

# Etude comparative de deux marqueurs de prolifération complémentaires l'index de prolifération Ki67 et l'indice d'activité mitotique dans 200 cas de carcinomes mammaires.

## Comparative study of two complementary proliferation markers in 200 breast carcinomas: Ki67 and mitotic index

Olfa El Amine<sup>1</sup>, Rihem Ouni<sup>1</sup>, Olfa Adouni<sup>1</sup>, Aida Goucha<sup>1</sup>, Jameleddine Ben Hassouna<sup>2</sup>, Khaled Rahal<sup>2</sup>, Ahmed El May<sup>1</sup>, Amor Gamoudi<sup>1</sup>

1-Service d'immuno histo cytologie Institut Salah Azaiez de Tunis / Université Tunis El Manar, Faculté de médecine de Tunis

2-Service de chirurgie carcinologique Institut Salah Azaiez de Tunis / Université Tunis El Manar, Faculté de médecine de Tunis

### R É S U M É

**Introduction :** L'évaluation de la prolifération dans les carcinomes mammaires permet d'apporter des informations pronostiques et prédictives utiles pour la prise en charge ultérieure. Parallèlement aux techniques d'évaluation strictement morphologiques de l'activité proliférative, représentées par l'évaluation de l'index mitotique, de nouvelles méthodes d'analyse ont été progressivement développées et perfectionnées. Parmi ces méthodes, l'étude immunohistochimique du Ki67 est particulièrement intéressante. Son expression est significativement augmentée lors du cycle cellulaire.

**But :** Etablir la corrélation entre l'index mitotique comme méthode classique d'évaluation de la prolifération cellulaire et l'index de prolifération au Ki 67 par détection immunohistochimique afin de définir le marqueur prolifératif le plus fiable.

**Méthodes :** Nous avons étudié 200 patientes atteintes de carcinome canalaire infiltrant mammaire sur une période de 12 mois de l'année 2014. Nous avons identifié pour chaque cas le grade SBR modifié, l'index de prolifération Ki67 et l'index mitotique. La recherche d'une corrélation entre les deux paramètres a été réalisée grâce au test Spearman. Un résultat est considéré comme significatif lorsque  $p < 0,01$ . La méthode de l'ANOVA nous a permis d'étudier la distribution de ces deux marqueurs selon le grade SBR.

**Résultats :** Le Ki67 est corrélé de façon statistiquement significative avec l'index mitotique. Bien que ces deux méthodes sont superposables et que les deux marqueurs sont dépendants, le Ki67 est le plus sensible et lié au grade SBR.

La détermination isolée du Ki67 apporte une information intéressante qui pourrait remplacer le compte mitotique en fournissant des données fiables et reproductibles pouvant être incorporées dans un score pronostique.

**Conclusion :** Le Ki67 est un marqueur plus performant que l'index mitotique, reflétant la prolifération cellulaire et par suite son utilisation apparaît a priori plus fiable.

### M o t s - c l é s

Carcinome mammaire, index mitotique, prolifération, Ki 67

### S U M M A R Y

**Background:** The evaluation of the proliferation in the mammary carcinomas provides useful prognostic and predictive information for subsequent management. The purely morphological evaluation of proliferative activity was represented by the evaluation of mitotic index. New analytical methods were gradually developed and performed. Among these methods, evaluation of Ki67 by immunohistochemistry is particularly interesting. Its expression is significantly increased in the cell cycle.

**Aim:** To correlate the mitotic index as a classic method of assessing cell proliferation and Ki 67 proliferation index detected by immunohistochemistry to identify the most reliable proliferative marker.

**Methods:** We studied 200 patients with invasive ductal carcinoma breast over a period of 12 months of 2014. We identified in each case the SBR grade, Ki67 proliferation index and the mitotic index. Correlation between the two parameters was identified using the Spearman test. A result is considered significant when  $p < 0.01$ . The distribution of these markers by SBR grade was studied using the ANOVA method.

**Results:** Ki67 is significantly correlated to the mitotic index. Although these two methods are dependent, Ki67 is the most sensitive and bonded to SBR grade. Determination of Ki67 provides interesting information that could replace the mitotic account. It provides reliable and reproducible data that can be incorporated into a prognostic score.

