



HAL
open science

Étude de l'évolution de l'index de prolifération dans le cancer du sein entre 1994 et 2014

Stéphanie Lin

► **To cite this version:**

Stéphanie Lin. Étude de l'évolution de l'index de prolifération dans le cancer du sein entre 1994 et 2014. Médecine humaine et pathologie. 2015. dumas-01223809

HAL Id: dumas-01223809

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01223809>

Submitted on 3 Nov 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE



Année : 2015

**ETUDE DE L'EVOLUTION DE L'INDEX DE
PROLIFERATION DANS LE CANCER DU SEIN
ENTRE 1994 ET 2014**

THESE

PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MEDECINE
DIPLOME D'ETAT

Stéphanie LIN

Née le 2 juillet 1984 à Grenoble (38)

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE
GRENOBLE*

Le 29 octobre 2015

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Président du jury : Mme le Professeur Pascale HOFFMANN

Membres du jury :

Mr le Docteur Raoul PAYAN, Directeur de thèse

Mme le Docteur Isabelle GABELLE-FLANDIN

Mme le Professeur Mireille MOUSSEAU

Mr le Professeur Jean-Pierre BELLOCQ

Et Mr le Professeur Pierre-Marie MARTIN

*La Faculté de Médecine de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

Affaire suivie par Marie-Lise GALINDO sp-medecine-pharmacie@ujf-grenoble.fr

Doyen de la Faculté : M. le Pr. Jean Paul ROMANET

Année 2014-2015

ENSEIGNANTS A L'UFR DE MEDECINE

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	ALBALADEJO Pierre	Anesthésiologie réanimation
PU-PH	APEL Florent	Ophtalmologie
PU-PH	ARVIEUX-BARTHELEMY Catherine	chirurgie générale
PU-PH	BALOSSO Jacques	Radiothérapie
PU-PH	BARRET Luc	Médecine légale et droit de la santé
PU-PH	BENHAMOU Pierre Yves	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	BERGER François	Biologie cellulaire
PU-PH	BETTEGA Georges	Chirurgie maxillo-faciale, stomatologie
MCU-PH	BIDART-COUTTON Marie	Biologie cellulaire
MCU-PH	BOISSET Sandrine	Agents infectieux
PU-PH	BONAZ Bruno	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
MCU-PH	BONNETERRE Vincent	Médecine et santé au travail
PU-PH	BOSSON Jean-Luc	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	BOTTARI Serge	Biologie cellulaire
PU-PH	BOUGEROL Thierry	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	BOUILLET Laurence	Médecine interne
MCU-PH	BOUZAT Pierre	Réanimation
PU-PH	BRAMBILLA Christian	Pneumologie
PU-PH	BRAMBILLA Elisabeth	Anatomie et cytologie pathologiques
MCU-PH	BRENIER-PINCHART Marie Pierre	Parasitologie et mycologie
PU-PH	BRICAULT Ivan	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	BRICHON Pierre-Yves	Chirurgie thoracique et cardio- vasculaire
MCU-PH	BRIOT Raphaël	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	CAHN Jean-Yves	Hématologie

MCU-PH	CALLANAN-WILSON Mary	Hématologie, transfusion
PU-PH	CARPENTIER Françoise	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	CARPENTIER Patrick	Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire
PU-PH	CESBRON Jean-Yves	Immunologie
PU-PH	CHABARDES Stephan	Neurochirurgie

PU-PH	CHABRE Olivier	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	CHAFFANJON Philippe	Anatomie
PU-PH	CHAVANON Olivier	Chirurgie thoracique et cardio- vasculaire
PU-PH	CHIQUET Christophe	Ophthalmologie
PU-PH	CINQUIN Philippe	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	COHEN Olivier	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	COUTURIER Pascal	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	CRACOWSKI Jean-Luc	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PU-PH	DE GAUDEMARIS Régis	Médecine et santé au travail
PU-PH	DEBILLON Thierry	Pédiatrie
MCU-PH	DECAENS Thomas	Gastro-entérologie, Hépatologie
PU-PH	DEMATTEIS Maurice	Addictologie
PU-PH	DEMONGEOT Jacques	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	DERANSART Colin	Physiologie
PU-PH	DESCOTES Jean-Luc	Urologie
MCU-PH	DETANTE Olivier	Neurologie
MCU-PH	DIETERICH Klaus	Génétique et procréation
MCU-PH	DOUTRELEAU Stéphane	Physiologie
MCU-PH	DUMESTRE-PERARD Chantal	Immunologie
PU-PH	EPAULARD Olivier	Maladies Infectieuses et Tropicales
PU-PH	ESTEVE François	Biophysique et médecine nucléaire
MCU-PH	EYSSERIC Hélène	Médecine légale et droit de la santé
PU-PH	FAGRET Daniel	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	FAUCHERON Jean-Luc	chirurgie générale
MCU-PH	FAURE Julien	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	FERRETTI Gilbert	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	FEUERSTEIN Claude	Physiologie
PU-PH	FONTAINE Éric	Nutrition
PU-PH	FRANCOIS Patrice	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	GARBAN Frédéric	Hématologie, transfusion

PU-PH	GAUDIN Philippe	Rhumatologie
PU-PH	GAVAZZI Gaétan	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	GAY Emmanuel	Neurochirurgie
MCU-PH	GILLOIS Pierre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	GODFRAIND Catherine	Anatomie et cytologie pathologiques (type clinique)
MCU-PH	GRAND Sylvie	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	GRIFFET Jacques	Chirurgie infantile
MCU-PH	GUZUN Rita	Endocrinologie, diabétologie, nutrition, éducation thérapeutique
PU-PH	HALIMI Serge	Nutrition
PU-PH	HENNEBICQ Sylviane	Génétique et procréation

PU-PH	HOFFMANN Pascale	Gynécologie obstétrique
PU-PH	HOMMEL Marc	Neurologie
PU-PH	JOUK Pierre-Simon	Génétique
PU-PH	JUVIN Robert	Rhumatologie
PU-PH	KAHANE Philippe	Physiologie
PU-PH	KRACK Paul	Neurologie
PU-PH	KRAINIK Alexandre	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	LABARERE José	Epidémiologie ; Eco. de la Santé
PU-PH	LANTUEJOUL Sylvie	Anatomie et cytologie pathologiques
MCU-PH	LAPORTE François	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH	LARDY Bernard	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH	LARRAT Sylvie	Bactériologie, virologie
MCU-PH	LAUNOIS-ROLLINAT Sandrine	Physiologie
PU-PH	LECCIA Marie-Thérèse	Dermato-vénérologie
PU-PH	LEROUX Dominique	Génétique
PU-PH	LEROY Vincent	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
PU-PH	LETOUBLON Christian	chirurgie générale
PU-PH	LEVY Patrick	Physiologie
MCU-PH	LONG Jean-Alexandre	Urologie
PU-PH	MACHECOURT Jacques	Cardiologie
PU-PH	MAGNE Jean-Luc	Chirurgie vasculaire
MCU-PH	MAIGNAN Maxime	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	MAITRE Anne	Médecine et santé au travail
MCU-PH	MALLARET Marie-Reine	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-PH	MARLU Raphaël	Hématologie, transfusion

MCU-PH	MAUBON Danièle	Parasitologie et mycologie
PU-PH	MAURIN Max	Bactériologie - virologie
MCU-PH	MCLEER Anne	Cytologie et histologie
PU-PH	MERLOZ Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	MORAND Patrice	Bactériologie - virologie
PU-PH	MOREAU-GAUDRY Alexandre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	MORO Elena	Neurologie
PU-PH	MORO-SIBILOT Denis	Pneumologie
MCU-PH	MOUCHET Patrick	Physiologie
PU-PH	MOUSSEAU Mireille	Cancérologie
PU-PH	MOUTET François	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique, brûlologie
MCU-PH	PACLET Marie-Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	PALOMBI Olivier	Anatomie
PU-PH	PARK Sophie	Hémato - transfusion
PU-PH	PASSAGGIA Jean-Guy	Anatomie
PU-PH	PAYEN DE LA GARANDERIE Jean-François	Anesthésiologie réanimation
MCU-PH	PAYSANT François	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	PELLETIER Laurent	Biologie cellulaire
PU-PH	PELLOUX Hervé	Parasitologie et mycologie
PU-PH	PEPIN Jean-Louis	Physiologie
PU-PH	PERENNOU Dominique	Médecine physique et de réadaptation
PU-PH	PERNOD Gilles	Médecine vasculaire
PU-PH	PIOLAT Christian	Chirurgie infantile
PU-PH	PISON Christophe	Pneumologie
PU-PH	PLANTAZ Dominique	Pédiatrie
PU-PH	POLACK Benoît	Hématologie
PU-PH	POLOSAN Mircea	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	PONS Jean-Claude	Gynécologie obstétrique
PU-PH	RAMBEAUD Jacques	Urologie
MCU-PH	RAY Pierre	Génétique
PU-PH	REYT Émile	Oto-rhino-laryngologie
MCU-PH	RIALLE Vincent	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	RIGHINI Christian	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	ROMANET J. Paul	Ophthalmologie
MCU-PH	ROUSTIT Matthieu	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique, addictologie
MCU-PH	ROUX-BUISSON Nathalie	Biochimie, toxicologie et pharmacologie

PU-PH	SARAGAGLIA Dominique	Chirurgie orthopédique et traumatologie
MCU-PH	SATRE Véronique	Génétique
PU-PH	SAUDOU Frédéric	Biologie Cellulaire
PU-PH	SCHMERBER Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	SCHWEBEL-CANALI Carole	Réanimation médicale
PU-PH	SCOLAN Virginie	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	SEIGNEURIN Arnaud	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	STAHL Jean-Paul	Maladies infectieuses, maladies tropicales
PU-PH	STANKE Françoise	Pharmacologie fondamentale
MCU-PH	STASIA Marie-José	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	TAMISIER Renaud	Physiologie
PU-PH	TONETTI Jérôme	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	TOUSSAINT Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	VANZETTO Gérald	Cardiologie
PU-PH	VUILLEZ Jean-Philippe	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	WEIL Georges	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	ZAOUI Philippe	Néphrologie
PU-PH	ZARSKI Jean-Pierre	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie

REMERCIEMENTS

Je remercie : les membres du jury, d'avoir accepté de juger mon travail.

Au Pr Hoffmann : merci Pascale pour ton soutien inconditionnel en cette fin d'internat et ce, malgré nos divergences. C'est promis, j'apprendrai à travailler dans les temps impartis... Je ne sais pas comment tu arrives à gérer ta triple casquette de chef de service, de médecin et de mère de famille, mais sache que tu as toute mon admiration.

Au Dr Payan : cher maître, merci pour votre enthousiasme contagieux ! Je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir proposé de travailler sous votre égide, de m'avoir épaulée, d'avoir mis sur ma route vos prestigieux amis et de m'avoir montré à quel point on peut prendre du plaisir dans le travail. Je ne sais pas où vous puisez toute votre énergie (je ne ferai pas de commentaire sur votre jeune âge), mais j'espère encore apprendre de vous.

Au Dr Gabelle-Flandin : merci Isabelle pour ta classe, ton humeur constante, ton aide, pour m'avoir initiée aux affres de la radiothérapie, et de faire partie de ces chefs qui remercient les internes pour leur travail.

Au Pr Mousseau : merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Je n'ai jamais travaillé directement avec vous, mais j'ai fait l'expérience de votre gentillesse ces mardis soirs de RCP.

Au Pr Bellocq : merci d'avoir accepté au pied-levé de participer à la modeste thèse d'une interne de gynécologie et ce, malgré la distance et votre renommée. Je suis terrorisée rien qu'à l'idée d'entendre vos commentaires.

Au Pr Martin : puisque je puis enfin vous remercier ! Merci de m'avoir portée à bout de bras pour cette thèse, d'avoir relu chacun de mes mots, d'avoir passé des heures à me corriger, de m'avoir orientée vers vos accointances pour mes statistiques, merci pour votre passion et pour vos précieux conseils.

A ceux qui m'ont aidée dans l'ombre pour l'élaboration de cette thèse : merci à Mr Soullière et à Mr Fina pour m'avoir guidée dans le labyrinthe des statistiques, pour leurs encouragements, leur intérêt et leur accessibilité. Merci à Mme Siché, d'avoir pris le temps de répondre à mes questions. Merci à la douce Lydie, qui malgré les centaines de dossiers que je lui ai fait ranger, est toujours restée disponible et attentionnée.

Je remercie : mes maîtres et tous ceux qui ont participé, de près ou de loin, à ma formation en contribuant à faire de moi le médecin que je suis.

A toute l'équipe de l'HCE de Grenoble, où j'ai passé la moitié de mon internat... Merci aux gynécologues, aux anesthésistes, aux infirmières, aux aide-soignantes, aux brancardiers, aux secrétaires, aux auxi et aux sage-femmes... tous vous citer m'est impossible, mais merci pour tout ce que j'ai appris, pour votre soutien et votre confiance au cours de ces gardes de la poisse. Un merci particulier au Dr Delorme, au Dr Petitperrin, au Pr Sergent pour m'avoir accompagnée dans toutes mes premières fois en obstétrique même à 3 heures du mat', au Dr Rosier parce que grâce à vous la galanterie ne meurt pas, au Dr Thong Vanh pour notre duo laotien en garde, au Dr Virginie Guigue pour ton calme en quasi-toutes circonstances, au Dr Xavier Douysset pour notre nuit de l'horreur et pour ces grandes

extractions sur J2, au Dr Laure Villaret pour sa gentillesse et au Dr Quénard pour les samedis matins où elle rend visite à Mme Lin.

A toute l'équipe de la maternité de Chambéry, qui m'a formée en tant que jeune interne et qui va maintenant me former en tant que jeune assistante. Merci aux Dr Deyrolle, au Dr Cabaud, au Dr Truong, au Dr Descombe, au Dr Haller, au Dr Passarelli, au Dr Rosenberg, au Dr Decroissette, au Dr Lebrun-Kéris, au Dr Chevillot et au Dr Dubois, de m'avoir donné envie de revenir et de m'accepter dans votre service pour les 2 années à venir. J'espère ne pas vous décevoir.

Au service de chirurgie digestive du CHU de Grenoble, merci de m'avoir initiée à « la vraie chirurgie »... Merci au Pr Letoublon, au Pr Faucheron, au Dr Risse, au Dr Julio Abba, au Dr David Voirin, au Dr Alex Amariutei et au Dr Romain Riboud de m'avoir fait passer ces 6 mois à la dure avec ces greffes hépatiques sur table à 6 heures du matin, ces interminables CHIP de 10 heures, ces départs en PMO en plein milieu de la nuit avec le jet privé... Plus grand-chose ne me fait peur à présent !

A l'équipe de gynécologie de Voiron : merci au Dr Eric Amblard pour sa convivialité et sa pédagogie, merci au Dr Giard, au Dr Laetitia Lazzaron, au Dr Katia Otu, au Dr Marie Gaillard, au Dr Ricardo Lujan pour leur gentillesse et pour m'avoir laissée toucher au scalpel, merci aux super secrétaires Christine, Maria, Emilie, merci aux IBODE et merci à Catherine Chassigneux sans qui je n'aurais jamais eu le DIU d'écho.

Au service de radiothérapie du CHU de Grenoble, merci pour cette parenthèse dans le monde parallèle des contourages et des centrages... Merci aux secrétaires, Nadine, Nathalie, aux manip, aux physiciens, au Dr Verry, au Dr Julie Villa, au Pr Balosso et surtout au Dr Caroline Pasteris pour son sens acerbe de la critique qui me divertit tant. J'ai appris beaucoup de nouveaux mots, mais j'ai surtout bien ri !

Au service d'urologie du CHU de Grenoble, merci de m'avoir accueillie dans votre belle famille. Je n'ai jamais vu d'équipe aussi soudée, aussi attentionnée et aussi investie auprès des internes. Un peu plus tôt et vous m'auriez convertie... Merci au Pr Descotes pour m'avoir donné cette chance, au Pr Rambaud pour m'avoir aidée à améliorer mon anglais les jeudis matins, au Dr Boillot pour m'avoir fait rencontrer la fameuse jeune mariée, au Dr Nicolas Terrier et son adage « La 1^{ère} fois, tu ne savais pas, la 2^{ème} fois tu as oublié, mais la 3^{ème} fois, t'es juste con », au Dr Caroline Thuillier pour ce fameux week-end à 3 greffes et 2 PMO, au Dr Jean-Alex Long pour avoir cassé la porte des toilettes du 14^{ème} D lorsque je m'y suis retrouvée coincée, au Dr Valentin Arnoux pour... ben oups, j'ai oublié ! Et au Dr Gaëlle Fiard, mon mentor de la chirurgie, qui fut ma co-externe puis ma co-interne et mon assistante.

Au Dr Maryvonne Baudo, merci de m'avoir donné l'occasion d'acquérir cette expérience en libéral, merci de ta confiance, merci de m'avoir formée à la gynécologie qu'on n'apprend pas à l'hôpital. Merci à Isabelle pour sa disponibilité et sa gentillesse.

A la maternité de la Clinique mutualiste de Grenoble, un grand merci pour ce dernier semestre : au Dr Eyriey, pour votre immense gentillesse bien cachée derrière vos airs d'ours mal léché, votre soutien, votre confiance et votre humanité. J'essaierai peut-être un jour de vous tutoyer. Merci au Dr Corinne Fize pour sa bonne humeur, au Dr Jean-Claude Reynaud pour mes premières fois en médecine fœtale, au Dr Anne-Catherine Grimaud pour m'avoir appris qu'un bébé vivant vaut mieux qu'un bébé mort, au Dr Pierre-Louis Coulon pour sa contribution à l'économie du Laos, au Dr Bianca Ioan pour sa capacité à attirer le bizarre et pour sa gentillesse, au Dr Cécile Jacquet qui téléphone le soir avant de partir pour me souhaiter une bonne garde et au Dr Camille Véran, qui aurait pu être mon maître de thèse. Merci de ta présence et de ton aide tout au long de mon internat. Et bien sûr merci à toute l'équipe

des auxi, des IBODE et des sage-femmes qui m'ont initiée à une obstétrique alternative et m'ont accompagnée et soutenue au cours de mes premières décharges de surrénales de chef.

Je remercie : tous mes condisciples, qui ont eu la chance et / ou la charge de me supporter.

A mes co-internes de Chambé : merci à Audrey, Elise, Pierrick, Alain, Salim et Georges.

A mes co-internes inter-spécialités qui ont eu la lourde tâche de m'initier aux joies d'une autre discipline : merci à Jérôme, à César, au Dr Antoine Guillaud (oui, nous avons bien été co-internes), à Nico (ma galette, elle est bien loin cette époque où on dérivait telle une planche sur une rivière), à Barbois (parce qu'on est souvent sur la même longueur d'onde, surtout quand il s'agit de sushis-bière) ; merci au Dr Gaël Roth (parce qu'un jour je pourrais me vanter d'avoir été co-interne avec le président de la CME), à Johan (parce qu'on se vantera à 2 d'avoir été co-internes avec le président de la CME et parce que tu étais toujours partant pour une bière et une bouffe en sortant de stage) ; merci à la petite Delphine (et sa pédicure parfaite), à Nico Peilleron (pour s'être si bien occupé de Mr Kühn), à Rémi (pour avoir essayé de me faire rentrer dans l'auge du bloc), à Overs (parce que maintenant je peux enregistrer 3000 mots à la minute et bien sûr pour ton aide précieuse dans les méandres des choix).

Aux p'tits jeunes de gynéco qui ont supporté mes sautes d'humeur : merci à Marion, Maryline, Emilie, Sophie, Clara, Alexia, Julie, Julia, Jessica, Charlotte, Pierre-Alain, Anna, Célia, Chloé, et mon petit Charles pour m'avoir vraiment supportée au cours de la pire période de l'internat (et pour les tablettes de chocolat).

A mes anciens co-internes devenus mes maitres : merci au Dr Amélie Chatrian pour sa détermination au ballon prisonnier, à Clémentine pour sa disponibilité, à Claire, à Anne-Laure (parce que je pense à toi quand j'ai envie de me rouler par terre pour pleurer lorsque ça saigne la rage en césarienne), au Dr FIstasse mais a minima seulement, à Fabien pour notre complicité puisqu'il s'avère qu'on a le même penchant pour le travail de dernière minute (et le même profil de transit aussi).

Aux vieux co-internes : merci à Caro ma future co-assistante, à Pauline, à Audrey parce qu'avec toi la vie paraît toujours plus simple, au nouvellement Dr Camille Dunand-Faure. Evoluer à tes côtés fut un plaisir et ton sens de l'autodérision n'enlève rien au fait que tu sois éminemment brillante.

A mes copines de promo : merci à la Boudou pour sa douceur (comment peux-tu toujours à ce point être agréable ?), à l'Anne-Flore bien sûr pour son rire (mais surtout pour avoir pensé à nous à la veille de chaque nouveau stage), à la Ronin pour sa présence et sa « ralitude » (et surtout pour son courage d'exprimer tout ce qui ne lui plait pas). Merci pour votre constance à toutes les 3, traverser cet internat avec vous a été une belle aventure.

Au Dr Krups, merci à toi pour ta confiance en moi. Je n'ai jamais compris pourquoi tu as tellement foi en moi, mais merci pour ton amitié et ces apéros improvisés.

Je remercie enfin : mes amis et ma famille.

Merci à la petite bande des soirées arrosées : Maryse, pour avoir supporté mes amis, Sèv pour les margaritas, Clarisse pour notre colocation hors normes, ma Lulu pour être Lulu. Merci à Christophe et son humeur égale, pour ta capacité à me divertir quel que soient les circonstances. Merci à Anna, j'aime ton excentricité, pas seulement par ce qu'elle me fait sentir un peu plus socialement adaptée...

Merci à Vilat pour avoir souvent été là quand il le fallait.

Merci à mon trio favori Isa, Gaëlle et Tételle, mes soutiens qu'il pleuve ou qu'il vente, correctrices de fautes d'orthographe à leurs heures, psychothérapeutes, compagnons de choix pour la bière du vendredi soir après une dure semaine, mes deuxièmes mères nourricières. Vous avez fait le choix après toutes ces années de continuer à me supporter (même après 28 ans d'amitié pour certaine) et j'espère qu'il reste encore de nombreuses années à venir.

Thanks to my Lao roots: thank you Grandma and Grandpa for being proud of me (well, I hope so), thank you auntie Lai for always being here for Mum and us, and thanks to the whole Athakhanh family, can't wait to see all of you soon again.

