



**HAL**  
open science

## Contenu en ADN et texture de la chromatine des cellules tumorales mammaires humaines

Martina Opfermann

► **To cite this version:**

Martina Opfermann. Contenu en ADN et texture de la chromatine des cellules tumorales mammaires humaines. Modélisation et simulation. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 1987. Français. NNT : . tel-00323704

**HAL Id: tel-00323704**

**<https://theses.hal.science/tel-00323704>**

Submitted on 23 Sep 2008

**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.

# THESE

Présentée à

**L'UNIVERSITE SCIENTIFIQUE, TECHNOLOGIQUE  
ET MEDICALE DE GRENOBLE**

pour obtenir le titre de  
docteur de l'Université Scientifique, Technologique  
et Médicale de Grenoble

"BIOLOGIE"

par

**Martina OPFERMANN**

OOOOO

**CONTENU EN ADN ET TEXTURE DE LA CHROMATINE  
DES CELLULES TUMORALES MAMMAIRES HUMAINES**

OOOOO

**Thèse soutenue le 23 Janvier 1987 devant la commission d'examen.**

**P. CHIBON**

**Président**

**G. BRUGAL**

**F. GIROUD**

**E. SCHULTE**

**P. VASSILAKOS**

**Examineurs**



**UNIVERSITE SCIENTIFIQUE ET MEDICALE DE GRENOBLE**

**Année universitaire 1982-1983**

**Président de l'Université : M. TANCHE**

**MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT DE L'U.S.M.G.**

**(RANG A)**

**SAUF ENSEIGNANTS EN MEDECINE ET PHARMACIE**

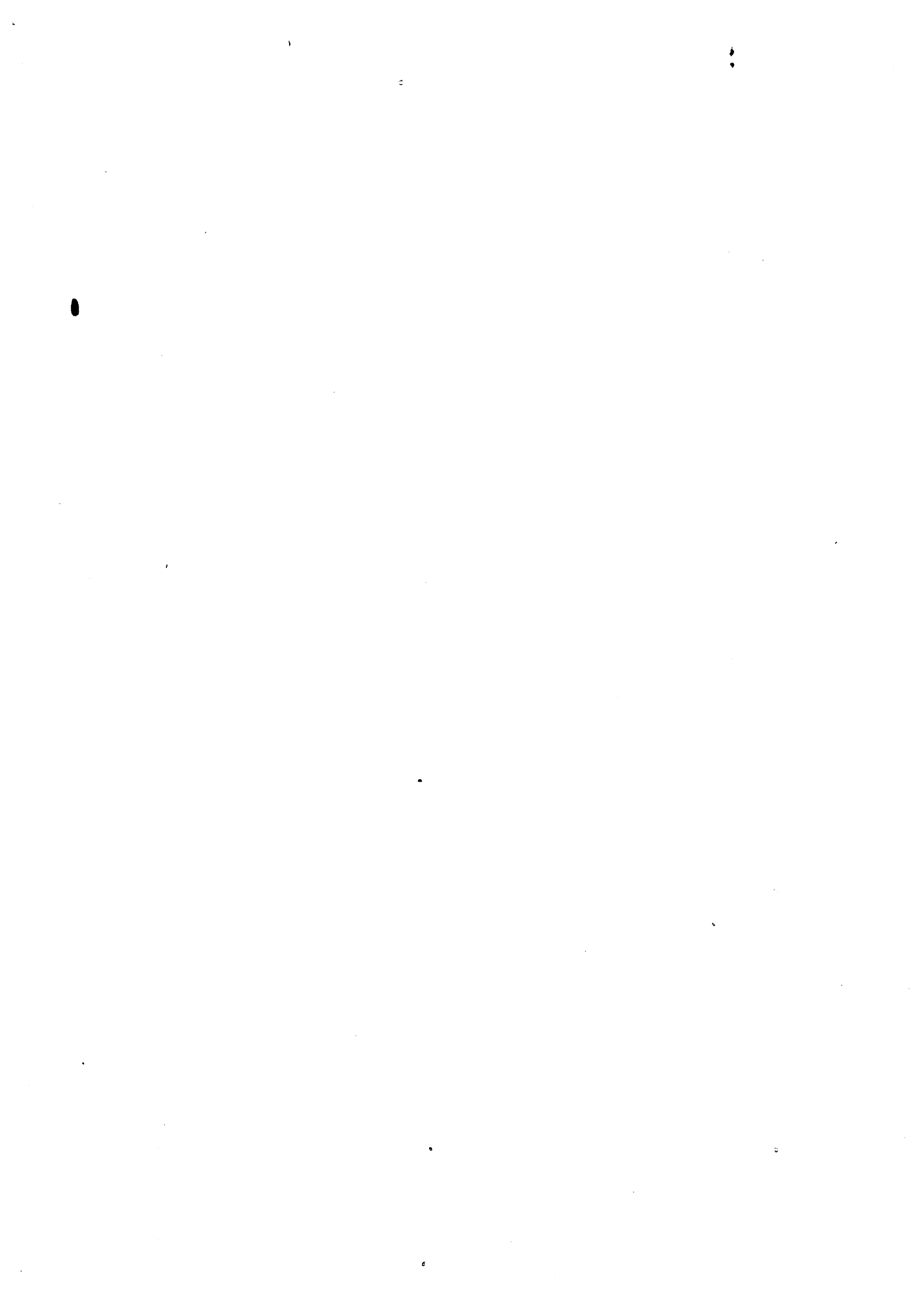
**PROFESSEURS DE 1<sup>ère</sup> CLASSE**

ARNAUD Paul	Chimie organique
ARVIEU Robert	Physique nucléaire I.S.N.
AUBERT Guy	Physique C.N.R.S.
AYANT Yves	Physique approfondie
BARBIER Marie-Jeanne	Electrochimie
BARBIER Jean-Claude	Physique expérimentale C.N.R.S. (labo de magnétisme)
BARJON Robert	Physique nucléaire I.S.N.
BARNOUD Fernand	Biosynthèse de la cellulose-Biologie
BARRA Jean-René	Statistiques - Mathématiques appliquées
BELORISKY Elie	Physique
BENZAKEN Claude (M.)	Mathématiques pures
BERNARD Alain	Mathématiques pures
BERTRANDIAS Françoise	Mathématiques pures
BERTRANDIAS Jean-Paul	Mathématiques pures
BILLET Jean	Géographie
BONNIER Jean-Marie	Chimie générale
BOUCHEZ Robert	Physique nucléaire I.S.N.
BRAVARD Yves	Géographie
CARLIER Georges	Biologie végétale
CAUQUIS Georges	Chimie organique
CHIBON Pierre	Biologie animale
COLIN DE VERDIERE Yves	Mathématiques pures
CRABBE Pierre (détaché)	C.E.R.M.O.
CYROT Michel	Physique du solide
DAUMAS Max	Géographie
DEBELMAS Jacques	Géologie générale
DEGRANGE Charles	Zoologie
DELOBEL Claude (M.)	M.I.A.G. Mathématiques appliquées
DEPORTES Charles	Chimie minérale
DESRE Pierre	Electrochimie
DOLIQUE Jean-Michel	Physique des plasmas
DUCROS Pierre	Cristallographie
FONTAINE Jean-Marc	Mathématiques pures
GAGNAIRE Didier	Chimie physique

.../...

GASTINEL Noël	Analyse numérique - Mathématiques appliquées
GERBER Robert	Mathématiques pures
GERMAIN Jean-Pierre	Mécanique
GIRAUD Pierre	Géologie
IDELMAN Simon	Physiologie animale
JANIN Bernard	Géographie
JOLY Jean-René	Mathématiques pures
JULLIEN Pierre	Mathématiques appliquées
KAHANE André (détaché DAFCO)	Physique
KAHANE Josette	Physique
KOSZUL Jean-Louis	Mathématiques pures
KRAKOWIAK Sacha	Mathématiques appliquées
KUPTA Yvon	Mathématiques pures
LACAZE Albert	Thermodynamique
LAJZEROWICZ Jeannine	Physique
LAJZEROWICZ Joseph-	Physique
LAURENT Pierre	Mathématiques appliquées
DE LEIRIS Joël	Biologie
LLIBOUTRY Louis	Géophysique
LOISEAUX Jean-Marie	Sciences nucléaires I.S.N.
LOUP Jean	Géographie
MACHE Régis	Physiologie végétale
MAYNARD Roger	Physique du solide
MICHEL Robert	Minéralogie et pétrographie (géologie)
MOZIERES Philippe	Spectrométrie - Physique
OMONT Alain	Astrophysique
OZENDA Paul	Botanique (biologie végétale)
PAYAN Jean-Jacques (détaché)	Mathématiques pures
PEBAY PEYROULA Jean-Claude	Physique
PERRIAUX Jacques	Géologie
PERRIER Guy	Géophysique
PIERRARD Jean-Marie	Mécanique
RASSAT André	Chimie systématique
RENARD Michel	Thermodynamique
RICHARD Lucien	Biologie végétale
RINAUDO Marguerite	Chimie CERMAV
SENGEL Philippe	Biologie animale
SERGERAERT Francis	Mathématiques pures
SOUTIF Michel	Physique
VAILLANT François	Zoologie
VALENTIN Jacques	Physique nucléaire I.S.N.
VAN CUTSEN Bernard	Mathématiques appliquées
VAUQUOIS Bernard	Mathématiques appliquées
VIALON Pierre	Géologie
<b>PROFESSEURS DE 2<sup>ème</sup> CLASSE</b>	
ADIBA Michel	Mathématiques pures
ARMAND Gilbert	Géographie

AURIAULT Jean-Louis	Mécanique
BEGUIN Claude (M.)	Chimie organique
BOEHLER Jean-Paul	Mécanique
BOITET Christian	Mathématiques appliquées
BORNAREL Jean	Physique
BRUN Gilbert	Biologie
CASTAING Bernard	Physique
CHARDON Michel	Géographie
COHENADDAD Jean-Pierre	Physique
DENEUVILLE Alain	Physique
DEPASSEL Roger	Mécanique des fluides
DOUCE Roland	Physiologie végétale
DUFRESNOY Alain	Mathématiques pures
GASPARD François	Physique
GAUTRON René	Chimie
GIDON Maurice	Géologie
GIGNOUX Claude (M.)	Sciences nucléaires I.S.N.
GUITTON Jacques	Chimie
HACQUES Gérard	Mathématiques appliquées
HERBIN Jacky	Géographie
HICTER Pierre	Chimie
JOSELEAU Jean-Paul	Biochimie
KERCKOVE Claude (M.)	Géologie
LE BRETON Alain	Mathématiques appliquées
LONGEQUEUE Nicole	Sciences nucléaires I.S.N.
LUCAS Robert	Physiques
LUNA Domingo	Mathématiques pures
MASCLE Georges	Géologie
NEMOZ Alain	Thermodynamique (CNRS - CRTBT)
OUDET Bruno	Mathématiques appliquées
PELMONT Jean	Biochimie
PERRIN Claude (M.)	Sciences nucléaires I.S.N.
PFISTER Jean-Claude (détaché)	Physique du solide
PIBOULE Michel	Géologie
PIERRE Jean-Louis	Chimie organique
RAYNAUD Hervé	Mathématiques appliquées
ROBERT Gilles	Mathématiques pures
ROBERT Jean-Bernard	Chimie physique
ROSSI André	Physiologie végétale
SAKAROVITCH Michel	Mathématiques appliquées
SARROT REYNAUD Jean	Géologie
SAXOD Raymond	Biologie animale
SOUTIF Jeanne	Physique
SCHOOL Pierre-Claude	Mathématiques appliquées
STUTZ Pierre	Mécanique
SUBRA Robert	Chimie
VIDAL Michel	Chimie organique
VIVIAN Robert	Géographie



## AVANT-PROPOS

Mes remerciements les plus sincères s'adressent à Monsieur le Professeur BRUGAL qui m'a témoigné sa confiance en dirigeant mon travail. Son énergie et son enthousiasme resteront pour moi un exemple. Je lui suis très reconnaissante pour le temps qu'il m'a consacré. En plus de sa compétence professionnelle, son soutien amical m'a été très précieux.

Je remercie Monsieur le Docteur VASSILAKOS de m'avoir accueillie au Centre de Cytologie et Dépistage du Cancer à Genève, et de m'avoir offert un cadre de recherche très enrichissant. Je le remercie aussi de m'avoir initiée à la cytologie médicale et conseillée dans mes recherches.

Je tiens à remercier très sincèrement Monsieur le Professeur CHIBON pour l'intérêt qu'il a manifesté au long de ma formation à l'Université de Grenoble et d'avoir accepté d'être membre du jury.

Je remercie Madame le Docteur GIROUD, qui m'a initiée à la recherche pendant mon D.E.A. et qui m'a aidée en de nombreuses occasions pour conduire à terme ce travail. Les discussions fructueuses que nous avons eues et son amitié m'ont souvent encouragée. Je la remercie également d'avoir accepté d'être membre du jury.

Je remercie Monsieur le Docteur SCHULTE d'avoir accepté de s'intéresser à mon travail et d'être membre du jury.

Je remercie très sincèrement Monsieur le Docteur ALBE pour sa disponibilité et son aide et j'ai apprécié l'efficacité avec laquelle il a résolu les problèmes informatiques et techniques qui se sont posés au cours de mon travail.

Je tiens à remercier chaleureusement Madame Christiane SAYOT-ISENSCHMID de son assistance technique et sa participation à la réalisation de ce document.

Je remercie également tous mes collègues du Centre de Cytologie qui m'ont aidée à des titres divers dans mon travail.

Mes remerciements s'adressent également aux membres de l'Equipe de Microscopie Quantitative de Grenoble qui m'ont accordé leur sympathie, en particulier Madame le Docteur BRUGAL qui m'a de plus fourni la plupart des références bibliographiques et Madame P. SOUILLARD qui s'est chargée de toutes les tâches administratives.