**Conclusion:** Ki67 is a more efficient marker mitotic index, reflecting the cell proliferation.

### K e y - w o r d s

Breast carcinoma, mitotic index, proliferation, Ki 67

La prolifération cellulaire dans une tumeur est définie par le rapport entre le nombre de cellules engagées dans le cycle cellulaire et l'ensemble de la population cellulaire tumorale. L'évaluation de la prolifération cellulaire, telle qu'elle est effectuée en anatomie pathologique, permet d'apporter des informations pronostiques et prédictives utiles au clinicien pour la prise en charge ultérieure [1].

De nombreuses méthodes d'évaluation de la prolifération cellulaire sont employées en pathologie mammaire. Parallèlement aux techniques d'évaluation strictement morphologique de l'activité proliférative, représentées par l'évaluation de l'index mitotique, de nouvelles méthodes d'analyse ont été progressivement développées et perfectionnées. Parmi ces méthodes, l'étude immunohistochimique au Ki67 est particulièrement intéressante. L'expression du marqueur de prolifération Ki 67 est exclusivement associée ou au moins significativement augmentée lors du cycle cellulaire et susceptible de ce fait d'être détectée uniquement dans les cellules en phase active de prolifération [2].

Sur la base de l'indice prolifératif Ki67, les carcinomes mammaires peuvent être classés en deux catégories. Les tumeurs de faible indice de prolifération sont celles avec un indice de moins de 14%. Celles avec un indice supérieur ou égal à 14% ont un indice de prolifération élevé et sont donc une indication à la chimiothérapie adjuvante. Les plus sensibles sont celles avec un indice > 25% [3, 4].

Le système de classement Scarff-Bloom-Richardson modifié, aussi appelé Elston-Ellis [5] recommande de classer les cancers du sein en additionnant les scores par la formation de tubes, le polymorphisme nucléaire et l'index mitotique. Chaque paramètre est codé de 1 à 3 points. Les scores pour chacun de ces trois critères sont ensuite additionnés pour donner un score final global et le grade correspondant.

Le compte mitotique évalue le nombre de figures de mitose. Le pathologiste doit les évaluer dans 10 champs au fort grossissement (x40).

On cherche les mitoses à la périphérie de la tumeur, et le décompte devrait être réalisé dans les zones les plus mitotiques. Les points sont accordés de la façon suivante :

1 point: 0-5 chiffres mitotiques par 10 champs sous l'objectif X40

2 points: 6-10 chiffres mitotiques par 10 champs sous l'objectif X40

3 points: plus de 10 mitoses par 10 champs sous l'objectif x 40 [5, 6].

Dans notre étude nous nous proposons d'établir la corrélation entre l'index mitotique comme méthode classique d'évaluation de la prolifération cellulaire et l'index de prolifération au Ki 67 évalué par détection immunohistochimique, afin de définir le marqueur de prolifération le plus fiable.

## MÉTHODES

Nous avons étudié 200 dossiers de patientes atteintes de carcinome canaux infiltrants mammaires. Les pièces opératoires avaient été analysées au laboratoire d'immuno-histo-cytologie à l'INSTITUT SALAH AZAIEZ de TUNIS sur une période de 12 mois de l'année 2012. Nous avons identifié pour chaque cas le grade SBR modifié, l'index de prolifération Ki67 révélé par l'anticorps anti MIB1. On a relu l'index mitotique sur 200 lames colorées à l'Hématoxyline-Eosine.

La meilleure méthode pour calculer l'indice Ki67 reste controversée, il a été recommandé de compter parmi 500 à 2000 cellules, celles ayant un noyau avec un marquage intense [7].

Pour évaluer le nombre de figures de mitose. Nous les avons quantifiées dans 10 champs au fort grossissement (x40) à la périphérie de la tumeur.

La saisie et l'analyse des données ont été réalisées en utilisant le logiciel SPSS. La recherche d'une corrélation entre les deux paramètres Ki67 et index mitotique, qui sont deux variables quantitatives, a fait appel au test de corrélation non paramétrique de Spearman. Un résultat est considéré comme significatif lorsque  $p < 0,01$ . Ainsi pour étudier la distribution de ces deux marqueurs selon le grade SBR, nous avons eu recours à la méthode de l'ANOVA.

