno-reactive after microwave antigen retrieval pretreatment. In a recent study, Leong et al. (1995)

have compared the various proliferation antibodies and reached the conclusion that MIB-1 staining is the most intense and the easiest to read.

The assessment of cell proliferation by means of antibodies directed against antigens related to cell proliferation has been extensively studied in order to find new prognosis parameters in a wide variety of tumors. However, the growth fraction represents only a single feature of the overall kinetics of the growth of malignant tumor and does not take into account the cycle duration. The only way to assess the cell cycle speed, *in situ*, on paraffin embedded material consists of quantifying the AgNOR proteins. Derenzini et al. (1990a,b), using 12 tumoral cell lines and Tréré et al. (1989) using a series of neuroblastoma cell lines have demonstrated an inverse correlation between the amount of AgNOR and the duration of the cell cycle. However, AgNOR proteins are also present in non-proliferating cells. In the latter, AgNOR expression reflects the transcription of rDNA related to the protein synthesis which is not linked to cell growth. Thus, it appears that measuring AgNOR in KI-67 positive cells (i.e. cycling cells) could improve our knowledge about tumor growth kinetics. A prerequisite to such

* Corresponding author. Tel.: + 33-3-26-78-75-53; fax: + 33-3-26-78-77-39.

measurements is the simultaneous staining of KI-67 antigen and AgNOR.

Previous studies have already proposed the double staining of AgNOR associated with KI-67 (Munakata and Hendricks, 1994) or AgNOR associated with Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), an S-phase specific antigen (Smith et al., 1993). They have revealed a direct relationship between the amount of AgNOR and that of the proliferating cells. However, these studies have not searched any correlation between the features examined and the patient outcome. On the contrary, Bigras et al. (1996) have investigated the survival of 30 patients with non-small cell lung cancers by measuring AgNOR in KI-67 positive cells by image cytometry.

The aim of our study was to describe a double staining method that could be used on formalin-fixed paraffin embedded breast cancer tissues. The MIB-1 antibodies were coupled to FITC in order to avoid the segmentation drawbacks when peroxidase or alkaline phosphatase are used simultaneously to AgNOR staining. We have also investigated the efficiency of this double staining technique in the early detection of lesions with bad prognosis.

2. Material and methods

2.1. Cells and tissues

2.1.1. Cell cultures

KB cells (European Collection of Cell Culture no. 86103004) were grown on minimum essential medium (Sigma, St Louis, MO) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (Sigma, St Louis, MO), 100 µg/ml streptomycin, 100 IU/ml penicillin and glutamin (Sigma, St Louis, MO) at 37°C in 5% CO₂. Cells were seeded at 5 × 10⁴ cells/ml and grown for 48 h on glass coverslips.

2.1.2. Tissue sections

Thirty-nine breast carcinoma specimens with at least 4 years follow up have been selected. The pathological type distribution (Scarff, Bloom and Richardson grading) was the following: 28 ductal (4 SBR1, 15 SBR2, 9 SBR3), 7 lobular, 3 medullar and 1 colloid mucous carcinomas. The TNM distribution (Tumor-Node-Metastasis) was: T0N0: 3 cases; T1N0: 10 cases; T2N0: 19 cases; T1N1: 1 case; T2N1: 2 cases; T3N1: 3 cases and T4N1 1 case. Each tumor was M0 at the time of the diagnostic.

2.2. KI-67 (MIB1)-AgNOR double staining

2.2.1. Cell cultures

Cells were rinsed in PBS (Phosphate Bufferd Saline). They were first fixed for 5 min in a 3% (w/v) paraformaldehyde solution in PBS containing 1% Triton X-100. Saturation was performed for 30 min. in 3% BSA (Bovine Serum Albumin) in PBS. The slides were incubated for 30 min. at room temperature in a dark, wet chamber with MIB-1

antibodies (Immunotech, France), freshly diluted to 1/50 with PBS, and then rinsed two times for 5 min with PBS. The slides were then saturated with 3% BSA in PBS for 15 min. Subsequently, they were submitted to a 30 min. incubation at room temperature in the dark, wet chamber with the biotinylated secondary antibody (Amersham, France) freshly diluted to 1/50 in PBS. The slides were then rinsed two times for 5 min with PBS. Finally, they were incubated for 15 min at room temperature in the chamber with FITC-streptavidin (Amersham, France) freshly diluted to 1/25 in PBS, and rinsed two times for 5 min with PBS and once with deionized water.

The AgNOR staining was performed according to the technique described by Ploton et al. (1986). The slides were first dehydrated in absolute alcohol, then passed in a mixture of absolute ethanol and acetic acid (3:1) during 5 min. They were incubated 25 min in a freshly prepared silver staining solution containing one part of 2% gelatin in 1% formic acid, and two parts of 50% aqueous silver nitrate solution. After three rinsings in deionized water, the slides were immersed for 10 min in a 5% sodium thiosulfate solution, rinsed again in deionized water and mounted with buffered glycerin.

2.2.2. Tissue sections

Three micron sections were spread on coated slides (Super frost plus, CML, France) with distilled water. They were then air dried for at least one night at 37°C. The slides were dewaxed for a maximum of half an hour in xylene and rehydrated by the following sequence: alcohol 100°, two times for 5 min; alcohol 95°, two times for 5 min; distilled water 5 min. The slides were then autoclaved in pH 6.0 citrate buffer for 20 min at 120°C and cooled at room temperature before being rinsed for at least 5 min in PBS. After being carefully wiped around the tissue section, the slides were processed for immunostaining as seen above for cell cultures.

AgNOR staining was performed according to the technique described by Ploton et al. (1986) and modified by Öfner et al. (1994). The slides were air-dried and incubated for 25 min in a freshly prepared silver staining solution containing one volume of 2% gelatin in 1% formic acid, and two volumes of 25% aqueous silver nitrate solution. After rinsing three times in deionized water, the slides were immersed for 2 min in 5% sodium thiosulfate and then rinsed in deionized water.

The counterstaining was performed as follow: 10 s in Mayer's hematoxylin to obtain a very light staining, which was turned to blue by rinsing the slides under tap water. They were then rinsed with deionized water, and mounted with buffered glycerin. The slides were stored at - 20°C.

2.3. Image cytometry

The measurement of AgNOR in MIB-1 positive cells was

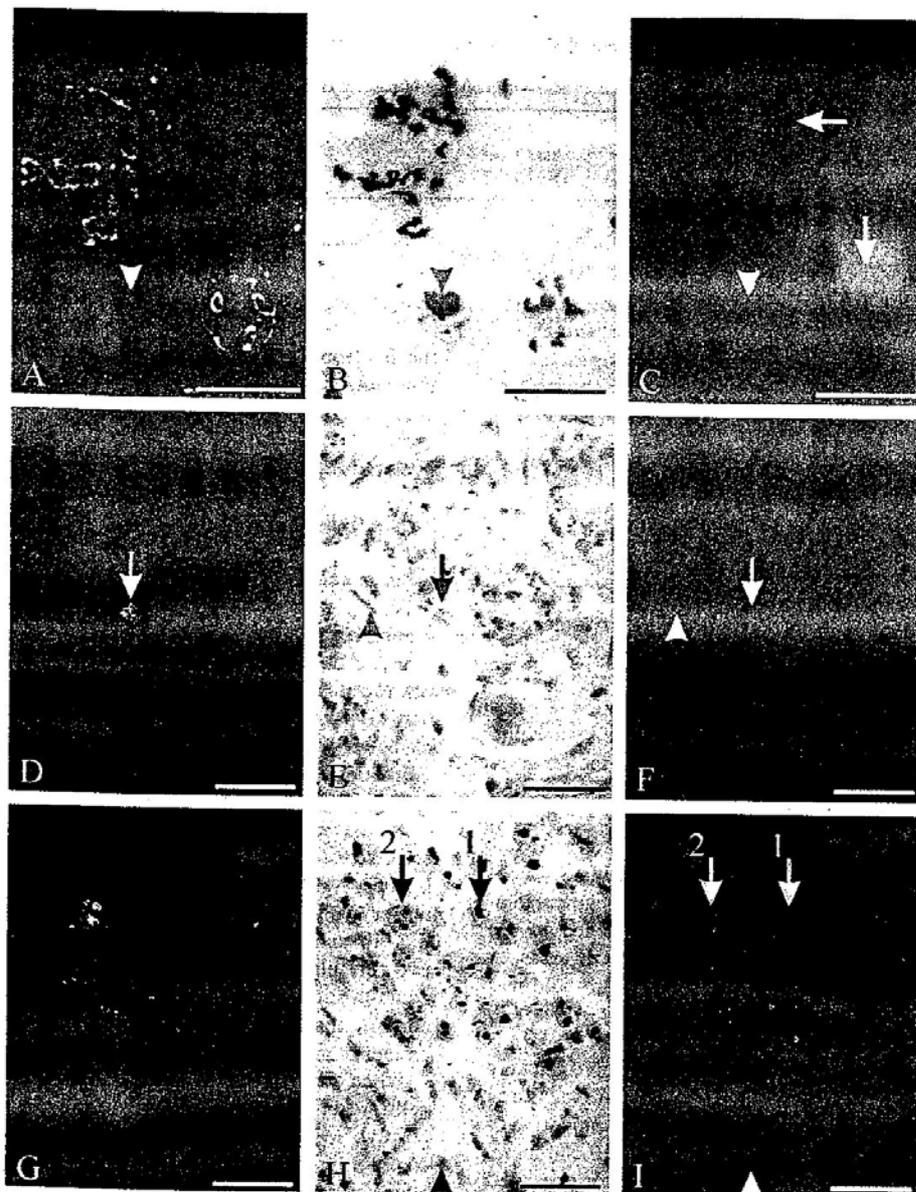


Fig. 1. (a)–(i): co-localization of MIB-1 antigen and of AgNOR proteins within the same field of view of cells in culture (a–c), in non-cancerous areas of breast tissue sections (d–f) and in cancerous areas of breast tissue sections (g–i). For each case, MIB-1 antigen is first localized in fluorescence (a, d and g), then AgNOR staining is shown in transmitted light (b, e and h) and finally the merge of the two labelings is shown (with MIB-1 antigen in green and Ag-NOR in red) (c, f and i). In (c) the arrows point to MIB-1 positive cells in which AgNOR staining is disposed as necklaces of beads; the arrow-head points to a MIB-1 negative cell with a compact cluster of silver dots. In (f), a metaphase cell (arrow) is positive for MIB-1 antigen; the other cells were negative and show tiny spots of silver (arrowhead). In (i), a group of positive MIB-1 positive cancerous cells with several medium-sized silver clusters is evidenced (arrow 2); negative cells with each a large cluster of silver dots were numerous (arrow 1); negative cells with small silver dots were also visible (arrowhead). Scale bar indicates 5 μm in (a), (b) and (c), and 20 μm in figures (d)–(i).

performed with the Discovery System (Becton Dickinson, Leiden, The Netherlands). It is an automated image analyzer consisting of:

- a fully automated Leitz Autoplan Microscope with a 40 \times

oil objective (numerical aperture 1.3). An image can be obtained at two magnifications via a multiple camera system. The low magnification mode gives half the magnification of the objective used, and the high magnification gives twice the magnification of the objective;

Table 1
Results of AgNOR, MIB-1 and P measurement on the 39 breast cancers

	AgNOR area (in μm^2)	MIB-1 (percentage of positive cells)	P (proliferative activity)
Mean	9.59	13.97	197.58
Standard deviation	3.88	8.61	118.37
cut off value	10	15	200

- a Xillix Microimager 1400 black and white CCD camera (Kodak). It is able to detect low level fluorescence signals and is also capable of absorbance detection;
- a Matrox Image series architecture consisting of a base board (8Mb memory), a color frame grabber and a black and-white frame grabber, and a real time processing module;
- a PC computer (486 DX 33).