Thanks to my Chinese side and the Chanthara family: I am so glad you find us 10 years ago. All of you have always been there for our family through ups and downs. So bad there's this big ocean between us! Thank you grand uncle Lao Kou for being so fun, for the Chinese chess, for lighting up the last years of Grandma. Thanks to Khamphet, Khamna, James, Jasmine, Leck, Abby, Phoenix, Anais and funny Leya and the coming babies for sure!

Merci à mon beau-frère, Nobla, qui malheureusement pour lui en choisissant ma sœur a choisi toute sa famille. Merci d'avoir planter ta petite graine pour faire de moi la plus comblée des tatas.

Merci à mes merveilleuses nièces qui illuminent mes week-ends : Leen mon petit double, June la pile électrique et Jeen la Papy-ventouse.

A ma grande sœur Ling, ma meilleure amie d'enfance, à mon petit frère Long, mon support infaillible. Merci d'avoir toujours été à mes côtés et de m'avoir soutenue en toutes circonstances. Rien n'aurait été possible sans vous.

A Maman et Papa, merci de m'avoir fait naître du bon côté de la Terre, de m'avoir appris le goût du travail, de me rappeler que la vie n'est pas faite pour être facile mais de toujours de remplir mon estomac. Tous vos sacrifices et la recherche de votre fierté m'ont amenée là où je suis aujourd'hui.

A ma grand-mère Lao Ma, en espérant que de là où tu es, tu restes fière de moi.

RESUME

Introduction

L'évaluation de la prolifération dans le cancer du sein est actuellement admise comme un facteur pronostique et prédictif de la réponse aux traitements. L'index de prolifération généralement évalué par le Ki-67 est ainsi régulièrement déterminé sur les prélèvements tumoraux par les anatomopathologistes. Or, les équipes cliniques constatent de façon subjective, depuis plusieurs années, une tendance à des taux de prolifération plus élevés.

Objectifs

L'objectif principal de cette étude est de mettre en évidence une variation des valeurs de l'index de prolifération évalué en immunohistochimie entre 1994 et 2014.

L'objectif secondaire est, si une augmentation significative est observée, d'étudier les facteurs étiologiques ayant pu induire ce phénomène. Trois hypothèses sont proposées : l'inflation des taux pourrait être liée soit à l'émergence de cancers plus agressifs, soit à l'impact de perturbateurs endocriniens d'origine exogène ou à des facteurs endogènes individuels, soit à un artefact résultant de l'évolution des techniques utilisées pour sa détermination.

Matériel et méthodes

Il s'agit d'une étude rétrospective unicentrique menée sur une cohorte de 890 patientes analysées selon 3 groupes discontinus sur une période de 20 ans : la population I concerne les femmes incluses entre 1994 et 1996, la population II entre 2003 et 2004 et la population III entre 2012 et 2014.

Les critères d'analyse recueillis se répartissent en 4 groupes : A) les éléments cliniques et épidémiologiques de la patiente, B) les critères anamnétiques de la tumeur, C) les caractéristiques anatomopathologiques tumorales et D) la prise en charge thérapeutique et le suivi.

Résultats

La comparaison de ces 3 groupes a permis de mettre en évidence une augmentation significative des taux de l'index de prolifération entre 1994 et 2012 et entre 2003 et 2012 ($p < 0,0001$) avec des moyennes respectives pour les populations I, II et III de 14,5%, 12% et 25,7%. Ce constat est fait dans la sous-population des cancers infiltrants primitifs localisés.

Par la suite, nous avons constaté une association significative entre un index de prolifération élevé et le type histologique canalaire infiltrant, l'envahissement ganglionnaire, un âge jeune inférieur à 40 ans et la survenue de métastases, corroborant ainsi l'hypothèse de cancers plus agressifs.

Enfin, il est retrouvé une relation entre la variation des taux de prolifération observés et le type d'anticorps utilisé ainsi qu'une différence significative selon l'observateur.

Discussion

Ce travail souligne donc l'importance de la variabilité dans la technique d'obtention de l'index de prolifération et ce à plusieurs niveaux : en pré-analytique (selon les techniques de préparation des tissus, la technique d'immunohistochimie et notamment le type d'anticorps utilisé), et sur le plan analytique (selon les techniques de lecture et d'interprétation des résultats avec la notion de valeur-seuil).

Conclusion

En l'absence de standardisation de ces techniques, l'utilisation en pratique clinique de ce paramètre reste controversée malgré son apport potentiel dans la prise en charge thérapeutique des cancers du sein. Il est ainsi souhaitable de définir un cadre standardisé pour sa détermination et un système de validation interne, inter-laboratoire puis national avec une calibration des anticorps utilisés et un contrôle qualité à chaque étape de la technique.

Mots-clés

Cancer du sein ; Index de prolifération ; Ki-67 ; Validité analytique

TABLES DES MATIERES

Résumé	11
Abréviations	14
Introduction	16
Contexte actuel	17
1. Conduites à tenir thérapeutiques dans le cancer du sein	17
2. L'index de prolifération dans la littérature et les recommandations.....	18
Objectifs de l'étude	21
Matériel et méthodes	22
1. Population d'étude	22
2. Critères d'étude	23
3. Analyses statistiques	27
4. Tests statistiques.....	27
Résultats	28
1. Description de la population	28
2. Résultats des analyses statistiques.....	39
Discussion	50
1. Biais et limites de l'étude	50
2. Discussion des résultats de l'étude	51
3. Revue de la littérature sur la validité du Ki-67.....	55
4. Perspectives	59
Conclusion	60
Bibliographie et références web	62
Annexes	65

ABREVIATIONS

AC : Adriblastine^R – Cyclophosphamide

ADN : acide désoxyribonucléique

AGO : *Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie* ou Groupe de travail allemand d'oncologie gynécologique

ARN : acide ribonucléique

ARS : Agence régionale de santé

ASCO : *American Society of Clinical Oncology*

BCSS : *breast-cancer specific survival* ou survie spécifique pour le cancer du sein

BRCA : *breast cancer gene*

CCI : carcinome canalaire infiltrant

CIS : carcinome *in situ*

CLI : carcinome lobulaire infiltrant

CMF : Cyclophosphamide – Méthotrexate – 5FU

COP : contraception œstro-progestative

EDTA : acide éthylène – diamine – tétraacétique

EORTC : *European Organization for Research and Treatment of Cancer*

FAC : 5FU – Adriblastine^R – Cyclophosphamide

FEC : 5FU – Epirubicine – Cyclophosphamide

FISH : *fluorescent in situ hybridization*

FNC : 5FU – Novantrone^R – Cyclophosphamide

FSH : *follicle-stimulating hormone*

5FU : 5-fluorouracile

HAS : Haute autorité de santé

HER2 : *human epidermal growth receptor 2*

IHC : immunohistochimie

IMC : indice de masse corporelle

INCa : Institut national du cancer

IP : index de prolifération

LH : *luteinizing hormone*

LHRH : *luteinizing hormone - releasing hormone*

NP : niveau de preuve ou LOE : *level of evidence*

ODLC : Office de lutte contre le cancer

OR : *odds-ratio*

PAI-1 : *plasminogen activator inhibitor 1*

RE : récepteurs aux œstrogènes

RH : récepteur hormonal ou récepteurs hormonaux

RP : récepteurs à la progestérone

RPC : recommandations pour la pratique clinique

SBR : grade histopronostique de Scarff-Bloom-Richardson ; mSBR : grade SBR modifié par Elston et Ellis

SG : survie globale

SSR : survie sans récurrence

TAC : Taxotère^R – Adriablastine^R – Cyclophosphamide

TC : Taxotère^R – Cyclophosphamide

TEC : Taxotère^R – Epirubicine – Cyclophosphamide

THM : traitement hormonal substitutif de la ménopause

uPA : *urokinase plasminogen activator*

INTRODUCTION

Un des enjeux actuels dans la stratégie thérapeutique des cancers du sein est la recherche de la prise à charge personnalisée des patientes. Ainsi, il est proposé des traitements plus ou moins agressifs en situation adjuvante ou néoadjuvante adaptés au terrain et à la pathologie maligne. Dans le but d'affiner la sélection des patientes devant bénéficier ou non de certains protocoles, notamment de chimiothérapie, plusieurs indicateurs appelés facteurs pronostiques et facteurs prédictifs sont utilisés.

Les facteurs pronostiques évaluent la survie sans récurrence (SSR) de la patiente et les facteurs prédictifs la réponse tumorale aux thérapeutiques. Les études internationales les classent selon leur niveau de preuve (NP) ou *level of evidence* (LOE). Leur évaluation doit avoir fait l'objet d'essais standardisés avec des contrôles de qualité internationaux pour permettre leur recommandation en pratique clinique. C'est le cas par exemple des techniques de dosage des récepteurs hormonaux (RH) évaluées par *radio-ligand-binding*, avec des études pilotées aux Etats-Unis par McGuire et sur le plan européen par l'*European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC).

Cependant, à l'heure actuelle, ces techniques ont évolué, entre autres avec la détermination par immunohistochimie (IHC) qui n'a été soumise à aucun contrôle de qualité, que ce soit sur le plan local, national ou européen, et ce problème est au cœur de notre préoccupation.

La prolifération tumorale est un des facteurs intervenant dans le grade histopronostique et il est admis qu'elle reflète l'agressivité du cancer. Cependant l'index de prolifération (IP) reste un outil très controversé. De nombreux travaux dans la littérature ont étudié son impact en termes de facteur pronostique et de facteur prédictif avec des résultats inconstants mais globalement en faveur de sa valeur pronostique et prédictive dans le cancer du sein. En revanche, son utilisation systématique en pratique clinique de routine n'est pas recommandée. La cause citée dans la majorité des études est son manque de reproductibilité.

Ainsi, l'apport potentiel de l'IP dans la stratégie thérapeutique du cancer du sein reste sous-estimé et sous-utilisé, du fait de son manque de fiabilité ; mais paradoxalement, ce critère est quasi-systématiquement dosé par les pathologistes.

Notre travail part d'un constat simple régulièrement évoqué par les équipes cliniques spécialisées dans la prise en charge de ces cancers : il existe une impression subjective de variation du taux de l'IP depuis plusieurs années avec une tendance à l'inflation des pourcentages rapportés dans les compte-rendus anatomopathologiques. L'implication potentielle épidémiologique et thérapeutique d'une telle augmentation, si elle existe, est importante et appelle à une vérification objective de ce constat.

CONTEXTE ACTUEL

1. Conduites à tenir thérapeutiques dans le cancer du sein

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent de la femme et représente 33% des cancers féminins. Une femme sur 8 présentera dans sa vie une pathologie maligne mammaire (Hill 2007) [1].

Sur le plan de l'incidence, il a été constaté une augmentation progressive depuis 1980 en France, possiblement expliquée par la généralisation du dépistage, puis une tendance à la stabilisation depuis 2007 que certains auteurs attribuent à la baisse massive de prescription des traitements hormonaux substitutifs de la ménopause (THM) depuis 2004 (HAS 2015) [2]. Pour expliquer l'augmentation initiale de l'incidence, l'effet du dépistage seul n'est pas suffisant et d'autres hypothèses ont été évoquées avec l'intervention possible de facteurs environnementaux non identifiés et le rôle des hormones d'origine endogène ou exogène est encore à clarifier.

Sur le plan de la mortalité, il est observé une diminution de son taux depuis 1993 et ce malgré la courbe inverse de son incidence. Néanmoins, le cancer du sein reste en 2012 la première cause de décès par cancer chez la femme, devant le cancer du poumon et le cancer colo-rectal, avec un taux estimé à 19% des décès par cancer en France (HAS 2015) [2]. Cette amélioration du pronostic vital dans le cancer du sein est attribuée d'une part à un diagnostic plus précoce, permettant de détecter des tumeurs à un stade infraclinique, mais aussi à une meilleure connaissance de la physiopathologie ayant conduit à l'avènement de thérapeutiques efficaces et à une amélioration de la prise en charge globale des patientes. Ainsi, malgré sa fréquence, le pronostic du cancer du sein est globalement plus favorable que la plupart des autres cancers avec une survie relative à 5 ans de 80% (INCa 2012) [3].

Nous sommes aujourd'hui à l'ère de la médecine personnalisée mais aussi de *evidence-based medicine*. Ainsi, l'utilisation de traitements agressifs dans une pathologie mettant en jeu le pronostic vital est compréhensible mais force est de constater que certains cancers du sein ont été traités de façon excessive. Nous devons donc être capables de personnaliser nos décisions thérapeutiques en fonction du type de cancer, de son extension et du terrain afin d'apporter aux patientes un bénéfice réel par rapport aux risques encourus et de prendre donc en considération la dimension humaine mais aussi les contraintes médico-économiques.

La difficulté de la prise en charge de ces patientes réside donc dans l'indication des traitements systémiques en situation néoadjuvante ou adjuvante, soit dans la prescription des chimiothérapies, des traitements anti-hormonaux et des thérapeutiques ciblées. Les facteurs clinico-histologiques actuellement admis pour la décision thérapeutique sont l'âge de la patiente, la taille tumorale, le grade histopronostique, l'envahissement ganglionnaire, la présence d'emboles lymphatiques ou vasculaires, la présence de RH et le statut HER2, auxquels ont été rajoutés uPA et PAI-1.

Cependant, malgré ces indicateurs utilisés en pratique clinique quotidienne, le pronostic reste incertain pour environ 50 voire 60% des patientes qui appartiennent donc à un groupe dit à risque intermédiaire (Héry 2002) [4] et pour lesquelles les

conduites à tenir sont très hétérogènes. Ceci justifie le développement d'autres marqueurs tumoraux pronostiques et prédictifs. Ces outils décisionnels sont classés selon leur NP en fonction de leur valeur pronostique, de leur valeur prédictive du bénéfice d'un traitement et de leur utilité clinique (en apportant une valeur surajoutée par rapport aux marqueurs usuels) (Luporsi 2015) [5]. A titre d'exemple, l'Institut national du cancer (INCa) a récemment validé l'utilisation d'uPA et de PAI-1 dans ce cadre.

Quant à l'IP, sa validation en tant que biomarqueur tumoral dans le cancer du sein reste sujette à controverse, faisant l'objet du paragraphe suivant.

2. L'index de prolifération dans la littérature et dans les recommandations

La prolifération non contrôlée caractérise le processus tumoral et reflète son agressivité. Il est donc aisé de conclure que l'évaluation de la prolifération dans le cancer du sein a une valeur pronostique. Deux types de traitements illustrent ce constat avec les chimiothérapies conventionnelles qui ciblent les cellules en prolifération et les thérapies ciblées qui visent les moteurs de la prolifération, que sont les RH et HER2.

Un peu d'histoire...

Traditionnellement, la prolifération est évaluée par l'index mitotique, lequel correspond au compte du nombre de figures mitotiques par 10 champs au grossissement x 400 sous microscope optique et intervient dans l'élaboration du grade histopronostique. Ce grade, ayant apporté la preuve de sa valeur pronostique et prédictive, a fait l'objet, à des fins de standardisation, de recommandations internationales pour sa détermination : il s'agit du grade de Scarff-Bloom-Richardson modifié par Elston et Ellis (mSBR).

L'alternative la plus utilisée pour cette évaluation de la prolifération est la détermination immunohistochimique du Ki-67. Il s'agit d'un anticorps monoclonal de souris découvert par Gerdes en 1983 [6], appelé Ki-67, Ki pour *Kiel University* en Allemagne et 67 pour le numéro de clone issu d'un panel de 96 clones. Cet anticorps reconnaît l'antigène nucléolaire Ki-67 exprimé dans les cellules en phase active (G1, S, G2, M) et absent dans les cellules quiescentes (G0). Cet antigène serait impliqué dans les phases précoces de la synthèse d'ARN ribosomale dépendante de la polymérase I et jouerait un rôle important dans la division cellulaire, notamment au cours de la mitose. L'utilisation de cet anticorps n'était initialement possible que sur tissus frais ou congelés, la fixation altérant l'immunoréactivité. Actuellement, l'immunomarquage sur coupes paraffinées est possible et de nombreux clones ont été développés avec notamment les anticorps Ki-S5, Ki-S11, SP-5, SP-6 et MM-1, à partir de cellules de souris ou de lapin et reconnaissant des épitopes variables en taille sur l'antigène nucléaire. Le plus utilisé reste l'anticorps MIB-1.

Ainsi, par abus de langage, nous faisons référence en routine et dans la littérature ainsi que dans notre travail à l'IP déterminé en IHC sous les termes de Ki-67 ou MIB-1.

L'IP a été largement étudié, il est facilement réalisé en routine par les anatomopathologistes mais paradoxalement et contrairement au grade histopronostique, il n'est pas établi comme un standard en tant que marqueur tumoral.

La valeur pronostique de l'index de prolifération

Sa valeur pronostique a été reportée par de nombreuses études (Ellis 2008 ; Viale 2008) [7] [8], même si la plupart sont rétrospectives et concernent des groupes hétérogènes de patientes. Ainsi, les revues de la littérature (Luporsi 2012) [9] permettent d'établir l'IP déterminé par le Ki-67 comme un facteur pronostique indépendant : un IP élevé est associé à un pronostic plus sombre avec une SSR, une survie globale (SG) et une survie spécifique pour le cancer du sein (BCSS) plus mauvaises. Deux méta-analyses ont été conduites : De Azambuja (2007) [10] conclut à une valeur pronostique du Ki-67 sur la SSR et la SG, significative en analyse univariée, dans les cancers avec ou sans envahissement ganglionnaire et en l'absence de traitement adjuvant systémique ; alors que Stuart-Harris (2008) [11] ne lui accorde qu'une valeur pronostique modeste pour la SSR et la SG en analyse multivariée, mais il est retrouvé qu'un taux d'IP très élevé est prédictif de l'évolution métastatique ganglionnaire dans les cancers primitifs localisés.

De plus, l'IP est corrélé aux autres facteurs pronostiques et est d'ailleurs utilisé pour la définition de sous-groupes histologiques avec les récepteurs aux œstrogènes (RE), les récepteurs à la progestérone (RP), et HER2 (Yerushalmi 2010 ; Goldhirsch 2011) [12] [13]. Le Ki-67 permet de distinguer les cancers *Luminal A* des cancers *Luminal B*. Or, il existe un meilleur pronostic pour la récurrence et le décès dans les tumeurs *Luminal A* (92% de BCSS à 10 ans) par rapport aux *Luminal B* (79%).

Ainsi, selon la classification de Hayes modulée par Simon en 2009 [14], le NP du Ki-67 en tant que facteur pronostique serait IB (Luporsi 2012) [9], sans considération pour sa validité analytique.

La valeur prédictive de l'index de prolifération

Concernant la valeur prédictive du Ki-67, les études publiées ont des résultats inconstants mais globalement en faveur d'une prédiction de la réponse aux traitements. Dans le cas de l'hormonothérapie néoadjuvante, des essais (Ellis 2008 ; Viale 2008) [7] [15] ont étudié l'impact de la mesure de l'IP avant et après instauration d'un traitement anti-hormonal afin d'évaluer le risque résiduel de récurrence post-thérapeutique et concluent à sa fiabilité comme marqueur prédictif de la réponse à l'hormonothérapie. Ainsi, en cas de bonne réponse, une hormonothérapie seule pourra être poursuivie en adjuvant permettant d'éviter une chimiothérapie. Pour la chimiothérapie adjuvante, certaines études ne permettent pas de valider le Ki-67 en tant que facteur prédictif (Viale 2008) [8]. En revanche, Yerushalmi (2010) [12] montre qu'il n'est pas prédictif de la supériorité de la chimiothérapie sur l'hormonothérapie, mais reste une aide à l'indication dans le cadre des sous-groupes histologiques *Luminal A* (chimiorésistants) et *B* (bonne réponse à la chimiothérapie). Enfin, pour les chimiothérapies néoadjuvantes, le dosage du Ki-67 avant et après traitement est, lorsqu'il est très élevé, associé à une meilleure réponse pathologique complète immédiate (Penault-Llorca 2008 ; Jonat 2011) [16] [17], ce qui lui accorderait un NP IIB en tant que facteur prédictif (Luporsi 2012) [9], toujours sans prise en compte de la validité technique du test.

L'index de prolifération en pratique

Se pose alors la question de l'utilité clinique de l'IP. Sa réalisation simple, son accessibilité et son coût modeste comparé aux autres marqueurs immunohistochimiques font qu'il est facilement évalué par les anatomopathologistes.

Nous avons voulu savoir si son résultat était alors pris en compte dans les décisions thérapeutiques en France et nous avons, pour cela, parcouru les référentiels régionaux des réseaux de cancérologie. Sur 14 réseaux, 8 ne considèrent pas le Ki-67 nécessaire pour le compte-rendu anatomopathologique et ne l'intègrent donc pas dans les modèles décisionnels (références *web*) [18] [19] [20] [21] [22]. C'est notamment le cas du réseau Rhône-Alpes (référence *web*) [23]. Dans les autres référentiels, notamment en Ile-de-France, dans le nord-est, en Basse-Normandie et en Midi-Pyrénées (références *web*) [24] [25] [26] [27] [28] [29], le Ki-67 est une aide à la décision thérapeutique pour l'indication de chimiothérapie adjuvante, associé à l'âge, la taille tumorale et le statut ganglionnaire dans les tumeurs primitives localisées à risque intermédiaire (RH positifs, HER2 négatif).

Nous sommes ainsi face à un paradoxe, l'IP étant régulièrement pris en considération par beaucoup d'équipes mais peu présent dans les recommandations. En effet, sur le plan national, le Ki-67 n'apparaît pas dans les consensus de la prise en charge des cancers non métastatiques (INCa 2012) [3]. De même, les recommandations pour la pratique clinique (RPC) de Saint-Paul-de-Vence (2013) [30] ne valident pas le Ki-67 comme un biomarqueur de la décision de chimiothérapie à lui seul en cas de cancer RE positifs - HER2 négatif - sans envahissement ganglionnaire (accord d'experts), même si sa valeur prédictive pour la chimiothérapie et pronostique est admise. Pour les groupes d'experts internationaux, les avis divergent avec l'*American Society of Clinical Oncology* (ASCO) (Harris 2007) [31] statuant sur le manque de preuves suffisantes pour recommander le Ki-67 comme marqueur tumoral en routine, alors que le panel du *St. Gallen International Expert Consensus* (Goldhirsch 2011) [13] recommande son utilisation comme un des marqueurs d'indication des chimiothérapies avec le grade histopronostique, le statut hormonal et le statut HER2, dans le cadre de la classification des cancers *Luminal A* et *B*.