## RÉSULTATS

L'âge moyen des patientes dans notre étude est de 51 ans avec un écart type de 11,7 ans. La plus jeune patiente atteinte avait 24 ans au moment du diagnostic clinique et la plus âgée 85 ans.

La répartition complète, par âge, au moment du diagnostic tumoral est représentée sur la figure 1.

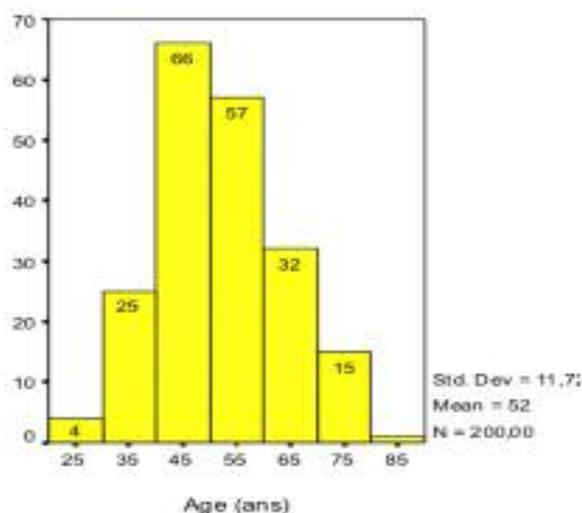


Figure1 : Répartition par âge au moment du diagnostic tumoral

La valeur moyenne de l'index mitotique dans la population est de 7 mitoses avec un écart type de 3, un minimum de 2 et un maximum de 30 mitoses. La population étudiée est regroupée en 7 classes selon les intervalles de valeurs de l'index mitotique. Ainsi, la distribution de cet index sur la population totale suit une loi normale avec une asymétrie à droite. D'où la majorité de la population a un index mitotique modéré (plus que 70% des patientes présentent un nombre de mitoses entre 4 et 12 mitoses). Seize patientes présentent un index mitotique faible (inférieur à 4) et 40 patientes ont un nombre important de mitoses (supérieur à 12) (Figure 2).

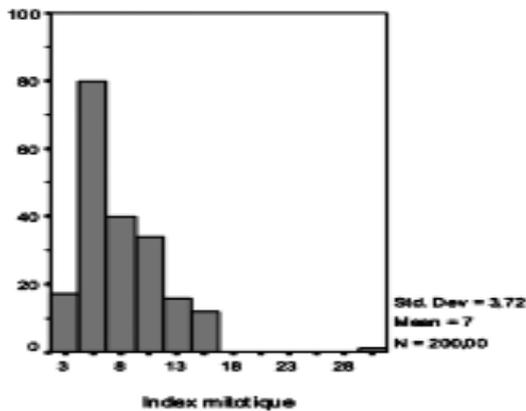


Figure 2 : Distribution de l'index mitotique sur la population étudiée.

Le score au Ki67 est le pourcentage de nombre total de cellules tumorales entrées dans le cycle cellulaire. La définition du pronostic repose sur un taux de cellules marquées compris entre 10% et 14%.

Dans notre étude la valeur moyenne de l'index prolifératif Ki67 de la population entière est de 18 % avec un écart type de 15 et varie entre 1 % et 100%. La population étudiée est regroupée en 6 classes, avec une distribution de la population plus importante (80%) pour les valeurs de ki 67 comprises entre 5% et 35%.

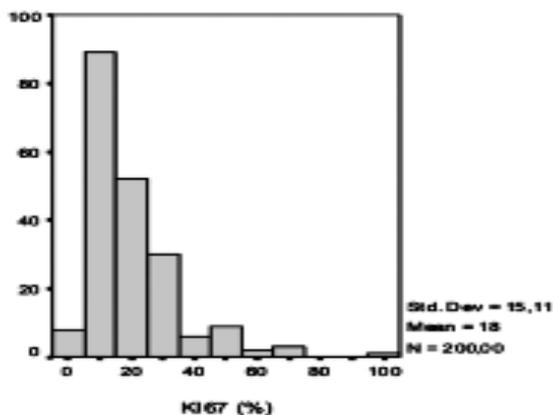


Figure 3 : Histogramme de la répartition de la population selon le Ki67

La figure 4 montre que la majorité des patientes étudiées avaient un grade 2. En effet, 9,6% des patientes présentent un grade 1, alors que 64% ont un grade 2 et 26,4% un grade 3.