The stage can be under manual or computer control with an autofocus.

The AgNOR-MIB1 quantification application has been created in our laboratory and consists in the following steps: the program starts by finding a primary image in order to detect all the nuclei (counterstained with hematoxylin) by using a transmission illumination type with a wavelength of 580 nm. After thresholding, segmentation features were defined in order to separate automatically touching nuclei (ultimate erosion, 12 iterations). Then, the program automatically switched to the second image detection consisting of the MIB1 positive cells. This needed the use of the epifluorescence illumination type with a 485 nm excitation filter. As for the first image, after thresholding, touching nuclei were automatically separated by segmentation parameters. The program automatically switched to the third image for the measurement of the AgNOR areas. A 580 nm transmission filter was used and the threshold was determined on a unique AgNOR dot (fibroblast). At least 20 fields were measured.

The duration of the analysis was between approximately 10 and 30 min. (300–500 nuclei investigated). All measured events were controlled on an image gallery at completion of the analysis in order to eliminate artifacts or cell clumping. The available features were: the total number of measured nuclei, the percentage of MIB1 positive cells (MIB-1 index), the mean AgNOR area within MIB1 positive and MIB1 negative cells, and the global mean of AgNOR area. By multiplying the percentage of MIB1 positive cells by the mean value of their AgNOR area, a proliferative activity was obtained (Brugal, 1995): $P = \text{MIB-1} \times \text{AgNOR}$.

3. Results

3.1. Features of MIB-1 and AgNOR stainings in cultured cells and in tissue sections

In cells in culture (Fig. 1a–c), the percentage of MIB-1

positive cells is very high (approximately 95%). In Fig. 1a, fluorescent MIB-1 staining appears mainly localized at the nucleolar border; a faint staining is also observed within the nucleoplasm and along the nuclear envelope. When the same field of view is observed in transmitted light mode (Fig. 1b), the AgNOR staining appears as well-defined black dots exclusively distributed within the nucleoli. By merging the two images and using false colors (green for MIB-1 staining and red for AgNOR staining), it is possible to precise the relative localization of the two markers. Thus, it appears that within MIB-1 positive cells (arrow in Fig. 1c), the AgNOR staining is exclusively observed in the central part of nucleoli and organized as necklaces of beads. On the other hand, this mode of observation allows to identify a MIB-1 negative cell (arrowheads in Fig. 1a–c) in which the AgNOR staining is typically organized as a large and compact cluster of black dots.

In normal ductules of breast tissue sections (Fig. 1d–f), MIB-1 positive cells are rare and are exclusively mitotic cells (the arrows in Fig. 1d–f point to the same metaphasic cell). When the same field of view is observed in transmitted light for AgNOR staining, all normal cells appear with only one or two small silver-stained nucleoli. The arrowheads in Fig. 1e and f point to the nucleus of a fibroblast with two tiny black dots, which were used as a reference for quantification. By merging the two images (Fig. 1f), we confirm that no interphasic cell is positive for MIB-1 antigen.

When areas of tissue sections with infiltrating cancerous cells are observed (Fig. 1g–i), large groups of interphase positive MIB-1 positive cells are easily identified. The observation of the same field of view in transmitted light allows us to identify numerous cells with different AgNOR patterns. Thus, in the lower part of the field, cells appear with small AgNOR labeling (arrowhead). At the opposite, cells within the upper part of the field display large nuclei with numerous silver dots localized within a single large nucleolus (arrow 2) or within several medium-sized nucleoli (arrow 1). By merging these two images and using false colors (green for MIB-1 staining and red for AgNOR staining), one can easily identify the cells with the different types of staining. Thus, it appears that positive MIB-1 cells contain numerous medium-sized nucleoli (arrow 2), whereas negative MIB-1 cells possess either one large compact nucleolus (arrow 1) or one small nucleolus (arrowhead).

Table 2
Mean values of the different features analyzed in the good and bad prognostic groups

	Bad prognosis mean (sd)	Good prognosis mean (sd)	<i>t</i>	<i>p</i>
MIB-1	19.11 (6.55)	13.03 (8.91)	1.57	= 0.12
AgNOR	15.11 (4.41)	8.59 (3.11)	4.42	< 0.0001
AgNOR in MIB-1 + cells	19.28 (5.6)	10.55 (4.10)	3.07	= 0.004
AgNOR in MIB-1 - cells	14.5 (4.46)	8.33 (3.02)	4.2	= 0.0002
<i>P</i>	339.72 (170.6)	125.33 (103.6)	3.67	= 0.0002

3.2. MIB-1 index, AgNOR and proliferative activity measurement

The results of AgNOR, MIB-1 and proliferative activity (*P*) measurements and the cut-off values chosen in these experiments are summarized in Table 1. Mean AgNOR area is 9.59 μm² (range 3.25–20.53). Mean MIB-1 index is 13.97% (range 1.5–35.2%) and mean *P* value is 197.58 (range 10.54–637.18). These values were determined in order to classify the results in low or high values. When the global AgNOR values are taken into account, 37% of the tumors are classified as low AgNOR–low MIB-1 (mean *P* = 82.8), 21% as low AgNOR–high MIB-1 (mean *P* = 196), 19% as high AgNOR–low MIB-1 (mean *P* = 168.8) and 23 % as high AgNOR–high MIB1 (mean *P* = 334.64). This distribution changes when the AgNOR areas are considered in MIB-1 positive cells only. In this case, 21% of the tumors are classified as low AgNOR–low MIB-1, 15.8% as low AgNOR–high MIB-1, 34.1% as high AgNOR–low MIB-1 and 29 % as high AgNOR–high MIB-1. The global AgNOR value is not correlated to the MIB-1 index (*p* = 0.08), neither is the

AgNOR value in MIB-1 positive cells (*p* = 0.39) or in MIB-1 negative cells (*p* = 0.14). However, there is a strong correlation between AgNOR values in MIB-1 positive and negative cells (*r* = 0.88, *p* < 0.0001). The mean AgNOR value in cycling cells is significantly higher (11.54) than in G0 cells (9.26) (*p* < 0.001).

3.3. Patients stratification

The patients were classified into two groups, depending on their good or bad prognosis. The patients who entered the bad prognosis group were those who developed visceral metastasis or death. All other patients entered the good prognosis group. The mean values of the different features analyzed in the good and bad prognosis groups were figured in Table 2.

3.4. MIB-1 and prognosis

The percentage of MIB-1 positive cells is not significantly different in bad or good prognosis groups (Table

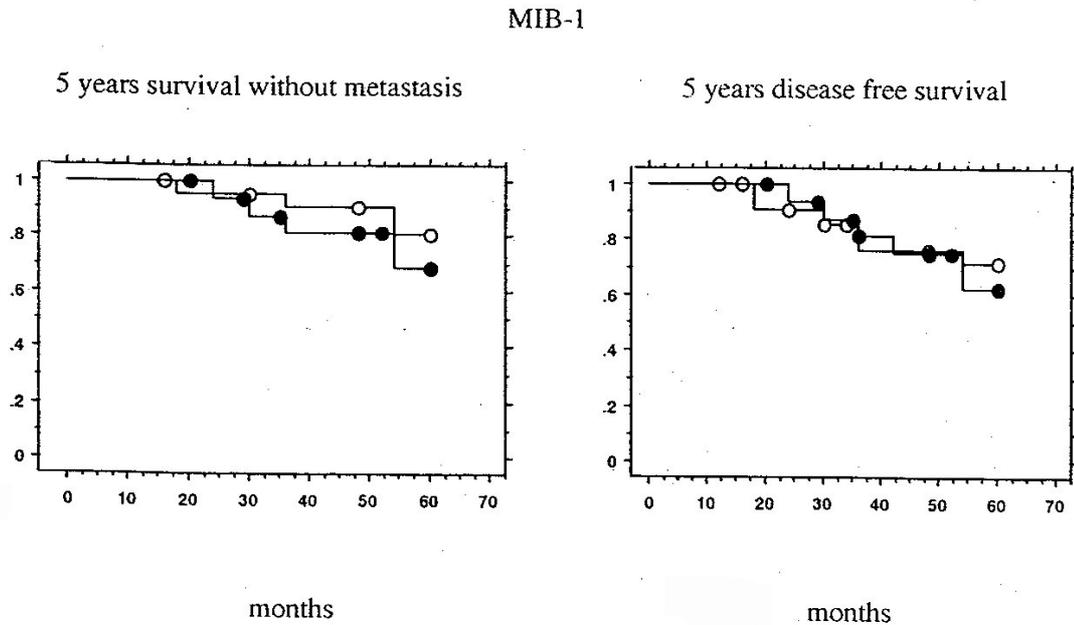


Fig. 2. Actuarial survival curves: survival without metastasis (left) and disease-free survival (right) for patients having a high MIB-1 index (black dots) or a low MIB-1 index (white dots). Cut-off value 15%.

AgNORS

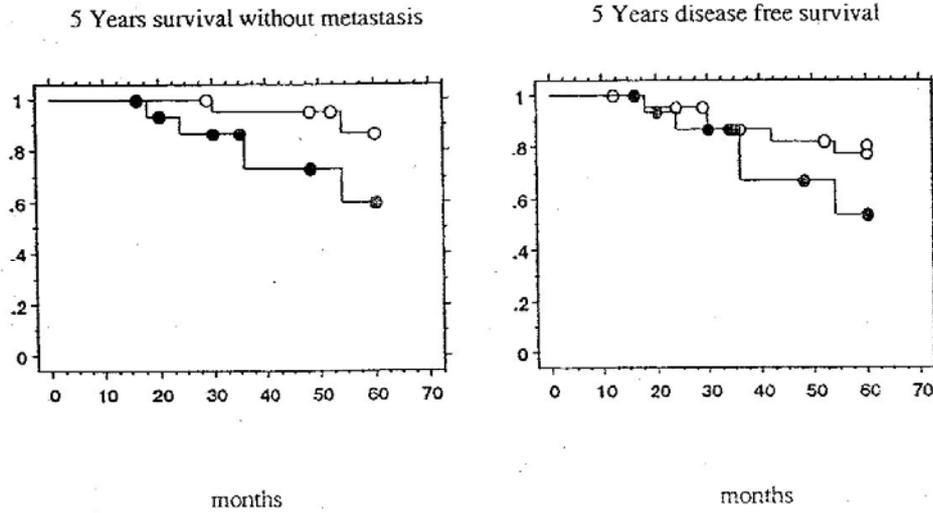


Fig. 3. Actuarial survival curves: survival without metastasis (left) and disease-free survival (right) for patients having a high AgNOR (black dots) or a low AgNOR (white dots). Cut-off value $10 \mu\text{m}^2$.

2). MIB-1 index is neither linked to survival without metastasis nor to disease free survival. The actuarial survival curves concerning patients with low or high MIB-1 index were shown in Fig. 2. The mean survival without metastasis is 55.5 months in the group with MIB-1 index lower than 15%, and 51.2 months in the group with high percentage of MIB-1 positives cells ($>15\%$, $p = 0.8$).