Deux problèmes d'importance sont évoqués pour expliquer son éviction des recommandations et feront l'objet de notre discussion.

- Le premier est l'absence de consensus possible sur la définition des valeur-seuils à appliquer.
- Le second est l'immense variabilité des techniques de détermination mettant en doute sa validité analytique et pré-analytique.

OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'objectif principal de cette étude est de mettre en évidence une variation des valeurs de l'IP dans le cancer du sein évalué par IHC au cours des 20 dernières années.

L'objectif secondaire est, si une telle augmentation des taux de l'IP est retrouvée, de comprendre les mécanismes étiologiques ayant pu induire ce phénomène. Ainsi nous évoquerons 3 hypothèses que nous tenterons ensuite d'étayer.

Hypothèse n°1 :

L'augmentation des taux de l'IP est-elle liée à l'émergence de cancers du sein de plus en plus agressifs ?

Nous considérerons afin de répondre à cette question que des tumeurs plus agressives sont caractérisées par des facteurs pronostiques plus défavorables (cliniques et histologiques), des récurrences plus fréquentes et ont pour conséquence des traitements plus lourds.

Hypothèse n°2 :

L'augmentation des taux de prolifération est-elle un reflet de l'impact de perturbateurs endocriniens, qu'ils s'agissent de facteurs environnementaux ou individuels ?

Certains éléments peuvent potentiellement modifier l'agressivité intrinsèque d'une tumeur et donc son taux de prolifération. Il peut s'agir de facteurs endogènes (obésité) ou de facteurs exogènes, soit par le biais des traitements hormonaux prescrits par le corps médical (THM, contraception hormonale), soit dans le cadre de molécules présentes dans l'environnement de façon non contrôlée (engrais et pesticides en milieu agricole par exemple).

Hypothèse n°3 :

S'agit-il simplement d'un biais dû à l'évolution des techniques d'IHC utilisées pour la détermination de l'IP ?

La variation du taux de l'IP peut être due à l'anticorps utilisé, au site de dosage (biopsie ou pièce) ou au type de lecture, laquelle est variable selon l'observateur.

MATERIEL ET METHODES

Il s'agit d'une étude épidémiologique observationnelle rétrospective et unicentrique.

1. Population d'étude

La population d'étude est issue d'une cohorte homogène puisqu'elle concerne des patientes opérées dans un même centre par un même chirurgien à Grenoble, lequel confie ses prélèvements de façon quasi-exclusive à un seul cabinet d'anatomopathologie, au sein duquel essentiellement 4 praticiens se sont partagés l'analyse des biopsies ou des pièces opératoires de cancer du sein sur les 20 dernières années.

La période d'étude s'étend sur 21 ans entre le 1^{er}/01/1994 et le 31/12/2014 ; au cours de celle-ci on estime le nombre de patientes opérées par ce chirurgien pour un cancer du sein à environ 4200. Afin de faciliter la comparaison, nous avons pris le parti d'étudier 3 groupes discontinus représentatifs de cette période, équivalents en termes d'effectif, en incluant la totalité des patientes ayant bénéficié d'une chirurgie du sein pour pathologie maligne sur 3 périodes de 2 à 3 ans.

Ont été exclues d'emblée les patientes dont la chirurgie première a été réalisée dans un autre centre (dans le cadre de mastectomie de rattrapage par exemple), les cas où l'analyse anatomopathologique a été effectuée dans un autre cabinet, les dossiers incomplets (dont le compte-rendu d'anatomopathologie n'était pas disponible par exemple) et les cancers du sein chez l'homme.

Le tableau I résume la répartition de notre population globale.

Tableau I : Dates d'inclusion et effectifs des sous-populations étudiées

	population globale	population I	population II	population III
période d'inclusion	1994-2014	1994-1996	2003-2004	2012-2014
effectif total	863	271	296	296

La population I est constituée de 271 patientes incluses sur 3 années consécutives : 1994, 1995 et 1996.

La population II comporte 296 patientes incluses de façon consécutive sur 2 années, 2003 et 2004.

Enfin, la population III est composée de 296 patientes incluses sur les 3 dernières années 2012, 2013 et 2014.

Au total, 863 dossiers ont été analysés sur ces 3 intervalles de temps discontinus entre 1994 et 2014.

2. Critères étudiés

Pour chaque cas, les critères d'analyse ont été recueillis dans le dossier clinique des patientes de façon rétrospective.

Nous avons choisi de diviser nos critères d'étude en 4 groupes différents intitulés A, B, C et D. Ceux-ci sont résumés dans le tableau II.

Tableau II : Classification des critères recueillis par groupes

Groupe A <ul style="list-style-type: none">- A1 : Âge de la patiente- A2 : Statut ménopausique- A3 : Traitements hormonaux- A4 : Indice de masse corporelle- A5 : Lieu d'habitation- A6 : Antécédents familiaux de cancer du sein
Groupe B <ul style="list-style-type: none">- B1 : Statut primitif et localisé de la tumeur- B2 : Statut clinique ou infraclinique de la tumeur- B3 : Modalités diagnostiques
Groupe C <ul style="list-style-type: none">- C1 : Type de prélèvements- C2 : Marges de résection- C3 : Type histologique- C4 : Taille de la tumeur- C5 : Grade SBR- C6 : Statut ganglionnaire- C7 : Présence d'embolies- C8 : Statut des récepteurs hormonaux- C9 : Statut HER 2- C10 : Index de prolifération
Groupe D <ul style="list-style-type: none">- D1 : Traitements néoadjuvants- D2 : Traitements adjuvants- D3 : Eléments du suivi

Groupe A

Le groupe A regroupe les caractéristiques cliniques et épidémiologiques de la patiente et se subdivise en 6 items :

- A1 :
L'âge de la patiente, en années, en date de l'intervention chirurgicale réalisée ou à défaut en date de la biopsie.
- A2 : Le statut ménopausique de la patiente.
Le diagnostic de la ménopause utilisé est uniquement clinique, recueilli à l'interrogatoire de la patiente et corrélé à son âge, sans mesure objective des dosages de LH et de FSH. La patiente est considérée ménopausée si elle a présenté une période minimale d'un an sans cycle menstruel. Les femmes en période péri-

ménopausique sont donc considérées comme non ménopausées. Il n'est pas précisé si la ménopause est induite soit par castration chirurgicale pour une autre pathologie ou induite dans le cadre du traitement d'un antécédent de cancer du sein.

- A3 : Les traitements hormonaux éventuellement en cours.
L'existence d'un traitement hormonal au moment du diagnostic est relevée, qu'il s'agisse d'une contraception œstro-progestative (COP) en incluant les dispositifs intra-utérins à la progestérone, ou d'un THM ou d'une hormonothérapie encore en cours dans le cadre d'un antécédent de cancer du sein. Les traitements arrêtés dans l'année précédant le diagnostic du cancer sont inclus.
- A4 :
L'indice de masse corporel (IMC) de la patiente est calculé en kg/m² selon le poids recueilli à la première consultation.
- A5 : Le lieu de résidence de la patiente.
Ce critère est recueilli selon l'adresse administrative déclarée par la patiente et analysé selon 2 catégories : zone urbaine et zone rurale, sans considération pour la durée d'habitation.
Nous avons défini les zones rurales comme agricoles, donc exposées aux polluants potentiellement perturbateurs endocriniens, contenus dans les pesticides ou les engrais. Cet item a été défini selon la liste des communes vulnérables caractérisées par une pollution diffuse des eaux en nitrates publiée par la Direction Régionale de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt de Rhône-Alpes (référence *web*) [32].
- A6 : Les formes familiales de cancer du sein.
Les antécédents familiaux de cancer du sein, s'ils existent, sont recueillis dans la famille au premier degré et au deuxième degré. La notion de mutation BRCA 1 ou 2 n'a pu être retrouvée de façon systématique dans le dossier clinique des patientes.

Groupe B

Le groupe B concerne les critères anamnestiques de la tumeur étudiée et se subdivise en 3 items :

- B1 : Le statut primitif et localisé de la tumeur.
Sont relevés les taux de cancers primitifs et de cancers récidivants, de cancers bilatéraux et de cancers présentant une ou des métastase(s) inaugurale(s).
- B2 : Le statut clinique ou infraclinique de la tumeur.
La tumeur est dite clinique si elle est détectée à l'examen clinique par la palpation ou dans le cadre de signes inflammatoires locaux. Elle est infraclinique si elle est non palpable au moment du diagnostic.
- B3 : Les modalités diagnostiques de la tumeur.
Elles sont classées selon 4 possibilités :
 - 1 Diagnostic clinique par palpation mammaire par un médecin au cours d'une visite de contrôle ou dans le cadre d'une autre pathologie.
 - 2 Diagnostic clinique par la patiente, soit par autopalpation ou sensation de modification clinique de son sein (rétraction mamelonnaire, augmentation du volume du sein) ou apparition d'une douleur, d'un écoulement mamelonnaire ou d'une anomalie cutanée comme un hématome par exemple.

- 3 Dépistage mammographique organisé par l'Office de lutte contre le cancer (ODLC), mis en place en Isère depuis 1990.
- 4 Dépistage mammographique individuel sur point d'appel : il peut être réalisé à l'initiative du praticien ou à la demande de la patiente pour la surveillance de lésions connues (microcalcifications, mastose fibrokystique, adénofibromes, hyperplasies), selon les antécédents personnels et familiaux de cancers, selon les traitements (THM), en référence préopératoire en cas de chirurgie mammaire (réduction mammaire, prothèses), dans le bilan étiologique d'embolie pulmonaire, ou la recherche d'un cancer primitif en cas de métastase inaugurale.

Groupe C

Le groupe C comprend les caractéristiques anatomopathologiques de la tumeur et se compose de 10 items :

- C1 : Le type de prélèvement chirurgical initial sur lequel sont évalués les critères ci-après.
Il peut s'agir d'une biopsie, chirurgicale ou non, d'un traitement conservateur ou d'un traitement radical (mastectomie totale).
- C2 :
Les marges d'exérèse chirurgicale, *in sano* ou non, pour les tumeurs infiltrantes ou pour les carcinomes *in situ* (CIS) associés.
- C3 : Le type histologique.
Nous ne retiendrons que le type histologique dominant à l'analyse de la pièce opératoire, ou en l'absence de reliquat tumoral, de la biopsie (carcinome canalaire infiltrant (CCI), carcinome lobulaire infiltrant (CLI), autres types de cancers invasifs, CIS). Cependant, il sera pris note des cancers multifocaux.
- C4 : La taille tumorale histologique sur la pièce d'exérèse.
Sera prise en compte la taille tumorale définitive sur la pièce opératoire, après traitement néo-adjuvant s'il a lieu, classifiée selon le stade pTNM ou ypTNM.
- C5 : Le grade histopronostique de mSBR, s'il est applicable.
Nous n'avons pas détaillé ce score qui nous aurait cependant permis de vérifier la concordance des résultats de l'index mitotique avec ceux de l'IP.
- C6 : Le statut ganglionnaire.
L'évaluation de l'envahissement ganglionnaire est réalisée par technique du ganglion sentinelle ou par curage.
- C7 :
La présence ou non d'embolies, lymphatiques et / ou vasculaires.
- C8 : L'évaluation de l'hormonosensibilité par dosage des RH.
Le statut des RH est classé selon 2 possibilités : RH positifs (RE+/RP+, RE+/RP- ou RE-/RP+) et RH négatifs (RE-/RP-). Lors du recueil de cet item, nous avons cherché à préciser la technique de dosage (biochimique ou immunohistochimique et l'anticorps utilisé) et si le dosage a été réalisé sur la pièce opératoire ou sur la biopsie (si non redéterminés sur la pièce opératoire).
- C9 :
Le statut HER2, positif ou négatif, en IHC ou par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) le cas échéant.

- C10 : L'IP.

Trois sous-items de ce critère ont été recueillis :

- 1 La valeur de l'IP en pourcentage et son interprétation qualitative selon les valeur-seuils utilisées. Ces seuils définis par le laboratoire d'étude sont constants pour notre population globale depuis 1994 avec : une prolifération faible pour un IP inférieur ou égal à 10%, modérée entre 11 et 20% et élevée à partir de 21%.
- 2 Le type d'anticorps utilisé en IHC pour le Ki-67 (MIB-1, MM-1) et son fabricant. Cet anticorps a été changé au minimum 4 fois dans le laboratoire d'étude au cours de la période analysée et il existe globalement un anticorps différent utilisé sur chaque période d'étude.
Le type de prélèvement a été noté : la valeur de l'IP sur pièce opératoire a été conservée, et en cas de résultat non disponible (pas de nouvelle détermination du Ki-67 sur pièce), nous avons étudié la valeur sur biopsie.
- 3 Le pathologiste responsable de la détermination de l'IP parmi les 4 principaux praticiens qui se sont succédés au cours de la période d'étude.

Il est à noter que nous avons aussi voulu collecter des informations relatives à la technique de lecture. Les compte-rendus nous ont permis de savoir que l'IP était déterminé après compte de 300 cellules au grossissement x 400 en microscopie optique, mais il n'est pas fait mention de la zone étudiée ou du nombre de champs observés.

Groupe D

Le groupe D comporte les traitements mis en place et le suivi des patientes, avec l'analyse de 3 items :

- D1 : Les traitements néoadjuvants.
En cas de traitement néoadjuvant appliqué, nous préciserons s'il s'agit de chimiothérapie, et le protocole appliqué, ou d'hormonothérapie, avec la molécule utilisée et la durée de traitement.
- D2 : Les traitements adjuvants.
Ils peuvent comprendre de façon séquentielle ou non : reprise chirurgicale, chimiothérapie, radiothérapie loco-régionale et hormonothérapie. Les protocoles et les molécules utilisés ont été précisés.
Il est à noter que nous n'avons pris en compte que les traitements réellement délivrés sans évoquer les traitements parfois indiqués par le comité multidisciplinaire mais refusés par la patiente ou contre-indiqués du fait de comorbidités.
- D3 : La survenue de récurrence et de décès.
Ont été recueillis : la durée de suivi et la date de fin de suivi (arrêt de la surveillance, perdue de vue ou décès de toute cause confondue) et le cas échéant, la survenue de récurrence loco-régionale ou métastatique en précisant le délai de la récurrence, si possible.

3. Analyses statistiques

Trois analyses successives seront réalisées afin de vérifier la constatation subjective des cliniciens et nos hypothèses de travail.

Analyse 1 :

Nous avons comparé les 3 populations d'étude décrites ci-dessus avec une analyse de façon séquentielle entre les populations I et II, puis entre les populations II et III, et enfin entre les populations I et III sur la totalité des critères décrits dans les groupes A, B, C et D, avec pour objectif d'étudier la comparabilité des populations et de démontrer une augmentation du taux de l'IP.

Nous avons fait le choix d'isoler d'emblée de la population analysée les cancers a priori plus agressifs (cancers récidivants, cancers bilatéraux et cancers métastatiques d'emblée) ainsi que les cancers moins agressifs (CIS). Ces patientes exclues de l'analyse seront comparées en termes de variation du recrutement pour ainsi ne conserver dans notre analyse que les cancers infiltrants primitifs et localisés.

Analyse 2 :

Par la suite, nous avons étudié la corrélation entre un IP élevé et l'agressivité de la tumeur en analysant les autres facteurs pronostiques admis (âge de la patiente, taille tumorale, envahissement ganglionnaire, type histologique, grade histopronostique, présence d'embolies, hormonosensibilité) et les conséquences sur la prise en charge et le pronostic (traitements néoadjuvants, adjuvants, décès, récurrence loco-régionale et métastatique).

Analyse 3 :

Enfin, nous avons réalisé une analyse de l'IP par sous-groupes pour rechercher une corrélation avec l'IMC, les traitements hormonaux en cours et l'exposition aux pesticides selon le lieu d'habitation, le type d'anticorps utilisé, le site de dosage (pièce ou biopsie) et l'anatomopathologiste.

4. Tests statistiques

Pour la réalisation des tests statistiques, nous avons utilisés le logiciel « *Analyse-it* » v2.26 d'Excel.

Pour les tests non paramétriques, nous avons appliqué le test de Kruskal-Wallis pour la comparaison de variables quantitatives.

Pour l'étude de la relation entre deux variables nominales, nous avons utilisé le test du Chi² avec l'application du coefficient de corrélation selon Pearson. Pour les résultats statistiquement significatifs obtenus par ce biais, nous avons ensuite réalisé le test exact de Fisher pour recalculer la *p-value* et obtenir l'*Odds-Ratio* (OR) avec son intervalle de confiance à 95%.

Enfin, le test de Mann-Whitney a été utilisé pour permettre la comparaison de 2 catégories nominales selon une donnée numérique (ici, le taux d'IP en pourcentage).

Le seuil de significativité retenu pour ces analyses statistiques est *p-value* < 0,05.

RESULTATS

1. Description de la population

Huit-cent-quatre-vingt-dix (890) tumeurs ont été analysées, pour un total de 856 patientes, si l'on considère les 15 cancers ayant récidivé entre les 3 périodes d'étude et les 19 cancers bilatéraux. Nous avons analysé chacune de ces tumeurs comme des cancers différents et nous avons considéré pour notre analyse statistique les cancers récidivants dans une même population (I, II ou III) comme survenant chez une même patiente, mais les cancers récidivants sur 2 populations différentes comme survenant chez 2 patientes différentes, compte-tenu du fait que plusieurs facteurs analysés peuvent être significativement différents sur des périodes de 10 à 20 ans. Ainsi, on considère au total avoir inclus 863 patientes.

Nos analyses statistiques ne porteront que sur la sous-population des cancers infiltrants primitifs et localisés. La figure 1 est un *flow-chart* expliquant l'obtention de cette sous-population d'étude à partir de la population globale pour chacun des sous-groupes I, II et III avec la précision des effectifs.

Pour chaque période, nous allons décrire les critères d'analyse de la population et nous rapporterons les techniques de dosage des RH et de l'IP, le contenu du compte-rendu anatomopathologique et les protocoles de traitement.

Les résultats statistiques descriptifs pour les 3 populations sont résumés dans les tableaux III et IV-1, IV-2 et IV-3. Les effectifs des populations sont équivalents avec une absence de différence statistiquement significative.

Le tableau V en annexe rapporte l'ensemble des données descriptives et statistiques de l'analyse 1.

Population I : 1994-1996

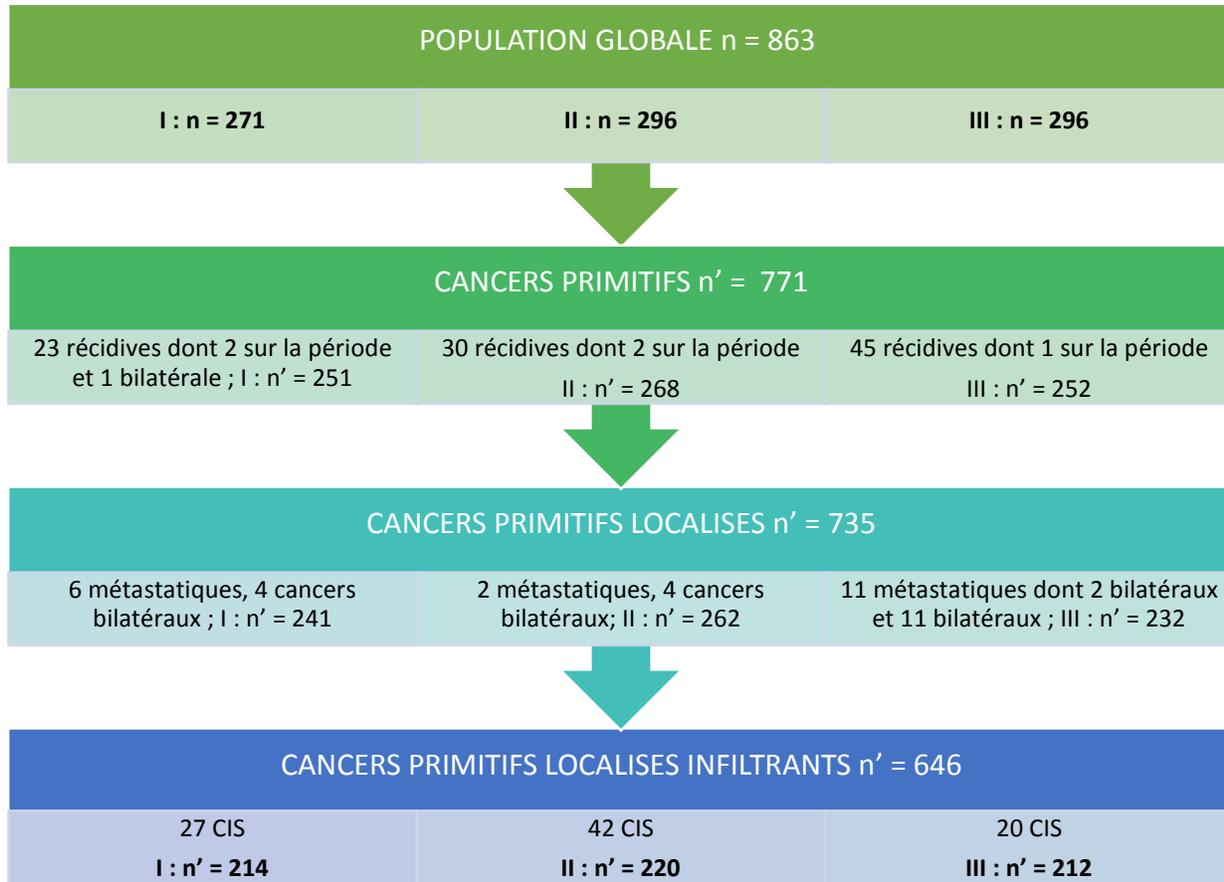
Cette première période s'étend sur 3 années successives, du 3/01/1994 au 30/12/1996. 278 cancers pour 271 patientes y sont inclus. La sous-population des cancers infiltrants primitifs et localisés, contient 214 patientes. Les principaux résultats statistiques concernant cette sous-population sont décrits dans le tableau IV-1.

Groupe A :

- A1 : Âge moyen de 57 ans, pour des extrêmes allant de 27 à 92 ans.
- A2 : 66% de patientes ménopausées avec un taux de ménopauses traitées de 30% et une durée moyenne de traitement de 78 mois (soit environ 3 ans).
- A3 : 26% de traitements hormonaux en cours au moment du diagnostic de cancer avec 18% de THM et 8% de COP. Le taux de contraception hormonale chez la femme non ménopausée est de 23%.
- A4 : IMC moyen de 24,9 kg/m² avec des extrêmes allant de 17,4 à 50,2 kg/m².