## SOMMAIRE

RESUME .....	
=====	
A. INTRODUCTION .....	1
=====	
B. MATERIEL ET METHODES .....	15
=====	
<u>B.I. MATERIEL BIOLOGIQUE</u> .....	15
1. Cas rétrospectifs .....	15
1.1. Provenance	
2. Cas prospectifs .....	17
2.1. Provenance	
2.2. Préparation	
<u>B.II. MATERIEL INFORMATIQUE</u> .....	19
1. Système d'analyse .....	19
1.1. Organisation du système	
1.2. Déroulement de l'analyse d'une lame	
1.3. Programmes d'applications utilisés	
1.4. Paramètres mesurés	
2. Programmes de traitement des données .....	29
2.1. Programmes disponibles sur le processeur externe (SIRIUS)	
2.2. Programmes disponibles sur l'ordinateur APOLLO	
<u>B.III. METHODE D'ANALYSE DES DONNEES</u> .....	33
1. Ploïdie .....	33
1.1. Normalisation	
1.2. Classification des histogrammes selon AUER	
1.3. Méthode des intervalles de ploïdie	
1.4. Calcul de l'indice de ploïdie et de l'indice de prolifération	
1.5. Séparation de groupes par analyse discriminante	
2. Taille et texture nucléaire .....	38
2.1. Matrice de corrélation	
2.2. Analyse monoparamétrique	
2.2.1. Histogrammes des paramètres	
2.2.2. Moyennes et écart-types des paramètres	

2.3. Analyse multiparamétrique	
2.3.1. Différents plans d'ACP	
2.3.2. Méthodes d'analyse d'un plan d'ACP	
C. ANALYSE DE LA PLOIDIE .....	43
=====	
C.I. RESULTATS .....	43
C.I.I. DIVERSITE DES TUMEURS .....	43
1. Etude rétrospective .....	43
1.1. Lymphocytes	
1.2. Classification selon AUER	
1.3. Méthode des intervalles	
1.4. Indice de ploïdie et indice de prolifération	
2. Etude prospective .....	47
2.1. Lymphocytes	
2.2. Méthode des intervalles	
2.3. Indice de ploïdie et indice de prolifération	
C.I.II. SIGNIFICATION CLINIQUE .....	50
1. Etude rétrospective .....	50
1.1. Classification selon AUER	
1.2. Analyse en composante principale fondée sur les histogrammes synthétiques	
1.3. Analyse discriminante décisionnelle fondée sur les dix valeurs de ploïdie	
1.4. Indice de ploïdie et indice de prolifération	
1.5. Corrélations avec les données cliniques	
1.6. Aspect des histogrammes de ploïdie	
2. Etude prospective .....	54
2.1. Analyse en composante principale fondée sur les histogrammes synthétiques	
2.2. Analyse discriminante décisionnelle fondée sur les dix valeurs de ploïdie	
2.3. Indice de ploïdie et indice de prolifération	
2.4. Corrélations avec les données cliniques	
C.II. DISCUSSION .....	57
D. ANALYSE DE LA TAILLE ET DE LA TEXTURE NUCLEAIRE .....	75
=====	
D.I. RESULTATS .....	75
D.I.I. DIVERSITE DES TUMEURS .....	75

1. Matrice de corrélation .....	75
2. Analyse monoparamétrique .....	76
2.1. Histogrammes	
2.2. Moyennes et écart-types des paramètres nucléaires	
3. Analyse multiparamétrique par ACP .....	78
3.1. Différents plans d'ACP	
3.2. Analyse du plan d'ACP impliquant les paramètres SODH, CVAR et RLD	
D.I.II. SIGNIFICATION CLINIQUE .....	84
1. Etude rétrospective .....	84
1.1. Analyse monoparamétrique	
1.1.1. Corrélations	
1.1.2. Histogrammes	
1.1.3. Moyennes et écart-types	
1.2. Analyse multiparamétrique	
2. Etude prospective .....	88
2.1. Analyse monoparamétrique	
2.1.1. Corrélations	
2.1.2. Histogrammes	
2.2.2. Moyennes et écart-types	
2.2. Analyse multiparamétrique	
D.II. DISCUSSION .....	92
E. CONCLUSIONS ET HYPOTHESES .....	101
=====	
FIGURES ET TABLEAUX .....	105
=====	
REFERENCES .....	165
=====	



à mes Parents



## RESUME

Les populations cellulaires de 158 tumeurs mammaires (41 cas rétrospectifs et 117 cas prospectifs) ont été caractérisées par analyse d'image de frottis colorés par la réaction de Feulgen. Dans chaque tumeur, 200 à 500 noyaux ont été représentés par 15 paramètres décrivant le contenu en ADN (ploïdie), la taille et la texture de la chromatine. Ces données ont permis de décrire de façon objective et quantitative les profils cytologiques des tumeurs du sein et de rechercher leurs corrélations avec les données cliniques conventionnelles (taille de la tumeur, âge des patientes, nombre de ganglions métastatisés, taux de récepteurs hormonaux). Diverses méthodes permettant de rendre les analyses multifactorielles usuelles indépendantes de l'échantillonnage ont été développées.

Ces travaux ont montré que l'histogramme de distribution des cellules tumorales en fonction de leur quantité d'ADN permet de classer correctement 86% des 41 cas rétrospectifs selon la durée de leur survie après le premier diagnostic (inférieure à 5 ans ou supérieure à 10 ans) ; cependant, certaines patientes ont des tumeurs de ploïdie identiques malgré la grande différence de leur durée de survie.

De grandes différences entre tumeurs ont aussi été observées à l'égard des caractères morphologiques et texturaux de la chromatine. Les corrélations entre les paramètres texturaux et les données cliniques sont en général faibles. Par contre, la fréquence de certains types nucléaires, définis par analyse multifactorielle non supervisée, est significativement corrélée ( $p < 0,05$ ) avec la durée de survie et le nombre de métastases axillaires.

En conclusion, l'analyse d'image est une méthode utile pour la caractérisation objective des populations cellulaires tumorales dans les cancers du sein. la prise en compte d'un nombre plus important de ces cas analysés selon des protocoles et des méthodes standardisés est nécessaire pour évaluer la signification pronostique des paramètres nucléaires ou de la fréquence de certains types nucléaires.





## ABSTRACT

The cell populations of 158 breast tumors (41 retrospective cases and 117 prospective cases) were characterized by image analysis using cytologic preparations stained by the Feulgen reaction. For every tumor 200 to 500 cell nuclei were represented by 15 parameters which described the DNA content (ploidy), the size and the texture of the chromatin. Based on these data, an objective and quantitative cytologic profile was established for each tumor. The correlation between the objective cytologic profile and conventional clinical data including patient age, tumor size, the number of axillary lymph node metastases, and the concentration of estrogen and progesterone receptors, was evaluated. Different methods of data analysis were developed to render the usual multivariate analysis independent of the sample considered.

Using DNA histograms parameters 86% of the retrospective patients were correctly classified according to their survival time into either a short survival (less than 5 years) or a long survival (greater than 10 years) group. However, some patients with tumors having an identical DNA histogram had widely different survival times.

When the series of tumors was evaluated according to the texture of chromatin, large differences were observed between individual tumors. The correlation between individual parameters of texture and clinical data were poorly significant. However, a significant correlation ( $p < 0,05$ ) was observed between the frequency of specific nuclear types in individual tumors as defined by non-supervised multivariate analysis and the presence of axillary lymph node metastases and survival.

In conclusion, the techniques of image analysis represent a useful method to objectively characterize tumor cell populations in breast cancer. A greater number of cases prepared by a standardized method will be necessary to evaluate the prognostic significance of nuclear parameters and of the frequency of specific nuclear types in individual tumors.



## A. INTRODUCTION

=====

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme dans les pays occidentaux. La probabilité de développer un cancer du sein est estimée à 1/14 (Zdeb, 1977). Des études plus récentes estiment même qu'une femme sur 11 ou 12 serait atteinte (Kelsey et Hildreth, 1983).

### I. Histologie du cancer du sein

La plupart des cancer du sein sont d'origine épithéliale. Il s'agit donc de carcinomes parmi lesquels les pathologistes distinguent plus de vingt types différents (World Health Organization ; 1981). Dans trois quart des cas il s'agit de carcinomes canaliculaires invasifs.

Certains types histologiques se révèlent d'un pronostic plus favorable que d'autres (Gallager, 1984). Ce sont, par exemple, les carcinomes mucineux, les carcinomes médullaires, les carcinomes tubuleux et les carcinomes sécrétants considérés comme moins agressifs que les carcinomes canaliculaires.

#### **Carcinome mucineux du sein**

Dans la plupart des cas le carcinome mucineux est bien différencié. L'image histologique est caractérisé par de grandes quantités de mucus dans l'espace extraluminal. Si ce type de cancer est concomitant avec un carcinome de type canaliculaire invasif, le pronostic est moins favorable.

### **Carcinome médullaire**

Ce type est formé d'un mélange de lymphocytes, et de cellules épithéliales peu différenciées.

### **Carcinome tubuleux**

Cette forme est bien différenciée et caractérisée par la présence de tubules néoplasiques ; elle est considérée comme peu stable.

### **Carcinome sécrétant**

Ce type rare apparaît surtout chez les enfants et les adolescents. Il est formé de cellules présentant une intense activité sécrétoire du même type que celle observée au cours de la grossesse et de la lactation.

### **Carcinomes métaplasiques**

Il s'agit de carcinomes identifiables par ailleurs comme carcinomes canaliculaires infiltrants qui présentent de remaniements métaplasiques de type épidermoïde, de type à cellules fusiformes, de type chondroïde, de type osseux ou de type mixte.

D'autres types rares sont le carcinome adénoïde kystique, le carcinome papillaire, le carcinome apocrine et le carcinome lobulaire.

Le carcinome inflammatoire est considéré comme un syndrome clinique plutôt que comme un type histologique ; il s'agit d'un cancer très

agressif.

## II. Les bases cellulaires des cancers du sein

Les principales étapes vers la malignité sont l'acquisition de la capacité d'invasion suivie de la formation de métastases (Mareel et Van Roy, 1986). Ceci implique une certaine capacité de prolifération que l'on constate également dans les tumeurs bénignes. La dépendance entre la transformation maligne et l'activité proliférative réside au moins dans l'amplification du (ou des) clone(s) malin(s) qui est responsable de la croissance de la tumeur et de son comportement parfois invasif. Cette hypothèse implique une palette de gènes responsables de l'invasion, de la métastatisation et de la prolifération des cellules. L'activation de ces gènes pourrait résulter d'une instabilité génotypique provoquée par des oncogènes. Ceci expliquerait aussi la grande hétérogénéité des cancers du sein.

Des analyses caryologiques n'ont pas mis en évidence d'anomalie chromosomique commune à tous les cancers mammaires ; cependant, certains chromosomes (numéro 1, 11, 6 et 7) semblent d'être impliqués plus souvent que d'autres (Whang-Peng et al., 1983).

## III. Facteurs pronostiques

### **1. Type histologique**

La corrélation entre le type histologique d'un cancer du sein et le pronostic est faible (cf A. I.). Pourtant, la formulation d'un pronostic est nécessaire à la sélection des malades qui doivent

recevoir une chimiothérapie destinée à prévenir la croissance des métastases. En raison des complications secondaires qu'elle provoque, la chimiothérapie n'est appliquée qu'aux patientes dont le pronostic est mauvais.

## 2. Nombre de ganglions axillaires métastatisés

Un facteur pronostique reconnu comme significatif est la présence de métastases dans les ganglions axillaires. Certains auteurs rapportent une corrélation entre l'augmentation de la fréquence des rechutes et le nombre de métastases ganglionnaires (Bulbrook, 1983). D'autres auteurs (Contesso et al., 1977) précisent qu'au delà d'un seuil de quatre ganglions métastatisés, le pronostic s'aggrave. Par contre, aucune variation significative de la durée de survie n'a été démontrée entre les cas ayant 0, 1, 2 ou 3 ganglions métastatisés. (Fisher, 1984).

## 3. Taille de la tumeur

La signification pronostique de la taille d'une tumeur du sein est contestée.

Contesso et al.(1977) ont constaté que la moyenne du temps de survie des malades diminue lorsque la taille de la tumeur primaire augmente. La taille de la tumeur évaluée sur la pièce opératoire aussi bien que la taille clinique déterminée par palpation sont corrélées avec le pronostic: ainsi Némoto et al.(1980) ont rapporté une probabilité de métastases axillaires croissante avec la taille clinique de la tumeur mais 25% des malades ayant des tumeurs plus petites que 1 cm ont également des métastases axillaires.

Par contre, d'autres auteurs tels que Sears et al.(1982) n'ont pas observé de variation de la durée de rémission en fonction de la taille de la tumeur, ceci après étude de 275 malades dépourvus de métastases axillaires. D'autre part, Fisher et al.(1983) ont montré que les tumeurs de taille différente semblent répondre de la même manière à un traitement par chimiothérapie.

#### 4. Degré histologique

Il existe plusieurs protocoles pour déterminer le degré histologique d'une tumeur du sein. Le plus utilisé est celui de Bloom et Richardson (1957). Cette évaluation histologique de la tumeur tient compte de trois critères:

- \* le degré de différenciation de la tumeur (formation de tubules notamment);
- \* l'activité mitotique;
- \* le pléomorphisme des noyaux cellulaires (grande variabilité de la taille, de la forme et de la structure).

Trois degrés sont définis à partir de ces critères. Bien qu'il s'agisse d'une classification subjective, des corrélations avec certains facteurs cliniques et avec la survie ont été rapportées (Contesso et al., 1977 ; Stosiek et Breitbart, 1983 ; Sharkey et al., 1983).



## 5. Récepteurs hormonaux

### a. Intérêt thérapeutique

Le traitement du cancer du sein par stérilisation (ovarectomie) ou par administration d'anti-oestrogènes (i.e. tamoxifène) n'est suivi d'effets que chez un tiers des malades (Knight et al., 1977). Actuellement, toutes les malades dont les cellules tumorales présentent des récepteurs aux oestrogènes reçoivent des traitements anti-hormonaux.

Environ 60 à 70% des tumeurs présentent des récepteurs aux oestrogènes mais la moitié seulement de ces cas répond à un traitement anti-hormonal. Paradoxalement, 10% des malades dont la tumeur est dépourvue de récepteurs aux oestrogènes répondent quand même à un traitement anti-hormonal (Pouillart et al., 1984 ; Saez et al., 1984).