3.5. AgNOR and prognosis

The global mean AgNOR area is significantly higher in the bad prognosis group than in the good prognosis one ($p < 0.0001$) (Table 2). The survival curves of patients with high AgNOR were shown in Fig. 3. Mean survival without metastasis is 57.8 months in the low AgNOR group and 47.75 months in the high AgNOR group ($p = 0.01$). These

Proliferative activity

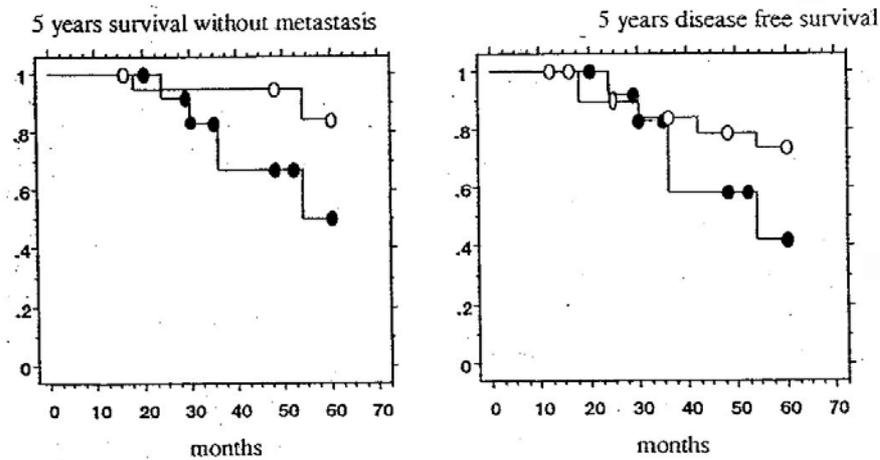


Fig. 4. Actuarial survival curves: survival without metastasis (left) and disease-free survival (right) for patients having a high proliferative activity (black dots) or a low proliferative activity (white dots). Cut-off value 200.

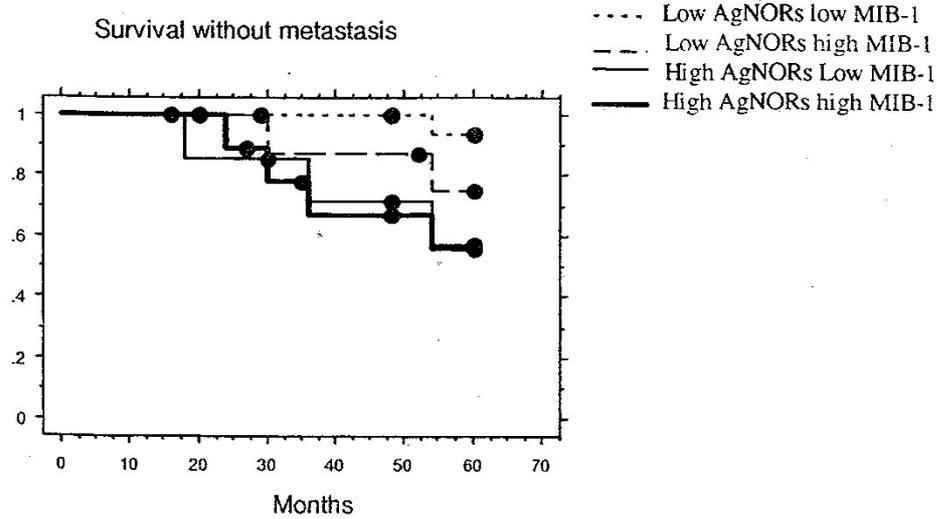


Fig. 5. Actuarial survival curves: survival without metastasis in the four groups for the global AgNOR content. Cut-off value for AgNOR $10 \mu\text{m}^2$, and 15% for MIB-1 labeling index.

values are 53.6 and 46.12 months for the disease-free survival of patients with low or high AgNOR, respectively ($p = 0.13$, not significant). Moreover, the global AgNOR area is strongly correlated to the duration of survival without metastasis ($p = 0.0004$) and disease-free survival ($p = 0.0006$). The global mean AgNOR area measurement is linked to 5 years survival, but it is insufficient to determine the time limit of appearance of relapse. The good and bad prognosis groups show significant differences concerning the mean values of AgNOR in MIB-1 positive cells on one hand, and AgNOR in MIB-1 negative cells on the other hand, as shown in Table 2. Surprisingly, this difference was more significant for the AgNOR in non-cycling cells.

3.6. Proliferative activity and prognosis

Proliferative activity (P) was obtained by multiplying the percentage of MIB-1 positive cells by the AgNOR area that those cells contain. P is significantly higher in the bad prognosis group than in the good prognosis one ($p = 0.0002$). The 5-year survival without metastasis and disease free survival curves were shown in Fig. 4. They demonstrate that P can be considered as a reliable prognosis factor. The mean duration of metastasis-free and disease-free survival are 57.38 months for a low P and 43.78 months for a high P ($p = 0.0024$), and 53.69 months for a low P and 41.92 months for a high P ($p < 0.002$), respectively. The

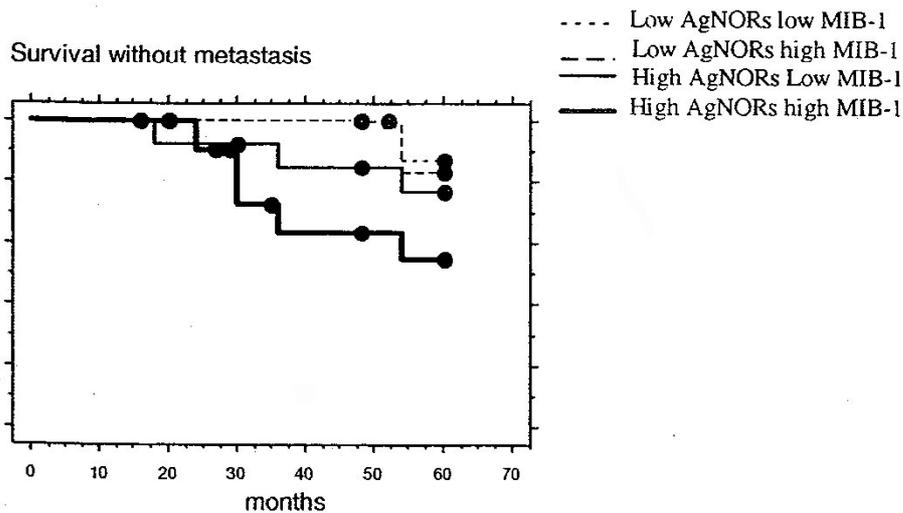


Fig. 6. Actuarial survival curves: survival without metastasis in the four groups for the global AgNOR content in MIB-1 positive cells. Cut off value for AgNOR $10 \mu\text{m}^2$, and 15% for MIB-1 labeling index.

patients who will surely present either a metastasis or a relapse can be detected by global AgNOR area measurement, but those with a high *P* should relapse earlier than those with a low *P*.

3.7. Distribution of low and high values of AgNOR and MIB-1 and prognosis

Figs. 5 and 6 represent the curves for 5-year survival without metastasis according to the four groups (low AgNOR–low MIB-1, low AgNOR–high MIB-1, high AgNOR–low MIB-1 and high AgNOR–high MIB-1). Fig. 5 shows the global mean AgNOR area and Fig. 6 presents the mean AgNOR area in MIB-1 positive cells. It is obvious that a high mean AgNOR area is a feature strongly correlated to survival without metastasis. However, a high AgNOR value in tumors having a high MIB-1 index allows us to select tumors with a high metastasis potential.

3.8. Correlation with other prognosis parameters

Neither MIB-1 index, nor AgNOR, nor *P* show any significant difference between lymph node positive and lymph node negative tumors. These features are not correlated with tumor size (results not shown).

4. Discussion

4.1. Double staining technique

In this study, we propose a new AgNOR-MIB-1-FITC double staining technique which can be used on cell cultures and on routine formalin fixed and paraffin embedded tissues. This staining method is relatively simple to perform and particularly adapted for the image cytometry measurement of various features. Indeed, by using a fluorescent staining for MIB-1, the problems of segmentation encountered by double staining based on peroxidase or alkaline phosphatase are overcome. This double staining is very stable at -20°C , since similar results were obtained from the same preparation over a period of 2 years.

For the AgNOR staining on tissue sections, we have used the reference method described by Ploton et al. (1986) and modified by Öfner et al. (1994). This technique requires a wet autoclave pretreatment, which standardizes the AgNOR staining particularly when AgNOR quantification is made by image analysis. Normally, MIB-1 staining requires a microwave irradiation step. Although, this method has the enormous advantage to retrieve antigens in formalin fixed tissues, it is known to have drawbacks resulting to the uneven distribution of microwaves within the oven, and leading to hot and cold regions, violent boiling and evaporation. Bankfalvi et al. (1994) have demonstrated that autoclaving at 120°C in a citrate buffer for immuno-histochemistry presents many advantages, such as a better conservation of the morphology, a more homogeneous heating, and that

a large number of slides could be treated simultaneously. Moreover, microwave irradiation can significantly increase the extend of AgNOR area, as described by Munakata and Hendricks (1994). For all these advantages, the microwave treatment was replaced by a step using a wet autoclave.

4.2. Correlation between proliferation features

We have not found any correlation between AgNOR values and MIB-1 index. The same observation was made by Bigras et al. (1996) in lung cancers. We agree with these authors that such a correlation could exist only in tumors with similar cycle duration. However, in our study the breast tumors analyzed are of different types, stages and grades which leads in a very heterogeneous tumor population.

The mean AgNOR area is significantly higher in cycling cells (i.e. MIB-1 +) than in G0 (i.e. MIB-1 -) cells. This is in agreement with other studies on tonsil tissue, non-Hodgkin's lymphomas and lung cancer (Bigras et al., 1996; Janmohamed et al., 1990; Munakata and Hendricks, 1994). AgNOR area in cycling cells was highly correlated to AgNOR values in quiescent cells but the pattern of silver staining is different in the two types of cells as assessed by the study within cultured cells. Thus, it appears that MIB-1 positive cells have very decondensed AgNOR staining, whereas negative ones show one large circular cluster of silver dots. Such characteristics can be strongly correlated to earlier findings within various types of cancerous cell lines with different cell-cycle duration (Derenzini et al., 1990a,b) or different grades of cancerous tissues (Ploton et al., 1986) after AgNOR staining alone.

4.3. Proliferation features and prognosis

MIB-1 index is neither correlated with survival without metastasis, nor with disease-free survival. In breast carcinomas, Veronese and Gambacorta (1991); Ostrowski et al. (1995) have observed no correlation between KI-67 labeling index and the lymph node status or with the presence of metastasis, despite a strong correlation between Ki-67 values and tumor size. This finding suggests that the tumor growth fraction determined by the number of cycling cells is independent of the spreading of the cancer. On the contrary, a correlation between KI-67 (MIB-1) labeling and patient survival have been found in other studies (Pietiläinen et al., 1996; Veronese et al., 1993; Veronese et al., 1996). The global AgNOR value is linked to prognosis independently of the MIB-1 index. Therefore, global mean AgNOR area appears like a potential prognostic factor for breast cancer. In the literature, the usefulness of AgNOR to determine the prognosis in tumor pathology remains controversial. In general, the authors who have not found any prognosis interest in counting AgNOR have not used an image analysis system for AgNOR quantification and have counted the number of silver dots within the nuclei (Nogushi et al., 1993; Toikkanen and Joensuu, 1993). On the other hand, the authors who have measured AgNOR area

with the help of image cytometry have often found a link between mean AgNOR area and patient prognosis (Aubele et al., 1994; Derenzini et al., 1990a,b; Gimenez-Mas et al., 1996; Sirri et al., 1995). In our study, the patients have been distributed in four groups depending on their low or high AgNOR index and their low or high MIB-1 score. This allowed us to discriminate a group of high risk of metastasis, i.e. the group with a high MIB-1 index and a high AgNOR index in the MIB-1 positive cells. This could be explained by the fact that tumors with a high MIB-1 index have a higher number of cells that have passed the G1 phase and entered the mitosis. As explained by Sirri et al. (1995), cells that were in S or G2 phases show a 3.04 fold increase of the amount of AgNOR proteins in comparison to cells in G1. It is easy to imagine that tumors with a large growth fraction associated to a high cycle speed could have a strong tendency to develop metastasis.

By measuring proliferative activity (P), we can obtain an idea of tumor cell kinetics. As demonstrated in the present work, the patients who will die, or present either a metastasis or a relapse, can be detected by global AgNOR area measurement, but those with a high P should relapse earlier than those with a low P . Similar results have been found by Bigras et al. (1996).