Pour évaluer la relation index mitotique-grade et l'index Ki67-grade nous avons eu recours à la méthode de l'ANOVA (analyse de la variance) qui compare la dispersion de l'ensemble des observations.

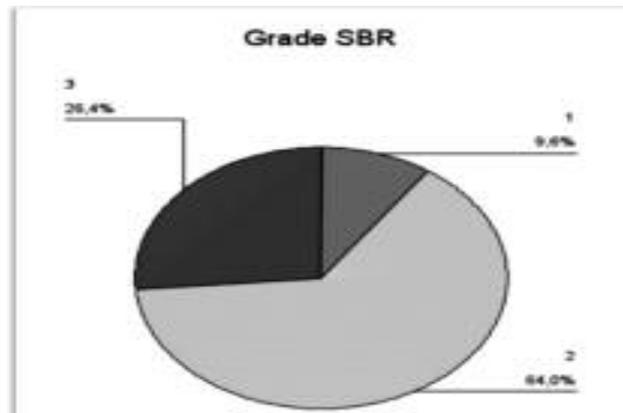


Figure 4 : Répartition de la population selon le grade SBR

Les figures 5 et 6 mettent en évidence la relation entre le grade SBR- IM et grade SBR-index Ki67.

La relation entre grade SBR et IM, bien qu'elle soit positive (les deux paramètres varient dans le même sens), n'est pas linéaire montrant que le degré d'association entre ces deux paramètres est faible. En contrepartie, une relation linéaire entre l'index de prolifération au Ki 67 et le grade SBR a été bien mise en évidence (fig 6). En effet, plus l'index au Ki67 augmente plus le grade SBR est élevé. Cette relation décrite forte indique que le Ki67 présente paramètre fiable pour la détermination du grade.

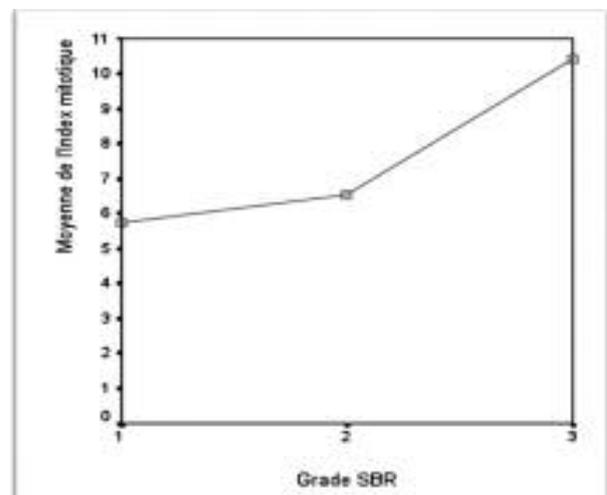


Figure 5 : Droite de la relation entre index mitotique et grade SBR

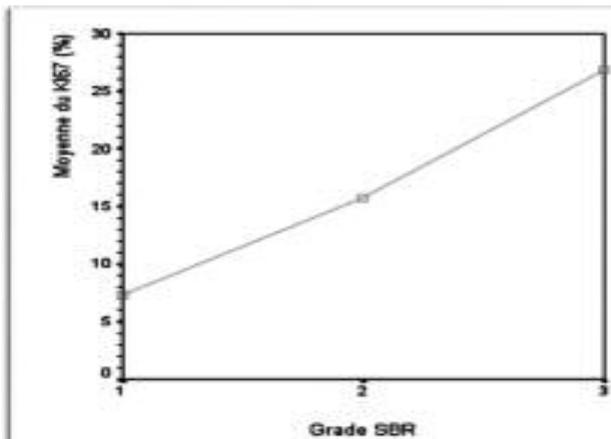


Figure 6 : Droite de la relation entre Ki67 et grade SBR

La figure 7 représente la variation de l'index de prolifération au Ki67 en fonction de l'index mitotique. L'analyse statistique montre une corrélation significative positive entre l'index Ki67 et l'index mitotique ( $p=0.004$  et Spearman rho =0.201>0) d'où la dépendance entre les deux variables.