- A5 : 87% de la population vivant en milieu urbain et 13% en milieu rural.
- A6 : 26% d'antécédents familiaux rapportés dont 53% au premier degré et 47% au second degré.

Figure 1 : Diagramme explicatif de la constitution de la population des cancers primitifs localisés infiltrants par groupe



n = effectifs initiaux en nombre de patientes ; n' = effectifs rectifiés en nombre de patientes ; I = groupe entre 1994 et 1996 ; II = groupe entre 2003 et 2004 ; III = groupe entre 2012 et 2014

Groupe B :

- B1 : Ont été recensés et d'emblée isolés de cette population, 7,4% de cancers récidivants, 1,5% de cancers bilatéraux et 2,2% de cancers métastatiques d'emblée. L'analyse a donc porté sur les 88,9% de cancers primitifs localisés.
- B2 : 13% des tumeurs sont infracliniques, soit 87% sont palpables.
- B3 : 52% des tumeurs ont été diagnostiquées de façon clinique avec 14% par un médecin et 38% par la patiente, et 48% ont été diagnostiquées par une mammographie, dont 19% dans le cadre de l'ODLC et 29% par dépistage individuel. Parmi les tumeurs infra-cliniques, 79% ont été détectées par mammographie individuelle.

Notons que le dépistage organisé par l'ODLC n'en était qu'à ses débuts puisqu'il a été instauré en 1990 en Isère.

Tableau III : Sous-groupes isolés pour l'analyse 1

Critères	POPULATION I	POPULATION II	POPULATION III
Effectif (n)	278	302	310
Cancers primitifs	241 (88,9%)	262 (88,2%)	232 (78,1%)
Cancers récidivants	23 (7,4%)	30 (10%)	44 (15,2%)
Cancers bilatéraux	4 (1,5%)	4 (1,2%)	11 (3,7%)
Cancers métastatiques	6 (2,2%)	2 (0,6%)	9 (3%)
Cancers <i>in situ</i>	27 (11,2%) n = 241	42 (14%) n = 262	20 (6,7%) n = 232

n : effectif en nombre de cancers

Pour les cancers *in situ*, le pourcentage est calculé sur l'effectif des cancers primitifs par rapport aux cancers infiltrants.

Groupe C :

- C1 : 91% des traitements chirurgicaux ont été conservateurs.
- C2 : Les marges ne sont pas saines dans 11% des cas, dont 42% pour le contingent infiltrant et 58% pour le contingent *in situ* associé.
- C3 : La distribution des types histologiques retrouve : 88,8% de cancers infiltrants et 11,2% de CIS, ces derniers ont été exclus de l'analyse. Les cancers infiltrants, se répartissent en : 68% de CCI, 23% de CLI et 9% d'autres types, avec principalement des carcinomes tubuleux ou colloïdes muqueux et à moindre échelle, des carcinomes papillaires ou médullaires.

Il est à noter que toutes ces variantes histologiques sont de bon pronostic et l'envahissement ganglionnaire y est rare.

Un contingent de CIS est associé au carcinome infiltrant dans 48% des cas.

- C4 : La taille tumorale moyenne est de 16 mm avec des extrêmes allant de 0 à 75 mm. Selon la classification pTNM, nous retrouvons 77% de stades T1, 19% de stades T2, 1% de stades T3 et 3% de stades T4. 8% de ces cancers sont multifocaux.
- C5 : Concernant le grade SBR, il y a 27% de grade I, 41% de grade II et 32% de grade III.
- C6 : Il existe un envahissement ganglionnaire dans 34% des cas.
- C7 : Des embolies sont retrouvées dans 24% des cas.
- C8 : Les RH sont négatifs dans 18% des cas et positifs pour les RE et/ou les RP dans 56% des cas.

Il existe à cette époque deux techniques de dosage des RH avec une méthode biochimique en phase d'azote liquide où le seuil de positivité fixé par le laboratoire est de 15 ftm/mg de protéines cytosoliques et une méthode immunohistochimique utilisant les anticorps anti-RE clone 1D5 de DAKO et anti-RP clone 1A6 de TEBU avec une valeur-seuil de positivité pour 10% de cellules marquées. La méthode biochimique était centralisée et n'était réalisée qu'au centre hospitalo-universitaire (CHU) de Grenoble. Il s'agit d'un dosage quantitatif des récepteurs dans le surnageant obtenu à partir de l'ultracentrifugation d'un broyat de tumeur d'environ 1 mg (soit environ 1 million de cellules). Les valeurs obtenues étaient comprises entre 0 et 2000 ftm/mg et l'on estimait que le seuil de réponse optimale à l'hormonothérapie (90% de taux de réponse) était de 70 en pré-ménopause et de 250 en post-ménopause.

Tableau IV-1 : Description de la population I pour les cancers primitifs localisés infiltrants (analyse 1)

Critères	POPULATION I
Effectifs (n)	214
Âge moyen +/- écart-type (ans)	57 +/- 12
Ménopause	141 (65,9%)
Traitement hormonal	56 (26,2%)
IMC moyen +/- écart-type (kg/m ²)	24,94 +/- 5,5 n = 128
Lieu d'habitation rural	28 (13,1%) n = 213
Antécédents familiaux	55 (25,7%)
Tumeur infra-clinique	28 (13,1%) n = 213
Dépistage clinique	106 (52,2%) n= 203
CCI	145 (67,8%)
Taille p T1	161 (75,2%)
Multifocalité	17 (7,9%)
Envahissement ganglionnaire	70 (34,1%) n = 205
Présence d'emboles	51 (23,8%)
Marges non <i>in sano</i>	24 (11,2%)
Grade SBR II	86 (41,1%) n = 209
Grade SBR III	66 (31,6%) n = 209
RH négatifs	36 (17,6%) n = 205
IP moyen +/- écart-type (%)	14,53 +/- 9,93 n = 200
Traitement néo-adjuvant	62 (29%)
Chirurgie conservatrice	194 (90,7%)
Traitement adjuvant : CT	57 (26,6%)
Traitement adjuvant : HT	121 (56,5%)
Décès	18 (7,5%)
Rechute	95 (44,5%)

n : effectif reprécisé pour chaque critère si différent de l'effectif global de la population
 IMC : indice de masse corporelle ; CCI : carcinome canalaire infiltrant ; p T1 : taille sur pièce opératoire < ou = à 20 mm ; RH : récepteurs hormonaux ; IP : index de prolifération ; CT : chimiothérapie ; HT : hormonothérapie ; rechute : comprend les récurrences loco-régionales et métastatiques

La technique de dosage est biochimique dans 88% des cas et immunohistochimique dans 12% des cas.

Les RH sont principalement dosés sur pièce opératoire (97%).

En effet, La plupart des déterminations immunohistochimiques sont faites sur pièce opératoire car la plupart du temps, il n'y a pas de biopsies préalables (sauf biopsie chirurgicale avant traitement néoadjuvant). Ainsi le diagnostic préopératoire est généralement orienté par une cytoponction qui retrouve ou non des cellules suspectes de malignité.

- C10 : L'IP est en moyenne de 14,5% avec des extrêmes allant de 0 à 60. La prolifération est jugée faible dans 48%, modérée dans 28,5% et élevée dans 23,5% des cas.

La détermination de l'IP est immunohistochimique avec un seul anticorps utilisé sur la population, l'anticorps Ki-67 de DAKO issu du clone murin MIB-1, et est réalisée sur pièce opératoire dans 97% des cas.

Sur le plan technique, l'IHC est réalisée sur coupes de tissus congelés par de l'azote liquide. Le milieu de révélation utilisé est composé de streptavidine-biotine-peroxydase. Le résultat est rendu en pourcentage de cellules marquées.

Les 4 anatomopathologistes pratiquent de façon inégale lors de cette période. Nous retrouvons essentiellement l'anatomopathologiste n°1 (72% des lectures), suivi de l'anatomopathologiste n°2 (23%). Les anatomopathologistes n°3 (4%) et 4 (1%) débutent leur activité.

Groupe D :

- D1 : Les traitements néoadjuvants sont utilisés dans 29% des cancers avec 27,5% de chimiothérapie et 1,5% d'hormonothérapie.

Les traitements de chimiothérapie contiennent essentiellement la Novantrone^R / Mitoxantrone en péri-opératoire et le protocole FNC (6 cures de 5FU – Novantrone^R – Cyclophosphamide). La Novantrone^R de la classe des anthracène-diones, a été retirée du marché en 2011 pour impureté ; lorsqu'elle était utilisée seule en perfusion intraveineuse peropératoire, la dose était adaptée au calcul de la surface corporelle.

- D2 : Concernant les traitements adjuvants, on retrouve 27% de chimiothérapie, 90% de radiothérapie, et 57% d'hormonothérapie, seules ou en association.

Les protocoles de chimiothérapie étaient les suivants : FNC, CMF (6 cures de Cyclophosphamide – Méthotrexate – 5FU) et à moindre mesure, FAC (5FU – Adriblastine^R / Doxorubicine – Cyclophosphamide). Un point intéressant est le traitement séquentiel adjuvant quasi-systématique alternant chimiothérapie et radiothérapie avec 3 cures de FNC, suivie de la radiothérapie puis de 3 cures de FNC en clôture.

Concernant l'hormonothérapie, le Tamoxifène était utilisé en néoadjuvant et en adjuvant pour une durée moyenne de 5 ans. Une spécificité de cette période est l'association de l'hormonothérapie à une castration par radiothérapie des ovaires chez les femmes non ménopausées.

- D3 : La durée moyenne de suivi est de 90 mois avec des extrêmes allant de 6 à 252 mois, soit couvrant la période entre 1994 et 2015. Sont dénombrés 7,5% de décès de toute cause confondue, 36% de rechutes avec 15% de récurrence locale, 14% de récurrence contralatérale, 16% d'évolution métastatique dont 35% sur des sites multiples. La durée moyenne de SSR est de 87 mois.

Populations II : 2003-2004

Cette période comprend 2 années successives et s'étale du 02/01/2003 au 03/12/2004. 302 cancers pour 296 patientes composent cette population. Dans le sous-groupe des cancers primitifs localisés infiltrants, on recense 220 patientes. Cette sous-population selon les groupes de critères prédéfinis est décrite dans le tableau IV-2.

Tableau IV-2 : Description de la population II pour les cancers primitifs localisés infiltrants (analyse 1)

Critères	POPULATION II
Effectifs (n)	220
Âge moyen +/- écart-type (ans)	59 +/- 11
Ménopause	151 (68,6%)
Traitement hormonal	75 (34,1%)
IMC moyen +/- écart-type (kg/m ²)	24,64 +/- 4,9 n = 218
Lieu d'habitation rural	25 (11,8%) n = 212
Antécédents familiaux	73 (33,2%)
Tumeur infra-clinique	34 (15,5%)
Dépistage clinique	94 (43,6%) n = 216
CCI	173 (78,6%)
Taille p T1	172 (78,2%)
Multifocalité	20 (9,3%)
Envahissement ganglionnaire	76 (34,5%)
Présence d'emboles	49 (22,3%)
Marges non <i>in sano</i>	20 (9,1%)
Grade SBR II	99 (46%) n = 215
Grade SBR III	56 (26%) n = 215
RH négatifs	31 (14,4%) n = 215
IP moyen +/- écart-type (%)	11,95 +/- 11 n = 205
Traitement néo-adjuvant	26 (11,8%)
Chirurgie conservatrice	180 (81,8%)
Traitement adjuvant : CT	76 (34,5%)
Traitement adjuvant : HT	132 (60%)
Décès	3 (1,4%)
Rechute	38 (17,3%)

n : effectif reprécisé pour chaque critère si différent de l'effectif global de la population
IMC : indice de masse corporelle ; *CCI* : carcinome canalaire infiltrant ; *p T1* : taille sur pièce opératoire < ou = à 20 mm ; *RH* : récepteurs hormonaux ; *IP* : index de prolifération ; *CT* : chimiothérapie ; *HT* : hormonothérapie ; *rechute* : comprend les récidiues loco-régionales et métastatiques

Groupe A :

- A1 : Âge moyen de 59 ans avec des extrêmes allant de 33 à 84 ans.
- A2 : 67% de patientes ménopausées avec 40% de ménopauses traitées sur des durées moyennes de 112 mois (environ 5 ans).
- A3 : 34,5% de traitements hormonaux en cours au moment du diagnostic avec 25% de THM et 9,5% de COP. 30% des femmes non ménopausées ont une contraception hormonale.
- A4 : IMC moyen de 24,6 kg/m² avec des extrêmes allant de 14,5 à 57,5 kg/m².
- A5 : 88% des patientes vivent en milieu urbain et 12% en milieu rural.
- A6 : 33% des patientes présentent des antécédents familiaux dont 64% au premier degré et 56% au deuxième degré.

Groupe B :

- B1 : Il est retrouvé 88,2% de cancers primitifs localisés, 10% de cancers récidivants, 1,2% de cancers bilatéraux et 0,6% de cancers métastatiques d'emblée. Nous rappelons que ces 3 derniers ont été d'emblée isolés pour l'analyse ultérieure.
- B2 : 15,5% des tumeurs sont infracliniques au moment du diagnostic.
- B3 : Le dépistage clinique a permis le diagnostic dans 44% des cas (9% par un médecin et 35% par autopalpation) et la mammographie est à l'origine du diagnostic dans 56% des cas (31% par l'ODLC et 25% par dépistage individuel). Parmi les tumeurs infracliniques, 50% des diagnostics sont issus de l'ODLC et 44% de la mammographie individuelle.

Groupe C :

- C1 : 18% de mastectomies ont été réalisées.
- C2 : 9% de marges non *in sano* dont 30% pour le carcinome infiltrant et 70% pour le contingent *in situ* associé.
- C3 : En répartition de types histologiques, il y a 14% de CIS exclus de l'analyse. Sur les 74% de cancers infiltrants, sont retrouvés : 79% de CCI, 15% de CLI et 6% d'autres types avec dans l'ordre de fréquence, carcinomes tubuleux, colloïdes, mucineux, épidermoïde, et adénoïde kystique. 60% des carcinomes infiltrants sont associés à de l'*in situ*.
- C4 : La taille tumorale moyenne est de 15 mm avec des extrêmes allant de 1 à 75 mm. La répartition en termes de stade pTNM est la suivante : 80% de T1, 18% de T2, 1% de T3 et 1% de T4. Il y a 9% de multifocalité.
- C5 : Sont retrouvés 28% de grade SBR I, 46% de II et 26% de III.
- C6 : Il y a 35% d'envahissement ganglionnaire.
- C7 : 22% d'embolies sont retrouvées.
- C8 : 14% des tumeurs sont RH négatifs et 64% RH positifs pour RE et/ou RP.

La technique de dosage sur la période est uniquement immunohistochimique avec les mêmes anticorps utilisés dans toute la cohorte : anti-RE de DAKO et anti-RP de TEBU. La valeur-seuil utilisée est de 10% de cellules marquées avec précision des niveaux d'intensité du marquage (de + à +++).

Concernant le dosage, il a été effectué pour 49% sur pièce opératoire et 51% sur biopsie diagnostique.

- C9 : Le dosage de HER2 est positif dans 10% des cas et déterminé en IHC par l'anticorps anti erB-2 DA485 de DAKO.
- C10 : L'IP moyen est de 12% avec des extrêmes allant de 1 à 70. La prolifération est faible dans 65% des cas, modérée dans 18,5% et élevée dans 16,5% des cas. Les mêmes valeur-seuils qu'en 1994 sont appliquées. La détermination a été réalisée en IHC quasi-exclusivement par l'anticorps IMMUNOTECH issu du clone MIB-1 (97%) et dans 3% des cas par l'anticorps MIB-1 de DAKO.

Il est à noter que la technique était réalisée sur coupes incluses en paraffine, après pré-traitement par la chaleur et révélation par immunopéroxydase utilisant le complexe streptavidine-biotine-péroxydase. Les étapes d'application du réactif et de dilution étaient manuelles.

La moitié des dosages a été faite sur pièce opératoire et l'autre moitié sur biopsie. Les 4 anatomopathologistes exercent à des fréquences plus équivalentes avec 36% des déterminations par l'anatomopathologiste n°1, 26% par le n°2, 16% par le n°3 et 22% par le n°4.

Groupe D :

- D1 : 12% des patientes ont bénéficié d'un traitement néoadjuvant avec 5,5% de chimiothérapie et 6,5% d'hormonothérapie.

Les protocoles de chimiothérapie comprennent : TEC (6 cures de Taxotère^R / Docétaxel - Epirubicine - Cyclophosphamide) et TAC (4 cures de Taxotère - Adriblastine^R - Cyclophosphamide).

L'hormonothérapie néoadjuvante implique essentiellement les anti-aromatases pour des durées variables (de 15 à 120 jours).

- D2 : En situation adjuvante, 34,5% de chimiothérapie, 94% de radiothérapie et 60% d'hormonothérapie ont été prescrites, seules ou en association.

Les chimiothérapies utilisées par ordre de fréquence sont : les protocoles FEC (6 cures de 5FU - Epirubicine - Cyclophosphamide), TEC, TAC, CMF, FAC, plus moins associés à de l'Herceptine^R / Trastuzumab.

58% des hormonothérapies impliquent des anti-aromatases et 42% du Tamoxifène, pour une durée de 5 ans. Le Tamoxifène chez la femme non ménopausée est associé à un analogue de la LHRH.

- D3 : La durée moyenne du suivi est de 65 mois (de 6 à 144 mois, couvrant la période entre 2003 et 2015). Sur cette période sont survenus 1,5% de décès, 15,5% de rechutes dont 4% de récidives locales, 6% de récidives controlatérales, 17% d'évolution métastatique dont 62% multimétastatique. La moyenne de SSR est de 57 mois.

Populations III : 2012-2014

Cette période d'étude reprend 3 années successives, du 04/01/2012 au 18/12/2014 et inclut 296 patientes et 302 cancers. La sous-population après exclusion des cancers récidivants, bilatéraux, métastatiques et *in situ* purs comprend 212 patientes. L'analyse des groupes de critères sur le plan descriptif est réalisée dans le tableau IV-3.

Tableau IV-3 : Description de la population III pour les cancers primitifs localisés infiltrants (analyse 1)

Critères	POPULATION III
Effectifs (n)	212
Âge moyen +/- écart-type (ans)	60 +/- 12,6
Ménopause	142 (67%)
Traitement hormonal	29 (13,7%)
IMC moyen +/- écart-type (kg/m ²)	24,65 +/- 4,1 n = 210
Lieu d'habitation rural	24 (11,5%) n = 209
Antécédents familiaux	92 (43,4%)
Tumeur infra-clinique	50 (23,6%)
Dépistage clinique	94 (44,8%) n = 210
CCI	171 (80,7%)
Taille p T1	155 (73,1%)
Multifocalité	24 (11,3%)
Envahissement ganglionnaire	86 (41,3%) n = 208
Présence d'embolies	35 (16,5%)
Marges non in sano	9 (4,2%)
Grade SBR II	97 (46,6%) n = 208
Grade SBR III	48 (23,1%) n = 208
RH négatifs	19 (9%) n = 210
IP moyen +/- écart-type (%)	25,7 +/- 22,36 n = 210
Traitement néo-adjuvant	148 (69,8%)
Chirurgie conservatrice	167 (78,8%)
Traitement adjuvant : CT	83 (39,2%)
Traitement adjuvant : HT	185 (87,3%)
Décès	0 (0%)
Rechute	9 (4,2%)

n : effectif re-précisé pour chaque critère si différent de l'effectif global de la population
IMC : indice de masse corporelle ; *CCI* : carcinome canalaire infiltrant ; *p T1* : taille sur pièce opératoire < ou = à 20 mm ; *RH* : récepteurs hormonaux ; *IP* : index de prolifération ; *CT* : chimiothérapie ; *HT* : hormonothérapie ; *rechute* : comprend les récurrences loco-régionales et métastatiques

Groupe A :

- A1 : L'âge moyen est de 60 ans avec des extrêmes allant de 28 à 89 ans.
- A2 : 67% des patientes sont ménopausées avec 15% de ménopauses traitées sur des durées moyennes de 104 mois (environ 4 ans).

- A3 : 14% de traitements hormonaux sont retrouvés au moment du diagnostic avec 9% de COP et 5% de THM. 27% des femmes non ménopausées ont une contraception hormonale.
- A4 : IMC moyen de 24,65 kg/m² avec des extrêmes allant de 14,6 à 38,5.
- A5 : 11,5% de ces patientes vivent en milieu rural.
- A6 : 43% présentent un antécédent familial de cancer du sein avec 65% au premier degré et 35% au second degré.

Groupe B :

- B1 : Sont dénombrés 78% de cancers primitifs. Ont donc été isolés 15% de cancers récidivants, 4% de cancers bilatéraux et 3% de cancers métastatiques d'emblée.
- B2 : 24% des tumeurs sont infracliniques.
- B3 : 45% des cancers sont diagnostiqués cliniquement (8% par un médecin et 27% par la patiente) et 55% radiologiquement avec 27% par l'ODLC et 28% par dépistage individuel.

Groupe C :

- C1 : On retrouve 79% de traitement chirurgical conservateur.
- C2 : Les marges ne sont pas en zone saine dans 4% des cas (uniquement pour du CIS).
- C3 : Sur le plan histologique, 7% de CIS ont été exclus d'emblée et sur les 71% de cancers infiltrants, nous retrouvons : 81% de CCI, 16% de CLI et 3% d'autres types avec des carcinomes colloïdes muqueux, tubuleux, mucineux, apocrines, épidermoïdes. 59% des carcinomes infiltrants sont associés à un contingent *in situ*.
- C4 : La taille tumorale moyenne est de 17,6 mm avec des extrêmes allant de 3 à 150 mm. Selon la classification pTNM, on retrouve 74,5% de T1, 21% de T2, 2,7% de T3 et 1,8% de T4. Le taux de multifocalité est de 11,5%.
- C5 : Il y a 30% de grades SBR I, 47% de II et 23% de III.
- C6 : Le taux d'envahissement ganglionnaire est de 41%.
- C7 : Le taux d'embolies retrouvées est de 16,5%.
- C8 : Il est retrouvé 9% de RH négatifs et 67% de RH positifs pour RE et/ou RP.

La quasi-totalité des résultats sont déterminés par les anticorps fournis par NOVOCASTRA avec les clones 6F11 anti-RE et PgR312 anti-RP. La valeur-seuil de 10% de cellules marquées est appliquée et les résultats sont rendus en pourcentage de cellules marquées et en niveaux d'intensité côté de + à +++.