5. Conclusion

This work describes a new double staining method for measuring AgNOR silver-stained proteins in MIB-1 positive cells. This method, using a fluorescent chromogen linked to the MIB-1 antibody, is especially adapted for image cytometric measurements. It has allowed us to demonstrate that AgNOR measurement is linked to patient disease-free survival and survival without metastasis using a small series of breast tumors. A high mean AgNOR area within a tumor having a high MIB-1 index can discern tumors with metastatic potential. Moreover, the determination of the proliferation index, P , obtained by multiplying AgNOR area by MIB-1 labeling index, gives very useful data concerning the time limit before relapse.

References

- Aubele, M., Auer, G., Gais, P., Jütting, U., Rodenacker, K., Voss, A., 1994. Nucleolus organizer regions (AgNOR) in ductal mammary carcinoma. Comparison with classification and prognosis. *Path. Res. Pract.* 190, 129–137.
- Bankfalvi, A., Navabi, H., Bier, B., Böcker, W., Jasani, B., Schmid, K., 1994. Wet autoclave pretreatment for antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry. *J. Pathol.* 74, 223–228.
- Bigras, G., Marcelpoil, R., Brambilla, E., Brugal, G., 1996. Interest of targeting AgNOR measurement in cycling cells: in vivo cell kinetic evaluation of non-small cell lung cancer. *Anal. Cell. Pathol.* 11, 183–198.
- Brugal, G., 1995. Quantitative microscopy and tumor cell proliferation. *Bull. Cancer* 82 (suppl 5), 511s–517s.
- Derenzini, M., Pession, A., Trerè, D., 1990. Quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. *Lab. Invest.* 63, 137–140.
- Derenzini, M., Trerè, D., Mambelli, V., Millis, R., Eusebi, V., Cancellieri, A., 1990. Diagnostic value of silver stained interphasic nucleolar organizer regions in breast tumors. *Ultrastruct. Pathol.* 14, 233–245.
- Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H., Stein, H., 1983. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer.* 31, 13–20.
- Gerdes, J., Becker, M.H., Key, G., Cattoretti, G., 1992. Immunohistological detection of tumor growth fraction (KI-67 antigen) in formalin fixed routinely processed tissues. *J. Pathol.* 168, 85–86.
- Gimenez-Mas, J., Gallego-Calvo, P., Sanz-Moncasi, P., Rios-Mitchell, J., Valero, I., Sanz-Anquela, M., Burriel, J., Bavai, A., 1996. AgNOR evaluation by image processing methods. Staining modifications and results in 126 invasive ductal breast carcinomas. *Analyt Quant Cytol Histol* 18, 9–18.
- Jannohamed, R.M., Murray, P.G., Crocker, J., Leyland, M.J., 1990. Sequential demonstration of nucleolar organizer regions and KI-67 immunolabeling in non-Hodgkin's lymphomas. *Clin. Lab. Haematol.* 12, 395–399.
- Leong, A.S.-Y., Vinyuvat, S., Suthipintawong, C., Milios, J., 1995. A comparative study of cell proliferation markers in breast carcinomas. *J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.* 48, M83–M87.
- Munakata, S., Hendricks, J.B., 1994. A multilabeling technique for simultaneous demonstration and quantitation of KI-67 and nucleolar organizer regions (AgNOR) in paraffin-embedded tissue. *J. Histochem. Cytochem.* 21, 789–793.
- Nogushi, M., Thomas, M., Kitagawa, H., Kinoshita, K., Ohta, N., Miyazaki, I., Mizukami, Y., 1993. Argyrophilic nucleolar organizer regions in breast carcinoma: correlation with clinicopathological and biological variables and prognostic value. *Int. J. Oncol.* 2, 203–207.
- Öfner, D., Bankfalvi, A., Riehemann, K., Bier, B., Böcker, W., Schmid, K., 1994. Wet autoclave pretreatment improves the visualization of silver stained nucleolar organizer region associated proteins in routinely formalin fixed and paraffin embedded tissues. *Mod. Pathol.* 7, 946–950.
- Ostrowski, M.L., Chakraborty, S., Lauricia, R., Brown, R., Greenberg, S.D., 1995. Quantitative image analysis of MIB-1 immunoreactivity. A comparison with flow cytometric assessment of proliferative activity in invasive carcinoma of the breast. *Analyt. Quant. Cytol. Histol.* 17, 15–24.
- Pietiläinen, T., Lipponen, P., Aaltonen, S., Eskelinen, M., Kosma, V.-M., Syrjänen, K., 1996. The important prognostic value of KI-67 expression as determined by image analysis in breast cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 122, 687–692.
- Ploton, D., Menager, M., Jeannesseon, P., Himber, G., Pigeon, F., Adnet, J.J., 1986. Improvement of the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer regions at the optical level. *Histochem. J.* 18, 5–14.
- Sirri, V., Roussel, P., Trerè, D., Derenzini, M., Hernandez-Verdun, D., 1995. Amount variability of total and individual AgNOR proteins in cells stimulated to proliferate. *J. Histochem. Cytochem.* 43, 887–893.
- Smith, S.G., Murray, P.G., Crocker, J., 1993. Correlation between PCNA and AgNOR scores in non-Hodgkin's lymphomas using sequential staining technique. *J. Clin. Pathol.* 46, 28–31.
- Toikkanen, S., Joensuu, H., 1993. AgNOR counts have no prognostic value in breast cancer. *J. Pathol.* 169, 251–254.
- Trerè, D., Pession, A., Derenzini, M., 1989. The silver stained proteins of interphasic nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate. *Exp. Cell. Res.* 184, 131–137.
- Veronese, S.M., Gambacorta, M., 1991. Detection of KI-67 proliferation rate in breast cancer. Correlation with clinical and pathological features. *Am. J. Clin. Pathol.* 95, 30–34.
- Veronese, S.M., Gambacorta, M., Gottardi, M.D., Scanzi, F., Ferrari, M., Lampertico, P., 1993. Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer. *Cancer* 71, 3926–3931.
- Veronese, S.M., Maisano, C., Scibilia, J., 1996. Comparative prognostic value of KI-67 and MIB-1 proliferation indices in breast cancer. *Anticancer Res.* 16, 2717–2722.

* Manuscript (include title page, abstract, references, figure legends)

[Click here to download Manuscript \(include title page, abstract, references, figure legends\): Article AJSP R.doc](#)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Prognostic value of histological and biological markers in node negative breast cancer.

Pascal Abboud*, Marianne Lorenzato**, Christine Lechki**, Damien Joly***, Christian Quereux****, Philippe Birembaut**, Dominique Ploton**

* Department of Gynecology and Obstetrics, Hospital of Soissons, France

** Department of Pathology, University Hospital of Reims, France

*** Department of Informatics, University Hospital of Reims, France

**** Department of Gynecology and Obstetrics, University Hospital of Reims, France

Correspondence :

Pascal Abboud Department of Gynecology and Obstetrics, Hospital of Soissons, France

Email : pascal.abboud@ch-soissons.fr

Tel and fax : + (33) 323757406

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Prognostic value of histological and biological markers in node negative breast cancer.

Abstract

Background : Node negative breast cancer are over treated due to lack of pertinent prognostic markers.

Aim : This study was designed in order to evaluate the prognostic value of cell proliferation markers, including MIB1 to evaluate the rate of cycling cells, and AgNORs for estimation of the speed of the cell cycle.

Methods : We included 90 patients with node negative invasive breast cancer treated initially by surgery followed by radiotherapy (83.3%), and hormonotherapy (40%). No patient received chemotherapy. A double staining technique was used for both MIB1 and AgNORs labelling. The proliferation index (PI) was determined by multiplying the percentage of MIB1 positive cells and AgNORs area in MIB1+ cells. Proliferation index was evaluated for its impact on overall survival (OS) and disease free survival (DFS).

Results : The median follow-up was 98.7 months. Within this period, 14 (15.5%) patients developed metastasis, and 14 died (15.5%). We demonstrated that PI was correlated to OS in multivariate analysis and that the cut-off value at 200 was the most relevant. For DFS, PI conserved its high prognostic value in univariate analysis but did not reached, in multivariate analysis, the threshold of significativity. The global quantity of AgNORs seemed to be more discriminant in multivariate analysis.

Conclusion : AgNORs quantification and PI supply a supplementary information for the prognosis in node negative patients and we propose to integrate it in further study in this field.

Key words : MIB-1, AgNOR, cell proliferation, image cytometry, cancer prognosis, breast cancer

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Prognostic value of histological and biological markers in node negative breast cancer.

Introduction

Breast cancer is a major Public Health issue worldwide. In Europe, in 2004, it was estimated that there were 360 746 new cases of breast cancer (4). Classical clinical and pathological factors including age, tumor size, lymph node status, tumor grade and hormone receptor status (estrogen and progesterone receptors, ER and PR) are considered by some as sufficient prognostic factors (16, 32). Nevertheless, the optimal treatment of node negative breast cancer is still controversial. The risk of recurrence for a patient with a tumor measuring 1-2 cm and negative axillary node is approximately 20 to 30%. Most patients in this group are currently offered adjuvant systemic therapy (9). Judicial application of accurate, validated, and powerful prognostic factors is imperative to increase the efficiency of administration of chemotherapy and to spare toxicity to women at low risk of relapse (30).

In this study we evaluated the prognostic impact of a large panel of histological and biological markers in a cohort of node negative patient without adjuvant chemotherapy. Technical development of image cytometry analysis constitutes an attractive way to determine tumor proliferation. We have focused our interest on two controversial factors, ploidy analysis with the detection of tumors with abnormal DNA profiles (aneuploidy) and proliferation index including MIB1 index and AgNORS. The interphase AgNORS is a structural – functional unit for the synthesis of r RNA. The number and the size of AgNORS within the nucleolus is highly variable according to the rRNA transcription activity. There is evidence that in proliferating cells, the quantity of interphase AgNORS progressively increases from early G1, reaches a maximum value at the end of the S phase and remains constant up to the late G2 phase (25). The amount of interphase AgNORS is strictly related to the speed of cell proliferation. It was shown in human tumor cells lines, in vitro, that shorter the doubling time, greater the amount of interphase AgNORS (7). Thus the interphase AgNORS quantitative evaluation is the only way that allows estimating the rapidity of cell proliferation. Two markers are necessary to obtain an accurate proliferation index (PI) : quantification of the number of cycling cells which constitutes the growth fraction (GF), and AgNORS measurement which represents an indicator of the cell cycle duration (T). By using a double staining MIB1 and AgNORS on the same slide we were able to calculate a proliferation index $PI = GF \times 1/T$ where GF is the percentage of MIB1 positive cells and 1/T is appreciate by the AgNORS area in the MIB1 positive cells (5).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

The main aim of this study was to compare the prognostic impact of non classical parameters like ploidy profile and proliferation index to widely used features such hormonal status, lymphatic vessels invasion, tumor size and HER2-neu overexpression.

Patients and methods.

Patients : 90 patients with an unifocal invasive breast cancer who underwent, before the first January 1996, a complete surgical treatment with either lumpectomy or mastectomy, without lymph node involvement and without adjuvant chemotherapy were selected for the study. Women with metastatic breast cancer at the time of surgery were excluded. The date of entry was defined as the date of surgery. Termination date for the current analysis was the first January 2001. Histological diagnosis was based on the World Health Organization criteria. The histological grading was performed according to the Scarf Bloom and Richardson (SBR) classification. Numerous clinical, histological and biological parameters have been studied in order to evaluate their prognostic impact. The tumor size and the presence of lymphatic vessels invasion were noted in each case.

Immunohistochemical analysis (IHC) was used for the detection of the hormonal receptor, estrogen (ER) and progesterone (PR), (DAKO, France), for HER2-neu (NOVOCASTRA, France). Antigen retrieval was performed in boiling citrate buffer and immunostaining was done with the help of the streptavidin biotine peroxydase technique. The chromogen was DAB, and hematoxylin was used for the counterstaining. The MIB1 (DAKO, France) - Ag NORs double staining was performed using the technique described elsewhere (19)

DNA ploidy profile was determined after Feulgen staining on 5µm thick sections.