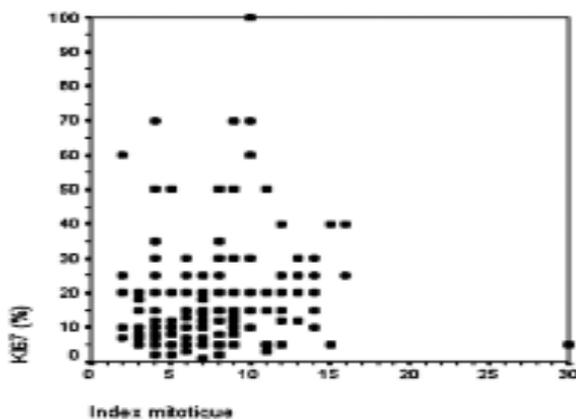


Figure 7 : Corrélation entre index mitotique et Ki67

L'analyse du graphique de dispersion montre que le nuage des points prend l'allure d'une ligne droite oblique pour des valeurs de Ki67 inférieur à 40%. La corrélation est alors forte et la relation est positive puisque le nuage s'étend de la partie inférieure gauche vers la partie supérieure droite. Au-delà de cette valeur (40%), les points sont dispersés exprimant une distribution aléatoire des observations les unes par rapport aux autres puisque chaque valeur de l'index mitotique ou de l'index au Ki67 correspond simultanément à plusieurs valeurs de la seconde variable. Ce sont les exceptions au modèle générale vu que peu de patientes présentent un index prolifératif supérieur à 40% et cette relation reste à confirmer par d'autres études.

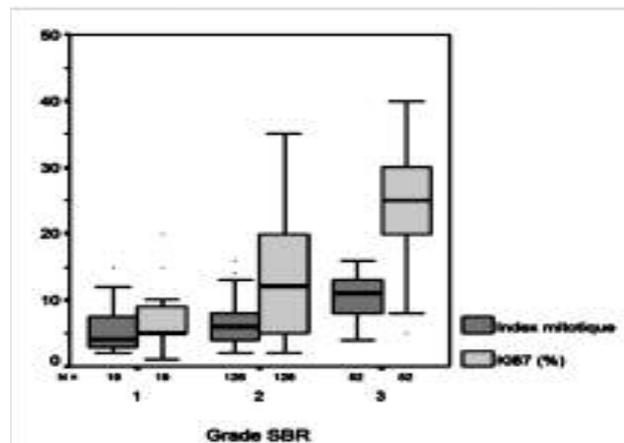


Figure 8 : Variabilité intra et inter groupes du Ki67 et de l'index mitotique selon les grades SBR.

La distribution des deux marqueurs selon le grade SBR est évaluée en utilisant le test d'ANOVA (fig 8). Ainsi, il montre une au sein de la même population. Pour le grade 1, la médiane est dans le bas de la boîte ce qui suppose une distribution dissymétrique vers les valeurs basses du Ki67 et index mitotique. Pour le Ki67, la moitié des patientes présente des valeurs supérieures à la médiane (5%). L'étendue interquartile ne varie pas et les moustaches sont asymétriques. En outre, la dispersion des nombres de IM observés supérieurs à la médiane est plus importante que celle inférieurs à la médiane.

Pour le grade 2, la distribution est plus allongée vers des valeurs plus élevés. La médiane est centrée dans la boîte qui est 7 pour l'IM et 13 pour le Ki67. L'écart interquartile est plus étalé pour Ki67 que pour IM avec des maximums respectifs de 35 et 13 et un minimum de 3. L'allure de la boîte représentant IM varie peu du grade 1 par rapport au grade 2 contrairement au Ki67.

La boîte à moustaches met clairement en évidence le fait que la dispersion des observations est beaucoup plus importante en haut de la médiane qu'à son bas (c'est-à-dire que la dispersion de la moitié des observations les plus grandes est beaucoup plus importante que celle de la moitié des observations les plus petites).

Pour le grade 3, le Ki67 présente une médiane centrée alors que la médiane de l'IM s'étend vers le haut de la boîte. De plus la valeur de la médiane est plus basse pour l'IM en le comparant à celle du Ki67.