Les récepteurs aux oestrogènes sont détectables biochimiquement sur la tumeur. La méthode la plus répandue pour la quantification des récepteurs hormonaux est le "radio-immuno-assay": le tissu est incubé en présence d'hormone marquée par un isotope ; l'hormone qui n'est pas fixée aux récepteurs est ensuite adsorbée sur "dextran-coated charcoal". La quantité d'hormone fixée par le tissu est proportionnelle au taux des récepteurs (Leclerc, 1984).

### b. Intérêt pronostique

Outre son utilité dans la sélection des malades susceptibles d'un traitement anti-hormonal, la présence des récepteurs hormonaux dans le

tissu tumoral est un facteur pronostique: les malades qui n'ont pas de récepteur ont un risque plus élevé de rechute et un temps de survie en moyenne plus court que les malades qui en sont pourvus (Howart et al., 1985). D'autre part, la présence de récepteurs aux oestrogènes est corrélée avec la prolifération cellulaire: l'activité proliférative est plus élevée dans les tumeurs qui n'ont pas de récepteur aux oestrogènes comme l'ont montré diverses expériences fondées sur le marquage par la thymidine tritiée (Silvestrini et al., 1984).

L'analyse des récepteurs à la progéstérone est pratiquée moins souvent que l'analyse des récepteurs aux oestrogènes. La synthèse des récepteurs à la progéstérone par une cellule est sous la dépendance des oestrogènes. La présence de récepteurs à la progéstérone est corrélée avec un temps de rémission plus long. (Meyer et Hixon, 1979).

#### c. Action du tamoxifène

Le tamoxifène est un antibiotique capable d'entrer en compétition avec les oestrogènes pour la liaison aux récepteurs et/ou aux transporteurs hormonaux. La cellule traitée par cette drogue devient donc insensible aux oestrogènes circulants (Rose et Mouridsen, 1984).

L'inhibition de la croissance de cellules dépourvues de récepteurs aux oestrogènes par tamoxifène indique qu'en plus de son activité anti-oestrogénique le tamoxifène agit sur d'autres cibles. Guille et Arnstein (1986) ont trouvé une inhibition de la translation d'ARNm dans des cellules traitées par le tamoxifène. Cet effet est indépendant de la présence de récepteurs aux oestrogènes et de la présence d'oestradiol. Les auteurs ont conclu qu'une partie de l'action du tamoxifène sur des cellules tumorales est due à la réduction de la

synthèse des protéines, qui provoque ainsi une diminution de la croissance de la tumeur.

#### d. Conclusion

Le dosage des récepteurs hormonaux est donc d'un intérêt évident et peut influencer sur le choix thérapeutique. Cependant, l'interprétation des dosages biochimiques des récepteurs hormonaux est compliquée par le fait que les populations cellulaires tumorales du sein sont souvent hétérogènes et constituées à la fois de cellules dépendantes des hormones et de cellules qui ne le sont pas.

### IV. Cinétique cellulaire des cancers du sein

Les caractéristiques cinétiques des cancers du sein sont parmi les plus étudiés (Gentili et al., 1981). Le but de ces études est de comprendre et de quantifier les événements dynamiques qui président à la croissance de la population tumorale: prolifération, différenciation, migration et mortalité cellulaire (Aherne et al., 1977).

#### 1. Indice de marquage

Le paramètre cinétique le plus couramment mesuré est l'indice de marquage par la thymidine tritiée. Gentili et al. (1981) ont observé pour 541 tumeurs du sein des corrélations entre l'indice de marquage et l'âge des malades. L'indice de marquage est plus élevé chez les malades en pré-ménopause que chez les malades en post-ménopause. Une différence de l'indice de marquage moyen entre malades à bon pronostic et malades

à mauvais pronostic n'est trouvée que chez des patientes en préménopause.

Par contre, cet indice n'est corrélé ni avec la taille de la tumeur ni avec le nombre de métastases axillaires.

Le manque de corrélation entre l'indice de marquage et la taille de la tumeur peut résulter de la difficulté à trouver des paramètres cinétiques qui rendent compte de la croissance d'une tumeur. Cette croissance dépend en effet de la mortalité cellulaire, des pertes par émigration, de la durée du cycle et du coefficient de prolifération. Ces données sont souvent difficiles à obtenir avec précision en raison des biais d'échantillonnage dans les tumeurs mammaires souvent hétérogènes (prélèvements sur la tumeur, cellules analysées sur les frottis...).

Meyer et al.(1983), après analyse de 278 cas de cancers du sein, ont trouvé des différences significatives de l'indice de marquage entre des patientes ayant des pronostics différents et indépendamment de l'âge des malades. De plus, l'indice de marquage est corrélé avec le type histologique et le taux de récepteurs hormonaux. Cette étude a confirmé l'absence de corrélation entre la taille des tumeurs et l'indice de marquage bien que les mêmes auteurs aient rapporté une tendance vers une telle corrélation dans des articles antérieurs (idem, Meyer et Bauer, 1975 ; Meyer et Hixon, 1979).

Schiffer et al.(1979) ont analysé la variabilité de l'indice de marquage par tumeur. Ils ont trouvé une différence maximale entre échantillons d'une même tumeur de 36% en moyenne et pouvant atteindre 72%. Ces auteurs ont donc démontré le manque de signification des valeurs moyennes de l'indice de marquage et par conséquent les erreurs pouvant résulter de son utilisation comme facteur pronostique. Pour

pallier ces difficultés, Strauss et Moran (1980) ont proposé la mesure de trois échantillons par tumeur pour obtenir l'indice de marquage avec une précision de  $\pm 33\%$ .

## 2. Reconnaissance des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire

Par les méthodes de cytométrie en flux et de cytométrie à balayage, il est possible de mesurer le contenu individuel en ADN des cellules. Beaucoup d'auteurs ont utilisé ces méthodes pour déterminer la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouvent les cellules tumorales. Le mode majeur de l'histogramme d'ADN est considéré comme représentant des cellules en phase G1 ou G0 ayant un contenu en ADN de 2c. Une cellule ayant le double de ce contenu est dite en phase G2 ou M (contenu en ADN de 4c). Les cellules ayant un contenu intermédiaire sont en phase S (Olszewski et al., 1981 ; Bedrossian et al., 1981 ; Chassevent et al., 1984).

La plupart des auteurs expriment la quantité d'ADN d'une cellule en terme de ploïdie: une cellule ayant un contenu en ADN correspondant à la référence diploïde est dite diploïde, une cellule ayant le double de ce contenu en ADN est dite tétraploïde (Fossa et al., 1982 ; Hedley et al., 1984). Cette nomenclature ne correspond pas à une définition biologique correcte (Bradbury et al., 1981; Alberts et al., 1983). Une cellule tétraploïde est une cellule contenant deux chromosomes d'origine paternelle et deux chromosomes d'origine maternelle de chaque type. Ainsi, une cellule diploïde en phase de G2 reste diploïde, bien qu'elle ait le double du contenu en ADN d'une cellule diploïde en phase G1 ou G0. La mesure de l'ADN ne permet donc pas de déterminer la

ploïdie d'une cellule au sens strict de ce terme. Corrélativement, le terme "aneuploïdie" est souvent utilisé d'une manière déroutante dans de nombreux travaux. Il devrait être réservé pour qualifier des cellules dont le nombre de chromosomes ne correspond pas à un multiple entier du nombre haploïde. L'aneuploïdie est due soit à des chromosomes supplémentaires (trisomies), soit à des pertes de chromosomes (monosomies).

Dans le cas de délétions ou de translocations de chromosomes, on ne peut pas parler d'aneuploïdie bien que le contenu en ADN puisse être modifié. Ainsi une cellule ayant un contenu en ADN correspondant à  $3c$  peut donc être soit une cellule triploïde (donc euploïde) en phase G1/G0, soit une cellule diploïde (euploïde) en phase S, soit une cellule aneuploïde en phase G1/G0 avec quelques chromosomes supplémentaires soit une cellule tétraploïde G1/G0 avec des délétions sévères, soit une cellule diploïde en G2 avec des délétions. Des cellules ayant le même contenu en ADN peuvent donc avoir des degrés de ploïdie différents et inversement. Ainsi, déterminer la ploïdie d'une cellule sur la seule base de son contenu en ADN n'est possible que si les populations cellulaires examinées sont homogènes et ne présentent que des pics distincts dans l'histogramme d'ADN. Ce n'est pas le cas pour la plupart des cancers du sein comme l'ont montré les analyses chromosomiques (Rodgers et al., 1984 ; Trent, 1985): des cellules des cancers du sein présentent souvent des nombres variables de chromosomes dans une même tumeur.

Outre son contenu en ADN, la texture de la chromatine d'une cellule change au cours du cycle cellulaire. En effet, la chromatine est fortement décondensée en phase de synthèse d'ADN. Ensuite, pendant la mitose, la condensation de la chromatine atteint son maximum avec

l'apparition des chromosomes. Le processus de décondensation débute pendant la télophase et se poursuit jusqu'à la fin de la phase G1 où la décondensation est maximale (Roa et Hanks, 1980 ; Giroud, 1982).

Dans des populations homogènes, les méthodes de cytométrie à balayage permettent d'identifier les différentes phases du cycle cellulaire en utilisant des paramètres qui décrivent à la fois la texture de la chromatine et le contenu en ADN des cellules. (Giroud, 1982 ; Brugal, 1984 ; Brugal et al., 1985).

#### V. Apport des méthodes d'analyse d'image

Les connaissances concernant la biologie des tumeurs du sein, et en particulier leur agressivité, restent essentiellement phénoménologiques et fondées sur des études de cas dans un contexte clinique.

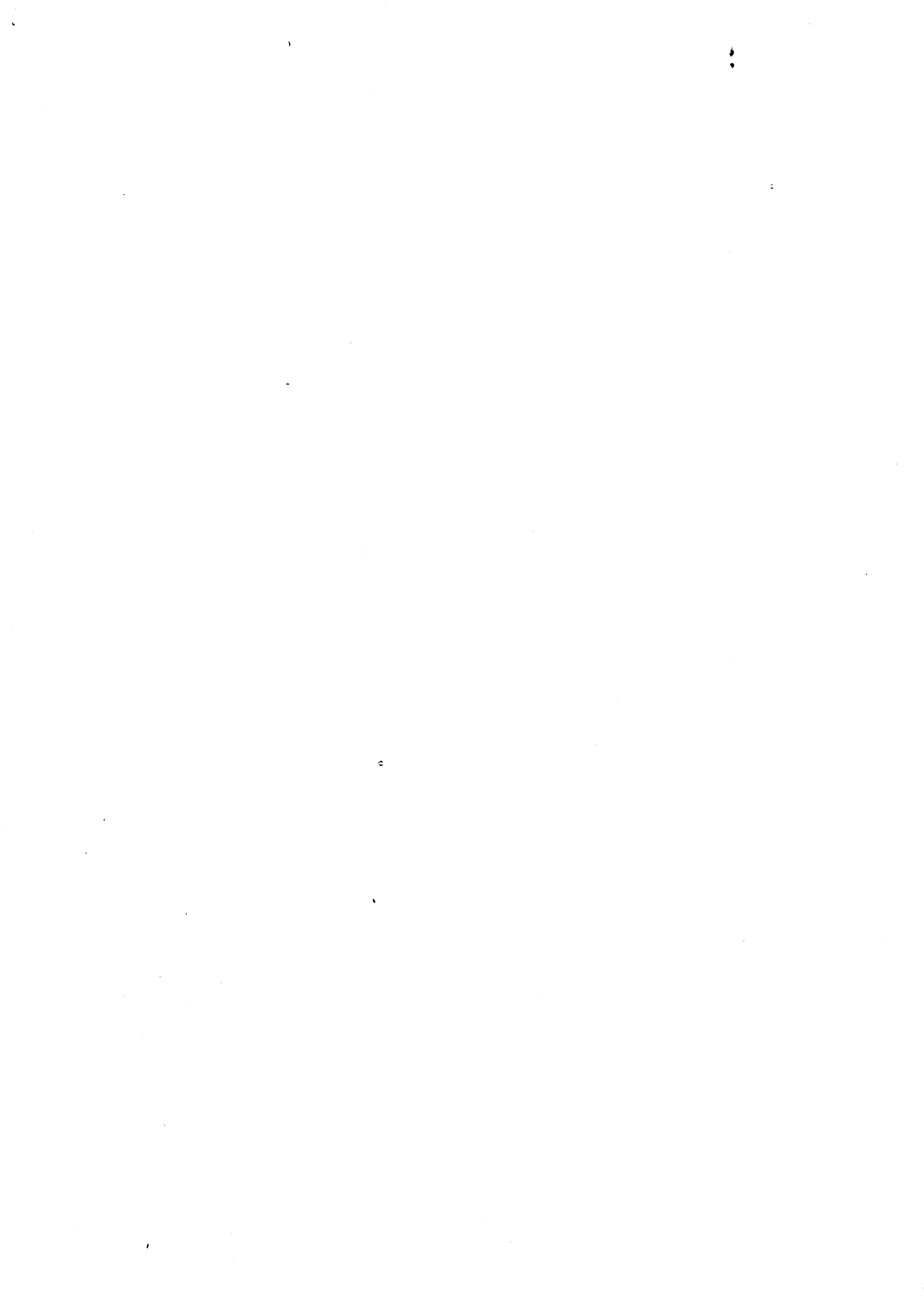
Il est donc nécessaire de tenter de discriminer, parmi les différents facteurs pronostiques, quels sont ceux qui dépendent directement des caractéristiques biologiques des cellules malignes et ceux qui dépendent des relations entre l'hôte, sa tumeur et la thérapeutique utilisée.

L'étude que nous avons entreprise n'a donc concerné que des tumeurs primaires du sein pour lesquelles nous avons tenté d'obtenir un relevé quantitatif et objectif des caractéristiques cellulaires, cellule à cellule. A cette fin, nous avons utilisé les méthodes de l'analyse d'image qui permettent de mesurer des paramètres morphométriques liés à l'état de différenciation des cellules et des paramètres densitométriques représentant la quantité et la concentration en ADN et liés à l'activité de prolifération cellulaire.

La corrélation entre les paramètres mesurés sur des cellules et les

facteurs cyto-pronostiques usuels, a été étudiée par des méthodes statistiques multivariées que nous avons tenté de rendre aussi indépendantes que possible de l'échantillonnage des tumeurs et des variations aléatoires des méthodes de préparation.