Image cytometry was used for the determination of the ER and PR status, for the quantification of the PI and for DNA ploidy measurement. RE and RP status like DNA ploidy measurement were performed on the CAS 200 image analyser (Becton Dickinson, Leiden The Netherlands) with the respective softwares. For the ploidy measurement, at least 200 cells were quantified. The determination of PI and the detection of rare events (5 C exceeding cells) were performed with the help of a semi automatic image analyser “The Discovery

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

System” (Becton Dickinson, Leiden, the Netherlands) with home made applications published elsewhere (19).

Features analysis :

Tumor size : two cut-off values were selected : 15 mm (pT15) and 20mm (pT20).

Tumor grade : according to the SBR classification, we compared grade 1,2 and 3 on one hand and grade 1 versus 2 and 3 on the other hand.

Lymphatic vessel invasion was classified as present or absent

ER and PR status was considered as positive if more than 10% of the infiltrating tumor cells were positive

The HER2-Neu status was classified as negative, 1+, 2+, or 3+ according to the recommendations of the French Association of Quality Assurance in anatomopathology. Only tumors classified as 3+ were considered as positives.

DNA ploidy profiles were classified into 3 groups :

Diploid : when the histogram presented an unique peak in the diploid region (after calibration on normal cells)

Aneuploid, if the histogram presented only one non diploid peak

Multiploid, if more than one aneuploid peak was present.

The quantification of the MIB1-AgNORS double stained slides was used to calculate PI. The Discovery system offers the possibility to obtain first, the percentage of MIB1 positive cells (MIB1+), and secondly the AgNORS area in MIB1 positive (AgNORS MIB+) or negative cells (AgNORS MIB-). It was of course possible to obtain the total AgNORS area regardless of the MIB1 status (AgNORS global).

The proliferation index PI was obtained by the following multiplication : (MIB1+) X (AgNORS MIB+).

Cut off values were chosen as follow with regard to the literature and our own experience: MIB1 + : 15%, AgNORS global : 15 and for PI : 2 cut-off values were studied : 100 and 200.

The prognosis was evaluated for these parameters for their univariate and multivariate effects to overall survival (OS) and disease free survival (DFS). P< 0.05 was considered to be statistically significant. Comparison between curves was assessed by log-rank test and the multivariate analysis was performed with the Cox’s proportional hazards regression model.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

We included in the multivariable Cox model all parameters correlated to the prognosis in the univariate analysis with $p \leq 0.10$.

Results.

In this series of 90 cases of invasive breast cancer, the mean patients' age was 53 (+/- 11.4). Tumour characteristics are provided in table1. Lumpectomy was performed for 69 patients (76.7%). Axillary dissection was realized in all cases. Mean histological size of the infiltrating component was 16.3 mm. Lymphatic vessel invasion (LVI) was observed in 12 patients (13.3%). Hormonal receptor analysis was performed in 76 cases (84.4%), and 66 of them (86.8%) were positive for estrogen and/or for progesterone. Radiotherapy was realized in 75 patients (83.3%) and hormonotherapy in 36 (40%). Lesions were diploids for 40 patients (46.5%), aneuploids for 24 patients (27.9%) and multiploids for 22 (25.6%). The lesions with minor 5c exceeding stemlines were present in 26 patients (29.2%). No chemotherapy was performed. Among our patients, 10 (11.1%) presented a local recurrence, 14 (15.5%) presented metastasis, 8 (8.8%) died from the disease, and 14 died at the end of the follow up period. Four cases with incomplete follow-up were censored. The mean period of OS was 98.7 months (+/- 32.4) with a median at 95 months. The mean of the DFS was 94.3 (+/- 35) with a median at 93 months. Death occurred with a mean of 98.9 months (+/- 32) and a median of 95.

Tumour size pT20 was correlated to SBR grade (1, 2+3) ($p = 0.01$), to HR expression ($p = 0.009$) and the presence of LVI ($p = 0.04$). Nevertheless, the tumour size was not correlated to MIB1 index, AgNORs quantity, PI and HER 2 neu over expression. In univariate analysis, pT15 and pT20 were correlated to OS with respectively $p = 0.04$ and $p = 0.01$, but not to DFS. In multivariate analysis only pT20 was correlated to OS with $RR = 3.5$ and $p = 0.03$, but not to DFS.

SBR grade (1,2+3) was correlated to tumour size with the cut-off at 20 mm ($p = 0.01$), to PI (PI200) ($p = 0.02$) and histologic variety ($p = 0.01$). Nevertheless, it was not correlated to LVI, HR expression, MIB1 index, AgNORs and HER 2 neu over expression. In univariate analysis, only SBR grade 1 versus 2+3 was correlated to OS but not to DFS. In multivariate analysis this factor was not an independent one.

In univariate analysis, ploidy was not correlated to OS even when it was analysed with three separate subgroups, namely, diploidy, aneuploidy and multiploidy or only diploidy versus non diploidy. Nevertheless, in this last configuration, diploid versus nondiploid lesions, ploidy was correlated to DFS. The second subgroup was more at risk for metastatic evolution.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Presence of 5c exceeding cells was not correlated to OS or to DFS. In multivariate analysis, no factor related to the ploidy was independent.

HR expression was correlated with OS, only in univariate analysis (table 2). MIB1 variable was significantly correlated to OS ($p = 0.001$) but not to DFS, in univariate analysis. MIB1 index ≥ 15 indicated a higher risk of fatal evolution. In multivariate analysis, MIB1 variable was not an independent prognostic factor for OS.

For AgNORs parameters, only AgNORs in MIB1+ cells were correlated to the prognosis in univariate analysis for OS ($p = 0.02$). For DFS, AgNORs MIB1+ ($p = 0.02$) and AgNORs glob ($p = 0.006$) were correlated to the prognosis (table 3) (fig 2). For these two factors, a value higher than the cut-off of $15 \mu\text{m}^2$, indicates a significantly improved risk of metastasis. In multivariate study, only AgNORs glob was correlated to DFS ($p = 0.01$).

In OS univariate analysis, PI was correlated to the prognosis even with a cut-off at 100 (PI 100) or 200 (PI 200) (fig 3). It was similar for DFS about PI100 and PI 200 with $p = 0.05$ and $p = 0.0001$ respectively (fig 4). In multivariate study, PI 200 was integrated in the analysis, but not PI 100. PI 200 was correlated to OS ($P < 0.001$, RR = 16.4, CI = [2.0- 129.9]) but did not reach the significant threshold for DFS ($p = 0.09$, RR = 5.0, CI = [1.0 - 25.0]).

The rate of HER2 neu overexpression 3+ was 10%. In univariate analysis this factor was slightly correlated to OS ($p = 0.05$) and to DFS ($p = 0.06$). In multivariate analysis this factor was independent $p < 0.05$, RR = 1.9, CI : [1.1 – 3.4] for OS, only when proliferative index, PI and AgNOR glob, were excluded. For DFS, in multivariate analysis, HER 2 did not reach significance, RR = 1.5, CI [0.9 – 2.5], $p = 0.08$.

LVI was not correlated to SBR grade, HR expression, histological type, MIB1 index, AgNORMIB+, AgNORglob and HER2 neu overexpression. Nevertheless LVI was positively correlated to PI 200 and to pT20. In univariate analysis, this factor was correlated to OS ($p = 0.02$) and DFS ($p = 0.008$). In multivariate analysis, LVI was correlated to OS (RR = 6.5) if PI 200 was not integrated in the model. For DFS, LVI was correlated ($p < 0.01$, RR : 5.1) with and without the integration of PI200 in the model.

Discussion

There is an evident over treatment for lymph node negative patients (14) and the application of St.Gallen 2005 international consensus recommendation (11) for our studied population should induced chemotherapy to 79 patients (87.7%). We decided to verify two major hypotheses concerning the prognostic value of ploidy, aneuploidy and minor stemlines with high DNA content, and the proliferation index (PI) on a homogeneous low risk population.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

We also integrated validated clinical and histological prognostic factors and evaluated two newly recognized prognostic factors: HER 2 neu overexpression and Lymphatic vessel invasion.

Ploidy study in breast cancer is not recommended in clinical practice by the American Society of clinical Oncology (1) neither by the consensus conference of American pathologist (10) but continues to be performed routinely in many institutions. In our study we used image cytometry analysis with the help of a software especially adapted to detect rare events or minor stemlines. The major advantage is the rapid screening of a large number of cells with the determination of the main stemlines and then measurement of only rarely occurring cells. We hypothesized that patients with breast cancer that had DNA aneuploidy or stemlines $> 5c$ DNA would have a worse prognosis than patients with breast cancer that did not have these characteristics. In the literature very often, all nondiploid lesions were considered in the same group called “aneuploidy” and were compared to diploid lesions. Our rate of “aneuploid” lesions, 53.5%, was similar to those reported by others with node negative breast cancer, 52.8% for Rudolf (21) and 50.8% for Trudeau (30). It was more important in series including node positive patients as for Gonzales-Vela with 64.7% (12) and for Spyrtos with 60% (27). In univariate analysis we observed that diploid lesions had higher rate of DFS ($p = 0.004$), but no impact on OS. For Rudolph too, the ploidy was correlated in univariate analysis with DFS ($p = 0.004$) but also with OS ($p = 0.015$) (21). In Cox model multivariate investigation, when we integrated the proliferative index PI200, ploidy status lost its prognostic strength. Similar results were reported by Rudolph, using topoisomerase II α and Ki67 as proliferative markers (21), and by Kute who used the S phase in their Cox model (18). For Shackney, DNA aneuploidy alone is an insufficient prognostic factor and the co-occurrence of multiple molecular abnormalities in the same cells might enable synergistic interactions. The presence of HER2-neu and ras over expression in DNA aneuploid cells implied a shorter DFS ($p = 0.004$) (24).

MIB1, an antibody directed against a Ki67 epitope, preserved in formalin fixed tissue, is a valuable tool for proliferation assessment on standard histological section. We observed that MIB1 is correlated to the OS ($p = 0.01$). Similar results were previously reported (2, 6). We did not observe any correlation between MIB1 and metastatic evolution. In multivariate analysis, MIB1 was not linked to OS, as reported by others authors (2, 6). Heterogeneous results were reported concerning the importance of MIB1, although they seem to be still in

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

favour of its prognostic value in breast cancer (23). Several factors can explain these discrepancies through the literature. Studies are heterogeneous with different therapeutic protocols and variety of clinical and biological variables included in the multivariate analysis (27). The cut-off value used to analyse the prognostic impact for MIB1 varied from 1% (13) to 32% (6).

The staining of cells by MIB1 is easy and reproducible but the determination of the percentage of cycling cells alone is not sufficient to appreciate the proliferation rate of a tumour (23). Estimation of the cell cycling duration is necessary and can be done with AgNORs quantification which is related to ribosomal biogenesis rate (8). The faster is the cycle, higher is the amount of AgNORs in the nucleolus (7). We observed that there was no relation between AgNORs glob and MIB1 index, as reported by others (2, 3, 28). We demonstrated that AgNORs MIB1+ was a pertinent prognostic parameter for OS and DFS. Quantification of global AgNORs was linked to the DFS and not to OS in univariate and multivariate analyses. Among AgNORs parameters, AgNORs glob seems to be the most impressive. Our results confirmed those previously reported by Kruger (17). Recently, Trere analysed MIB1 index and AgNORs area in a series including node negative and node positive breast cancer, and concluded that in node negative patients these two parameters did not showed an independent prognostic value, in opposition to node positive one (29). For MIB1 as for AgNORs, the absence of an identified and standardized cut-off value induces a lack of clarity and is responsible of the absence of interest observed, for this factor, in breast pathology. In Trere study these cut-off were respectively 20% and 5 μm^2 (29).