L'étendue interquartile varie en fonction du grade et suit une augmentation continue. Les médianes évoluent aussi bien pour le Ki67 que pour IM. Les valeurs extrêmes changent d'une façon meilleure pour le Ki67 que pour l'IM. On note toutefois une grande variabilité des valeurs chez les patientes de grade 3 pour le Ki67 qui s'étale vers des valeurs plus élevées et très peu de variabilité pour leurs IM. D'une façon générale, le Ki67 représente une meilleure dispersion des observations autour de la

médiane (à l'exception des patientes à grade 1) qui s'apparente étroitement à sa variabilité. Ceci permet une meilleure définition du grade et permet d'éviter le chevauchement des valeurs seuils pour chaque grade. En outre, IM présente peu de variabilité au sein des grades 1, 2 et 3 ce qui rend ces derniers difficiles à déterminer.

## DISCUSSION

L'évaluation de l'index mitotique et du Ki67 sont deux méthodes complémentaires malgré que leurs significations soient différentes. Bien qu'il y ait des points forts, mais aussi des limites importantes envisagées envers l'index mitotique, à notre conception le Ki67 est le marqueur dynamique le plus fin. On peut s'en servir comme un facteur pronostique puissant et il peut être très utile pour l'appréciation de l'agressivité des tumeurs mammaires [10].

Les progrès exponentiels réalisés dans la compréhension des mécanismes qui précèdent l'apparition et la progression des cancers, ainsi que les avancées technologiques dans les méthodes d'analyse actuellement disponibles, permettent d'entrevoir une nouvelle ère dans la prise en charge des cancers du sein. Parmi ces méthodes, l'étude de la prolifération cellulaire comme étant un trait caractéristique du phénotype malin de ce cancer. L'index mitotique et le Ki67 sont des marqueurs des cellules proliférantes et constituent une étape incontournable du diagnostic, en permettant de formuler un pronostic et de définir une stratégie thérapeutique. Cependant, les méthodes utilisées pour évaluer ce processus posent encore un problème vu leurs diversités et leurs différences. Dans notre étude nous avons essayé de déterminer si le Ki67 pourrait substituer l'utilisation de l'index mitotique [11,12].

Notre étude effectuée sur 200 patientes atteintes de carcinome canalaire infiltrant met l'accent sur les deux marqueurs de prolifération afin de déterminer celui le plus fiable. Les résultats ont montré une forte corrélation entre les deux marqueurs ( $p=0.004$ ).

L'index mitotique représente la méthode primitive d'évaluation de la prolifération cellulaire. Il correspond au pourcentage de cellules cancéreuses en train de se diviser et qui est déterminé par le comptage du nombre de figures de mitose dans 10 champs consécutifs observés au fort grossissement sur une lame coloré par la simple technique d'Hématéine-Eosine. Et bien qu'aujourd'hui de très nombreuses techniques d'évaluation de la prolifération cellulaire soient disponibles, la facilité de cette technique est en grande partie responsable de son utilisation de routine en pratique histopathologique comme critère diagnostique et surtout pronostique. En effet, l'index mitotique représente l'un des paramètres essentiel permettant d'apprécier le grade SBR.

Il a été considéré en plus le facteur le plus performant pour prédire la survie [13]. Ainsi, de nombreuses études ont souligné le rôle crucial de cet index comme facteur pronostique et pour l'orientation de la thérapie. Un index mitotique élevé (au-delà de 14 mitoses) reflète une évolution péjorative de la maladie. En plus l'activité mitotique nous renseigne relativement sur l'hormonosensibilité ou la chimiosensibilité de la tumeur [1, 2].

Cependant, cette technique n'autorise qu'une évaluation, dans un tissu donné et à un moment précis, du nombre de cellules présentes en phase M du cycle cellulaire, seule phase morphologiquement identifiable par les modifications structurales de l'ADN qui la caractérisent.

Or cette phase représente la plus brève période du cycle cellulaire et la détermination de l'index mitotique peut, de ce fait, sous-estimer l'activité et le potentiel de prolifération véritable d'une tumeur donnée. Par ailleurs, l'identification, sans équivoque, des figures de mitose sur coupes tissulaires est parfois difficile et leur distinction avec des images d'hyperchromatisme nucléaire, de condensation, pycnotique voire avec des figures d'apoptose peut s'avérer impossible [12].

Enfin, une standardisation des techniques d'évaluation quantitative du nombre de figures de mitose présentes dans un tissu donné est nécessaire. Par ailleurs, plusieurs auteurs ont signalé le rôle crucial du grading SBR en pronostic. Toutefois, il n'existe pas dans notre étude une bonne corrélation entre l'index mitotique et le grade SBR surtout pour la population du grade 2 qui représente la majorité étudiée (64%).