## B. MATERIEL ET METHODES

=====

### B.I. MATERIEL BIOLOGIQUE

Deux séries de tumeurs du sein ont été analysées: une série de cas rétrospectifs et une série de cas prospectifs.

#### 1. Cas rétrospectifs

##### 1.1. Provenance

Le matériel rétrospectif provenait des archives du Centre de Cytologie de Genève. Il s'agissait de ponctions à l'aiguille fine de 41 cas de tumeurs du sein. Les ponctions ont été faites entre 1972 et 1984. (Vassilakos et Riotton, 1984). Il s'agissait de préparations de routine utilisées pour le cyto-diagnostic. Toutes les lames avaient été fixées dans le mélange éthanol/éther (1/1) pendant 30 minutes et colorées selon la technique de Papanicolaou (tableau 1). Nous avons choisi deux séries de cas présentant une évolution très différente de la tumeur:

1. Une série de lames provenait de malades avec une courte période de survie, les patientes étant mortes dans les 5 ans après le premier diagnostic.

2. Une série de lames provenait de malades avec une longue période de survie, les patientes étant encore vivantes 10 ans après le premier diagnostic.

Toutes les ponctions utilisées avaient été pratiquées lors du premier diagnostic de la maladie.

Parmi les 500 tumeurs archivées par le laboratoire depuis environ 12 ans, les cas suivants ont été éliminés:

- \* patientes ayant un temps de survie intermédiaire entre 5 et 10 ans;
- \* patientes qui n'ont pas été entièrement suivies à Genève;
- \* patientes étant décédées d'une autre maladie que le cancer du sein ou qui, n'ayant pas été autopsiées, n'ont pas un décès attribuable en toute certitude à l'évolution de la tumeur;
- \* patientes pour lesquelles les préparations n'étaient pas utilisables en analyse automatique, ces préparations étant mal fixées ou très pauvres en cellules épithéliales ou trop riches en cellules sanguines;
- \* les aspirations de tumeurs récidivantes ou de métastases;
- \* les tumeurs bénignes.

Ces restrictions expliquent le petit nombre de cas finalement retenus pour l'étude rétrospective.

Les cas étudiés représentaient une grande variabilité clinique. Pour chaque cas nous avons disposé des données suivantes:

âge de la malade;

taille de la tumeur;

- nombre de métastases axillaires;
- type histologique.

Les histogrammes de distribution des cas rétrospectifs en fonction des données cliniques sont montrés sur les figures 1, 2 et 3.

Le type histologique a été déterminé pour 34 cas. 30 cas présentaient des carcinomes canaliculaires invasifs. Deux cas étaient des adénocarcinomes mucineux et deux cas présentaient des types mixtes.

### 1.2. Préparation des échantillons

Les lamelles des frottis archivés ont été décollées dans un bain de xylol pendant environ 24 heures puis les lames ont été colorées par la réaction de Feulgen (tableau 2). L'hydrolyse acide qui précède la réaction de Schiff entraîne la disparition de la coloration initiale de Papanicolaou de sorte que seuls les noyaux ont été colorés.

## 2. Cas prospectifs

### 2.1. Provenance

Le matériel prospectif a été obtenu au Centre de Cytologie (Genève) entre janvier 1984 et mai 1985. Il s'agissait de pièces opératoires résultant de biopsies, de tumorectomies ou de mammectomies pour lesquelles nous avons disposé des données suivantes:

- âge des patientes au moment de l'opération;
- taille de la tumeur;
- nombre de ganglions axillaires métastatisés;

- type histologique;
- taux des récepteurs aux oestrogènes;
- taux des récepteurs à la progestérone.

Les histogrammes de distribution des cas prospectifs en fonction des données cliniques sont portés dans les figures 1, 2 et 3. Les figure 4 et 5 présentent les histogrammes de fréquence de ces cas en fonction du taux des récepteurs hormonaux.

Le type histologique était connu pour 115 cas. 87 cas (76%) présentaient des carcinomes canaliculaires invasifs, sept cas (6 %) avaient des comédocarcinomes invasifs et six cas (5%) des adénocarcinomes mucineux. Cinq cas (4%) présentaient des tumeurs bénignes. Les autres cas avaient des carcinomes canaliculaires in situ, des carcinomes papillaires invasifs et des types mixtes.

Toutes les malades ont été traitées selon le protocole utilisé à l'Hôpital Cantonal de Genève.

## 2.2. Préparation des échantillons

Les tumeurs ont été sectionnées et la surface de section a été grattée avec un scalpel. Le matériel ainsi obtenu a été étalé sur lame et fixé immédiatement pendant dix minutes dans le mélange de Boehm-Sprenger contenant 80 % de méthanol, 15 % de formol à 40 % et 5 % d'acide acétique.

Plusieurs lames ont été préparées à partir de la même tumeur en grattant différentes régions. Les tumeurs de grande taille ont été coupées en tranches de façon à obtenir du matériel à différentes profondeurs .

Les frottis ont été séchés à l'air puis colorés par la réaction de Feulgen (tableau 2). Des lames de chaque tumeur ont été colorées selon Papanicolaou pour les observations de contrôle. Ces lames ont été fixées dans un mélange d'éthanol et d'éther (1/1) pendant 30 minutes puis colorées selon le protocole indiqué dans le tableau 1.

## B.II. MATERIEL INFORMATIQUE

### 1. Système d'analyse

Les images des cellules ont été analysées par le système SAMBA 200 de TITN (Système d'Analyse Microphotométrique à Balayage Automatique: Brugal et Chassery, 1977).

#### 1.1. Organisation du système

La structure générale du système d'analyse est montrée dans la figure 6. Les différents composants du système sont : un microscope associé à un double capteur, des logiques d'acquisition et de traitement des images et un micro-ordinateur de gestion.

##### a) Microscope

Le microscope (Nachet NS 400) est équipé d'une platine motorisée pas à pas dans deux directions orthogonales (directions horizontales X et Y). La focalisation (axe Z) est réalisée grâce à un moteur pas à pas fixé sur la vis micrométrique de mise au point du microscope.

Le déplacement des platines est effectué à une fréquence maximale de 400 Hz. La platine utilisée avec l'objectif X100 a un pas élémentaire de 2,5  $\mu\text{m}$  selon les axes X et Y. Le déplacement selon l'axe Z est de 0,25  $\mu\text{m}$ . La source lumineuse est une lampe halogène de 100 W. Le flux lumineux issu de la lampe traverse le condenseur, la préparation et l'objectif. Il est ensuite séparé suivant en différentes voies:

- une voie permettant l'observation visuelle;
- une voie permettant le contrôle direct à l'aide d'une caméra TV ou la prise de vue photographique;
- une voie transportant l'image vers le capteur à basse résolution;
- une voie transportant l'image vers le capteur à haute résolution.

#### b) Capteurs

Le système possède deux capteurs:

Un capteur à basse résolution constitué d'une barrette de 256 photodiodes. Avec un objectif de grossissement X100, la résolution de l'image obtenue est de 2,5  $\mu\text{m}$ .

Un capteur à haute résolution est constitué d'un photomultiplicateur à cathode S20, d'un barrillet porte-filtres à quatre positions (R = rouge, V = vert, B = bleu, T = option) et de 2 miroirs vibrants orthogonaux. L'option T permet d'insérer un filtre à bande étroite pour l'analyse des colorations stoechiométriques.

Les images obtenues par ce système ont un format de 64 X 64 points correspondant à la région centrale du champ d'observation du microscope. Avec un objectif de grossissement X100, chaque point de l'image représente une surface de 0,4x0,4  $\mu\text{m}$  soit 0,16  $\mu\text{m}^2$ .

### c) Logiques de commande et de traitement

Cette partie informatique du système remplit les fonctions suivantes :

- commande et contrôle des capteurs;
- acquisition des images;
- traitement des images;
- traitement des données;
- interface homme-machine.

Ces fonctions sont assurées par deux processeurs internes (cartes à microprocesseurs INTEL et opérateurs câblés) et un processeur externe (micro-ordinateur SIRIUS).

#### 1.2. Déroulement de l'analyse d'une lame

##### a. Acquisition des images

L'acquisition des images se déroule en deux temps:

##### 1. Acquisition à basse résolution

L'acquisition à basse résolution permet de repérer sur la lame les cellules isolées devant être analysées. La sélection des cellules "isolées" est faite selon des critères de surface et de forme définis par l'opérateur. La préparation est déplacée automatiquement devant l'objectif et des images à basse résolution sont acquises. Après seuillage la surface et le facteur de forme ( $P^2/A$ ) de chacun des objets de l'image sont calculés. On ne mémorise alors que la position



des objets ou cellules "isolés", ce sont ceux dont les valeurs des 2 paramètres associés repondent aux critères prédéfinis.

## 2. Acquisition à haute résolution

Les cellules retenues à l'étape précédente sont ramenées successivement au centre du champ d'observation du microscope et leur image à haute résolution est acquise. Cette acquisition est effectuée à travers un filtre à bande étroite. Un filtre vert (570  $\pm$ 10nm) est utilisé dans le cas de cellules colorées au Feulgen.

### b. Ségmentation et analyse des images

Le traitement des images consiste, en premier lieu, à délimiter le noyau de chaque cellule (segmentation). La segmentation est fondée sur le seuillage des images en niveaux de gris suivi d'opérations morphologiques (érosion, dilatation, lissage), visant à déterminer de manière précise les points de l'image appartenant au noyaux.

### c. Paramétrisation des images

Sur chaque image nucléaire segmentée le programme d'application utilisé calcule trois types de paramètres :

1. un paramètre dimensionnel (la surface);
2. quatre paramètres densitométriques;
3. neuf paramètres de texture.

Les formules de calcul des paramètres sont données en B.II.1.4.

### 1.3. Programmes d'applications utilisés

Dans un programme d'application, il est possible de définir les commandes nécessaires pour l'acquisition et le traitement des images. L'utilisateur peut ainsi construire un programme spécifique à son application. En particulier pour l'analyse des cellules tumorales du sein nous avons utilisé un programme avec repérage automatique des noyaux, contrôle visuel du résultat de la segmentation, mesure et mémorisation de 15 paramètres nucléaires.

Dans un premier temps le programme repère à faible grossissement les cellules isolées. La surface balayée par cette analyse rapide est de 1,5 x 1,5 mm. La zone explorée et les images seuillées de cette zone sont contrôlées sur un moniteur. L'analyse rapide est terminée lorsque les adresses de 600 noyaux ont été acquises ou que toute la zone prédéfinie de 1,5 x 1,5 mm a été balayée.

La phase suivante consiste à analyser à haute résolution les 600 noyaux repérés. Chaque noyau est ramené automatiquement et séquentiellement sous l'objectif du microscope et son image est acquise puis traitée. L'opérateur vérifie si la segmentation est correcte, rejette les noyaux mal segmentés et les artéfacts. Sur les noyaux retenus, 15 paramètres sont alors mesurés.

Dans l'étude rétrospective, 1 ou 2 lames seulement étaient disponibles par cas. Les cellules étaient souvent peu nombreuses ou en amas. 200 noyaux de la population maligne et 20 lymphocytes ont été analysés en moyenne pour chaque cas. Tous les noyaux analysés ont été contrôlés par deux personnes. Pour les cas prospectifs 6 lames étaient disponibles et

d'une bonne qualité puisque le protocole de préparation avait été adapté à l'analyse automatique. 500 noyaux et 20 lymphocytes ont été analysés en moyenne par cas.

Dans ces deux études des lymphocytes on été utilisés comme cellules diploïdes de référence. Ils ont été analysés par un programme d'application permettant leur sélection manuelle.

#### 1.4. Paramètres mesurés

Sur chaque image du noyaux segmentée et validée par l'opérateur quinze paramètres sont mesurés:

- un paramètre **DIMENSIONNEL**: la surface nucléaire (NA) qui représente le nombre de pixels du noyau analysé à haute résolution.

- 5 paramètres **DENSITOMETRIQUES**:

ces paramètres sont calculés à partir des valeurs de niveaux de gris des points de l'objet ; ce sont:

\* la densité optique intégrée (IOD) ou somme des valeurs de densité optique associées à chacun des points de l'image.

$$IOD = \sum_{i=1}^{NA} ODi$$

(ODi représente la densité optique du pixel numéro i.)

Ce paramètre mesure, la quantité de matériel absorbant. Avec la

coloration de FEULGEN ce paramètre représente donc la quantité d'ADN dans le noyau.

La densité optique est mesurée en unités relatives. Le niveau de gris de chaque pixel est exprimé dans une échelle de valeurs numériques discrètes de 0 à 255. La valeur 255 correspond aux points non absorbants.

\* la densité optique moyenne (MOD) est définie comme le rapport entre la densité optique intégrée et la surface ; ce paramètre mesure donc la concentration en matériel absorbant.

$$\text{MOD} = \frac{\sum_{i=1}^{\text{NA}} \text{OD}_i / \text{NA}}{\text{NA}} = \text{IOD} / \text{NA}$$

\* l'écart-type de l'histogramme des densités optiques dans le noyau (SODH) mesure la variété des états de condensation de la chromatine.

$$\text{SODH} = \left( \sum_{i=1}^{\text{NA}} (\text{OD}_i - \text{MOD})^2 / \text{NA} \right)^{1/2}$$

\* la dissymétrie de l'histogramme des densités optiques de l'objet (SDODH)

$$\text{SDODH} = \left( \sum_{i=1}^{\text{NA}} (\text{OD}_i - \text{MOD})^3 / \text{NA} \right)^{1/2}$$

\* l'aplatissement de l'histogramme des densités optiques de l'objet  
(KODH)

$$KODH = \left( \sum_{i=1}^{NA} (ODi-MOD)^4 / NA \right) / SDODH^4$$

Dissymétrie et aplatissement mesurent l'homogénéité de distribution des différents états de condensation de la chromatine.

- 9 paramètres **MARKOVIEN** de **TEXTURE**:

ces paramètres mesurent la distribution spatiale et densitométrique des niveaux de gris dans l'objet. Quatre d'entre eux sont dérivés de la matrice de co-occurrence et cinq de la matrice de longueurs de sections.