We analysed PI obtained by multiplying 2 parameters: MIB1 index and the area of AgNORs in MIB1+ cells. Studies were previously performed with a double staining for AgNORs and Ki67 (20) or AgNORs and PCNA (26). A direct correlation between the quantity of AgNORs glob and AgNORs in cycling cells was reported (20, 26). Bigras was the first who studied the prognostic impact of the quantity of AgNORs in Ki67 positive cells, in patients with lung cancer (3). We calculated the PI, as defined by Brugal (5), which needed an AgNORs-MIB1-FITC double staining technique. Such a technique is easy to perform and particularly adapted to the image cytometry measurement of various features. This double staining is very stable at -20°C . We obtained similar results from the same preparation over a period of 2 years. Indeed, by using a fluorescent staining for MIB1, problems of segmentation encountered by double staining based on peroxidase or phosphatase alkaline, are overcome. We demonstrated that PI with a cut-off at 100 and 200 is discriminating for OS with $p = 0.02$ and $p < 0.001$

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

respectively and for DFS with $p = 0.05$ and $p = 0.0001$ respectively. Nevertheless, the performance was more important with PI 200. For the multivariate analysis we included PI 200, and not PI100. In our population, 33 patients (36.6%) had a $PI > 200$, among them 11 developed metastasis. The three others, who developed metastasis, had $PI < 100$. Biesterfeld reported a correlation between OS and PI with MIB1 index and AgNORsMIB1+ in a multivariate analysis with an accepted statistical significance of $p \leq 0.10$ (2). In this study with lymph nodes involvement and a high rate of death, the PI value was lower than ours with a mean of 89.9 versus 185.2 due to AgNORs. This pointed up the needs of a clearly defined cut-off value for MIB1, AgNORs and PI, and the usefulness of studies on larger cohorts in order to standardize the measurements. This will allow to clearly determine the importance of these biological markers in the detection of high risk patients with node negative breast cancer.

We retrospectively determined HER 2 neu overexpression by IHC only. The particularity of our population was the absence of node involvement, which was rarely studied. Our rate of tumours with HER2 neu 3+ was 10%, less than those usually reported and included between 15 and 30% (22). Nevertheless, it is comparable to Huang's (15) and Trudeau's rates (30), respectively 10,9% and 14%. We have demonstrated that HER 2 neu overexpression was an independent factor for OS in multivariate analysis. However, when we included in this analysis the proliferation markers such as AgNORs and PI200, HER2 neu lost its independent value.

Lymphatic and blood vessels invasion is assessed in peritumoral breast tissue in routinely processed tissue. Many studies had demonstrated that peritumoral vascular invasion is predictive of a worse prognosis, particularly for node negative patients (30, 31). In our study we only considered LVI. The prevalence of LVI varied among different series reflecting different methods of pathologic assessment and a low degree of reproducibility. We observed that LVI was correlated to OS and DFS in univariate and multivariate analysis. Our results are consistent with the data of Westenend, in node negative population (31). The St Gallen Consensus conference in 2005 considered that vascular invasion was a prognostic factor that implied the classification of these patients into the intermediate group and justified the use of adjuvant chemotherapy (11).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Conclusion.

In a node negative population without chemotherapy we demonstrated that PI was correlated to OS in multivariate analysis and that the cut-off at 200 was the most interesting one. For DFS, PI 200 conserved its high prognostic value in univariate analysis and the global quantity of AgNORs seemed to be more discriminative in multivariate analysis. AgNORs quantification and PI bring supplementary information for the prognosis in node negative patients and avoid unnecessary chemotherapy. They should be integrated in further studies in this field. Our data also support, the assessment that LVI is a useful prognostic factor for operable breast cancer.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

References

1- Bast RC Jr, Ravadin P, Hayes DF et al. 2000 update of recommendations for the use of tumors markers in breast and colorectal cancer : clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001 ; 19 : 1865-78

2- Biesterfeld S, Farokhzad F, Kluppel D, et al. Improvement of breast cancer prognostication using cell kinetic-based silver-stainable Nucleolar organizer region quantification of the MIB1 positive tumor cell compartment. *Virchows Arch* 2001 ; 438 : 478-84

3- Bigras G, Marcelpoil R, Brambilla E, et al. Interest of targeting AgNOR measurement in cycling cells : in vivo cell kinetic evaluation of non-small cell lung cancer. *Anal Cell Pathol* 1996 ; 11 : 183-98

4- Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe in 2004. *Ann Oncol* 2005 ; 16 : 481-8

5- Brugal G. Quantitative microscopy and tumor cell proliferation. *Bull Cancer* 1995 ; 82 (suppl 5) : 511s-517s

6- Caly M, Genin P, Alghuzlan A, et al. Analysis of correlation between mitotic index, MIB1 score and S-phase fraction as proliferating markers in invasive breast carcinoma. Methodological aspects and prognostic value in a series of 257 cases. *Anticancer Research* 2004 ; 24 : 3283-8

7- Derenzini M, Sirri V., Trere D, et al. The quantity of nucleolar silver stained proteins nucleolin and B23 is related to cell doubling time in human cancer cells. *Lab Invest.* 1995, 73, 497-502.

8- Derenzini M, Ceccarelli C, Santini D, et al. The prognostic value of the AgNOR parameter in human breast cancer depends on the pRb and p53 status. *J Clin Pathol* 2004 ; 57: 755-61

9- Esteva FJ, Hortobagyi GN. Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res* 2004; 6 : 109-18

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

10-Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus statement 1999. Arch Pathol Lab Med 2000 ; 124 : 966-78

11- Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD et al. Meeting highlights : international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. Ann Oncol 2005; 16 : 1569-83

12- Gonzalez-Vela MC, Garijo MF, Fernandez F et al. MIB1 proliferation index in breast infiltrating carcinoma : Comparison with other proliferative markers and association with new biological prognostic factors. Histol Histopathol 2001 ; 16 : 339-406

13- Haerslev T, Jacobsen GK, Zedeler K. Correlation of growth fraction by Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry with histopathological parameters and prognosis in primary breast carcinomas. Breast Cancer Res Treat 1996 ; 37 : 101-13

14- Hayes DF. Prognostic and predictive factors revisited. The breast 2005 ; 14 : 493-9

15- Huang HJ, Neven P, Drijkoningen M et al. Association between tumour characteristics and HER-2/neu by immunohistochemistry in 1362 women with primary operable breast cancer. J Clin Pathol 2005 ; 58 : 611-6

16- Kaufman M, Scharl A. Do we need better prognosis factors in node negative breast cancer ? Eur J Cancer 2000 ; 36 : 298-301

17- Kruger S, Stahlhut M, Muller H. Cell cycle-dependant AgNOR analysis in invasive breast cancer. Anal Quant Cytol Histol 2000 ; 22 : 358-63

18- Kute TE, Russell GB, Zbieranski N et al. Prognostic markers in node-negative breast cancer : a prospective study. Cytometry 2004 ; 59 B : 24-31

19- Lorenzato M, Abboud P, Lechki C et al. Proliferation assessment in breast cancer : a double-staining technique for AgNOR quantification in MIB-1 positive cells especially adapted for image cytometry. Micron 2000; 31 : 151-9

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

20- Munakata S, Hendricks JB. A multilabeling technique for simultaneous demonstration and quantitation of Ki-67 and nucleolar organizer regions (AgNORs) in paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem.* 1994 ; 42 :789-3

21- Rudolph P, Olsson H, Bonatz G et al. Correlation between p53, c-erbB-2, and topoisomerase II alpha expression, DNA ploidy, hormonal receptor status and proliferation in 356 node-negative breast carcinomas : prognostic implications. *J Pathol* 1999 ; 187 : 207-16

22- Saint Paul de Vence. Recommandations pour la pratique clinique. *Oncologie* 2005 ; 7 : 342-79

23- Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein : from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000 ; 182 : 311-22

24- Shackney SE, Smith CA, Pollice A et al. Intracellular patterns of HER-2/neu, ras and ploidy abnormalities in primary human breast cancers predict postoperative clinical disease-free survival. *Clin Cancer Res* 2004 ; 10 : 3042-52

25- Sirri V, Roussel P, Hernandez-Verdun D. The AgNORs proteins : qualitative and quantitative changes during the cell cycle. *Micron*, 2000, 31 (2) 121-6

26- Smith FG, Murray PG, Crocker J. Correlation between PCNA and AgNOR scores in non-Hodgkin's lymphomas using sequential staining technique. *J Clin Pathol.* 1993 ; 46 : 28-31

27- Spyrtos F, Ferrero-Pous M, Trassard M et al. Correlation between MIB-1 and other proliferation markers : clinical implications of the mib-1 cut-off value. *Cancer* 2002 ; 94 : 2151-9

28- Surowiak P, Paluchowski P, Wysocka T et al. Steroid receptor status, proliferation and metallothionein expression in primary invasive ductal breast cancers. *Pathology Oncology Research* 2004 ; 10 : 207-11

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

29- Trere D, Ceccarelli C, Migaldi M et al. Cell proliferation in breast cancer is a major determinant of clinical outcome in node-positive but not in node-negative patients. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2006 ; 14 : 314-23

30- Trudeau ME, Pritchard KI, Chapman J-A W et al. Prognostic factors affecting the natural history of node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2005 ; 89 : 35-45

31- Westenend PJ, Meurs CJC, Damhuis RAM. Tumour size and vascular invasion predict distant metastasis in stage I breast cancer. Grade distinguishes early and late metastasis. *J Clin Pathol* 2005 ; 58 : 196-201

32- Zujewski J, Liu ET. The 1998 St Gallen's Consensus Conference : an assessment. *J Natl Cancer Inst* 1998 ; 90 : 1587-9

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure legends

Fig 1 : overall survival and global AgNORs (cut-off : 15 μm^2)

Fig 2 : Disease free survival and global AgNORs (cut-off : 15 μm^2)

Fig 3 : overall survival and proliferative index (cut-off : 200)

Fig 4 : DFS and proliferative index (cut-off : 200)

Tables

Tables

Table 1 : Main characteristics of patients and tumours (n=90)

	Mean values (+/- SD)	N (%)
Age	57.3 +/- 11.4	
pT (mm)	16.3 +/- 7.3	
Surgery		
lumpectomy		69 (76.7)
mastectomy		21 (23.3)
Number of nodes	12.3 +/- 5.0	
MIB 1	9.1 +/- 6.4	
≥ 15		18 (20.0)
AgNOR MIB+	20.4 +/- 9.9	
≥ 15		59 (65.6)
Ag NOR global (µm ²)	18.9 +/- 7.7	
≥ 15		53 (58.9)
Proliferation Index	185.2 +/- 166.2	
< 100		40 (44.4)
≥ 200		33 (36.7)
Lymphatic invasion		
Presence :		12 (13.3)
Tumour grade (SBR)		
1		19 (23.7)
2		39 (48.7)
3		22 (27.5)
Hormone receptors (ER, PR)		
positive		66 (86.8)
Her2/neu status (IHC)		
0		54 (60.0)
1		16 (17.8)
2		11 (12.2)
3		9 (10.0)
Radiotherapy		
yes		75 (83.3)
Hormonotherapy		
yes		36 (40.0)

Table 2: Overall survival: univariate analysis (Logrank Test)

	Cut-off	p
Tumour grade (SBR)	1, 2, 3 1, 2+3	0.08 <u>0.03</u>
Age	50	NS
Proliferation Index	100 200	0.02 <u><0.0001</u>
Hormone receptors (RE, RP)		<u><0.004</u>
pT (mm)	15 20	0.04 <u>0.01</u>
Lymphatic invasion		<u>0.02</u>
Ploidy	Diploid, multiploid, aneuploid Diploide / multiploid + aneuploid	NS NS
MIB1 +	15	<u>0.01</u>
AgNORs MIB+	15	<u>0.02</u>
AgNORs global	15	0.11
Her2/neu	0, 1, 2, 3	<u>0.05</u>
Radiotherapy		<u>0.02</u>
Homonotherapy		NS