Ensuite, la cinétique cellulaire d'une tumeur peut être évaluée par le Ki67 ouvrant des perspectives visant l'étude du degré de malignité cellulaire. Ainsi, la détection immunohistochimique de ce marqueur a été démontrée dans de très nombreuses études à visée pronostique essentiellement [1,11].

L'index prolifératif Ki67 fournit une information majeure sur le comportement des cellules qui composent la tumeur en indiquant le pourcentage de cellules engagées dans le cycle cellulaire. Sa fonction précise n'est pas connue mais il intervient dans la régulation de l'activité de transcription des gènes liés à la prolifération cellulaire [11] et participe dans la synthèse de Polymérase I ARNr dépendante.

Par ailleurs, le Ki67 est détecté dans les cellules en voie de multiplication au cours du cycle cellulaire (G1, S, G2 et M) mais n'est pas détecté dans les cellules quiescentes [12, 13].

Plusieurs études ont mis l'accent sur l'intérêt de son utilisation dans les carcinomes mammaires. Les utilisations possibles incluent le diagnostic, le pronostic, la prédiction de la réponse relative ou la résistance à la chimiothérapie ou à l'hormonothérapie, l'estimation du risque résiduel chez les patients sous thérapie particulièrement néo-adjuvante [12, 14].

L'évaluation de l'index prolifératif permet aussi d'affiner la classification moléculaire des carcinomes mammaires étant donné qu'un seuil de 14% différencie le Luminal A du Luminal B. Enfin, cette détection immunohistochimique de l'antigène Ki67 fournit un critère objectif complétant l'évaluation morphologique et aidant le thérapeute à choisir le moment optimal pour amorcer le traitement, et l'orienter vers le traitement le plus efficace afin de prédire la réponse. Toutefois, il n'existe pas de consensus sur les utilisations cliniques précises du Ki67 [12,13].

La forte corrélation que nous avons trouvée entre le score Ki67 et la répartition en grades histologiques suggère que la valeur pronostique de ces deux techniques dépend du même événement biologique qui est la prolifération. En fait, le système de grade histologique est construit à partir d'un paramètre de différenciation (formation glandulaire), l'aspect nucléaire et un paramètre de prolifération clair. Cela explique pourquoi l'indice Ki67 en est étroitement lié. En effet, pour les différents grades, les valeurs du Ki67 sont toujours supérieures à celles de l'index mitotique ce qui reflète la pertinence de ce marqueur et dans notre étude la forte corrélation entre le grade et le Ki67 confirme sa fiabilité comme un marqueur pronostique ce qui est concordant avec la littérature. De plus, la majorité de notre population est classée comme grade 2 avec un risque mal défini et des valeurs mitotiques confondus. Les valeurs bien basses du Ki67 sont particulièrement utiles pour sous-classer les tumeurs de grade 2.

Certes, la détermination du Ki67 par immunohistochimie est adoptée en raison de ses modes d'expression biologique particulièrement favorables et ses modalités d'analyses vigoureuses par rapport aux autres biomarqueurs mais divers contraintes limitent son

utilisation en pratique courante. En d'autres termes, plusieurs facteurs sont susceptibles d'intervenir dans la réactivité immunohistochimique et dans ses variations techniques. Cela est en particulier le cas du type de fixateur et de la durée de fixation des prélèvements, des techniques de traitement utilisées lors de l'inclusion, des méthodes de prétraitements des lames préalablement à la technique immunohistochimique (traitement par la chaleur...), et du mode opératoire de la technique immunohistochimique elle-même (anticorps utilisés, conditions d'incubation, utilisation de techniques d'amplification...) [13-16]. Ainsi, la variabilité intra et inter observateurs et l'absence d'un seuil de positivité bien déterminé sont en raison de l'absence de son utilisation comme facteurs pronostique indépendant. C'est pour cela que ces paramètres doivent être parfaitement standardisés en vue de garantir la qualité et la reproductibilité. Nous avons besoin alors d'uniformiser la phase pré-analytique, les techniques de coloration et les méthodes de comptage et de disposer des contrôles positifs et négatifs. Nous avons également besoin de standardiser la détermination du seuil [13, 17, 18].