#### A. Méthode des matrices de co-occurrence

La valeur  $p(i,j)$  calculée dans la position  $(i,j)$  de cette matrice est la probabilité de trouver un couple de points dont l'un a la densité optique  $(i)$  et l'autre la densité optique  $(j)$ . Les valeurs de densité optique varient de 0 à  $G-1$ , où  $G$  représente le nombre de gris de l'image (généralement 16). La distance entre les points et la direction qu'ils définissent sont arbitraires. Pour éviter, en partie, l'influence de l'orientation du noyau dans le champ du microscope, les valeurs de la matrice finale  $P(i,j)$  sont calculés en cumulant les valeurs de deux matrices obtenues dans deux directions orthogonales.

Les paramètres dérivés de la matrice de co-occurrences sont liés à la distribution relative des valeurs densitométriques ; ce sont :

\* la moyenne locale (LM)

$$LM = \sum_{i=1}^G \sum_{j=1}^i (i+j) P(i,j)$$

\* le moment d'ordre 2 ou énergie (Z)

$$Z = \sum_{i=1}^G \sum_{j=1}^i (P(i,j))^2$$

\* l'écart-type des coefficients de la matrice ou inertie (CVAR)

$$CVAR = \sum_{i=1}^G \sum_{j=1}^i (P(i,j))^2 / D - 1/D^2$$
$$D = (G^2 + G) / 2$$

\* le moment d'ordre deux des différences ou contraste (DIFMO)

$$DIFMO = \sum_{i=1}^G \sum_{j=1}^i (i-j)^2 P(i,j)$$

#### B. Méthode des matrices de longueurs de sections

Une section est définie comme l'ensemble des points consécutifs de même niveau de gris dans une direction donnée. Le nombre de points d'un tel

ensemble définit la longueur de cette section. La valeur  $p(g,l)$  pour la position  $(g,l)$  dans la matrice des longueurs de section représente la fréquence des sections de densité optique  $(g)$  et de longueur  $(l)$ . La longueur  $l$  peut varier de 0 à  $L-1$  où  $L$  est au maximum égal à la taille de l'image. Les valeurs de densité optique  $g$  peuvent varier de 0 à  $G-1$ . Les paramètres sont calculés en cumulant les valeurs de deux matrices obtenues dans deux directions orthogonales. Les paramètres dérivés de la matrice de longueurs de sections sont liés à la distribution topographique des différents niveaux de gris ; ce sont :

\* l'importance des courtes sections (SRE)

$$SRE = \sum_{l=1}^L \sum_{g=1}^G (P(l,g)/l^2) / \sum_{l=1}^L \sum_{g=1}^G P(l,g)$$

\* l'importance des longues sections (LRE)

$$LRE = \sum_{l=1}^L \sum_{g=1}^G l^2 P(l,g) / \sum_{l=1}^L \sum_{g=1}^G P(l,g)$$

\* la distribution des niveaux de gris (GLD)

$$GLD = \sum_{g=1}^G (\sum_{l=1}^L P(l,g))^2 / \sum_{l=1}^L \sum_{g=1}^G P(l,g)$$

\* la distribution des longueurs de sections (RLD)

$$RLD = \sum_{l=1}^L (\sum_{g=1}^G P(l,g))^2 / \sum_{l=1}^L \sum_{g=1}^G P(l,g)$$

\* le pourcentage des sections (RPC)

$$RPC = \sum_{l=1}^L \sum_{g=1}^G P(l,g) / NA$$

## 2. Programmes de traitement des données

### 2.1. Programmes disponibles sur le processeur externe (SIRIUS)

#### a) Programme "LSTAT"

Ce programme calcule les moyennes et les écarts-types des paramètres dans une population cellulaire ainsi que la matrice de corrélation correspondante.

#### b) Programme "HISTO"

Ce programme permet l'affichage graphique des histogrammes de distribution des noyaux en fonction des paramètres calculés. La largeur des classes peut être ajustée. Le programme calcule également l'effectif de cellules dans chaque intervalle, la moyenne et l'écart-type.

#### c) Programme "NUAGE"

1. Ce programme permet la représentation d'une population cellulaire selon deux paramètres sous forme de "nuage de points" (graphe bidimensionnel).



2. Une représentation selon l'ensemble des paramètres peut être obtenue après une analyse en composante principale. Le programme calcule alors des combinaisons linéaires des paramètres permettant la meilleure séparation des cellules analysées.

3. L'analyse discriminante factorielle fournit une représentation de différentes classes de cellules sous forme de nuages de points. Alors que l'analyse en composante principale permet de visualiser la meilleure dispersion des cellules d'une même classe, l'analyse discriminante factorielle permet de visualiser la meilleure dispersion des différentes classes.

4. En mode direct comme en mode factoriel, le programme permet le tri des cellules soit par une droite de séparation, soit par une sélection manuelle des cellules en pointant leur représentation à l'écran. Si le programme est exécuté directement après une acquisition, il permet de repositionner et visualiser les cellules sous le microscope. Ceci est particulièrement utile pour revoir au microscope une cellule présentant certaines caractéristiques révélées par l'analyse des données.

#### d) Programme "DISCRI"

Ce programme d'analyse discriminante décisionnelle permet de déterminer les variables qui séparent au mieux des groupes d'individus (cellules,...) définis a priori par l'observateur. Il calcule une fonction de ces variables qui permet d'affecter tout individu anonyme à un des groupes définis.

Le programme procède par étapes successives. A chaque étape une

variable (paramètre) est sélectionnée et combinée aux variables déjà choisies pour former les fonctions de classification. Le choix de la nouvelle variable à sélectionner utilise le test de Fisher-Snedecor. En utilisant les fonctions discriminantes le programme classe chacune des cellules dans un des groupes définis puis calcule le pourcentage de cellules bien reclassées en tenant compte de leur groupe d'appartenance.

e) Programme "CLASSIF"

Ce programme permet de regrouper des cellules dans des classes qui ne sont pas définies a priori par l'observateur.

Lorsqu'un (ou plusieurs) paramètre semble jouer un rôle important pour la description du phénomène biologique étudié, l'expérimentateur peut imposer au programme ces variables appelés alors "variable à expliquer". Cette (ou ces) variable est alors prise en considération en début d'analyse par le programme afin de définir une première partition dans l'ensemble des individus. Le programme se poursuit alors de façon itérative en engendrant une suite de partitions, selon deux phases successives à chaque itération:

- une phase de division dite "descendante" au cours de laquelle est sélectionné le prochain paramètre à inclure dans l'analyse (paramètre le plus corrélé aux variables à expliquer).

- une phase de fusion dite "ascendante" au cours de laquelle les classes qui ne sont pas significativement différentes à l'égard de l'ensemble des paramètres sont rassemblées avec leurs plus proches

voisines.

Le processus prend fin lorsque la partition obtenue après fusion est jugée identique à la partition engendrée à l'étape précédente.

## 2.2. Programmes disponibles sur l'ordinateur APPOLO

Les paramètres calculés par l'analyseur d'image SAMBA 200 sont transférés vers une station de travail Apollo DN 660 pour y être archivés, puis traités par des logiciels spécialisés. Ce système est architecturé autour d'un processeur 32 bits adressant 2 mégaoctets. Il comprend de plus une unité de disques (control DATA) de capacité 500 mégaoctets, une imprimante graphique et une console permettant la visualisation de graphiques et d'images en noir et blanc ou en couleurs.

### a) Programme "SUPPAR"

Ce programme permet de supprimer l'un quelconque des paramètres mémorisés dans les fichiers transmis au système APOLLO.

### b) Programme "GROUPPAR"

Ce programme permet de calculer les indices de ploïdie et de prolifération (voir B.III.1).

### c) Programme "POURCENT"

Dans ce programme on définit N intervalles de variation d'un paramètre

donné. Le programme calcule alors la distribution des cellules dans ces intervalles, exprimée en pourcentages.

d) Programme "PLOT PAR"

Ce programme permet d'afficher des histogrammes et des graphes bidimensionnels sur la console de la station de travail.

e) Programme "STATIS"

Ce programme permet de calculer les moyennes et les écart-types ainsi que les corrélations de différents paramètres.

f) Programme "ACP"

Ce programme permet de réaliser une analyse en composante principale à partir d'un fichier paramètre.

### B.III. METHODE D'ANALYSE DES DONNEES

#### 1. Ploïdie

##### 1.1. Normalisation

La coloration de Feulgen est stoechiométrique par rapport au contenu en ADN d'une cellule (Feulgen et Rossenbeck, 1924). Pour l'interprétation des mesures, il est nécessaire de connaître la valeur de densité

optique intégrée correspondant au contenu en ADN d'une cellule diploïde en phase G0 ou G1 du cycle cellulaire. Toutes les valeurs de densité optique sont exprimées en unités relatives à cette valeur. Des lymphocytes de chaque préparation ont été utilisés comme standard interne. Pour chaque lame, 20 lymphocytes ont été mesurés et la moyenne de leur densité optique intégrée a été retenue comme valeur diploïde. A l'aide d'un programme exécuté après analyse de chaque lame, les paramètres dépendants de la valeur de densité optique sont recalculés en tenant compte de la valeur de densité optique intégrée correspondant aux lymphocytes. La densité optique intégrée des lymphocytes est alors 2000.

#### 1.2. Classification des histogrammes selon AUER

Une méthode de classification des histogrammes d'ADN a été proposée par AUER et al. (1980 a et b). Il s'agit d'une classification visuelle selon quatre types. Un exemple de chaque type est montré dans la figure 7.

Type I: il est caractérisé par un seul mode de contenu en ADN dans la région diploïde. Seul un petit nombre de cellules peut dévier de la valeur normale.

Type II: les histogrammes montrent soit un mode dans la région tétraploïde soit deux pics dans les régions 2c et 4c. Peu, ou pas, de cellules ont une quantité d'ADN correspondant à la phase de synthèse d'ADN de cellules normales. Seul un petit nombre de cellules peut se trouver en dehors du domaine des valeurs d'ADN d'une population normale ; ces cellules ont généralement des contenus en ADN dans la région 8c.

Type III: il se distingue des populations de type II par un nombre significatif de cellules ayant un contenu en ADN intermédiaire entre  $2c$  et  $4c$  et considérées comme des cellules en phase de synthèse d'ADN. Les positions des deux pics peuvent dévier quelque peu des valeurs  $2c$  et  $4c$  des populations normales.

Type IV: ces histogrammes révèlent une aneuploïdie prononcée et irrégulière avec des contenus en ADN qui s'étalent de  $2c$  jusqu'aux valeurs dépassant  $6c$  ou même  $8c$ . Quarante histogrammes d'ADN de tumeurs du sein ont été classés dans les quatre types par six observateurs de façon indépendante, afin d'évaluer la variabilité inter-observateur.

### 1.3. Méthode des intervalles de ploïdie

Les cellules de chaque cas ont été classées selon dix degrés de ploïdie, correspondant respectivement à un contenu en ADN de  $2c$  ;  $2,5c$  ;  $3c$  ;  $3,5c$  ;  $4c$  ;  $5c$  ;  $6c$  ;  $7c$  ;  $8c$  et supérieur à  $8c$ . Le tableau 3 fournit les seuils de densité optique intégrée choisis pour délimiter chaque classe. La valeur 2000 correspond à la valeur moyenne des lymphocytes de la lame analysée. En raison de la plus forte condensation de la chromatine des lymphocytes et de leur taille plus petite par comparaison avec les cellules normales, la valeur diploïde mesurée dans les cellules tumorales est 10% plus élevée que la valeur moyenne mesurée dans les lymphocytes. Nous avons donc défini l'intervalle  $2200 \pm 10\%$  comme l'intervalle des cellules diploïdes. En outre, cet intervalle tient compte à la fois de l'erreur de mesure et de l'erreur due à l'affaiblissement de la coloration provoqué par l'exposition des frottis à la lumière pendant les mesures répétées. On constate que la variation est encore plus importante pour les

cellules ayant un contenu élevé en ADN. Nous avons donc choisi des intervalles plus grands pour les cellules ayant un contenu en ADN de 4c et plus.

Pour toutes les tumeurs étudiées, les pourcentages de cellules dans les dix classes de ploïdie ont été calculés. Chaque tumeur a donc été caractérisée par dix paramètres.

Afin de comparer les histogrammes de ploïdie d'une manière indépendante de l'échantillon de tumeurs considéré, nous avons créé des histogrammes de référence et défini, par analyse en composante principale, des plans factoriels en utilisant les pourcentages de cellules de ces histogrammes synthétiques, dans dix classes de ploïdie. Le tableau 4 donne ces pourcentages pour les 28 histogrammes de référence. Ces derniers peuvent être séparés en quatre groupes:

Le premier groupe comprend dix histogrammes monomodaux dont les pics sont respectivement centrés sur chacune des dix classes de ploïdie.

Le deuxième groupe comprend six histogrammes bimodaux. Le deuxième pic est situé au double du premier pic et il est d'effectif inférieur.

Le troisième groupe comprend six histogrammes bimodaux dont le deuxième pic a un effectif supérieur à celui du premier pic.

Le quatrième groupe comprend six histogrammes qui sont similaires à ceux du deuxième groupe, mais les deux pics sont reliés par des valeurs intermédiaires.

#### 1.4. Calcul de l'indice de ploïdie et de l'indice de prolifération

Pour faciliter l'analyse des histogrammes d'ADN nous avons réduit les dix paramètres de ploïdie à deux combinaisons ayant une signification

biologique: l'indice de ploïdie et l'indice de prolifération.

L'indice de ploïdie est le pourcentage de cellules dans les classes 2c , 4c et 8c diminué du pourcentage de cellules dans les autres classes ( 2,5c ; 3c ; 3,5c ; 5c ; 6c ; 7c et supérieur à 8c ).

Les classes 2c ; 4c et 8c contiennent des cellules euploïdes ou des cellules aneuploïdes en phase de synthèse d'ADN. Les autres classes contiennent des cellules aneuploïdes et/ou des cellules euploïdes en phase de synthèse d'ADN.

L'indice de prolifération est le pourcentage de cellules en dehors du pic majeur et les pics ayant une ploïdie double ou moitié du pic majeur. Les pics ont été considérés comme s'étendant sur trois classes successives de ploïdie.

La figure 8 montre deux exemples de calcul de l'indice de prolifération.