32% des dosages sont réalisés sur pièce opératoire et 68% sur biopsie.

- C9 : Le statut HER2 est positif (score à 3+) dans 6% des cas.

Il est déterminé par le clone CB11 de NOVOCASTRA. En plus de l'anticorps utilisé, le compte-rendu précise sa dilution et les résultats sont rendus en termes de marquage membranaire faible, modéré ou élevé, partiel ou total, sous forme de +, ++ ou +++.

Les dosages d'uPA et de PAI-1, lorsqu'ils ont été réalisés, sont pathologiques dans 41% des cas.

- C10 : L'IP moyen est de 25,7% avec des extrêmes allant de 1 à 100 ; la prolifération est considérée faible dans 31%, modérée dans 28% et élevée dans 41% des cas. Les valeur-seuils et l'expression des résultats sont identiques aux 2 précédentes périodes. Dans 98% des cas, l'anticorps utilisé est le clone MM-1 de

souris de NOVOCASTRA, avec 50% de détermination sur pièce opératoire et 50% sur biopsie.

Sur le plan anatomopathologique, nous notons 3 modifications importantes par rapport à la période d'étude précédente :

- 1 Un nouveau fixateur a été introduit. Ses avantages sont la rapidité de fixation et la rigidité obtenue des pièces qui facilitent les coupes. Il s'agit du MAAF (méthanol, acide acétique, formol), utilisé dans le laboratoire depuis 2008. Après la fixation formolée, la pièce est classiquement incluse en paraffine.
- 2 Des automates ont été acquis pour l'application des réactifs et de l'anticorps. En revanche, la dilution des anticorps et la lecture des résultats restent manuelle.
- 3 Une double lecture en aveugle des biopsies a été introduite depuis environ 10 ans et sa réalisation est consignée dans le compte-rendu anatomopathologique. Il est à noter qu'une double lecture a été réalisée pour 51% des biopsies.

L'anatomopathologiste n°1 étant parti à la retraite, les 3 autres anatomopathologistes se partagent les lectures avec 14% des lectures pour l'anatomopathologiste n°2, 36% pour le n°3 et 37% pour le n°4.

Groupe D :

- D1 : Dans 70% des cas une thérapie néoadjuvante a été mise en place avec 5% de chimiothérapie et 65% d'hormonothérapie.

L'hormonothérapie néoadjuvante est utilisée en test thérapeutique sur des courtes périodes avec 65% de Tamoxifène et 35% d'anti-aromatases sur des durées de 16 jours en moyenne (entre 4 et 60 jours). En comparant ainsi de façon systématique l'IP obtenu sur biopsie et l'IP redéterminé sur pièce opératoire dans les suites du traitement, les cliniciens ont constaté dans la plupart des cas une chute de son taux.

- D2 : Dans le cadre adjuvant, on compte 39% de chimiothérapie, 94% de radiothérapie et 87% d'hormonothérapie, seules en association.

Les protocoles de chimiothérapie utilisés en situation néo-adjuvante ou adjuvante comprennent : le protocole 3 FEC 3 Taxotère^R, TC (4 cures de Taxotère^R – Cyclophosphamide), FEC, TAC, AC (4 cures d'Adriblastine^R - Cyclophosphamide), FAC et CMF, avec adjonction au cas par cas d'Herceptine^R selon le statut HER2.

Le Tamoxifène est utilisé pour 72% des hormonothérapies et les anti-aromatases dans 28% d'entre elles.

- D3 : Sur la période de suivi entre 2012 et 2015, nous n'avons pas retrouvé de décès mais 4% de rechutes avec 2 récurrences homolatérales, une récurrence controlatérale et 3% de cancers métastatiques dont la moitié sur des sites multiples.

2. Résultats des analyses statistiques

Analyse 1

Les résultats significatifs de la comparaison des 3 groupes sont résumés dans le tableau VI. Pour mémoire, le tableau V disponible en annexe est un récapitulatif complet des résultats significatifs et non significatifs de cette analyse.

On rappelle que nous n'avons analysé que la population des cancers infiltrants primitifs et localisés pour la comparaison des critères d'étude et l'IP. Les taux de cancers récidivants, bilatéraux, métastatiques et *in situ* ne seront comparés que dans le but de mettre en évidence ou non une variation du recrutement de notre chirurgien avec le temps.

Comparabilité des 3 groupes :

Les résultats significatifs entre 1994 et 2003 sont les suivants :

- Un taux supérieur de CCI dans la population II (79% *versus* 68%),
- Un taux de décès plus important est observé en 1994 (7,5% *versus* 3,4%).

Entre 2003 et 2012, on retrouve comme résultats statistiquement significatifs :

- Plus de cancers bilatéraux (3,7% *versus* 1,2%), plus de cancers métastatiques (3% *versus* 0,6%) et moins de CIS (6,7% *versus* 14%),
- Il y a plus de tumeurs infracliniques détectées dans la population III (23,6% *versus* 15,5%).

Enfin, entre 1994 et 2012, les résultats statistiquement significatifs sont :

- Dans la population III, on note le double de cancers récidivants (15% *versus* 7,5%) et plus de métastases inaugurales (3% *versus* 2%),
- L'âge des patientes au diagnostic est plus élevé dans la population III (60 ans *versus* 57 ans),
- La fréquence des traitements hormonaux au moment du diagnostic est moindre dans la population III (14% *versus* 26%),
- Mais on retrouve plus d'antécédents familiaux de cancer du sein chez le cas étudié (43% *versus* 25,7%),
- On détecte plus de tumeurs infracliniques en 2012 (24 *versus* 13%),
- Et plus de CCI (81 *versus* 68%).
- Sur le plan thérapeutique, on note moins de chirurgie conservatrice en 2012 (79% *versus* 90%) mais pour un taux de marges saines plus important (96 *versus* 89%).
- Enfin, on retrouve un taux supérieur de chimiothérapie dans la population III (39% *versus* 27%).

La comparabilité des groupes est donc satisfaisante entre 1994 et 2003 et entre 2003 et 2012 ; en revanche, plusieurs différences significatives dans les caractéristiques existent entre les groupes I et III.

Tableau VI : Comparaison des critères cliniques, histologiques et thérapeutiques des 3 populations (analyse 1) sur un effectif total de n = 646

Critères	POPULATION I	POPULATION II	POPULATION III	p-value : I vs II	p-value : II vs III	p-value : I vs III
Effectifs (n)	214	220	212	0,7683	0,9528	0,6797
Âge moyen +/- écart-type (ans)	57 +/- 12	59 +/- 11	60 +/- 12,6	0,0992	0,3861	0,0205
Traitement hormonal	56 (26,2%)	75 (34,1%)	29 (13,7%)	0,1905	6,0974	0,0015 OR 0,448 [0,2621 ; 0,7532]
Antécédents familiaux	55 (25,7%)	73 (33,2%)	92 (43,4%)	0,0977	0,0739	0,0001 OR 2,2549 [1,4711 ; 3,4785]
Tumeur infra-clinique	28 (13,1%) n = 213	34 (15,5%)	50 (23,6%)	0,4928	0,0386 OR 0,593 [0,3531 ; 0,9866]	0,0058 OR 0,4912 [0,2835 ; 0,8375]
CCI	145 (67,8%)	173 (78,6%)	171 (80,7%)	0,0192 OR 0,554 [0,3169 ; 0,9295]	0,3308	0,0276 OR 0,5774 [0,3421 ; 0,9657]
Marges non <i>in sano</i>	24 (11,2%)	20 (9,1%)	9 (4,2%)	0,5561	0,0541	0,0102 OR 0,3518 [0,1402 ; 0,8083]
IP moyen +/- écart-type (%)	14,53 +/- 9,93 n = 200	11,95 +/- 11 n = 205	25,7 +/- 22,36 n = 210	0,0001	0,0001	0,0001
Prolifération faible	96 (48%) n = 200	133 (64,9%) n = 205	65 (31%) n = 210	0,0006 OR 0,5006 [0,3286 ; 0,7593]	4,0885	0,0005 OR 2,0555 [1,3491 ; 3,1461]
Prolifération modérée	57 (28,5%) n = 200	38 (18,5%) n = 205	58 (27,9%) n = 210	0,0192 OR 1,7493 [1,0709 ; 2,8814]	0,0358 OR 0,5971 [0,3636 ; 0,972]	0,0002 OR 0,457 [0,2959 ; 0,7014]
Prolifération élevée	47 (23,5%) n = 200	34 (16,6%) n = 205	87 (41,1%) n = 210	0,0839	2,5925	0,0001 OR 0,4352 [0,2764 ; 0,6795]
Chirurgie conservatrice	194 (90,7%)	180 (81,8%)	167 (78,8%)	0,0653	0,4791	0,0007 OR 2,608 [1,4421 ; 4,8698]
Traitement adjuvant : CT	57 (26,6%)	76 (34,5%)	83 (39,2%)	0,0776	0,3692	0,0072 OR 0,565 [0,3664 ; 0,8672]
Décès	18 (7,5%)	3 (1,4%)	0 (0%)	0,005 OR 0,1511 [0,0281 ; 0,529]	0,088	5,2646

n : effectif reprécisé pour chaque critère si différent de l'effectif global de la population ; vs : versus

CCI : carcinome canalaire infiltrant ; IP : index de prolifération ; CT : chimiothérapie ;

Seuil de significativité pour une p-value < 0,05 ; résultats significatifs en gras ; OR : odds-ratio

Pour les valeurs qualitatives, la p-value, si elle est significative est suivie de l'OR et de son intervalle de confiance à 95%.

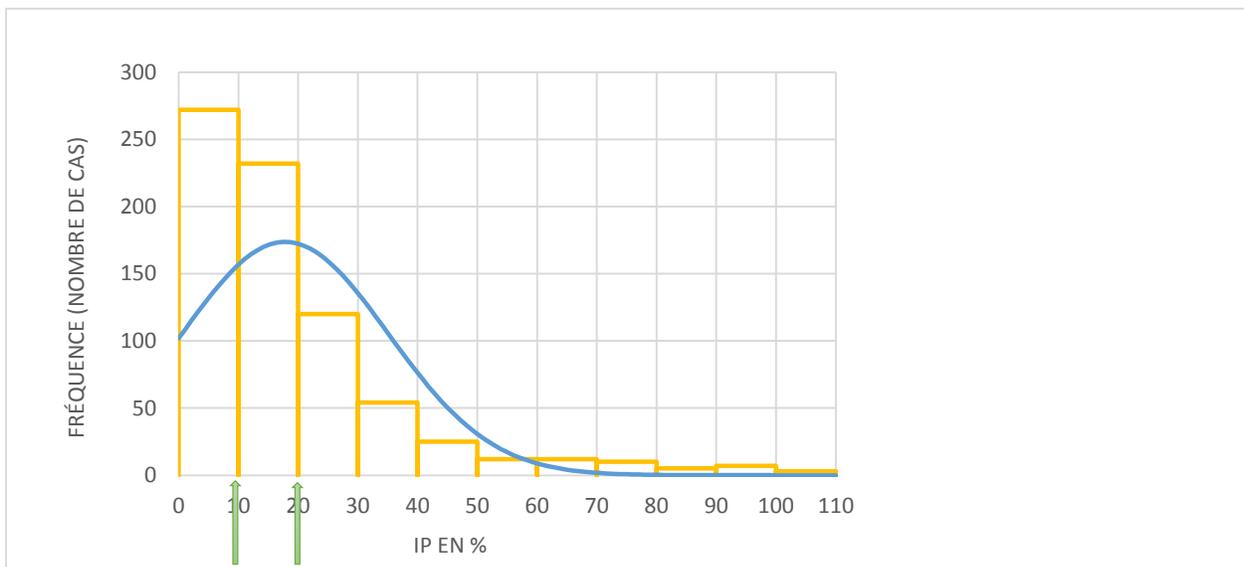
L'index de prolifération :

Dans la population globale comprenant les 890 cancers de tous stades évolutifs, l'IP a été déterminé dans 752 cas. Dans les 138 autres cas, la détermination du Ki-67 n'a pas été possible du fait d'un matériel tumoral insuffisant pour la réalisation de techniques d'IHC (tumeurs millimétriques, microinvasives), ou jugée inutile (non systématique pour les CIS).

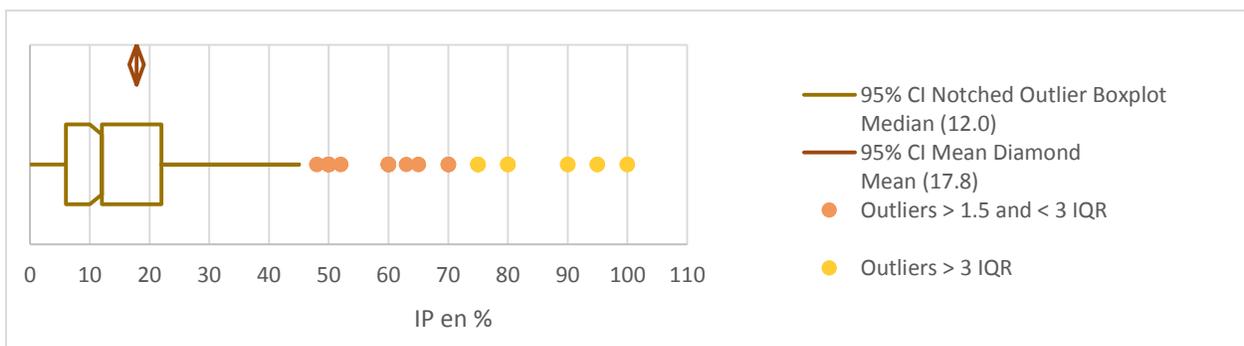
Sur ces 752 cas, 358 (47,6%) résultats sont compris entre 0 et 10% et 187 (24,9%) entre 11 et 20%. Ainsi, selon les valeur-seuils du laboratoire seulement 27,5% des cancers analysés ont une prolifération élevée. Ceci est illustré par la [figure 2](#).

Nous n'avons conservé qu'une seule valeur d'IP par cancer. Ainsi, en cas de tumeur multifocale, nous n'avons pris en compte que l'IP de la tumeur principale sur sa taille. En cas de résultats disponibles sur biopsie et sur pièce, nous avons conservé le résultat sur pièce opératoire, indépendamment des traitements néoadjuvants éventuellement reçus.

Figure 2 A et B : Distribution de l'index de prolifération dans notre population générale



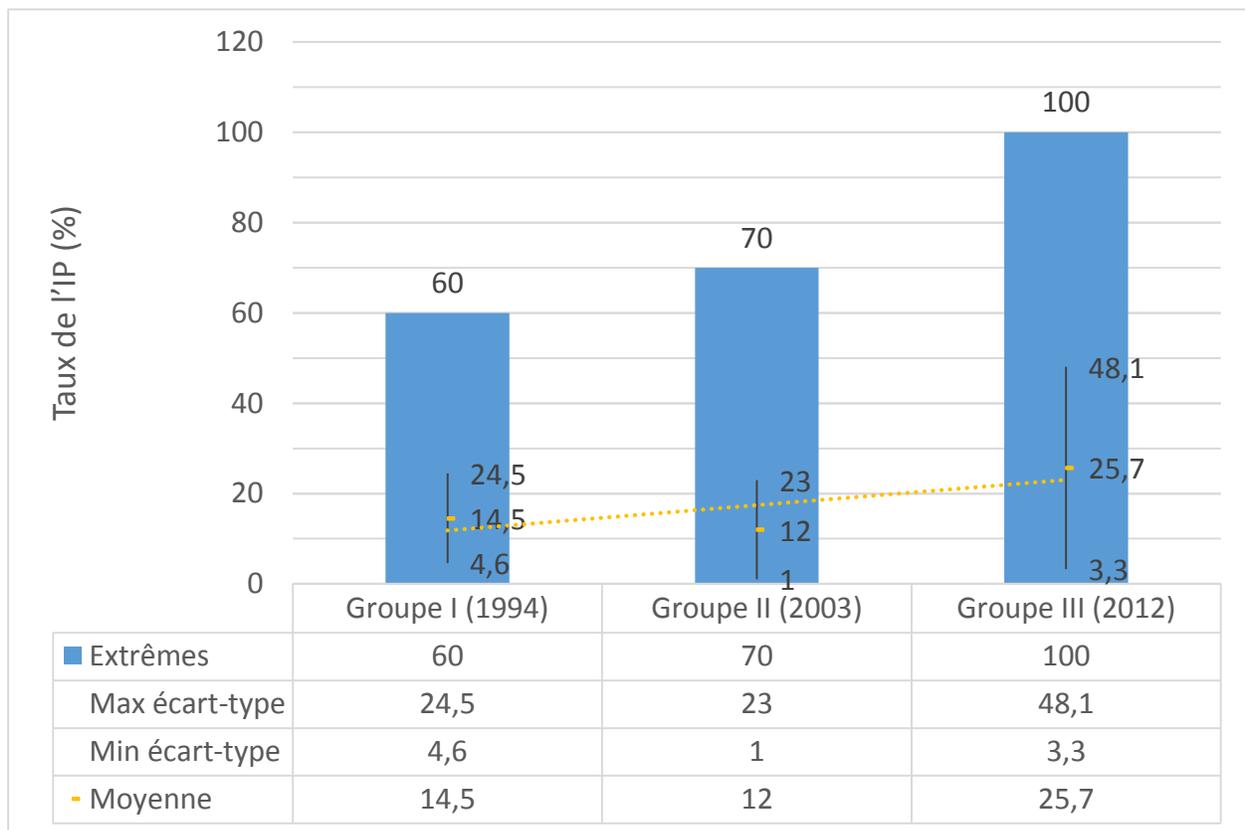
A – Histogramme : En bleu, courbe de distribution avec moyenne de 17,8, écart-type +/- 17,3. En vert, flèches correspondant aux seuils appliqués par le laboratoire d'analyse : < ou = à 10 % pour une prolifération faible et > à 20% pour une prolifération élevée.



B - Box-plot : En marron, intervalle à 95%, médiane de 12%. Diamant : moyenne de l'intervalle à 95% (17,8%). Points : valeurs extrêmes, en orange entre 1,5 et 3 EI (écart interquartile) et en jaune > à 3 EI.

A présent, dans la population des cancers infiltrants primitifs et localisés, la figure 3 étudie l'IP selon son taux en pourcentage dans les 3 groupes et la figure 4 la répartition selon l'interprétation de la prolifération (faible, modérée et sévère) dans chaque groupe.

Figure 3 : Variation des valeurs de l'index de prolifération selon les groupes



IP : index de prolifération

Pour chaque groupe, le volume bleu illustre la zone comprise entre les valeurs minimale et maximale retrouvées, le trait noir illustre l'écart-type par rapport à la moyenne (fourchette de valeurs où se situent environ 80% des résultats), le point jaune illustre la moyenne des valeurs. La courbe en pointillé jaune montre la tendance de la moyenne entre les groupes.

Ainsi, on retrouve de façon statistiquement significative :

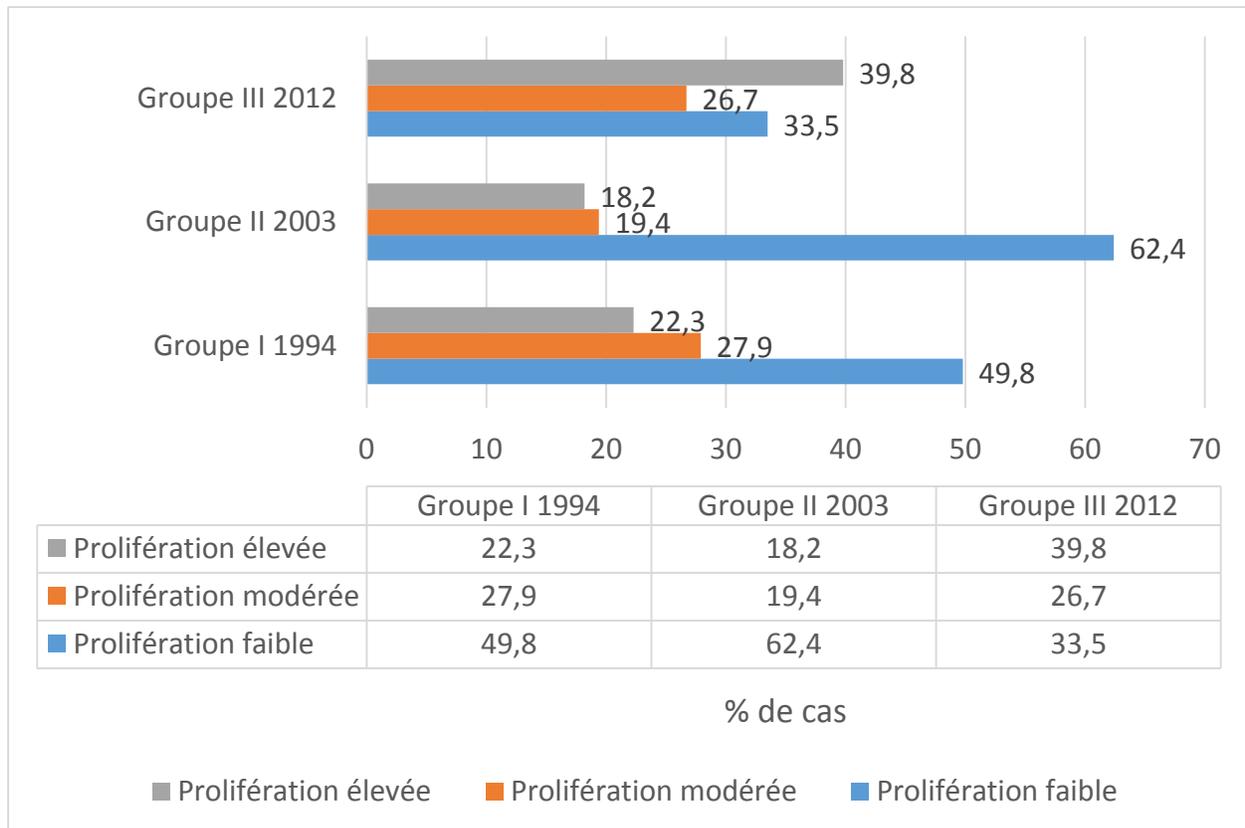
- Entre 1994 et 2003 :
L'IP moyen est plus important dans la population I (14,5 *versus* 12%) avec un taux de prolifération faible plus important dans la population II (65% *versus* 48%) et de prolifération modérée plus important dans la population I (28,5 *versus* 18,5%).
- Entre 2003 et 2012 :
L'IP moyen est plus important en 2012 avec une moyenne de 25,7 *versus* 12%. Le taux de prolifération modérée est plus important dans le groupe III (28 *versus* 18,5%).