NS : not significant

Multivariate analysis included all highlight factors

Table 3: Disease Free Survival : univariate analysis (Logrank Test)

	Cut-off	p
Bloom	1, 2, 3	NS
	1, 2+3	NS
Age	50	NS
Proliferation Index	100	0.05
	200	<u>0.0001</u>
Hormone receptors (RE, RP)		<u>0.10</u>
pT (mm)	15	<u>0.09</u>
	20	NS
Lymphatic invasion		<u>0.008</u>
Ploidy	Diploid, multiploid, aneuploid	NS
	Diploïde / multiploid + aneuploid	<u>0.04</u>
MIB1	15	NS
AgNORs MIB+	15	<u>0.02</u>
AgNORs global	15	<u>0.006</u>
Her2	0, 1, 2, 3	0.06
Radiotherapy		NS
Hommonotherapy		NS

NS : not significant

Multivariate analysis included all highlight factors

Figure

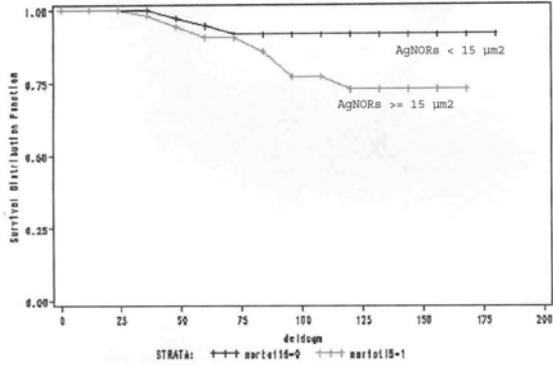


Fig 1 : overall survival and global AgNORs (cut-off : 15 μm²)

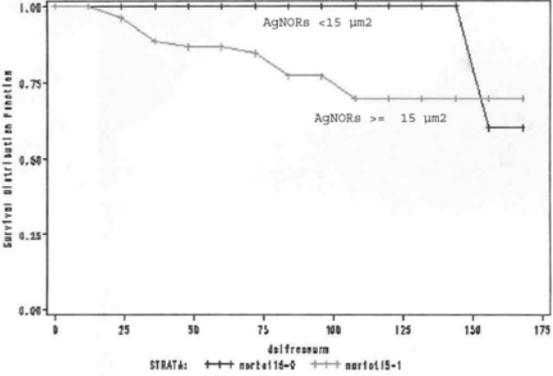


Fig 2 : Disease free survival and global AgNORs (cut-off : 15 μm²)

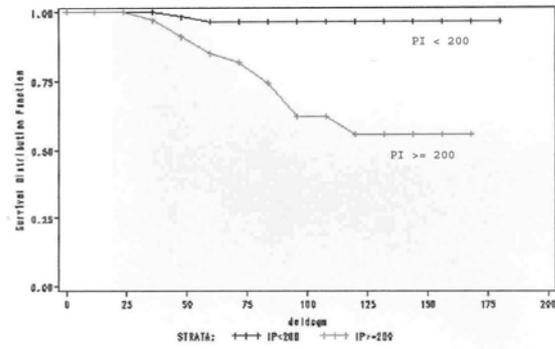


Fig 3 : overall survival and proliferative index (cut-off : 200)

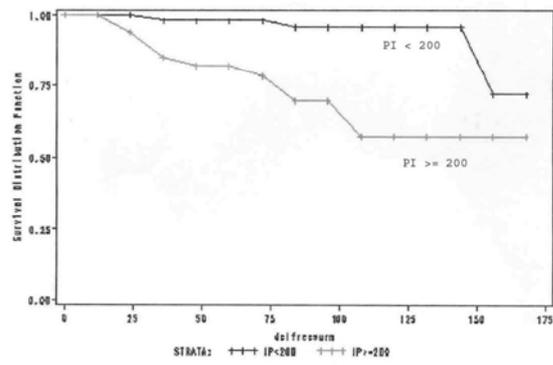


Fig 4 : DFS and proliferative index (cut-off : 200)

GBEA	LABORATOIRE POL BOUIN HISTOLOGIE - CYTOLOGIE U.F. 6120	Ch 6-3-3-5-A Page 1 / 5
FICHE 3A : NORS-MIB1		

1 - OBJECTIF

- Mesurer le nombre de noyaux engagés dans le cycle et approcher la durée du cycle.

2 - PRELEVEMENTS

- Prélèvement d'histologie, fixé, infiltré (ch. 6-3-3-2-1, page 5/17) et enrobé (ch. 6-3-3-2-1, page 7/17) selon la méthode histologique.

3 - TEMOIN

- En témoin positif : utiliser une rondelle d'appendice.

4 - REACTIFS

➤ Produits de base

- | | | | |
|------------------------------|-------------------------|---------------|---------------------------|
| • Mib1 | Réf. : M7240 | DAKO | à 4° réfrigérateur 3F |
| • Acide biotinylé | Réf. : RPN1001 Batch 18 | Amersham | à 4° réfrigérateur 3F |
| • Streptavidine
ALEXA 488 | Réf. : S11223 | Interchim | à 4° réfrigérateur 3F |
| • Hematoxyline de Mayer | Réf. : 361 62-1 | RAL | Temp. ambiante placard 24 |
| • Nitrate d'argent | Réf. : 1512 | Merck | Temp. ambiante placard 29 |
| • Gélatine | Réf. : 4078 | Merck | Temp. ambiante placard 29 |
| • Acide formique | Réf. : 264 | Merck | Temp. ambiante placard 32 |
| • Acide citrique | Réf. : 244 | Merck | Temp. ambiante placard 32 |
| • Citrate de sodium | Réf. : 6446 | Merck | Temp. ambiante placard 29 |
| • PBS | Réf. : 75511 | Bio Mérieux | Temp. ambiante placard 27 |
| • Lame super frost | Réf. : 041300 | Menzel Glaser | Placard 25 |
| • Vert d'éthyl | Réf. : M8884 | Sigma | Temp. ambiante placard 26 |

VERSION: 0	REDIGEE PAR : C. LECHKI	WISEE PAR : D. BOUTTENS - G. EVEARD
DATE :		DATE: <i>Bouttens</i>

GBEA	LABORATOIRE POL BOUIN HISTOLOGIE - CYTOLOGIE U.F. 6120	Ch 6-3-3-5-A Page 2 / 5
FICHE 3A : NORS-MIB1		

➤ Préparation des produits

◆ Tampon pH 6

- Solution A : acide citrique

Peser 0,21 g puis compléter avec 10 ml d'eau déminéralisée.

- Solution B : citrate de sodium

Peser 1,47 g pour 50 ml d'eau déminéralisée

Ou 0,29 g pour 10 ml d'eau déminéralisée.

- Solution de travail

POUR 100 ML DE SOLUTION :

- prendre : 1,8 ml de solution A
8,2 ml de solution B
- puis compléter avec 90 ml d'eau déminéralisée.

◆ Nitrate d'argent à 25 %

- Peser 1 g d'Ag NO₃ pour 4 ml d'eau déminéralisée.
- A diluer au moment de l'emploi.

◆ Gélatine à 2 %

- Peser 2 g de gélatine puis compléter avec 100 ml d'eau déminéralisée.
- Faire dissoudre à l'étuve à 60° C.
- Après dissolution et refroidissement, prendre 10 ml de gélatine et ajouter 0,1 ml d'acide formique.

VERSION: 0

REDIGEE PAR : C. LECHKI

DATE :

VISEE PAR : D. BOUTTENS - G. ENRARD

DATE:

Bouttens *Enrard*

GBEA	LABORATOIRE POL BOUIN HISTOLOGIE - CYTOLOGIE U.F. 6120	Ch 6-3-3-5-A Page 3 / 5
FICHE 3A : NORS-MIB1		

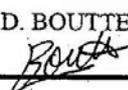
◆ **Solution de nitrate d'argent gélatinée à 25 %**

- Lorsque le nitrate d'argent est dilué, ajouter 2 ml de la solution de gélatine à 2 %.

IMPORTANT : la solution une fois mélangée réagit rapidement. Il est donc **impératif** de la mettre sur les lames et le tout à l'abri de la lumière le plus vite possible.

4 - PREPARATION DE L'AUTOCLAVE

- Mettre dans un autoclave d'une contenance de 7 litres : 850 ml d'eau déminéralisée.
- Dans un flacon hermétique, mettre les lames avec du tampon pH 6.
- Fermer le flacon, puis le poser dans le panier à l'intérieur de l'autoclave.
- Fermer l'autoclave, puis faire chauffer jusque 120° C.
- Pour cela mettre sur la plaque électrique à thermostat 7.
- Laisser dans l'autoclave à 120° C pendant 20 mn.
- Laisser refroidir à température ambiante ou dans un bain marie d'eau froide.
- Rincer dans l'eau déminéralisée.

VERSION: 0 REDIGEE PAR : C. LECHKI DATE :	VISEE PAR : D. BOUTTENS - G. FERRARD DATE:  
---	--

GBEA	LABORATOIRE POL BOUIN HISTOLOGIE - CYTOLOGIE U.F. 6120	Ch 6-3-3-5-A Page 4 / 5
FICHE 3A : NORS-MIB1		

6 - MODE OPERATOIRE

➤ Préparation des lames

- Couper les blocs.
- Etaler sur lames super frost avec de l'eau déminéralisée.
- Laisser sécher une nuit à l'étuve à 37° C.
- Déparaffiner dans :

3 bains de xylène	3 x 5 mn
2 bains d'alcool 100°	2 x 5 mn
1 bain d'alcool 95°	5 mn
1 bain d'eau déminéralisée.	

➤ Technique

MIB1

- bien essuyer la lame autour du prélèvement sans l'assécher complètement.
- mettre le MIB1 (KI67) dilué extemporanément au 1/10° dans du PBS 1 heure à température ambiante à l'obscurité et en chambre humide.
- rinçage 2 fois 5 mn dans du PBS.
- mettre l'anticorps biotinylé dilué extemporanément au 1/50° dans du PBS 1 heure à température ambiante à l'obscurité et en chambre humide.
- rinçage 2 fois 5 mn dans du PBS.
- mettre la streptavidine FITC dilué extemporanément au 1/50° ou de l'Alexa dilué au 1/1000° dans PBS 1/2 heure à température ambiante à l'obscurité et en chambre humide.
- rinçage 2 fois 5 mn dans du PBS.
- **rinçage dans de l'eau déminéralisée.**

VERSION: 0

REDIGEE PAR : C. LECHKI

DATE :

WISEE PAR : D. BOUTTENS - G. FERRARD

DATE:

Bouttens *Ferrard*

GBEA	LABORATOIRE POL BOUIN HISTOLOGIE - CYTOLOGIE U.F. 6120	Ch 6-3-3-5-A Page 5 / 5
FICHE 3A : NORS-MIB1		

NORS

- laisser sécher les lames à l'air.
- mettre la solution de nitrate d'argent gélatiné à 25 % pendant 25 mn à température ambiante à l'obscurité et en chambre humide.
- rincer dans de l'eau déminéralisée 3 fois.
- mettre dans du thiosulfate de sodium à 5 % pendant 1 à 5 mn.
- rincer dans de l'eau déminéralisée.
- mettre environ 10 sec dans de l'hématoxyline de Mayer pour obtenir une coloration bleue très très légère.
- rincer dans de l'eau déminéralisée.
- faire virer dans de l'eau courante.
- rincer dans de l'eau déminéralisée.
- monter les lames à la glycérine tamponnée puis luter au vernis à ongle, ou utiliser un milieu de montage pour fluorescence anti fading.
- **sans anti fading, les lames se conservent à - 20°.**

7 - ELIMINATION

- Bidons d'élimination des effluents.