#### 1.5. Séparation des groupes par analyse discriminante

Les tumeurs du sein que nous avons étudiées pouvaient être séparées en différentes classes définies a priori.

a. Les cas rétrospectifs ont été répartis en deux classes: les cas ayant une courte survie et les cas ayant une longue survie.

Parallèlement, les cas ont été subdivisés en quatre groupes selon deux critères cliniques, chacun étant défini de façon binaire selon:

\* la taille de la tumeur (<4 cm ou >=4cm);

\* le nombre de métastases ganglionnaires (<4 ou >=4).



La repartition des cas à courte et longue survie dans les groupes cliniques ainsi définis est donnée dans le tableau 5.

b. Les cas prospectifs ont été subdivisés en huit groupes selon trois critères cliniques chacun étant défini de façon binaire selon:

- \* la taille de la tumeur (<4 cm ou >=4 cm);
- \* le nombre de métastases ganglionnaires (<4 ou >=4);
- \* le taux des récepteurs aux oestrogènes (<=10fm/mg ou >10fm/mg).

Le tableau 6 résume les caractéristiques de ces huit groupes cliniques.

Les relations entre les dix paramètres de ploïdie et les différentes classes ainsi définies ont été analysées par une analyse factorielle discriminante.

## 2. Taille et texture nucléaire

### 2.1. Matrice de corrélation

Alors que la ploïdie est exprimée par un seul paramètre (la densité optique intégrée), la texture est décrite par treize paramètres: quatre paramètres de distribution monovariée des valeurs densitométriques et neuf paramètres MARKOVIEN de texture fondés sur des distributions bivariées.

Comme on peut le déduire des définitions de ces paramètres ( B.II.) ceux-ci n'apparaissent pas corrélés.

Pour examiner les dépendances entre les paramètres nous avons calculé

la matrice de corrélation pour les quinze paramètres mesurés sur les cellules tumorales analysées dans l'étude prospective. En effet, ces préparations ont subi un traitement plus homogène que les frottis rétrospectifs (temps de fixation standardisé ; faible variation de la technique préparative) ; de plus, le nombre de cellules analysées était plus grand pour l'étude prospective que pour l'étude rétrospective.

Pour faciliter les analyses multiparamétriques le nombre de paramètres a été réduit en excluant :

- \* les paramètres fortement corrélés sauf un ;
- \* les paramètres variant peu d'un cas à l'autre ;
- \* les paramètres montrant une variance très faible dans la population totale.

## 2.2 Analyse monoparamétrique

### 2.2.1. Histogrammes des paramètres

La distribution d'un paramètre dans une population est représentée par l'histogramme. Nous avons tracé les histogrammes des paramètres pour l'ensemble des cellules tumorales analysées dans l'étude rétrospective (8175 cellules). Le résultat est comparé avec les histogrammes obtenus pour l'ensemble des cellules analysées dans l'étude prospective (57211 cellules). Les limites de capacité d'affichage du programme HISTO ne permettent de représenter qu'un quart des cellules (14303 cellules).

### 2.2.2. Moyennes et écart-types des paramètres

Ces données permettent de comparer deux populations en termes de

types des quinze paramètres nucléaires pour l'ensemble des cellules de chaque cas. En outre, nous avons déterminé les moyennes et les écarts-types pour l'ensemble des cellules analysées dans chaque étude.

### 2.3. Analyse multiparamétrique

#### 2.3.1. Différents plans d'ACP

Le résultat d'une analyse en composante principale (ACP) varie selon les paramètres inclus. Nous avons calculé les plans d'ACP avec six combinaisons différentes de paramètres:

- a. l'ensemble des quinze paramètres;
- b. les cinq paramètres densitométriques et la surface nucléaire (NA);
- c. les neuf paramètres MARKOVIEN de texture;
- d. les quatre paramètres calculés à partir de la matrice de co-occurrence;
- e. les cinq paramètres calculés à partir de la matrice de longueurs de sections;
- f. les paramètres SODH, CVAR et RLD.

Tous les plans d'ACP ont été définis par l'ensemble des cellules acquises dans l'étude prospective.

Dans les plans factoriels ainsi définis, il a été possible d'associer, pour un nombre restreint de cellules, leur projection et leur image. Ceci a permis d'établir les correspondances entre les variations des paramètres nucléaire et l'expérience visuelle des cytologistes. Le poids de chaque paramètre dans la métrique des axes a été représenté sous forme de vecteurs.

### 2.3.2. Méthodes d'analyse d'un plan d'ACP

Le calcul des axes factoriels permet la réduction du nombre de paramètres . Les variables portées sur les axes sont des combinaisons linéaires de tous les paramètres.

Pour l'interprétation d'un plan d'ACP, trois méthodes ont été utilisées:

a. Calcul de la surface du rectangle d'encadrement du nuage de points et calcul des moyennes des deux premiers axes pour chaque cas.

Le rectangle d'encadrement du nuage de points est le rectangle le plus petit formé par des lignes parallèles aux axes du plan d'ACP et qui contient tous les points. La surface est exprimée en unités arbitraires correspondant aux unités des variables canoniques selon la relation:

$$S=(x_{\max} - x_{\min}) * (y_{\max} - y_{\min})$$

La distribution de la surface du rectangle d'encadrement a été représentée par des histogrammes de fréquence.

Le point défini par les moyennes des deux variables canoniques correspond au centre de gravité du nuage de points. Dans les populations qui montrent une distribution symétrique des valeurs des variables 1 et 2, ce point correspond au centre géométrique du nuage de points.

Les corrélations entre les deux paramètres "moyenne de la variable 1" et "moyenne de la variable 2" ont été analysées par des représentations bi-paramétriques sous forme de nuages de points.

b. Détermination de différentes zones du plan d'ACP et calcul des pourcentages de cellules par cas occupant ces différentes zones.

### b.1. Détermination arbitraire des zones

Les zones ont été déterminées selon les critères suivants:

1. les frontières des zones sont parallèles aux axes;
2. un nombre de zones de l'ordre de quatre à six est jugé suffisant;
3. chaque zone comporte au moins 10% des cellules analysées;
4. les frontières séparant les groupes de cellules séparées graphiquement par l'ACP sont respectées.

Les pourcentages de cellules de chaque cas appartenant aux différentes zones ont été déterminés en utilisant le programme "POURCENT".

### b.2. Détermination objective des zones par le programme "CLASSIF".

Le programme de classification automatique disponible sur le micro-ordinateur SIRIUS est limité au traitement de 324 cellules. Nous avons réduit le nombre de cellules de la population cellulaire en deux étapes: tout d'abord, le nombre de cellules a été réduit de 57211 cellules à 14303 cellules par élimination automatique de trois cellules sur quatre ; puis 324 cellules ont été choisies à partir de la projection dans les axes de l'ACP en prenant soin de préserver l'ampleur de la distribution initiale et par conséquent la diversité. Ces 324 cellules ont été traitées par le programme "CLASSIF" sans fixer de paramètres à expliquer.

Sur la base des sous-groupes déterminés par le programme, les pourcentages de cellules de chaque tumeur appartenant à ces sous-groupes ont été calculés par une analyse discriminante décisionnelle.

## C. ANALYSE DE LA PLOIDIE

=====

### C.I. RESULTATS

#### C.I.I. DIVERSITE DES TUMEURS

##### 1. Etude rétrospective

###### 1.1. Lymphocytes

Vingt lymphocytes ont été analysés par cas. La valeur de leur densité optique intégrée variait de 3301 u.a. (unités arbitraires) à 8020 u.a.. La moyenne était de 5618 u.a. avec un écart-type de 958.

L'uniformité des lymphocytes a été examinée en analysant la distribution des moyennes des deux paramètres NA (surface nucléaire) et IOD (densité optique intégrée) par cas. La figure 9 montre le nuage de points dans l'étude rétrospective par comparaison avec celui obtenu dans l'étude prospective. On constate une corrélation entre les deux paramètres. ( $r=0,53$ ).

###### 1.2. Classification selon AUER

Quarante histogrammes d'ADN ont été classés par six personnes (trois biologistes, deux pathologistes et un cytologiste) dans les types I à IV de AUER. Le tableau 7 montre la matrice de confusion. Cette matrice permet la comparaison entre le type choisi par la majorité des

personnes et les autres classifications éventuellement proposées. La ligne diagonale de la matrice correspond aux pourcentages d'histogrammes classés de façon identique par les six personnes.

La meilleure cohérence entre les personnes a été obtenue pour le type IV, et la moins bonne pour le type III. Les plus grandes confusions ont été observées entre les types III et II et entre les types II et I.

### 1.3. Méthode des intervalles

L'analyse en composante principale sur la base des 28 histogrammes synthétiques détermine neuf valeurs propres:

la valeur propre 1 explique 15 % de la distribution;  
la valeur propre 2 explique 15 % de la distribution;  
la valeur propre 3 explique 14 % de la distribution;  
la valeur propre 4 explique 12 % de la distribution;  
la valeur propre 5 explique 11 % de la distribution;  
la valeur propre 6 explique 9 % de la distribution;  
la valeur propre 7 explique 8 % de la distribution;  
la valeur propre 8 explique 8 % de la distribution;  
la valeur propre 9 explique 8 % de la distribution.

Les variables canoniques ont été combinées deux par deux pour former des plans factoriels, l'une des variables étant portée sur l'axe x et l'autre sur l'axe y. Les plans "variable 1 / variable 3" et "variable 1 / variable 4" ont été retenus et sont présentés dans les figures 10 et 11 respectivement.

Le plan "variable 1 / variable 3" sépare les cas qui ont principalement des cellules euploïdes (2c, 4c, 8c) des cas qui ont principalement des

cellules aneuploïdes ( $2,5c$ ,  $5c$ ,  $>8c$ ). La répartition des cas sur ce plan laisse apparaître deux groupes de cas. Les cas qui ont principalement des cellules  $3,5c/7c$  (situés en haut du plan) ou  $3c/6c$  (en bas) sont rares.

La répartition des cas dans le plan "variable 1 / variable 4" permet de distinguer au moins trois groupes: un groupe situé dans la région positive de la variable 4 ; un groupe situé dans la région "variable 1 positive, variable 4 négative" et un troisième groupe situé dans la région "variable 1 et variable 4 négatives".

La figure 12 montre quelques histogrammes de tumeurs situés à différents endroits du plan "variable 1 / variable 4". Les histogrammes euploïdes sont situés dans la moitié droite du plan et peuvent être classés du haut vers bas selon les quantités respectives de cellules  $2c$ ,  $4c$  et  $8c$ . L'histogramme type A a un mode unique à  $2c$ . L'apparition d'un deuxième pic à  $4c$  conduit à l'histogramme type B. Dans le type C le pic  $4c$  devient plus grand que le pic  $2c$ . Le pic diploïde disparaît et des cellules  $8c$  apparaissent dans le type D.

La moitié gauche du plan est occupée par des histogrammes aneuploïdes avec un pic à  $2,5c$ . Les histogrammes sont rangés de haut en bas selon l'ampleur du pic  $5c$  puis de l'apparition de cellules ayant un contenu en ADN  $>8c$  (types F, G, H, I).

La même évolution, selon laquelle un premier pic avec une ploïdie donnée est remplacé par un deuxième pic avec le double de ce contenu en ADN, se retrouve pour les histogrammes  $3c$ , (type N, O et P) et  $4,5c$  (type R et S).

Au centre du plan factoriel sont situés les histogrammes hybrides qui résultent de populations euploïdes et aneuploïdes.



Pour tous les cas confondus les pourcentages trouvés en moyenne dans les dix classes de ploïdie sont portés dans le tableau 8 par comparaison avec l'étude prospective.

La classe majoritaire est la classe 4c qui comporte 25% des cellules, suivie des classes 2c et 2,5c comportant 19% et 17% des cellules respectivement. La classe 5c comporte 13% des cellules. L'histogramme global est bimodal, le pic principal est centré sur 4c/5c, le deuxième pic est centré sur 2c/2,5c. Les autres classes (3c ; 3,5c ; 6c ; 7c ; 8c et > 8c) sont faiblement occupées. Aucune d'elles ne comporte plus de 10% des cellules.

Les cas analysés comportent donc principalement des cellules euploïdes (2c et 4c). La classe 2,5c qui contient des cellules hyper-ploïdes, est représentée de façon significative. Ce résultat est également illustré par la repartition des cas dans les plans représentés dans les figures 10 et 11.

#### 1.4. Indice de ploïdie et indice de prolifération

La figure 13 montre la représentation des cas en fonction de l'indice de ploïdie et de l'indice de prolifération. Les valeurs de l'indice de ploïdie varient de -92 % à 78%. Les valeurs de l'indice de prolifération varient de 0% jusqu'à 20%, mais la plupart des cas sont compris entre 0 et 10%.

L'indice de ploïdie varie largement depuis les cas qui comportent principalement des cellules aneuploïdes (indice négatif) jusqu'à ceux dont les populations cellulaires sont constituées principalement de cellules euploïdes (indice positif).

## 2. Etude prospective

### 2.1. Lymphocytes

Comme dans l'étude rétrospective environ 20 noyaux de lymphocytes par cas ont été analysés pour constituer une référence diploïde. Dans les quelques cas qui ne présentaient pas de lymphocytes, des noyaux de fibrocytes ou de cellules myoépithéliales ont été utilisés comme référence. Ces noyaux peuvent être facilement distingués des noyaux de cellules tumorales par leur forme allongée ; ils sont plus grands que les noyaux des lymphocytes et leur chromatine est moins condensée.

La valeur de densité optique intégrée des lymphocytes par cas était en moyenne de 8320 u.a. avec un écart-type de 1091.

La surface moyenne des lymphocytes était de 147 u.a. avec un écart-type de 28.

La figure 9 montre la distribution des lymphocytes en fonction de leur surface moyenne et de leur densité optique intégrée moyenne par cas. Une comparaison entre les lymphocytes de l'étude prospective et ceux de l'étude rétrospective montre que ces derniers ont en moyenne des valeurs inférieures pour la surface et la densité optique intégrée: la surface est en moyenne 7% plus petite et la densité optique intégrée 32% plus petite dans l'étude rétrospective que dans l'étude prospective ; par contre la variabilité observée dans les deux études est similaire.