- Entre 1994 et 2012 :

L'IP est beaucoup plus élevé en 2012 (25,7 *versus* 14,5% en moyenne) avec une proportion de prolifération faible plus importante en 1994 (48 *versus* 31%) et un taux de prolifération élevé plus conséquent en 2012 (41 *versus* 23,5%).

Ainsi, de façon statistiquement significative, on retrouve une évolution de l'IP lors de la comparaison des populations avec une tendance à la diminution des taux moyens entre 1994 et 2003 et une inflation des taux en 2012.

Figure 4 : Répartition des types de prolifération par groupe



Selon les valeur-seuils appliquées par le laboratoire :

- *Prolifération faible* : IP < ou = à 10%
- *Prolifération modérée* : IP entre 11 et 20%
- *Prolifération élevée* : IP > à 20%

Analyse 2

Nous n'avons pas observé de différences statistiquement significatives dans les caractéristiques histopronostiques tumorales usuelles entre les 3 populations en dehors d'une augmentation du taux de CCI entre 1994 et 2012.

Afin de vérifier si les taux plus élevés de prolifération peuvent être liés à des cancers plus agressifs, nous avons sélectionné les cas de prolifération élevée sur la population globale (IP strictement supérieur à 20%) et nous les avons comparés aux cas de prolifération faible ou modérée en termes de taux de facteurs de mauvais pronostic : l'âge inférieur à 40 ans, la taille tumorale avec les stades p T3 et T4, l'envahissement ganglionnaire, le grade SBR III, la négativité des RH, la présence d'emboles, le taux de

CCI et de CLI. Nous avons aussi repris nos critères de comparaison initiaux avec le milieu d'habitation rural, les antécédents familiaux de cancer du sein, les tumeurs infracliniques, le taux de mastectomie, les traitements néoadjuvants puis les taux de décès et de rechutes. Enfin, nous avons étudié le type de dosage sur pièce ou biopsie et l'allocation des résultats par anatomopathologiste.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau VII.

De façon statistiquement significative, on retrouve :

- Des taux d'envahissement ganglionnaire plus important dans le groupe IP élevé (43,5% *versus* 32,3%),
- Un taux de mastectomies plus élevé (27% *versus* 18%),
- Un taux de décès multiplié par 3 (7% *versus* 2,2%) et
- Un taux de rechute métastatique multiplié par 2 (16,4% *versus* 8%).
- On note de plus une plus faible contribution des anatomopathologistes 1 et 2 dans le groupe IP élevé (respectivement 23,7 *versus* 35% et 15,5% *versus* 24,8%).

Ainsi, les tumeurs à prolifération élevée sont liées à des taux d'envahissement ganglionnaire, de décès et de métastases plus importants, soulignant la valeur pronostique de l'IP et pouvant ainsi aller dans le sens de l'hypothèse de tumeurs plus agressives.

De plus, allant dans le sens de cette hypothèse, nous avons observé de plus près la sous-population des cancers isolés en début d'analyse, à savoir les cancers récidivants, bilatéraux, d'emblée métastatique et les CIS.

A titre indicatif, on peut noter que sur les 80 IP dosés parmi les 99 cancers récidivants, le taux moyen de prolifération était de 17,6%, sur les 32 index des 38 cancers bilatéraux (donc sur 19 patientes), le taux moyen était de 19,2% ; et l'on peut voir que sur les 12 index disponibles sur les 13 cancers métastatiques, le taux moyen du Ki-67 est de 38,2%. Parmi les 89 CIS, seulement 8 déterminations de l'IP sont retrouvées et leurs taux allaient de 5 à 50%.

Nous n'avons pas réalisé d'analyse statistique sur ces constatations, les effectifs étant trop faibles par rapport à la population des cancers infiltrants primitifs localisés.

Tableau VII : Comparaison des catégories index de prolifération élevé *versus* index de prolifération faible ou modéré

Critères	IP élevé	IP faible et modéré	p-value
Effectif (n)	207	545	752
Âge < 40 ans	21 (10,1%)	10 (1,8%)	2,1691
Taille p T3 et T4	13 (6,3%)	18 (3,3%)	0,0976
Envahissement ganglionnaire	90 (43,5%)	177 (32,3%)	0,0002 OR 1,8586 [1,3231 ; 2,6083]
CCI	180 (88,2%) n = 204	382 (70,9%) n = 539	3,0988
CLI	17 (8,3%) n = 204	125 (23,2%) n = 539	1,8938
SBR III	118 (57%)	68 (12,3%)	6,1624
RH négatifs	57 (27,5%)	46 (8,4%)	1,5104
Emboles	66 (31,9%)	87 (16%)	2,6791
Milieu rural	26 (12,8%) n = 203	68 (12,3%) n = 536	1
Antécédents familiaux	74 (35,7%)	176 (32,3%)	0,3866
Tumeur infra-clinique	33 (15,9%)	97 (17,9%)	0,5901
Dosage de l'IP sur pièce	137 (66,2%)	345 (63,4%) n = 544	0,4967
Anatomopathologiste N°1	49 (23,7%)	191 (35%)	0,0028 OR 0,5752 [0,39 ; 0,8385]
Anatomopathologiste N°2	32 (15,5%)	135 (24,8%)	0,0059 OR 0,5557 [0,3514 ; 0,8697]
Anatomopathologiste N°3	55 (26,6%)	76 (13,9%)	9,299
Anatomopathologiste N°4	53 (25,6%)	117 (21,5%)	0,2418
Mastectomie	56 (27,1%)	102 (18,7%)	0,0159 OR 1,6096 [1,0839 ; 2,3765]
CT néoadjuvante	45 (21,7%)	47 (8,6%)	2,9076
HT néoadjuvante	61 (29,4%)	138 (25,3%)	0,267
CT adjuvante	131 (63,3%)	130 (23,9%)	2,1092
HT adjuvante	142 (68,6%)	389 (71,4%)	0,4739
Décès	14 (6,8%)	12 (2,2%)	0,0057 OR 3,2158 [1,354 ; 7,7586]
Récidive loco-régionale	19 (9,2%)	59 (10,8%)	0,5927
Métastases	34 (16,4%)	44 (8,1%)	0,0012 OR 2,2351 [1,3385 ; 3,7083]

n : effectif reprécisé pour chaque critère si différent de l'effectif global de la population
IP : index de prolifération ; *CCI* : carcinome canalaire infiltrant ; *CLI* : carcinome lobulaire infiltrant ; *RH* : récepteurs hormonaux ; *CT* : chimiothérapie ; *HT* : hormonothérapie
 Seuil de significativité pour une p-value < 0,05 ; résultats significatifs en gras ; *OR* : odds-ratio
 Pour les valeurs qualitatives, la p-value, si elle est significative, est suivie de l'OR et de son intervalle de confiance à 95%.

Analyse 3

Pour terminer, afin de répondre aux hypothèses avancées, nous avons voulu étudier l'IP en fonction d'autres facteurs que sont le lieu d'habitation pour l'influence des polluants agricoles, l'IMC, l'influence des traitements médicaux hormonaux, le type d'anticorps, le dosage sur pièce ou sur biopsie, l'anatomopathologiste pour la technique de lecture. Nous avons aussi étudié l'IP en fonction de l'âge et de l'histologie puisque des différences significatives étaient retrouvées dans les populations comparées ci-dessus.

La population étudiée est la population globale.

Les résultats sont présentés dans les tableaux VIII 1 à 9.

Le tableau VIII-1 analyse l'IP dans les 2 populations constituées de 645 femmes vivant en milieu urbain et de 94 femmes vivant en milieu rural.

Il n'est pas retrouvé de différence significative entre les taux d'IP des 2 groupes.

Tableau VIII-1 : Index de prolifération en fonction du lieu de résidence

HABITAT	URBAIN	RURAL	p-value
Effectif (n)	645	94	739
IP moyen +/- écart-type (%)	17,7 +/- 16,9	18,6 +/- 19,2	0,4751

Le tableau VIII-2 compare l'IP d'une population de 359 patientes de poids normal (dont l'IMC est supérieur ou égal à 18,5 et inférieur à 25 kg/m²) à 3 autres populations : une catégorie de femmes dites en sous-poids (dont l'IMC est inférieur à 18,5 kg/m² et contenant 33 femmes), une catégorie de femmes en surpoids (dont l'IMC est supérieur ou égal à 25 et strictement inférieur à 30 kg/m² avec un effectif de 182 patientes) et enfin une catégorie de patientes obèses (dont l'IMC est supérieur ou égal à 30 kg/m², comprenant 76 femmes).

Aucune différence statistiquement significative n'est mise en évidence entre ces catégories.

Tableau VIII-2 : Index de prolifération en fonction de l'indice de masse corporelle

IMC	SOUS POIDS	POIDS NORMAL	SURPOIDS	OBESITE
Effectif (n) / 650	33	359	182	76
IP moyen +/- écart-type (%)	19,8 +/- 16,5	18,22 +/- 18,5	18,75 +/- 17	19,05 +/- 16,9
p- value par rapport au poids normal	0,5536	NA	0,214	0,0889

Le tableau VIII-3 présente une comparaison de l'IP dans 3 populations : une population de 577 patientes ne présentant pas de traitement hormonal en cours au moment du diagnostic de cancer du sein, une population de 59 femmes bénéficiant d'une COP et une population de 109 patientes chez qui il a été prescrit un THM. Nous comparons ainsi l'absence de traitement à une contraception hormonale ou à un THM et la contraception au THM.

On retrouve ici de façon significative, une moyenne du taux de l'IP plus faible lorsque les patientes sont traitées par THM par rapport à une contraception hormonale ou une absence de traitement.

Tableau VIII-3 : Index de prolifération en fonction des traitements hormonaux en cours

TRAITEMENTS HORMONAUX	ABSENCE DE TRAITEMENT	COP	THS	p-value COP vs THS
Effectif (n) / 745	577	59	109	168
IP moyen +/- écart-type (%)	18,3 +/- 17,3	20,85 +/- 21,4	13,9 +/- 14,1	0,0263
p-value vs absence de traitement	NA	0,7601	0,001	

Nous avons ensuite comparé dans le tableau VIII-4, le taux de l'IP en fonction de l'anticorps utilisé, parmi les 3 retrouvés sur la période d'étude. Notons que chaque anticorps correspond globalement à une période à quelques exceptions près. Nous les avons donc réanalysés pour pallier ce biais. Les anticorps comparés sont les clones MIB-1 de DAKO (groupe I), MIB-1 d'IMMUNOTECH (groupe II) et MM-1 de NOVOCASTRA (groupe III).

Il existe une différence significative lorsque l'on compare la population de chaque anticorps avec un IP moyen plus élevé de 25% avec le clone de NOVOCASTRA, un IP moyen de 14% avec le clone de DAKO et un IP plus faible (12,6%) avec le clone d'IMMUNOTECH. Ceci correspond ainsi aux différences significatives observées lors de notre comparaison par périodes.

Tableau VIII-4 : Index de prolifération en fonction du clone d'anticorps utilisé

ANTICORPS	MIB1 DAKO	MIB IMMUNOTECH	MM1 NOVOCASTRA
Effectif (n) / 747	237	235	275
IP moyen +/- écart-type (%)	14,2 +/- 10	12,6 +/- 11,25	25,3 +/- 22,9
p-value vs Ac DAKO	NA		
p-value vs Ac IMMUNOTECH	0,0003	NA	
p-value vs Ac NOVOCASTRA	0,0001	0,0001	NA

Nous avons de plus voulu savoir si le site de dosage pouvait être un facteur influençant le taux de l'IP : ainsi, le tableau VIII-5 présente les résultats de la comparaison de l'IP en fonction de son dosage, sur pièce opératoire et sur biopsie.

Nous n'avons pas relevé de différence significative.

Tableau VIII-5 : Index de prolifération en fonction du site de dosage

DOSAGE	SUR PIECE	SUR BIOPSIE	p-value
Effectif (n)	482	269	751
IP moyen+/- écart-type (%)	17,8 +/- 17	17,9 +/- 17,8	0,7258

Le tableau VIII-6 analyse l'IP dans 4 sous-groupes selon le pathologiste ayant déterminé son taux sur la période d'étude, avec 240 patientes dans le groupe anatomopathologiste n°1, 167 dans le groupe n°2, 130 dans le groupe n°3 et 170 dans le groupe n°4.

Les résultats sont en faveur de taux d'IP plus élevé chez l'anatomopathologiste n°3 par rapport à tous ses confrères (IP moyen de 23%). Il existe aussi une variation significative avec un IP moyen plus important chez l'anatomopathologiste n°4 par rapport à son confrère n°1 (moyenne de 19,7 *versus* 12,9%).

Tableau VIII-6 : Index de prolifération en fonction de l'observateur

ANATOMOPATHOLOGISTE	N°1	N°2	N°3	N°4
Effectif (n) / 707	240	167	130	170
IP moyen+/- écart-type (%)	12,9 +/- 9	15,9 +/- 15,7	23,1 +/- 20,4	19,7 +/- 19,3
p-value vs N°1	NA			
p-value vs N°2	0,3202	NA		
p-value vs N°3	0,0001	0,0001	NA	
p-value vs N°4	0,0031	0,0697	0,0291	NA

La question du biais de confusion se pose donc entre les différences observées entre les 4 pathologistes et celles retrouvées selon l'anticorps utilisé. En effet, ces praticiens se sont succédés dans le temps et ont donc utilisé des anticorps différents.

Ainsi, le tableau VIII-7 récapitule à titre indicatif sans test statistique conduit, la répartition des anticorps utilisés par observateur, illustrant ainsi le rôle possible de ce biais dans les résultats obtenus.

Tableau VIII-7 : Anticorps utilisés par chaque observateur

OBSERVATEUR	N°1	N°2	N°3	N°4
n = effectif	241	168	127	169
DAKO MIB1	163 (68%) IP m 13,7%	59 (35%) IP m 14,8%	9 (7%) IP m 23%	4 (2,7%) IP m 7,3%
IMMUNOTECH MIB1	78 (32%) IP m 10,6%	63 (37,5%) IP m 11,7%	38 (30%) IP m 17,6%	53 (31,3%) IP m 13,2%
NOVOCASTRA MM1	0	46 (27,5%) IP 23,9%	80 (63%) IP m 25,1%	112 (66%) IP m 23,2%

Pour finir, le tableau VIII-8 analyse l'IP dans différents groupes d'âge en comparant la classe d'âge 50-74 ans (fourchette du dépistage systématique), les femmes jeunes (entre 40 et 49 ans), les patientes très jeunes (avant 40 ans) et les femmes plus âgées (de 75 ans ou plus).

On retrouve une différence significative avec un taux moyen d'IP plus élevé dans la classe des moins de 40 ans par rapport à toutes les autres classes d'âge (30% *versus* 17 ou 18% dans les autres classes).

Tableau VIII-8 : Index de prolifération en fonction des classes d'âge

AGE	1 : < 40 ans	2 : 40-49 ans	3 : 50-74 ans	4 : > ou = 75 ans
Effectif (n) / 752	30	154	483	85
IP moyen+/- écart-type (%)	30,37 +/- 21,56	18,32 +/- 18,1	17,01 +/- 16,5	17,13 +/- 16,9
p-value vs 1	NA			
p-value vs 2	0,0002	NA		
p-value vs 3	0,0001	0,6076	NA	
p-value vs 4	0,0001	0,625	0,9133	NA

Enfin, le tableau VIII-9 compare le groupe des CCI au groupe des CLI en fonction de l'IP.

Le taux moyen de l'IP est statistiquement plus bas dans les CLI que dans les CCI (12,2% *versus* 19,6%).

Tableau VIII-9 : Index de prolifération en fonction du type histologique

HISTOLOGIE	CCI	CLI	p-value
Effectif (n)	562	142	704
IP moyen+/- écart-type (%)	19,63 +/- 18,42	12,19 +/- 10,9	0,0001

NA : non applicable

vs : versus

IP : index de prolifération ; IPm : index de prolifération moyen ; IMC : indice de masse corporelle ;

COP : contraception œstro-progestative ; THS : traitement hormonal substitutif de la ménopause ;

Ac : anticorps ; CCI : carcinome canalaire infiltrant ; CLI : carcinome lobulaire infiltrant

Seuil de significativité pour une p-value < 0,05 ; résultats significatifs en gras

DISCUSSION

Nous discuterons ici les biais et les limites de notre étude avant de reprendre les principaux résultats significatifs. Puis, nous étudierons les 2 prérequis qui font actuellement défaut à l'IP déterminé par IHC pour qu'il fasse partie des recommandations : la définition de valeur-seuil et la validité analytique du test. Enfin, nous proposerons des perspectives en ce sens.

Nous rappelons que, par abus de langage dans la pratique quotidienne mais aussi dans la littérature internationale, cet IP déterminé par IHC est communément mentionné sous le terme de Ki-67, indépendamment de l'anticorps réellement utilisé.

1. Biais et limites de l'étude

Notre étude contient en effet plusieurs biais, dont le principal est son caractère rétrospectif, avec un recueil de données sur des dossiers manuscrits parfois déjà archivés ; ainsi nous déplorons un certain nombre de données manquantes. Bien que les dossiers non analysables du fait de données indispensables manquantes aient été exclus, la plupart des observations de la période de 1994-1996 sont incomplètes (suivant l'évolution de la rigueur de l'observation clinique du praticien), mais tout de même incluses pour atteindre des effectifs de population équivalents. Ainsi, par exemple, 44% des données concernant l'IMC sont manquantes dans cette population.

De plus, le recrutement de notre population est unicentrique et discontinu sur une période d'étude continue, ce qui pose la question de la représentativité de notre échantillon. Cependant, la plupart de nos résultats descriptifs dans notre population concordent avec ce qui est retrouvé dans la littérature française.

Par exemple, si nous comparons les chiffres avancés par Penault-Llorca [33] dans une étude multicentrique de 2007 ou par Héry [4] dans une étude épidémiologique de 2002 à notre population de 2003, on retrouve respectivement dans la littérature et dans notre étude : un âge moyen au diagnostic de 60 et 59 ans, un envahissement ganglionnaire dans 35 et 34% des cas, 85% et 85,4% de tumeurs RH positifs, 41 et 46% de grade SBR II, 12% et 10% de tumeurs HER2 positif, 70-80% et 78% de CCI.

Enfin, concernant l'effectif de notre échantillon : si nous comparons les 2 moyennes du taux de l'IP des populations I et III (14 et 25%), en appliquant un écart-type *delta* de 25 et un risque de première espèce *alpha* de 0,05, la mise en évidence d'une relation statistiquement significative nécessiterait au minimum une population de 220 patientes avec 110 patientes par groupe.

Ainsi, nos effectifs sont satisfaisants pour les comparaisons entre les populations I et III et II et III, mais pas pour la comparaison des populations I et II, où l'écart entre les 2 moyennes est faible (2%) et nécessiterait 6000 sujets pour être pertinent. Globalement, nous pouvons tout de même considérer que la puissance de notre étude est suffisante pour atteindre notre objectif principal.

2. Discussion des résultats de l'étude

Nous avons donc objectivé une variation statistiquement significative du taux de l'IP dans le cancer du sein, avec une augmentation constatée entre 1994 et 2012 et entre 2003 et 2012. Selon les seuils utilisés par notre laboratoire, restés constants au cours de notre période d'étude, le taux moyen de prolifération en 2012 est élevé (25%) alors qu'il est modéré en 1994 et en 2003 (respectivement 14 et 12%).

Il existe en revanche une légère diminution du taux moyen entre 1994 et 2003. Mais comme nous l'avons vu précédemment, ce dernier constat n'est pas interprétable compte-tenu de l'effectif de notre échantillon.

Concernant la comparabilité de nos populations, elle est satisfaisante en termes d'effectif et pour une majorité des facteurs individuels et tumoraux étudiés. Il n'y a en effet pas de différence significative retrouvée entre les groupes pour : le statut ménopausique, l'IMC et le lieu d'habitation, le type de dépistage, la taille tumorale, la multifocalité, l'envahissement ganglionnaire, la présence d'embolies, le grade SBR et l'hormonorésistance de la tumeur.

Concernant les autres critères, des différences significatives ont été retrouvées dans la comparaison des 3 populations. La plupart d'entre elles ont été évoquées dans nos hypothèses de départ et peuvent permettre de les étayer. Cependant, en l'absence d'analyses multivariées réalisées, nous ne pourrions évoquer que des tendances sans pouvoir conclure à l'impact réel de chaque facteur.

Hypothèse n°1 : L'augmentation des taux de l'index de prolifération est liée à l'émergence de cancers plus agressifs.

Nous allons reprendre les résultats significatifs pouvant être en faveur de cette hypothèse.

- L'âge :

L'âge moyen des patientes au diagnostic est plus élevé dans la population de 2012 (60 ans) par rapport à la population de 1994 (57 ans). Ceci concorde avec les connaissances actuelles sur le cancer du sein, puisque la Haute autorité de santé (HAS) [2] rapporte un âge moyen de 61 ans en 2015, et que l'âge élevé est un facteur de risque bien établi et important de cancer du sein. Le développement du dépistage et l'augmentation de l'espérance de vie peuvent expliquer cette augmentation de l'âge moyen au diagnostic.

Nous avons aussi démontré qu'un IP plus élevé est statistiquement associé aux tumeurs survenant chez les femmes jeunes dans la catégorie des moins de 40 ans. En effet, l'âge inférieur ou égal à 35 ans est admis comme un facteur de mauvais pronostic puisque des cancers plus agressifs sont associés à cette classe d'âge.

- Les antécédents familiaux :

Il y a statistiquement plus d'antécédents familiaux de cancer du sein chez les patientes de la population III (43,4%) par rapport à la population I (25,7%). Sachant que les formes familiales sont généralement grévées d'un pronostic plus défavorable, cela va dans le sens de notre hypothèse d'émergence de cancers plus agressifs. Nous notons cependant que les taux de formes familiales dans la littérature sont plutôt de

20% (Héry 2002) [4], soit bien inférieurs à ce que nous retrouvons dans notre population de 2003 (33%).