---

## CONCLUSION

---

L'évaluation de l'index mitotique et du Ki67 sont deux méthodes complémentaires malgré que leurs significations soient différentes. Bien qu'il y ait des points forts, mais aussi des limites importantes envisagées envers l'index mitotique, à notre conception le Ki67 est le marqueur dynamique le plus fin. On peut s'en servir comme un facteur pronostique puissant et il peut être très utile pour l'appréciation de l'agressivité des tumeurs mammaires.

## Références

1. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol* 2010; 11(2): 174-83.
2. Contesso G, Mouriessse H., Friedman S, Genin J, Sarrazin D, Rouesse J. The importance of histologic grade in long term prognosis of breast cancer: a study of 1010 patients, uniformly treated at the Institut Gustave Roussy; *J Clin. Oncol* 1987; 5(9): 1378-86.
3. Spyrtos F, Ferrero-Poüs M, Trassard M, Hacène K, Phillips E, Tubiana-Hulin M and al. Correlation between MIB-1 and other proliferation markers: clinical implications of the MIB-1 cutoff value. *Cancer*. 2002 15;94(8):2151-9.
4. Cserni G, Vörös A, Liepniece-Karele I, Bianchi S, Vezzosi V4, Grabau D, Sapino A and al. Distribution pattern of the Ki67 labelling index in breast cancer and its implications for choosing cut-off values. *Breast*. 2014;23(3):259-63. doi: 10.1016/j.breast.2014.02.003. Epub 2014 Mar 7.
5. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *C. W. Elston & I. O. Ellis. Histopathology* 1991; 19: 403-10.
6. Frierson HF Jr, Wolber RA, Berean KW, Franquemont DW, Gaffey MJ, Boyd JC and al. Interobserver reproducibility of the Nottingham modification of the Bloom and Richardson histologic grading scheme for infiltrating ductal carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 1995;103(2):195-8.
7. Leher HA, Hansen KD, Coltera MD, Russ JC, Gown AM. Photoshop-based image analysis for the semiautomated assessment of Ki-67 defined proliferative activity in the routine diagnosis of the breast cancer. *Appl Immunohistochem* 1996;4 :117-27.
8. Verhoeven D1, Bourgeois N, Derde MP, Kaufman L, Buysens N. Comparison of cell growth in different parts of breast cancers. *Histopathology*. 1990;17(6):505-9.
9. Jannink I, van Diest PJ, Baak JP. Comparison of the prognostic value of four methods to assess mitotic activity in 186 invasive breast cancer patients: classical and random mitotic activity assessments with correction for volume percentage of epithelium. *Hum Pathol*. 1995 ;26(10):1086-92.
10. Bertucci F, Finetti P, Roche H, Le Doussal JM, Marisa L, Martin AL and al. Comparison of the prognostic value of genomic grade index, Ki67

- expression and mitotic activity index in early node-positive breast cancer patients. *Ann Oncol.* 2013;24(3):625-32.
11. Pascal ABBOUD .thèse de doctorat. Valeur pronostique de la ploïdie et de l'index de.- prolifération par double marquage MIB1-AgNORs dans le cancer du sein UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE,2007
  12. Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, A'Hern R and al .Prognostic value of Ki67 expression after short-term presurgical endocrine therapy for primary breast J Natl Cancer Inst. 2007 Jan 17;99(2):167-70.
  13. Mengel M, vonWasielewski R, Wiese B, Rüdiger T, Müller-Hermelink HK, Kreipe H and al. Inter-laboratory and inter-observer reproducibility of immunohistochemical assessment of the Ki-67 labelling index in a large multi-centre trial. *J Pathol.* 2002;198(3):292-9.
  14. Munakata S, Hendricks JB. Effect of fixation time and microwave oven heating time on retrieval of the Ki-67 antigen from paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem.* 1993; 41(8):1241-6.
  15. Arber DA. Effect of prolonged formalin fixation on the immunohistochemical reactivity of breast markers. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2002;10 (2):183-6.
  16. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S and al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2010; 134(6):907-22. doi: 10.1043/1543-2165-134.6.907.
  17. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer.* 1983 15; 31(1):13-20.
  18. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast.* 2008;17(4):323-34.