### 2.2. Méthode des intervalles

Les fréquences de cellules dans les dix intervalles de ploïdie pour l'ensemble des cellules acquises dans l'étude prospective sont portées

dans le tableau 8.

La classe majoritaire est la classe 2c avec 29%, suivie de la classe 2,5c avec 22%. Un deuxième pic est constitué par les classes 4c (17%) et 5c (13%). L'histogramme global de ploïdie est donc bimodal avec un pic centré sur 2c/2,5c et un deuxième pic centré sur 4c/5c. Les classes avec un contenu en ADN supérieur à 5c sont faiblement représentées: 6% seulement des cellules sont réparties dans les classes 6c, 7c, 8c et >8c. Les classes 3c et 3,5c contiennent respectivement une moyenne de 6% et 7% de cellules. La répartition des cellules dans les dix classes de ploïdie est donc similaire dans les deux séries de cas, mais dans l'étude rétrospective le pic centré sur 4c est le pic principal, alors que dans l'étude prospective, le pic centré sur 2c est plus grand.

La répartition des cas sur le plan défini par les histogrammes synthétiques caractérisés par les pourcentages dans ces 10 intervalles de ploïdie (figure 10 et 11) montre une distribution similaire à celle de l'étude rétrospective. Les tumeurs bénignes ont principalement des cellules 2c. Quelques cas bénins sont situés dans la région "variable 1 négative" et présentent donc des quantités importantes de cellules ayant un contenu en ADN de 2,5c.

La figure 14 montre:

(1) l'histogramme de distribution des cellules en fonction de leur densité optique (pour des raisons techniques seulement 14303 cellules parmi les 57211 cellules analysées sont représentées);

(2) l'histogramme du nombre de cas qui contribuent à chaque intervalle de ploïdie.

Les formes des deux histogrammes sont similaires: ils présentent deux pics: l'un centré sur les classes 2c - 2,5c et l'autre centré sur les classes 4c - 5c mais dans le deuxième histogramme les deux pics sont

moins prononcés. Ceci signifie, que le pourcentage de cas qui contiennent des cellules intermédiaires (2,5c et 3c) est plus important que le pourcentage de cellules dans les classes de la population totale. Cette observation est également vraie pour les classes 5c à >8c.

### 2.3. Indice de ploïdie et indice de prolifération

La figure 13 montre la distribution des cas prospectifs en fonction de l'indice de ploïdie et l'indice de prolifération. Les valeurs de l'indice de ploïdie varient de -97% à +93%. L'indice de prolifération est dans la plupart des cas inférieur à 5%. Deux cas seulement ont un indice de prolifération supérieur à 20%.

La répartition des cas selon l'indice de ploïdie est similaire dans les deux séries de cas ; par contre, l'indice de prolifération est généralement plus bas dans l'étude prospective.

Les cinq cas de tumeurs bénignes ont tous des indices de prolifération très bas. Les indices de ploïdie de ces cas restent supérieurs à -25%.

## C.I.II. SIGNIFICATION CLINIQUE

### 1. Etude rétrospective

#### 1.1. Classification selon AUER

Le tableau 9 montre la distribution des histogrammes type I à IV entre les cas à longue survie (LS) et courte survie (CS). Le même nombre de cas a été analysé dans les deux séries (20 cas).

Les histogrammes type IV sont uniformément répartis parmi les patientes à longue et courte survie. Les histogrammes de type I et II ont été rencontrés surtout chez les malades à longue survie (9/10 histogrammes) alors que les histogrammes de type III ont été trouvés surtout dans les cas à courte survie (12/14 histogrammes).

#### 1.2. Analyse en composante principale fondée sur les histogrammes synthétiques

La figure 15 montre la projection des tumeurs de patientes à longue et courte survie dans un plan de l'ACP calculé sur la base des 28 histogrammes synthétiques. Chaque tumeur est représentée par les fréquences de cellules dans les dix classes de ploïdie. Le plan présenté est défini par les variables canoniques 1 et 4.

Les cas à longue survie occupent principalement la moitié droite du plan qui contient des histogrammes euploïdes (la majorité des cellules sont dans les intervalles 2c, 4c et 8c). Les cas à courte survie sont au contraire situés principalement sur la moitié gauche du plan qui contient des histogrammes aneuploïdes (la majorité des cellules sont

dans les intervalles  $2,5c$  ;  $5c$  et  $>8c$ ). La zone du plan qui correspond aux valeurs négatives des deux variables est occupée exclusivement par des cas à courte survie. Ces cas ont des histogrammes avec une quantité élevée de cellules ayant un contenu en ADN supérieur à  $8c$ .

La séparation des cas à courte et longue survie n'est pas complète ; en effet, quelques cas à courte survie sont rencontrés dans la moitié inférieure droite du plan. Ils ont des histogrammes comportant une majorité de cellules ayant un contenu  $4c$  en ADN. Inversement, quelques cas à longue survie sont situés sur la moitié supérieure gauche du plan d'ACP. Ces cas ont des proportions importantes de cellules ayant un contenu en ADN de  $2,5c$ .

La figure 16 montre la répartition des cas de l'étude rétrospective dans les quatre groupes cliniques. Seulement pour 28 des 41 cas analysés les deux données cliniques considérées (taille de la tumeur et nombre de métastases axillaires ; cf. tableau 5) sont connues. Une séparation des quatre groupes sur le plan ne peut pas être constatée, mais l'effectif des cas par groupe est trop faible pour permettre des conclusions d'une significativité statistique.

### 1.3. Analyse discriminante décisionnelle fondée sur les dix valeurs de ploïdie

La répartition des cas à longue et courte survie sur le plan d'ACP permet de constater que ces deux groupes diffèrent à l'égard de leurs proportions de cellules dans les intervalles euploïdes et aneuploïdes. Pour vérifier cette assertion, les deux séries de cas ont été comparées par une analyse discriminante décisionnelle fondée sur les proportions,

de cellules de chaque cas dans chacune des 10 classes de ploïdie. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 10.

Le premier paramètre sélectionné par le programme est le pourcentage de cellules 4c. Avec ce paramètre, 63% des cas sont classés correctement, soit: 11 cas parmi les 21 à longue survie et 15 cas parmi les 20 cas à courte survie. Le deuxième paramètre choisi par le programme est le pourcentage de cellules en 2c ; le taux de bonne classification atteint alors 76% mais cinq cas de chaque série restent mal classés. Le taux de bonne classification atteint son maximum (80%) après la troisième étape en considérant le pourcentage de cellules en 3,5c. On constate alors que 5 des 21 cas à longue survie et 3 des 20 cas à courte survie restent mal classés. Les autres paramètres n'améliorent pas la classification.

Les huit cas qui restent mal classés après la troisième étape sont entourés dans la figure 15. Les trois cas à courte survie qui sont mal classés sont tous situés dans la région 4c. Deux cas parmi les cinq cas à longue survie qui sont mal classés par l'analyse discriminante sont aussi situés dans la région 4c. Les trois autres sont situés dans les régions 2,5c et 5c.

#### 1.4. Indice de ploïdie et indice de prolifération

La distribution des cas à courte et longue survie selon l'indice de ploïdie et l'indice de prolifération est présentée dans la figure 17. Les cas à longue survie sont trouvés principalement en bas à droite du plan ; ils ont des indices de ploïdie élevés et de faibles indices de prolifération. Les cas à courte survie sont au contraire trouvés surtout dans la moitié gauche du plan; ils ont un indice de ploïdie

négatif avec, pour certains, un indice de prolifération élevé.

La figure 18 correspond à la figure 17, mais elle montre la répartition des cas selon les quatre groupes cliniques. Aucune séparation claire de ces groupes n'apparaît.

#### 1.5. Corrélations avec les données cliniques

Le type histologique est un paramètre qualitatif. Pour calculer des coefficients de corrélation entre ce paramètre et des données quantitatives nous l'avons codé de la manière suivante:

- 1 = tumeurs bénignes
- 2 = carcinome intracanaliculaire in situ
- 3 = carcinome papillaire invasif
- 4 = adénocarcinome mucineux
- 5 = carcinome intracanaliculaire invasif
- 6 = carcinome lobulaire invasif
- 7 = carcinome contenant plusieurs types
- 8 = carcinome canaliculaire invasif

Le temps de survie était exprimé en nombres d'années: 5 (cas à courte survie) ou 10 (cas à longue survie).

Les coefficients de corrélation entre le pourcentage de cellules dans les 10 groupes de ploïdie et les données cliniques sont notés en tableau 11. Seuls les cas dont les cinq données cliniques étaient connues, ont été considérés (22 cas). Les corrélations significatives au seuil de probabilité de 95% sont entourées.

L'âge des malades et le temps de survie ne montrent de corrélation



significative avec aucune des classes de ploïdie. Par contre, la taille de la tumeur est corrélée avec le pourcentage de cellules dans la classe 2,5c. Le nombre de métastases axillaires montre une corrélation positive avec les pourcentages de cellules dans les classes 6c et >8c. Le type histologique est corrélé avec le pourcentage de cellules dans la classe 5c.

#### 1.6. Aspect des histogrammes de ploïdie

Les histogrammes de ploïdie des cas à longue et courte survie respectivement ne pouvant pas tous être séparés par les méthodes décrites, nous avons donc comparés deux à deux les histogrammes de cas proches dans le plan d'ACP mais l'un ayant une longue survie et l'autre une courte survie. La figure 19 donne deux exemples. On constate que ces patientes qui ont des temps de survie très différents présentent des histogrammes de ploïdie très similaires.

## 2. Etude prospective

### 2.1. Analyse en composante principale fondée sur les histogrammes synthétiques

Pour les cas prospectifs le temps de survie n'est pas connu. Nous avons donc étudié la corrélation entre la ploïdie et trois données cliniques qui sont considérées comme importantes pour le pronostic. Pour chaque donnée clinique, deux intervalles ont été choisis. L'ensemble des cas pour lesquels ces trois données cliniques étaient connues (92 cas) a été divisé en huit sous-groupes (voir B.III.).

La figure 20 montre la projection des huit groupes sur le plan d'ACP défini par les histogrammes synthétiques et représenté par les variables canoniques 1 (axe x) et 4 (axe y). Il convient de constater que les groupes cliniques ne présentent pas de distribution particulière dans le plan d'ACP.

## 2.2. Analyse discriminante décisionnelle fondée sur les dix valeurs de ploïdie

Les huit groupes cliniques définis pour l'étude prospective ont été traités par une analyse discriminante décisionnelle sur la base des dix valeurs de ploïdie. Les résultats sont résumés dans le tableau 12. Le meilleur taux de bonne classification est atteint après la troisième étape en considérant successivement les paramètres suivants:

- le pourcentage de cellules en 8c;
- le pourcentage de cellules en 6c;
- le pourcentage de cellules en 7c.

Après la troisième étape 46 des 92 cas sont classés correctement. Ceci ne correspond qu'à un taux de bonne classification de 50% et ne fait donc ressortir aucune relation évidente entre la ploïdie et le profil clinique des patientes.

Pour six des huit groupes cliniques, l'effectif est inférieur à 10 cas. Pour pouvoir comparer des groupes ayant des effectifs plus importants, nous avons séparé les cas selon les trois données cliniques considérées séparément. Les résultats d'une analyse discriminante décisionnelle entre ces groupes sont résumés dans le tableau 13. Pour les groupes

différents à l'égard du taux des récepteurs aux estrogènes, l'optimum de bonne classification était atteint après la deuxième étape. 86% des cas sont bien classés avec les pourcentages de cellules en 8c et >8c. Pour les groupes qui diffèrent à l'égard de la taille tumorale le taux de bonne classification atteint 67% en considérant les pourcentages de cellules dans les classes 6c et >8c. Pour les groupes qui diffèrent à l'égard du nombre de ganglions axillaires métastatisés, le meilleur taux de bonne classification atteint 73% en utilisant les pourcentages de cellules dans les classes 8c, 7c et 6c.

Alors que dans l'étude rétrospective ce sont les pourcentages de cellules ayant un faible contenu en ADN de 2c ; 3,5c et 4c qui sont utilisés pour la séparation des patientes selon leur temps de survie, ce sont les pourcentages de cellules ayant un contenu en ADN de 6c, 7c, 8c et >8c qui sont sélectionnés par l'analyse discriminante servant à caractériser les profils cliniques définis par des critères réputés de bonne valeur pronostique.

### 2.3. Indice de ploïdie et indice de prolifération

La figure 21 montre la distribution des huit groupes cliniques selon l'indice de ploïdie et l'indice de prolifération. Pour l'indice de prolifération aucune différence entre les groupes n'a été constatée. Concernant l'indice de ploïdie on note une corrélation entre les groupes GC-100, GC-111 et GC-011 et les indices négatifs. Pour les autres groupes aucune tendance n'a pu être observée.

## 2.4. Corrélations avec les données cliniques

Les coefficients de corrélation entre les pourcentages de cellules dans les 10 intervalles de ploïdie et les données cliniques sont portés dans le tableau 14. Pour le nombre de cas analysés (92 cas) un coefficient de corrélation de  $r=0,20$  est statistiquement significatif au seuil de probabilité de 95%. Des corrélations significatives apparaissent donc entre l'âge des malades et le pourcentage de cellules dans la classe 3,5c ; la taille de la tumeur est corrélée négativement avec le pourcentage de cellules dans la classe 2c et positivement avec toutes les classes de haute ploïdie (5c à >8c).

Le nombre de métastases axillaires montre une corrélation avec la classe 7c ; le type histologique est positivement corrélé avec la classe 4c et négativement corrélé avec la classe 6c. Le taux des récepteurs aux oestrogènes montre des corrélations négatives avec les pourcentages de cellules en 2,5c et >8c et une corrélation positive avec la classe 3,5c. Par contre, pour le taux des récepteurs à la progestérone, une corrélation positive avec la classe 2,5c est observée.

## C.II.DISCUSSION

### C.II.I. DIVERSITE DES TUMEURS

#### Préparation des frottis

Dans cette étude, deux méthodes différentes de préparations des frottis ont été utilisées: la préparation par ponction à l'aiguille fine et la

préparation par grattage de la surface de la tumeur fraîche après l'opération. Ces deux méthodes ont l'avantage de conserver des noyaux cellulaires intacts et de permettre une dispersion favorable à l'analyse automatique.