Deux biais sont possibles : celui dû à une modification du recrutement de notre chirurgien, ce que nous verrons ci-après, ou la significativité de l'antécédent familial, sachant que nous avons analysé dans cet item tout antécédent familial, indépendamment du nombre ou de l'âge des apparentés atteints. En effet, comme nous l'avons vu, une femme sur 8 est susceptible de présenter un cancer du sein au cours de sa vie. Ce qui signifie que par argument de fréquence, plusieurs cancers du sein peuvent être observés dans de grandes fratries sans forcément appartenir à des formes familiales. C'est la raison pour laquelle les onco-généticiens sélectionnent les patientes pouvant bénéficier d'une recherche de mutation BRCA (3 apparentés au premier ou au second degré, 2 apparentés au premier degré de 40 ans ou moins...).

- Les cancers récidivants, bilatéraux et métastatiques d'emblée :

En effet, il est de plus constaté un taux de cancers récidivants plus élevé en 2012 qu'en 1994 (15 *versus* 7,4%) et des cancers bilatéraux (3,7 *versus* 1,2%) et métastatiques d'emblée (3 *versus* 0,6%) plus fréquents en 2012 qu'en 2003. Ces augmentations significatives pourraient aller dans le sens de l'apparition de cancers de plus mauvais pronostic.

Cependant, le biais de l'évolution du recrutement du chirurgien de l'étude doit de nouveau être remis en question. En effet, sur cette période de 20 ans, le chirurgien a pu être amené à voir des patientes atteintes de cancers plus sévères dans le cadre de l'expertise qu'il a développé, ou des patientes récidivantes et fidèles, ou encore qui lui adressent les membres de leur famille. En effet, nous constatons que 7 des cancers récidivants dans la population de 2012 ont déjà été traités dans les populations de 1994 et 2003.

Il est donc difficile de tenir compte de ces 2 derniers critères pour affirmer l'hypothèse de cancers plus agressifs, compte-tenu de ce biais de confusion et du nombre réduit de ces cas dans nos populations.

- Les CCI :

Par la suite, il est constaté des taux de CCI progressivement plus élevés entre 1994 et 2014 (de 68 à 80%) avec donc un taux plus bas de CLI et d'autres types histologiques. Ces chiffres concordent avec les données épidémiologiques (Penault-Llorca 2011) [34].

Nous savons en revanche que les CLI ont souvent des taux de prolifération plus bas et que les autres types histologiques décrits (en dehors des carcinomes épidermoïdes rares) sont généralement de bon pronostic. Ainsi l'augmentation de la fréquence des CCI peut étayer notre hypothèse.

- Les traitements :

Nous constatons aussi des taux de mastectomies plus importants (21%) mais associés à des marges *in sano* plus fréquentes (96%) et une augmentation des indications de chimiothérapie posées en situation adjuvante (39%). Cela reflète donc des traitements plus sévères, soit dans un objectif d'efficacité, soit dans le cadre du traitement de cancers plus agressifs (relation de cause et / ou de conséquence).

Etant donné que nos praticiens prennent en compte l'IP dans leur décision thérapeutique à Grenoble, la prescription plus fréquente de ces traitements cytotoxiques est peut-être la conséquence de l'augmentation des taux de prolifération

qui a été observée. Ainsi, indiquons-nous des traitements, dont la toxicité et le coût sont élevés, sur la base de critères dont la fiabilité n'est pas prouvée ?

- Les récurrences et les décès :

Les notions de survie et de récurrence sont peu pertinentes pour la comparaison de nos 3 groupes, la durée moyenne d'observation de ces patientes n'étant pas comparable, surtout pour la population de 2012. Ainsi, ces critères n'ont pas été pris en compte dans l'analyse statistique n°1.

Pour pouvoir exploiter les notions sus-citées, nous avons donc comparé les patientes ayant un IP élevé aux patientes ayant une prolifération considérée comme faible ou modérée.

On retrouve alors statistiquement plus d'envahissements ganglionnaires (43%), plus de décès (taux multiplié par 3) et un taux double de rechutes métastatiques, soit plus de cancers agressifs dans le groupe d'IP élevé. Malgré tout, il n'a pas été mis en évidence de différences en termes de prise en charge thérapeutique selon l'IP puisque le nombre de chimiothérapie ou d'hormonothérapie en situation néoadjuvante ou adjuvante est comparable entre les 2 groupes ; on ne note qu'un taux de mastectomie plus élevé.

Donc, comme nous le savons déjà, un IP élevé est effectivement lié à des cancers de plus mauvais pronostic mais il n'est pas possible sur la base de ces analyses de prouver que son augmentation soit liée à l'émergence de cancers plus agressifs.

Hypothèse n°2 : L'augmentation des taux de l'index de prolifération est due à l'intervention de perturbateurs endocriniens endogènes ou exogènes.

Nous avons choisi d'étudier : l'IMC, les traitements hormonaux et le lieu d'habitation. En effet, l'obésité, les hormones médicamenteuses au moment de la ménopause ou en période péri-ménopausique et le lieu de résidence sont reconnus comme des facteurs de risque relatifs de cancer du sein (risque relatif multiplié par 1,5 à 2).

Il n'a pas été retrouvé de variation significative des taux d'IP selon l'IMC.

Concernant les traitements hormonaux, il y en a logiquement moins en 2012 (13,7%) qu'en 1994 (26,2%) suite à la diminution massive de prescription des THM. En revanche, nous avons observé de façon inexplicable que les patientes sous THM au moment du diagnostic ont des tumeurs moins proliférantes que les femmes sous contraception hormonale ou sans traitement, ce qui est contraire à notre hypothèse.

Enfin, nous savons que le lieu d'habitation urbain est un facteur de risque relatif de cancer du sein par rapport au lieu de vie rurale mais nous avons avancé l'hypothèse que la teneur en polluants de type pesticides des eaux et des sols en zones agricoles peut influencer sur la prolifération tumorale. En effet, l'Agence régionale de santé (ARS) reconnaît ces substances comme potentiellement cancérigènes. Cependant, nous ne sommes pas parvenus à associer le lieu de résidence à un taux d'IP plus élevé.

Notons cependant que le praticien de notre étude renseigne actuellement de façon systématique ses observations cliniques avec le lieu de résidence de la patiente, en précisant la proximité avec une zone agricole et le type de culture, le cas échéant.

Hypothèse n°3 : La variation observée des taux de l'index de prolifération est liée aux biais induits par la variabilité des techniques utilisées pour la détermination de ce paramètre.

Trois paramètres ont été étudiés dans cette hypothèse : le site de dosage (biopsie ou pièce opératoire), l'anticorps utilisé et l'observateur.

Dans les différentes analyses, nous n'avons pas trouvé de différence significative selon le dosage sur pièce ou sur biopsie.

La variation de l'IP en fonction du type d'anticorps se superpose à l'évolution du taux selon les périodes d'étude puisqu'il existe globalement un anticorps différent utilisé pour chaque population. En conclusion, le clone MM-1 de NOVOCASTRA est associé à des taux moyens d'IP significativement plus élevés par rapport aux clones MIB-1 de DAKO et d'IMMUNOTECH. Est-ce lié à une propriété intrinsèque de l'anticorps-même ? Il est hautement probable que les causes soient en réalité multiples et nous pouvons à partir de notre étude déjà évoquer des différences dans la préparation de la pièce opératoire (tissus congelés, paraffinés, fixateurs différents), dans les anticorps utilisés (dilutions variables, réactifs et protocoles de restauration antigénique différents)...

Enfin, une étude par pathologiste a permis de retrouver un taux moyen d'IP de 23% dans l'échantillonnage du praticien n°3, donc statistiquement plus élevé que la moyenne des 3 autres observateurs. De même, le praticien n°4 a une moyenne statistiquement plus élevée (19%) que l'anatomopathologiste n°1 (13%) et on note de plus une participation moindre des pathologistes n°1 et 2 dans le groupe des IP élevés.

Est-ce la conséquence de l'application de techniques de lecture différentes ? L'absence de précision quant à la technique de lecture (évaluation globale ou compte cellulaire, intensités de marquage prises en compte, sites de la détermination par rapport à la topographie tumorale...) dans le compte-rendu anatomopathologique ne nous permet pas d'avancer d'hypothèses en ce sens. Existe-t-il une possible tendance à la sous-estimation ou à la surestimation de l'IP par certains pathologistes ? Ou existe-t-il un biais de confusion selon l'anticorps utilisé ? En effet, les praticiens n°3 et 4, ayant une activité plus importante en 2012, ont plus utilisé le clone MM-1 de NOVOCASTRA, alors que le pathologiste n°1 a arrêté son exercice avant l'acquisition de cet anticorps. Une analyse de l'anticorps utilisé en fonction de l'anatomopathologiste aurait pu être ici intéressante.

En conclusion, les biais techniques de la détermination du Ki-67 découlant de l'absence de protocoles standardisés semblent jouer un rôle prépondérant dans la variabilité du taux de l'IP. Ainsi nous allons voir comment ces facteurs réduisent considérablement sa validité analytique et contribuent à sa sous-utilisation en pratique clinique.

3. Revue de la littérature sur la validité du Ki-67

Nous avons vus dans notre introduction que la détermination de la prolifération par le Ki-67 pourrait bénéficier d'un NP IB en tant que facteur pronostique et IIB en tant que facteur prédictif. En réalité, avant de pouvoir affirmer la valeur pronostique et prédictive d'un marqueur tumoral, ainsi que son utilité clinique, il doit avoir été fait la preuve de sa validité pré-analytique et analytique (Luporsi 2015) [5]. Ce qui, nous le savons, n'est pas le cas. Pour obtenir cette validité, un test doit être fiable et reproductible (Teutsch 2009) [35] et donc reposer sur un protocole standardisé et validé de façon longitudinale dans le temps et sur un plan national voire international, avant de pouvoir faire l'objet de recommandations. En conséquence de l'hétérogénéité des pratiques, la définition de valeur-seuil du Ki-67 est impossible.

Nous avons donc parcouru la littérature afin d'étudier les solutions proposées par la communauté scientifique pour pallier ce problème

Les valeur-seuils

Tout d'abord, de très nombreuses tentatives de recommandations de *cut-offs* pour l'utilisation du Ki-67 ont été retrouvées et nous constatons une variabilité des valeurs proposées pouvant aller de 1 à 34%. Ces seuils permettent une dichotomie entre un IP négatif ou positif, soit bas ou élevé, ou bien une gradation en prolifération faible, intermédiaire et élevée (comme c'est le cas dans notre étude). Peu d'auteurs parviennent à s'accorder sur une valeur-seuil et beaucoup préconisent de la fixer en fonction du but de l'étude (pronostique, prédictive de la réponse à une chimiothérapie ou une hormonothérapie en situation néoadjuvante ou adjuvante, en utilisation indépendante ou au sein d'une classification en sous-groupes...), voire de façon arbitraire. Les seuils les plus recommandés sont situés entre 10 et 20% et concordent avec les valeurs établies par notre laboratoire.

On peut ainsi citer : les recommandations de Cheang (2009) [36] pour un seuil à 13,5% pour la distinction des cancers *Luminal A* et *B*, du panel de *St. Gallen* pour des seuils supérieur à 15% et inférieur ou égal à 30% pour la définition de tumeurs à risque intermédiaire (Luporsi 2012) [9], alors que l'*AGO Breast Committee* (Liedtke 2014) [37] préconise un seuil de 20% pour la classification en *Luminal A* et *B* et des seuils supérieur ou égal à 15% et inférieur à 25% pour la caractérisation d'une tumeur de grade intermédiaire. Enfin, Aleskandarany (2010) [38] propose en 2010 un seuil de 10% pour distinguer les cancers de bon et de mauvais pronostic et De Azambuja (2007) [10] conseille d'utiliser un *cut-off* de 10% pour éviter les chimiothérapies excessives mais de 25% pour identifier les patientes dont la chimiosensibilité est plus probable.

On peut en effet admettre que la situation clinique dans laquelle nous souhaitons utiliser le Ki-67 peut influencer le choix du *cut-off* mais la grande variabilité des propositions est aussi très fortement liée au manque de standardisation de sa technique puisque certaines études concluent que ces valeurs doivent être définies au niveau local.

La validité analytique du Ki-67

Comment parvenir alors à cette uniformisation des pratiques ? Cinq études internationales ont retenu notre attention.

Tout d'abord, Mengel [39] a mené une étude en 2002 dans 172 laboratoires allemands. Pour chaque laboratoire, 30 échantillons tumoraux ont été distribués, conditionnés localement et lus par 2 observateurs différents.

Une bonne reproductibilité inter-observateur, mais une reproductibilité inter-laboratoire modeste, plus marquée pour les proliférations élevées avec des variations de 20%, ont été retrouvées. L'auteur explique ces différences essentiellement par la diversité des techniques de fixation tissulaire : selon le fixateur utilisé (formol, éthanol, EDTA...), la durée du temps d'ischémie froide (délai entre la dévascularisation chirurgicale de la pièce et la fixation) et le temps de fixation qui peut, s'il est prolongé, amener à sous-estimer le Ki-67.

Ainsi une expérience conduite par Polley (2013) [40] aux Etats-Unis dans 8 laboratoires confirme ces résultats : la reproductibilité intra-laboratoire est bonne, la cohérence inter-laboratoire est modérée lorsque les lames sont marquées de façon centralisée et très médiocre lorsque les lames sont techniquées et lues selon les habitudes locales, avec des différences de 25%. Alors même qu'un anticorps identique était utilisé dans tous les laboratoires (clone MIB-1 de DAKO), les protocoles de dilution, d'incubation, de récupération antigénique et les systèmes de détection étaient totalement différents et expliquent ces variations.

Par la suite, Varga [41] propose en 2012 une évaluation des techniques de lecture parmi 5 pathologistes suisses. Les lames étaient immunomarquées centralement dans son laboratoire de Zürich et localement dans chaque laboratoire d'étude.

La variabilité inter-observateur était plus marquée pour les grades intermédiaires alors qu'il s'agit de la zone d'intérêt du Ki-67, et se trouvait bien évidemment améliorée en cas de marquage central. Quant à la variabilité intra-observateur, elle pouvait atteindre 35% lorsque les observateurs effectuaient une nouvelle lecture des mêmes lames 4 mois après !

Ce travail met surtout en exergue les différences dans les modalités d'interprétation des lames : *eyeballing* (estimation moyenne de l'IP à faible grossissement) *versus* comptage manuel des cellules tumorales (nombre de cellules marquées par rapport aux cellules non marquées, sur un nombre total de 500, 1000 ou 2000 cellules), définition d'un noyau positif en fonction de l'intensité du marquage (marquage intense *versus* toutes les intensités de marquage), champ d'intérêt pour la lecture (*hot-spot*, c'est-à-dire zone tumorale centrale où l'intensité du marquage est maximale *versus growth zone*, c'est-à-dire en périphérie tumorale). Il est conclu que les habitudes des pathologistes sont variables sur tous ces critères et que la technique du *eyeballing* est soumise à moins de variabilité puisqu'elle permet une observation à faible grossissement et intègre donc mieux les variations loco-régionales dues à l'hétérogénéité intra-tumorale de l'expression du Ki-67.

Les analyses d'image semi-automatisées ou automatisées ont été proposées pour pallier ces variations, puisque selon certains auteurs ces techniques assureraient une meilleure reproductibilité (Gudlaugsson 2012) [42].

En pratique, les lectures digitales tendent à surestimer les valeurs du Ki-67 puisque que contrairement à l'œil du pathologiste, les automates ne distinguent un noyau marqué

dans une cellule saine d'un noyau marqué tumoral (puisque nous le rappelons, les tissus sains peuvent aussi exprimer le Ki-67).

Enfin, le travail le plus complet reste celui de Dowsett [43] avec l'*International Ki67 in Breast Cancer Working Group* publié en 2011 puisqu'il détaille chaque étape de la technique soumise à des variations et aboutit à des recommandations.

Sont passées en revue la préparation tissulaire et la technique d'IHC pour la validité pré-analytique puis les modalités de lecture pour la validité analytique du test.

Préparation de la pièce :

- Le type de prélèvement, nous l'avons vu, n'influe pas sur le résultat ;
- Le temps d'ischémie froide doit être le plus réduit possible car la fixation permet de conserver l'intégrité nucléaire et d'harmoniser le marquage par la suite ;
- Le choix du fixateur se porte sur le formol puisque les solutions d'éthanol ou d'EDTA ont tendance à diminuer le taux du Ki-67 ;
- Le temps de fixation adéquat est de 4 à 48 heures ;
- Le stockage des pièces doit être fait après inclusion en paraffine pour éviter la dégradation des tissus par l'exposition à l'air.

Immunoréaction :

- Il n'y a pas de recommandation concernant le milieu de restauration antigénique à utiliser, celui-ci étant souvent fourni avec l'anticorps ;
- Le pré-traitement par la chaleur à micro-ondes est recommandée ;
- Le clone MIB-1 de l'anticorps monoclonal de souris anti-Ki-67 humain est proposé en tant que *Gold Standard* pour sa spécificité, sa sensibilité, sa résistance et son efficacité, même à des dilutions variables. Il n'y a pas de recommandation sur la dilution ou la durée d'incubation ;
- Le système de détection colorimétrique classique est le complexe avidine-biotine-immunoperoxydase.

Interprétation de la coloration :

- Ne prendre en compte que les colorations nucléaires et non pas les colorations cytoplasmiques ou membranaires rares mais possibles en cas d'altérations nucléaires ou de métaplasies ;
- Utiliser des contrôles positifs internes (lymphocytes) qui orientent sur la qualité de la lame ;
- Prendre en compte toutes les colorations indépendamment de l'intensité pour définir un noyau positif.

Détermination du résultat :

- La lecture manuelle est recommandée ;
- En cas de coloration homogène, il est recommandé d'effectuer un compte au grossissement x 400 dans 3 champs différents. La sélection de ces champs se fera après un survol de la pièce à faible grossissement ;
- Il est préférable de sélectionner les champs d'intérêt dans la périphérie tumorale et de ne pas prendre en compte les *hot-spots* où le marquage est prévalent. En cas d'hétérogénéité tumorale, il convient d'estimer un IP moyen ;
- Un compte sur 1000 cellules est satisfaisant, un minimum de 500 cellules est acceptable ;
- Le résultat est rendu en pourcentage de cellules marquées sur le nombre total de cellules malignes.

En conclusion, ce travail est donc quasi-complet, mais il n'est pas fait mention en pré-analytique de la standardisation-même des anticorps, que nous aborderons ci-dessous. Cependant, l'application de ces recommandations semble accessible et pourrait permettre une standardisation de la technique. Alors qu'en est-il en pratique en France ?

L'index de prolifération dans les recommandations

Selon les RPC de Saint-Paul-de-Vence (2013) [30], la validité analytique du Ki-67 est donc trop faible par rapport aux exigences actuelles (NP II, grade C), et les experts s'accordent sur le fait qu'un travail d'homogénéisation de la technique est nécessaire pour l'utilisation optimale de cet outil.

Ainsi l'exploitation du travail de *l'International Ki67 in Breast Cancer Working Group* devrait conduire à l'élaboration de recommandations précises pour standardiser la technique et pour compléter le compte-rendu anatomopathologique. En effet, il semble nécessaire que ces critères et notamment ceux liés à la lecture soient portés à l'attention du clinicien qui prend en charge la patiente afin d'optimiser la décision thérapeutique.

En exemple, le réseau régional du Grand-Est avec l'Association française d'assurance qualité en anatomie pathologique a récemment élaboré dans cette optique des recommandations et a développé un outil, disponible sur le *web*, d'aide à la lecture en cas d'hétérogénéité du marquage intra-tumoral du Ki-67 (référence *web*) [44].

L'outil *Ki-67recoGE* est utilisable quelle que soit la technique de lecture (*eyeballing*, comptage manuel des cellules marquées sur le nombre de cellules tumorales ou du nombre de cellules marquées par rapport aux cellules non marquées).

Au préalable, le pathologiste doit sélectionner au maximum 3 zones de niveaux de prolifération différents à faible grossissement et estimer le pourcentage d'occupation de chacune d'entre elles. Puis, il sélectionne un champ représentatif pour chaque zone et y évalue au grossissement x 400 la densité cellulaire et l'IP. En renseignant la surface de chaque zone, l'IP et la densité cellulaire par zone, l'outil permet de calculer un IP moyen. Pour le compte-rendu, il est recommandé que si le résultat obtenu moyen est compris dans la zone intermédiaire, entre 11 et 30%, l'observateur doit porter à l'attention des cliniciens si une zone occupe plus de 30% de la surface avec un IP supérieur à 30%.

Il serait donc intéressant de diffuser ces recommandations puisque peu de consensus ont été retrouvés quant à la prise en compte et l'évaluation de l'hétérogénéité intra-tumorale de la prolifération.

4. Perspectives

Pour l'optimisation de nos pratiques, la mise en place d'une standardisation technique selon les pistes citées ci-dessus est donc indispensable sur un plan intra et inter-laboratoire et doit être étendue sur un plan national voire international. Cependant, est-ce suffisant pour valider l'utilisation du Ki-67 ?

Car au-delà des considérations pré-analytiques et analytiques, une problématique majeure persiste sans jamais avoir été citée dans la littérature: qu'en est-il de la validité intrinsèque des anticorps utilisés ? En effet, il n'existe pas de contrôle de qualité de ces anticorps avec une absence de traçabilité et une absence de suivi longitudinal de leur calibrage, les uns par rapports aux autres ou par rapport à un test de référence.

Par exemple, il ne nous a pas été possible de récupérer les numéros des lots des anticorps utilisés dans notre population d'étude et les notices d'utilisation des anticorps éditées par les fabricants ne nous permettent pas de savoir comment l'anticorps est calibré (références *web*) [45] [46]. Il peut donc exister une dérive de ces produits en l'absence d'étalonnage standardisé, ce qui appelle à une vérification de leur validité et nous proposons une étude ultérieure en ce sens.

Nous avons en effet accès à une tumorothèque depuis 2008 à partir de laquelle des coupes de tissus congelés ou inclus en paraffine pourront être analysées. Ainsi, seront réalisées pour une même tumeur :

- une nouvelle détermination du taux de l'IP par les techniques d'IHC de routine après mise en place d'un cadre technique standardisé,
- puis une détermination de l'IP par une technique alternative en utilisant par exemple la biologie moléculaire (mesure de l'ARNm du Ki-67 ou des enzymes impliquées dans la synthèse et la réplication de l'ADN).

L'intérêt est donc triple : celui de valider l'utilisation de l'IHC pour la détermination de l'IP, celui de permettre une calibration des anticorps et donc celui de contribuer à fixer une valeur-seuil universelle. Ce paramètre deviendrait alors incontournable dans la prise en charge des cancers du sein.