8 - PRECAUTIONS PARTICULIERES

- Faire bien attention à ce que la solution soit bien à l'abri de la lumière.

9 - RESULTATS

- Les Ag-NORS apparaissent sous forme de petits amas bruns noirs dans les noyaux.
- Les MIB doivent être observés en lumière fluorescente à 486 nanomètres. Ils apparaissent verts fluorescents.

VERSION: 0 REDIGEE PAR : C. LECHKI DATE :	VISEE PAR : D. BOUTTENS - G. EVRARD DATE : <i>Bouttens</i>
---	---

ANNEXE 5 : liste des tableaux

Tableau 1 :	Taux d'envahissement ganglionnaire axillaire en fonction de la taille de la tumeur	p.7
Tableau 2 :	Survie à 5 ans en fonction de la taille tumorale et de l'envahissement ganglionnaire	p.8
Tableau 3 :	Grade histopronostique d'Elston-Ellis	p.13
Tableau 4 :	Exemples de longueur d'ondes d'excitation utilisables en fluorescence	p.25
Tableau 5 :	Les taux utilisés pour décrire le pronostic	p.26
Tableau 6 :	Classification de la population tumorale	p.35
Tableau 7 :	Sous population avec une bonne évolution	p.59
Tableau 8 :	Sous population avec une mauvaise évolution	p.60
Tableau 9 :	Synthèse des deux groupes	p.60
Tableau 10 :	Contenu en ADN et devenir des patientes	p.65
Tableau 11 :	Résultats des paramètres étudiés	p.70
Tableau 12 :	Valeurs moyennes des paramètres analysés dans les groupes de bon et de mauvais pronostic	p.72
Tableau 13 :	Résultats descriptifs. Population globale (n=90)	p.80
Tableau 14 :	Survie globale quelle que soit la cause du décès. Analyse univariée (test de Logrank)	p.83
Tableau 15 :	Survie sans métastases. Analyse univariée (test de Logrank)	p.84
Tableau 16 :	Survie globale. Analyse multivariée (Modèle de Cox)	p.94
Tableau 17 :	Survie sans métastases. Analyse multivariée (Modèle de Cox)	p.97
Tableau 18 :	Récapitulatif de la quantité d'AgNORs exprimée en μm^2 (n=90)	p.98
Tableau 19 :	Récapitulatif de l'analyse univariée	p.107
Tableau 20 :	Récapitulatif de l'analyse multivariée	p.107
Tableau 21 :	Valeur pronostic de l'index Ki67 dans la littérature	p.118
Tableau 22 :	Valeur pronostic : seuil retenu et valeur moyenne du MIB1	p.121
Tableau 23 :	Estimation du risque relatif de rechute et de décès selon les différents seuils de Ki67	p.122

ANNEXE 6 : liste des figures

Figure 1 : carcinome canalaire infiltrant (x20)	p.11
Figure 2 : carcinome intra-canalaire (x20)	p.11
Figure 3 : comédocarcinome (x20)	p.11
Figure 4 : carcinome lobulaire infiltrant (x20)	p.11
Figure 5 : carcinome mucineux (x 20)	p.11
Figure 6 : carcinome cribriforme (x20)	p.11
Figure 7 : carcinome canalaire infiltrant, SBR 1 (X20)	p.14
Figure 8 : canalaire infiltrant, SBR 2 (X20)	p.14
Figure 9 : carcinome canalaire infiltrant, SBR 3 (X20)	p.14
Figure 10 : images de mitoses, SBR 3 (X 20)	p.14
Figure 11 : seuillage noir et blanc	p.21
Figure 12 : images de dilatation (à gauche) et d'érosion (à droite) d'un objet (situé au centre)	p.22
Figure 13 : exemples de squelettes	p.23
Figure 14 : Une courbe de survie typique, avec le détail d'une partie de la courbe	p.27
Figure 15 : histogramme du contenu en ADN	p.34
Figure 16 : marquage MIB1 : 10% (x 20)	p.39
Figure 17 : marquage MIB1 : 35% (x 20)	p.39
Figure 18 : marquage MIB1 : 43% (x 20)	p.39
Figure 19 : Nucléole en microscopie électronique	p.41
Figure 20 : marquage des AgNORs : les points noirs (x 40)	p.44
Figure 21 : La famille des gènes HER (erb)	p.47
Figure 22 : HER2 : 0+ (X20)	p.50
Figure 23 : HER2 : 1+ (X20)	p.50
Figure 24 : HER2 : 2+ (X20)	p.50
Figure 25 : HER2 : 3+ (X20)	p.50
Figure 26 : Distribution de l'ADN, concordance entre les deux analyses avec détection d'une population tétraploïde par les analyses CAS	

(haut) et Discovery (bas)	p.62
Figure 27 : Distribution de l'ADN, détection d'un pic aneuploïde minoritaire par l'étude Discovery (bas), non mis en évidence avec l'étude CAS (en haut)	p.63
Figure 28 : Distribution de l'ADN, détection de cellules hyperploïdes, sur le côté droit, par l'analyse Discovery (en bas) et non l'analyse CAS (en haut)	p.64
Figure 29 : marquage des cellules MIB1 positives au fluochrome	p.69
Figure 30 : Courbes de survie actuarielles : survie sans métastases (à gauche), sans récidives (à droite), pour les patientes avec un index MIB1 élevé (points noirs) ou faible index MIB1 (points blancs). Valeur seuil 15%	p.71
Figure 31 : Courbes de survie actuarielles : survie sans métastases (à gauche), sans récidives (à droite), pour les patientes avec un index AgNORs élevé (points noirs) ou faible index AgNORs (points blancs). Valeur seuil $10\mu\text{m}^2$	p.73
Figure 32 : Courbes de survie actuarielles : survie sans métastases (à gauche), sans récidives (à droite), pour les patientes avec un index de prolifération élevé (points noirs) ou faible index de prolifération (points blancs). Valeur seuil à 200	p.74
Figure 33 : Courbes de survie actuarielle sans métastases dans les 4 groupes pour les AgNORs totaux (à gauche) et pour les AgNORs dans les cellules MIB1 positives (à droite). Les valeurs seuils : AgNORs = $10\mu\text{m}^2$, index MIB1= 15%	p.75
Figure 34 : Survie globale en fonction de la taille tumorale (pT) avec un seuil à 15 mm	p.86
Figure 35 : Survie globale en fonction de la taille tumorale (pT) avec un seuil à 20 mm	p.86
Figure 36 : Survie sans métastases en fonction de la taille tumorale (pT) avec un seuil à 15 mm	p.87
Figure 37 : Survie sans métastases en fonction de la taille tumorale (pT) avec un seuil à 20 mm	p.87
Figure 38: Survie globale en fonction du score de SBR	p.89
Figure 39 : Survie sans métastases en fonction du SBR	p.89
Figure 40 : Survie sans métastases en fonction de la présence d'embolies lymphatiques	p.90
Figure 41 : Survie sans métastases en fonction de la ploïdie	p.92

Figure 42 : Survie sans métastases en fonction de la ploïdie	p.92
Figure 43 : Survie globale en fonction de la présence de clones tumoraux avec > 5c ADN	p.93
Figure 44 : Survie sans métastases en fonction de la présence de clones tumoraux avec > 5c ADN	p.93
Figure 45 : Survie globale avec un seuil à 15% de l'index MIB1	p.96
Figure 46 : Survie sans métastases avec un seuil à 15% de l'index MIB1	p.96
Figure 47 : Survie globale en fonction de la quantité d'AgNORs dans les cellules MIB+ (Seuil à 15 μm^2)	p.100
Figure 48 : Survie sans métastases en fonction de la quantité d'AgNORs dans les cellules MIB+	p.100
Figure 49 : Survie globale en fonction de la quantité totale d'AgNORs (Seuil à 15 μm^2)	p.101
Figure 50 : Survie sans métastases en fonction de la quantité totale d'AgNORs (Seuil à 15 μm^2)	p.101
Figure 51 : Survie globale en fonction de l'index de prolifération (un seuil à 100)	p.103
Figure 52 : Survie sans métastases en fonction de l'index de prolifération (un seuil à 100)	p.103
Figure 53 : Survie globale en fonction de l'index de prolifération (un seuil à 200)	p.104
Figure 54 : Survie sans métastase en fonction de l'index de prolifération (un seuil à 200)	p.104
Fig 55 : Survie globale en fonction de la surexpression de HER2/neu	p.106
Fig 56 : Survie sans métastase en fonction de la surexpression de HER2/neu	p.106

Résumé

Dans ce travail, nous avons testé deux hypothèses concernant le pronostic du cancer du sein. La première reposait sur l'idée que le pronostic pourrait être lié à l'importance du clone cellulaire le plus agressif, à haut contenu en ADN, mesuré par analyse d'images automatique. La seconde hypothèse était que le pronostic pourrait être affiné par la détermination d'un nouvel index de prolifération (IP) prenant en compte le pourcentage de cellules dans le cycle et la vitesse de prolifération. Ces deux paramètres ont été quantifiés par analyse d'images après marquage par l'anticorps MIB1 (marquant les cellules dans le cycle) et par la réaction cytochimique des Ag-NORs (mesure de la durée du cycle). L'IP a été obtenu en multipliant le pourcentage des cellules MIB1 + par la quantité des Ag-NORs dans ces mêmes cellules.

Deux études préliminaires ont permis de valider chacune une hypothèse. Afin de vérifier la validité de ces hypothèses sur un nombre de cas plus important, nous avons entrepris une étude sur une population homogène (n = 90), à faible risque de récurrence (pN0, sans chimiothérapie). La détection de clones à contenu de plus de 5c ADN s'est révélée sans impact pronostique. A l'opposé, nous avons montré que la survie globale était corrélée à l'IP et que le seuil de 200 était le plus pertinent. Pour la survie sans métastase, l'IP 200 gardait une très forte valeur pronostique en analyse univariée. Mais ce facteur n'était pas indépendant de la quantité totale d'AgNORs qui semblait être plus pertinente. La quantification des AgNORs totaux et la détermination de l'IP ont ainsi fourni une information pronostique pertinente supérieure à celle des facteurs classiquement utilisés.

Mots clés : tumeur du sein, pronostic, prolifération cellulaire, cytométrie d'image, ploïdie.

Summary

Our aim was to test two hypotheses concerning the prognosis of breast cancer. The first one was that the prognosis could be related to the most aggressive stemlines, identified with their high DNA content measured by using a semi automatic image analyser. The second hypothesis was that the prognosis could be increased by using a new proliferation index (PI index) based both on the percentage of proliferating cells and on the duration of the cell cycle. These two parameters were quantified by using image analysis after the labelling of tissue sections, firstly, with the MIB1 antibody (revealing only cells out of G0 phase) and, secondly, with the cytochemical Ag-NOR staining (directly linked to the rapidity of cell proliferation). PI index was obtained by multiplying the percentage of MIB1 positive cells with the quantity of Ag-NORs within the same cells.

Two preliminary studies validated each hypothesis. In order to check the usefulness of these parameters, we worked on more homogeneous population (n = 90) with a low risk of recurrences (node negative patients without chemotherapy). Presence of 5c exceeding cells was not correlated to overall survival (OS) or to disease free survival (DFS). In multivariate analysis, no factor related to the ploidy was independent. We demonstrated that PI was correlated to OS in multivariate analysis and that the cut-off at 200 was the most interesting one. For DFS, PI 200 conserved its high prognostic value in univariate analysis and the global quantity of AgNORs seemed to be more discriminative in multivariate analysis. Relatively to classical markers, AgNORs quantification and PI bring supplementary information in node negative patients.

Key words : MIB1, AgNORs, cell proliferation, image cytometry, cancer prognosis, breast