De plus, le dosage par biologie moléculaire pourra être proposé comme une technique de contrôle de qualité à long terme au sein d'un laboratoire voire sur un plan national. Chaque laboratoire aurait dans son tableau des charges annuel l'obligation de redéterminer, sur une série de 20 tumeurs, l'IP par la technique immunohistochimique habituelle et par la technique alternative de biologie moléculaire.

CONCLUSION

Ainsi, ce travail avait pour objectif de démontrer une variation de l'IP sur ces 20 dernières années. Les taux actuels sont effectivement statistiquement plus élevés en comparaison de ceux rapportés il y a 20 ou 10 ans. Différents mécanismes étiologiques ont été évoqués mais l'affirmation de leur rôle propre nécessiterait une analyse multivariée.

Cependant, l'inflation observée des valeurs de l'IP semble en grande partie liée aux différentes techniques utilisées dans sa détermination. Cette impression rejoint les causes de son absence dans les recommandations internationales et de sa sous-utilisation en pratique clinique : il existe un manque évident de standardisation de la technique et de calibration des anticorps, soit une absence totale de contrôle de qualité longitudinal et sur les plans interne, inter-laboratoire, national et international.

Il est donc souhaitable de définir un cadre technique standardisé pour la détermination de l'IP en suivant par exemple le modèle du grade histopronostique de SBR et des critères de Nottingham. Il convient d'imposer un nombre de champs à observer et d'évaluer de façon systématique les zones intra-tumorales, péri-tumorales et extra-tumorales. L'analyse de plusieurs coupes permettrait de plus, de couvrir l'étendue tumorale et pallier ainsi les biais de l'hétérogénéité intra-tumorale.

Puis, pour confirmer ou infirmer la variation réelle de l'IP, une étude de validité de la technique d'IHC actuelle nous semble indispensable avec l'utilisation d'une méthode de détermination alternative.

Ainsi, les critères de qualité et la standardisation technique qui font actuellement défaut à l'IP permettraient enfin d'assurer sa validité analytique et son utilisation optimale dans la prise en charge personnalisée des patientes, afin d'éviter une escalade thérapeutique basée sur l'augmentation observée des taux de prolifération qui pourrait être, en fait, artéfactuelle.

THESE SOUTENUE PAR : Stéphanie LIN

TITRE :

Etude de l'évolution de l'index de prolifération dans le cancer du sein entre 1994 et 2014

CONCLUSION

La prolifération dans le cancer du sein est actuellement régulièrement évaluée du fait de sa valeur pronostique et prédictive. Or, il est constaté de façon subjective depuis plusieurs années, une tendance à des taux de prolifération plus élevés.

Ainsi l'objectif de notre travail est de mettre en évidence de façon rétrospective une variation des valeurs de l'index de prolifération déterminé par le Ki-67 en immunohistochimie entre 1994 et 2014, puis d'étudier les facteurs étiologiques ayant pu induire ce phénomène. Trois hypothèses sont proposées : l'inflation des taux pourrait être liée soit à l'émergence de cancers plus agressifs, soit à l'impact de perturbateurs endocriniens, soit à un artefact résultant de l'évolution des techniques utilisées pour sa détermination.

Une cohorte de 890 patientes a été analysée selon 3 groupes discontinus sur une période de 20 ans : la population I entre 1994 et 1996, la population II entre 2003 et 2004 et la population III entre 2012 et 2014. La comparaison de ces 3 groupes a permis de mettre en évidence une augmentation significative des taux de l'index de prolifération entre 1994 et 2012 et entre 2003 et 2012 ($p < 0,0001$) avec des moyennes respectives pour les populations I, II et III de 14,5%, 12% et 25,7%. Ce constat est fait dans notre population globale ainsi que dans la sous-population des cancers infiltrants primitifs localisés.

Par la suite, nous avons constaté une association significative entre un index de prolifération élevé et le type histologique canalaire infiltrant, l'envahissement ganglionnaire, un âge jeune inférieur à 40 ans et la survenue de métastases.

Enfin, il est retrouvé une relation entre la variation des taux de prolifération observés et le type d'anticorps utilisé ainsi qu'une différence significative selon l'anatomopathologiste à l'origine de sa détermination.

Ce travail souligne donc l'importance de la variabilité dans la technique d'évaluation de l'index de prolifération et ce, à plusieurs niveaux : en pré-analytique (selon les techniques de préparation tissulaire, d'immunohistochimie et notamment le type d'anticorps utilisé), et sur le plan analytique (selon les techniques de lecture, l'interprétation des résultats et les valeurs-seuils appliquées).

En l'absence de standardisation de ces techniques, l'utilisation en pratique clinique de ce paramètre reste controversée malgré son apport potentiel dans la prise en charge thérapeutique des cancers du sein. Il est ainsi souhaitable de définir un cadre standardisé pour sa détermination et un système de validation interne, inter-laboratoire puis national avec une calibration des anticorps utilisés et un contrôle qualité à chaque étape de la technique.

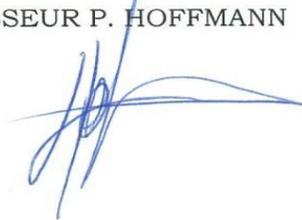
VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 19/10/15

LE DOYEN
J.P. ROMANET



LE PRESIDENT DE LA THESE
PROFESSEUR P. HOFFMANN



BIBLIOGRAPHIE ET REFERENCES WEB

1. Hill C. *Epidémiologie du cancer du sein*. 2007, 109^{ème} Congrès Français de Chirurgie.
2. HAS (Haute autorité de santé). *Dépistage et prévention du cancer du sein : Etat des connaissances sur le cancer du sein*. Mise à jour : février 2015. www.has-sante.fr
3. INCa (Institut national du cancer). Recommandations professionnelles. *Cancer du sein infiltrant non métastatique – Questions d’actualité*. Avis et Recommandations 2012. www.e-cancer.fr
4. Héry M. *Natural history of node-negative breast cancer: are conventional prognostic factor predictors of time relapse?* Breast 2002.
5. Luporsi E. Bellocq JP. *uPA/PAI-1, Oncotype DX, Mammaprint. Valeurs pronostique et prédictive pour une utilité clinique dans la prise en charge du cancer du sein*. Bull Cancer 2015.
6. Gerdes J. *Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67*. J Immunol 1984.
7. Ellis MJ. *Outcome prediction for estrogen receptor-positive breast cancer based on postneoadjuvant endocrine therapy tumor characteristics*. J Natl Cancer Inst 2008.
8. Viale G. *Predictive value of tumor Ki-67 expression in two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer*. J Natl Cancer Inst 2008.
9. Luporsi E. *Ki67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review*. Breast Cancer Res Treat 2012.
10. De Azambuja E. *Ki-67 as a prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12 155 patients*. Br J Cancer 2007.
11. Stuart-Harris R. *Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients*. Breast 2008.
12. Yerushalmi R. *Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential*. Lancet Oncol 2010.
13. Goldhirsch A. *Strategies for subtypes – dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011*. Ann Oncol 2011.
14. Simon RM. *Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers*. J Natl Cancer Inst 2009.
15. Viale G. *Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labelling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole*. J Clin Oncol 2008.
16. Penault-Llorca F. *Changes and predictive and prognostic value of the mitotic index, Ki-67, Cyclin D1, and Cyclo-oxygenase-2 in 710 operable breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy*. The Oncologist 2008.
17. Jonat W. *Is the Ki-67 labelling index ready for clinical use?* Ann Oncol 2011.
18. Réseau de Cancérologie de la région Centre. *Référentiels de prise en charge des cancers du sein*. 2011. www.oncocentre.org

19. Réseau d'oncologie – hématologie du Limousin. *Référentiel régional « Cancer du sein »*. Mise à jour : novembre 2012. www.sante-limousin.fr
20. Réseau de Cancérologie de la Région Auvergne : Oncauvergne. *Référentiel « Cancer du sein »*, 2012. www.oncauvergne.fr
21. Réseau de Cancérologie d'Aquitaine. *Référentiel régional de prise en charge des cancers du sein non métastatiques*. Mise à jour : septembre 2010. www.canceraquitaine.org
22. Réseau régional de Cancérologie en Languedoc-Roussillon : Onco Languedoc-Roussillon. *Référentiel loco-régional et métastatique des cancers du sein*. Juin 2010. www.oncolr.org
23. Réseau espace santé – Cancer Rhône-Alpes. *Référentiels « Cancer du sein »*. Mise à jour 05/12/2013. www.rrc-ra.fr
24. Assistance Publique des Hôpitaux de Paris. *Référentiel « Cancer du sein »*. Mise à jour : 2014. <http://ghparis10.aphp.fr>
25. Institut Curie : le Groupe Sein et Institut de Cancérologie Gustave Roussy. *Référentiels REMAGUS « Cancer du Sein »*. Mise à jour : août 2011. www.cancersdusein.curie.fr
26. Réseau Régional de Cancérologie de l'Ile-de-France : Oncorif. *Référentiel régional de prise en charge initiale des cancers du sein*. Mise à jour : décembre 2011. www.oncorif.fr
27. Réseau de cancérologie inter-régional : Oncolor, Carol, Oncobourgogne, Oncolie, Oncocha. *Principes de prise en charge dans le cancer du sein*. Mise à jour : 05/12/2014. www.oncologik.fr
28. Réseau Basse-Normandie. *Référentiel du cancer du sein (Recommandations pour la Pratique Clinique)*. Avril 2014. www.oncobassenormandie.fr
29. Réseau de cancérologie de Midi-Pyrénées : Oncomip. *Référentiel régional de prise en charge sénologique*. Actualisation : octobre 2012. www.oncomip.org
30. Compte-rendu du cours supérieur francophone de cancérologie de Saint-Paul-de-Vence. *Prolifération des cancers du sein et biomarqueurs décisionnels en pratique*. Recommandations pour la pratique clinique 2013.
31. Harris L. *American Society of Clinical Oncology 2007 update or recommendations for the use of tumor markers in breast cancer*. J Clin Oncol 2007.
32. Direction Régionale de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt de Rhône-Alpes. *Liste des communes de la zone vulnérable de Rhône-Alpes*. Mise à jour : 05/06/2015. <http://draaf.rhone-alpes.agriculture.gouv.fr/Revsision-du-zonage-dit-zones>
33. Penault-Llorca F. *Adjuvant breast cancer: which clinical and pathological characteristics in 2007?* Bull Cancer 2010.
34. Penault-Lorca F. *Cancers infiltrants de bon pronostic : trop ou pas assez ? Mieux faire que les facteurs histopronostiques classiques TN et grade histopronostique : biochimie ou immunohistochimie ?* 2011, 33èmes Journées SFSPM.
35. Teutsch SM. *The Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Initiative: methods of the EGAPP Working Group*. Genet Med 2009.
36. Cheang MCU. *Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer*. J Natl Cancer Inst 2009.
37. Liedtke C. *AGO Recommendations for the diagnosis and treatment of patients with early breast cancer: update 2014*. Breast Care 2014.
38. Aleskandarany MA. *MIB1 / Ki67 labelling index can classify grade 2 breast cancers into two clinically distinct subgroups*. Breast Cancer Res Treat 2010.

39. Mengel M. *Inter-laboratory and inter-observer reproducibility of immunohistochemical assessment of the Ki-67 labelling index in a large multi-centre trial.* J Pathol 2002.
40. Polley MY. *An international Ki67 reproducibility study.* J Natl Cancer Inst 2013.
41. Varga Z. *How reliable is Ki-67 immunohistochemistry in grade 2 breast carcinomas? A QA Study of the Swiss Working Group of Breast- and Gynecopathologists.* PLoS One 2012.
42. Gudlaugsson E. *Comparison of the effect of different techniques for measurement of Ki67 proliferation on reproducibility and prognosis prediction accuracy in breast cancer.* Histopathology 2012.
43. Dowsett M. *Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group.* J Natl Cancer Inst 2011.
44. *Recommandations du Grand-Est pour la pratique clinique et outil de l'Association française d'Assurance Qualité en anatomie pathologique (afAQap) pour la détermination de l'index Ki-67 en cas de marquage tumoral immunohistochimique hétérogène par plages.* 11/04/2014
<https://www.afaqap.fr/index-ki67>
45. Novocastra™ Anticorps Monoclonal Liquide de Souris. Ki67 Antigen. Référence du Produit : NCL-L-Ki67-MM1. *Notice d'utilisation.* Date de Publication : 11/04/2013.
www.leicabiosystems.com
46. Dako Monoclonal Mouse Anti-Human Ki67 Antigen Clone MIB1. Code M7240. *Notice d'utilisation.* 2011. www.dako.com

ANNEXES

Tableau V : Analyse statistique et comparaison des populations I, II et III portant sur les cancers primitifs localisés infiltrants (analyse 1)

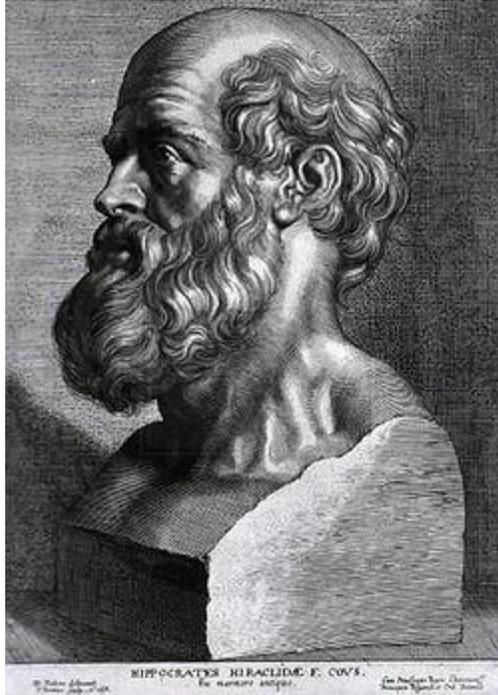
Critères	POPULATION I	POPULATION II	POPULATION III	p-value I vs II	p-value II vs III	p-value I vs III
Effectifs (n)	214	220	212	0,7683	0,9528	0,6797
Âge moyen +/- écart-type (ans)	57 +/- 12	59 +/- 11	60 +/- 12,6	0,0992	0,3861	0,0205
Ménopause	141 (65,9%)	151 (68,6%)	142 (67%)	0,5418	0,7128	0,8112
Traitement hormonal	56 (26,2%)	75 (34,1%)	29 (13,7%)	0,1905	6,0974	0,0015 OR 0,448 [0,2621 ; 0,7532]
IMC moyen +/- écart-type (kg/m ²)	24,94 +/- 5,5 n = 128	24,64 +/- 4,9 n = 218	24,65 +/- 4,1 n = 210	0,9796	0,5279	0,6253
Lieu d'habitation rural	28 (13,1%) n = 213	25 (11,8%) n = 212	24 (11,5%) n = 209	0,6729	0,9212	0,6035
Antécédents familiaux	55 (25,7%)	73 (33,2%)	92 (43,4%)	0,0977	0,0739	0,0001 OR 2,2549 [1,4711 ; 3,4785]
Tumeur infra-clinique	28 (13,1%) n = 213	34 (15,5%)	50 (23,6%)	0,4928	0,0386 OR 0,593 [0,3531 ; 0,9866]	0,0058 OR 0,4912 [0,2835 ; 0,8375]
Dépistage clinique	106 (52,2%) n = 203	94 (43,6%) n = 216	94 (44,8%) n = 210	0,789	0,6875	0,1243
CCI	145 (67,8%)	173 (78,6%)	171 (80,7%)	0,0192 OR 0,554 [0,3169 ; 0,9295]	0,3308	0,0276 OR 0,5774 [0,3421 ; 0,9657]
Taille p T1	161 (75,2%)	172 (78,2%)	155 (73,1%)	0,3592	0,5973	0,6823
Multifocalité	17 (7,9%)	20 (9,3%)	24 (11,3%)	0,6796	0,4437	0,2438
Envahissement ganglionnaire	70 (34,1%) n = 205	76 (34,5%)	86 (41,3%) n = 208	1	0,1631	0,1217
Présence d'embolies	51 (23,8%)	49 (22,3%)	35 (16,5%)	0,6998	0,1303	0,0598
Marges non <i>in sano</i>	24 (11,2%)	20 (9,1%)	9 (4,2%)	0,5561	0,0541	0,0102 OR 0,3518 [0,1402 ; 0,8083]

Tableau V (suite) : Analyse statistique et comparaison des populations I, II et III portant sur les cancers primitifs localisés infiltrants (analyse 1)

Critères	POPULATION I	POPULATION II	POPULATION III	p-value I vs II	p-value II vs III	p-value I vs III
Effectifs (n)	214	220	212	0,7683	0,9528	0,6797
Grade SBR I	57 (27,3%) n = 209	60 (28%) n = 215	63 (30,3%) n = 208	0,9137	0,5944	0,5176
Grade SBR II	86 (41,1%) n = 209	99 (46%) n = 215	97 (46,6%) n = 208	0,3282	0,9225	0,2784
Grade SBR III	66 (31,6%) n = 209	56 (26%) n = 215	48 (23,1%) n = 208	0,238	0,4995	0,0616
RH négatifs	36 (17,6%) n = 205	31 (14,4%) n = 215	19 (9%) n = 210	0,4246	0,0982	8,2016
IP moyen +/- écart-type (%)	14,53 +/- 9,93 n = 200	11,95 +/- 11 n = 205	25,7 +/- 22,36 n = 210	0,0001	0,0001	0,0001
Prolifération faible	96 (48%) n = 200	133 (64,9%) n = 205	65 (31%) n = 210	0,0006 OR 0,5006 [0,3286 ; 0,7593]	4,0885	0,0005 OR 2,0555 [1,3491 ; 3,1461]
Prolifération modérée	57 (28,5%) n = 200	38 (18,5%) n = 205	58 (27,9%) n = 210	0,0192 OR 1,7493 [1,0709 ; 2,8814]	0,0358 OR 0,5971 [0,3636 ; 0,972]	0,0002 OR 0,457 [0,2959 ; 0,7014]
Prolifération élevée	47 (23,5%) n = 200	34 (16,6%) n = 205	87 (41,1%) n = 210	0,0839	2,5925	0,0001 OR 0,4352 [0,2764 ; 0,6795]
Traitement néoadjuvant	62 (29%)	26 (11,8%)	148 (69,8%)	8,6457	1,0671	2,8341
Chirurgie conservatrice	194 (90,7%)	180 (81,8%)	167 (78,8%)	0,0653	0,4791	0,0007 OR 2,608 [1,4421 ; 4,8698]
Traitement adjuvant : CT	57 (26,6%)	76 (34,5%)	83 (39,2%)	0,0776	0,3692	0,0072 OR 0,565 [0,3664 ; 0,8672]
Traitement adjuvant : HT	121 (56,5%)	132 (60%)	185 (87,3%)	0,496	1,3121	9,9098
Décès	18 (7,5%)	3 (1,4%)	0 (0%)	0,005 OR 0,1511 [0,0281 ; 0,529]	0,088	5,2646
Rechute	95 (44,5%)	38 (17,3%)	9 (4,2%)	9,3151	8,7507	0,0809

n : effectif reprecisé pour chaque critère si différent de l'effectif global de la population ; *vs* : versus
IMC : indice de masse corporelle ; *CCI* : carcinome canalaire infiltrant ; *p T1* : taille sur pièce opératoire < ou = à 20 mm ; *RH* : récepteurs hormonaux ; *IP* : index de prolifération ; *CT* : chimiothérapie ; *HT* : hormonothérapie ; *rechute* : comprend les récidives loco-régionales et métastatiques
 Seuil de significativité pour une p-value < 0,05 ; résultats significatifs en gras ; OR : odds-ratio
 Pour les valeurs qualitatives, la p-value, si elle est significative est suivie de l'OR et de son intervalle de confiance à 95%.

SERMENT D'HIPPOCRATE



En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'HIPPOCRATE,

Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuitement à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis dans l'intimité des maisons, mes yeux n'y verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

RESUME

Introduction

La prolifération dans le cancer du sein est actuellement régulièrement évaluée du fait de sa valeur pronostique et prédictive. Or, il est constaté de façon subjective depuis plusieurs années, une tendance à des taux de prolifération plus élevés.

Objectifs

Ainsi l'objectif principal de notre travail est de mettre en évidence une variation des valeurs de l'index de prolifération déterminé par le Ki-67 en immunohistochimie entre 1994 et 2014. L'objectif secondaire est, si une augmentation significative est observée, d'étudier les facteurs étiologiques ayant pu induire ce phénomène. Trois hypothèses sont proposées : l'inflation des taux est liée soit à l'émergence de cancers plus agressifs, soit à l'impact de perturbateurs endocriniens, soit à un artefact résultant de l'évolution des techniques utilisées pour sa détermination.

Matériel et méthodes

Une cohorte de 890 patientes a été analysée de façon rétrospective selon 3 groupes discontinus sur une période de 20 ans : la population I entre 1994 et 1996, la population II entre 2003 et 2004 et la population III entre 2012 et 2014.

Résultats

La comparaison de ces 3 groupes a permis de mettre en évidence une augmentation significative des taux de l'index de prolifération entre 1994 et 2012 et entre 2003 et 2012 ($p < 0,0001$) avec des moyennes respectives pour les populations I, II et III de 14,5%, 12% et 25,7%. Ce constat est fait dans la population des cancers infiltrants primitifs localisés.

Par la suite, nous avons constaté une association significative entre un index de prolifération élevé et le type histologique canalaire infiltrant, l'envahissement ganglionnaire, un âge jeune inférieur à 40 ans et la survenue de métastases.

Enfin, il est retrouvé une relation entre la variation des taux de prolifération observés et le type d'anticorps utilisé ainsi qu'une différence significative selon l'anatomopathologiste à l'origine de sa détermination.

Discussion

Ce travail souligne donc l'importance de la variabilité dans la technique d'évaluation de l'index de prolifération et ce, à plusieurs niveaux : en pré-analytique (selon les techniques de préparation tissulaire, d'immunohistochimie et notamment le type d'anticorps utilisé), et sur le plan analytique (selon les techniques de lecture, l'interprétation des résultats et les valeur-seuils appliquées).

Conclusion

En l'absence de standardisation de ces techniques, l'utilisation en pratique clinique de ce paramètre reste controversée malgré son apport potentiel dans la prise en charge thérapeutique des cancers du sein. Il est ainsi souhaitable de définir un cadre standardisé pour sa détermination et un système de validation interne, inter-laboratoire puis national avec une calibration des anticorps utilisés et un contrôle qualité à chaque étape de la technique.

Mots-clés

Cancer du sein ; Index de prolifération ; Ki-67 ; Validité analytique