Pour les études rétrospectives, des préparations réalisées partir de blocs de paraffine peuvent être obtenues par digestion enzymatique ménagée (Van Driel-Kulker et al., 1985 ; Hedley et al., 1984). Nous avons testé cette technique et obtenu des préparations généralement moins riches en cellules que par les 2 méthodes précédentes. Les noyaux sont plus condensés en raison de la fixation "en masse" par le formol et le cytoplasme est très mal conservé. En outre, des noyaux coupés peuvent rendre l'interprétation des résultats difficile.

Une autre méthode utilisée par Berryman et al. (1984) et par Fu et Hall (1985) consiste à mesurer la ploïdie sur des coupes histologiques. Deux difficultés apparaissent alors :

1. dans l'épaisseur des coupes utilisées en routine (5 à 10  $\mu$ m) beaucoup de noyaux sont coupés de façon variable.

2. les cellules ne sont pas étalées comme dans les frottis cytologiques de sorte que des noyaux ou des parties de noyaux s'étalent sur plusieurs plans de focalisation.

Diverses méthodes, fondées sur les lois de la stéréologie, ont été proposées pour corriger les mesures de ploïdie réalisées sur coupes (Barres et al., 1985). Les modèles mathématiques correspondants ne s'appliquent cependant que si les noyaux sont sphériques et de taille homogène. Ils ne conviennent donc pas à l'analyse des tumeurs du sein qui sont souvent très hétérogènes.

L'avantage de la mesure de la ploïdie sur des coupes histologiques est que les régions pathologiques de la coupe pouvant être sélectionnées et

mesurées séparément, les résultats obtenus sont alors corrélés directement avec la morphologie histologique.

#### Référence diploïde

Pour pouvoir comparer les résultats de spécimens traités par différents lots de colorants, une référence est nécessaire. Nous avons utilisé comme référence des lymphocytes présents dans chaque frottis.

Les valeurs de densité optique des lymphocytes sont différentes d'un cas à l'autre. Les moyennes varient de 3301 u.a. à 8020 u.a.. La plupart des cas (29 cas = 71%) ont une moyenné comprise entre 5.000 u.a. et 6.500 u.a.. Ces différences reflètent la grande hétérogénéité des préparations analysées:

Les frottis varient selon la date de leur confection et le temps de fixation réel ne peut pas être vérifié a posteriori. Selon le protocole le temps de fixation était de 30 minutes mais aucune rigueur n'était requise dans le contexte de l'observation visuelle des frottis.

Des différences de préparation pourraient expliquer les différences de l'intensité de coloration des lymphocytes ainsi que la variation de leur taille de 86 u.a. à 193 u.a. selon les frottis. Dans l'étude prospective, la standardisation des méthodes préparatives n'a pas abouti à une plus faible variabilité du faciès nucléaire des lymphocytes.

Outre des différences de préparation, les lymphocytes ne peuvent de toute façon pas être considérés comme une population homogène. Leur taille et le degré de condensation de leur chromatine varie selon leur état d'activation immunologique (Germain et al., 1981).

Il existe d'autres références diploïdes possibles. Quelques auteurs utilisent des fibroblastes (Atkin, 1972). Ces cellules ont l'avantage de mieux correspondre aux cellules tumorales à l'égard de la taille et du niveau de décondensation de la chromatine ; de plus elles peuvent être facilement distinguées des cellules tumorales par leur forme allongée. Malheureusement, les fibrocytes ne se trouvent pas en quantité suffisante dans tous les frottis. Nous avons donc choisi des lymphocytes comme référence essentiellement parce qu'ils sont présents dans la majorité des préparations et sont toujours très facilement reconnaissables. Certains auteurs utilisent une référence externe, telle que des erythrocytes de poulet ou de truite. Bien que ces cellules présentent des populations plus uniformes que les lymphocytes humains une référence interne est préférable. En effet les lymphocytes subissent le même traitement que les cellules tumorales, ils ont le même âge et ont reçu la même quantité de lumière pendant les mesures. Ce dernier critère est important parce que la coloration de Feulgen pâlit à la lumière (Kasten et al., 1962).

Nous avons constaté que les noyaux des lymphocytes mesurés dans l'étude prospective sont en moyenne plus grands que les noyaux des lymphocytes mesurés dans les frottis rétrospectifs: La moyenne était de 147 u.a. dans les cas prospectifs comparé à 137 u.a. dans les cas rétrospectifs. Cette différence est significative au seuil de probabilité de 95%. La différence concernant la densité optique intégrée est encore plus importante: 8320 u.a. pour les cas prospectifs au lieu de 5618 u.a. pour les cas rétrospectifs. Cette différence est significative au seuil de probabilité de 99%.

Il est probable que ces différences soient dues aux différences de

préparation: les cas rétrospectifs avaient été fixés par le mélange alcool/éther et colorés initialement selon PAPANICOLAOU par contre, les cas prospectifs ont été fixés dans le fixateur de BOEHM-SPRENGER et colorés directement par la réaction de FEULGEN. La préparation des cas rétrospectifs rend les cellules moins colorables et provoque une contraction plus grande des cellules et notamment des lymphocytes.

Enfin les lymphocytes sont plus petits que les cellules tumorales et la chromatine des lymphocytes est naturellement plus condensée que la chromatine des cellules tumorales (Okagaki et Izvo, 1978). Cette condensation est à l'origine d'une erreur négative affectant les mesures de densité optique (loi de Lambert/Beer). La valeur de IOD correspondant au contenu en ADN de cellules diploïdes était environ 10% plus élevée que la valeur de IOD mesurée sur des lymphocytes. De tels résultats ont déjà été observés par différents auteurs qui en tiennent compte de façon différente:

Si la valeur des lymphocytes est fixée à 100 la valeur 110 est considérée comme valeur diploïde (Atkin, 1972 ; Atkin et Kay, 1979). D'autres auteurs multiplient la valeur des lymphocytes par un coefficient 1,2 (Boecking et al., 1984). Cornelisse et al. (1984) considèrent que les cellules qui ne varient pas de plus de 10 à 15% par rapport à la valeur des lymphocytes sont diploïdes.

Fossa et al. (1982) utilisent des granulocytes comme référence interne avec les mêmes inconvénients que ceux rencontrés avec les lymphocytes.

Les analyses par cytométrie en flux utilisent une référence externe, par exemple des érythrocytes de poulet ou de truite.

Nous avons gardé la valeur 2 000 comme valeur moyenne diploïde de IOD par référence aux lymphocytes, de sorte que la valeur correspondant aux cellules tumorales diploïdes était de 2 200 environ. Considérant



les différentes sources d'erreurs, l'intervalle de 2000 à 2400 u.a. a été retenu comme caractéristique des cellules diploïdes.

#### Analyse d'image et cytométrie en flux

Les deux principales techniques utilisées en cytologie analytique sont l'analyse d'image et la cytométrie en flux. Les études comparant ces deux méthodes (Cornelisse et al., 1984 ; Cornelisse et Van Driel-Kulker, 1985) montrent que les qualités respectives de ces deux approches sont différentes et qu'elles ne peuvent pas être considérées comme compétitives. La cytométrie en flux permet la mesure d'une grande quantité de cellules (i.e. plus de 100 000 cellules) de sorte que la quantité moyenne en ADN d'une population cellulaire peut être déterminée avec une grande précision. Les résultats fournis par cette méthode sont donc souvent exprimés en terme "d'indice d'ADN" qui est le quotient entre le contenu en ADN de la population G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub> analysée et le contenu en ADN d'une population diploïde normale de référence. Cet indice est pratique pour évaluer le contenu en ADN des cellules de la lignée principale de la tumeur, mais il ne rend pas compte de clones éventuels ayant un contenu différent.

La méthode d'analyse d'image présente l'avantage de permettre le contrôle visuel des cellules analysées ; on peut donc discriminer les cellules bénignes des cellules malignes et les cellules épithéliales des cellules stromales ou sanguines. De plus, les agrégats de cellules peuvent être reconnus et écartés de l'analyse. Enfin le contenu en ADN d'une cellule considérée individuellement peut être déterminé et permet ainsi de détecter d'éventuels clones de peu de cellules ayant des paramètres densitométriques et/ou morphologiques particuliers.

### Classification des histogrammes d'ADN

Les méthodes de classification des histogrammes d'ADN proposées à ce jour avaient pour principal objectif de faciliter l'analyse des corrélations entre la ploïdie et le temps de survie des malades (Auer et al., 1980 a) ou les facteurs pronostiques tels que le nombre de métastases axillaires (Cornelisse et al., 1985) et/ou le taux des récepteurs aux oestrogènes (Auer et al., 1980 b).

Atkin (1972) examine les modes des histogrammes d'ADN et sépare les histogrammes en deux groupes: les diploïdes ou assimilés et les triploïdes/tétraploïdes.

Auer et al. (1980 a, 1980 b) utilisent une classification selon quatre types (cf. définitions en B III). Cette classification est fondée sur la position des modes de l'histogramme et la présence ou l'absence de cellules entre les modes.

En cytométrie en flux, c'est la position du pic majeur (indice de ploïdie) qui est généralement considérée plutôt que la forme de l'histogramme.

Quelques auteurs (Bedrossian et al., 1981 ; Raber et al., 1982) évaluent l'activité de prolifération en calculant la proportion de cellules en phase S, celles-ci sont supposées être les cellules ayant un contenu en ADN supérieur à celui de la population G1,G0 et inférieur à celui des cellules en phase G2,M. Cette approche implique que les populations soient homogènes ce qui est rarement le cas dans les cancers du sein (Hager et Heppner, 1983) ; en outre, la distinction entre cellules en phase S et cellules aneuploïdes n'est pas possible sur la base du seul contenu en ADN.

Boecking et al. (1984) ont proposé de calculer deux paramètres à partir

de l'histogramme de ploïdie:

le premier est le pourcentage de cellules ayant un contenu en ADN supérieur à  $2c$  ( $2cDI$ ). On détermine d'abord pour chaque cellule la différence entre sa valeur d'ADN et la valeur correspondant aux cellules diploïdes. L'indice est la somme des carrés de ces différences divisé par le nombre de cellules analysées.

Le deuxième paramètre est la proportion de cellules ayant un contenu en ADN  $>5c$  ( $5cER$ ).

Chassevent et al. (1984) ont proposé d'extraire des histogrammes d'ADN obtenus par cytométrie en flux, 5 paramètres qui sont: le taux de ploïdie (indice d'ADN); le pourcentage de cellules dont le contenu en ADN est supérieur à  $2c$  et la répartition des cellules dans le cycle cellulaire ( $\%G0,G1$ ;  $\%S$ ;  $\%G2,M$ ). La diversité des méthodes proposées (Bedrossian et al., 1981; Boecking et al., 1984; Chassevent et al., 1984; Cornelisse et al., 1984; Ewers et al., 1984; Fossa et al., 1982; Olszewski et al., 1981 etc.) démontre l'absence de modèle de référence permettant d'évaluer la signification biologique de la distribution des cellules en fonction de leur quantité d'ADN et rend difficile la comparaison directe entre ces travaux.

La méthode de classification des histogrammes d'ADN que nous avons développée avait, contrairement aux méthodes précédentes, pour principal objectif de décrire la diversité des histogrammes d'ADN et d'en extraire des caractéristiques plutôt biologiques que cliniques. Les histogrammes d'ADN ont donc été représentés par les pourcentages de cellules dans dix classes de contenu en ADN. Les intervalles choisis (tableau 3) tiennent compte des facteurs biologiques en conservant les intervalles  $2c$ ,  $4c$  et  $8c$ , significatifs de l'euploïdie.

Pour une représentation graphique des histogrammes, un plan d'ACP a été choisi qui sépare les tumeurs euploïdes des tumeurs aneuploïdes. En deuxième lieu, deux paramètres étaient extraits de ce plan: il s'agit de l'indice de ploïdie et de l'indice de prolifération.

Cette représentation offre les avantages suivants:

1. elle tient compte de toutes les cellules aneuploïdes et pas seulement du degré d'aneuploïdie de la lignée principale;

2. elle tient compte de l'activité de prolifération pour autant que les cellules ayant une quantité d'ADN intermodale peuvent être considérées comme des cellules en phase S indépendamment de leur ploïdie;

3. ces deux indices permettent de caractériser les histogrammes d'ADN aussi bien que le plan d'ACP puisque l'indice de ploïdie représente, en réalité, l'une des composantes vectorielles des paramètres qui définissent le premier axe du plan; l'indice de prolifération représente l'étalement de l'histogramme dû à la présence de cellules intermodales.

En conséquence ces deux indices sont riches en information biologique interprétable.

#### **Problème biologique de l'aneuploïdie**

L'expression "euploïde" signifie qu'une cellule a un multiple entier du nombre haploïde de chromosomes des cellules sexuelles. Des cellules diploïdes, triploïdes, tétraploïdes etc. sont donc des cellules euploïdes (Bradbury et al., 1981). Des cellules qui ont plus de deux lots haploïdes de chromosomes sont dites "polyploïdes". Il est à noter que ces définitions sont fondées sur le nombre de chromosomes et non

sur le nombre de chromatides ou le contenu en ADN des cellules. Une cellule en phase G2 du cycle cellulaires n'est donc pas tetraploïde (4n), mais contient quatre chromatides par paire de chromosomes (4c), chaque paire ne comptant que 2 chromosomes (2n).

Une cellule aneuploïde contient un multiple non-entier du nombre haploïde de chromosomes. Cette anomalie se manifeste par des chromosomes additionnels (hyperploïdie) ou par des pertes de chromosomes dans certaines paires (hypoploïdie). En ce qui concerne les délétions et translocations, dont certaines sont difficilement détectables, le qualificatif de "aneuploïdie" ne convient pas puisque le nombre de chromosomes n'est pas modifié.

Les approches cytogénétiques des cancer du sein (Trent, 1985) ont montré que les anomalies chromosomiques y sont fréquentes. De nombreuses tumeurs malignes du sein ont un caryotype pathologique comportant des "chromosomes marqueurs" aux formes anormales. Les anomalies des chromosomes 1, 6, 7 et 11 sont particulièrement fréquentes.

#### C.II.II. SIGNIFICATION CLINIQUE

Nous avons établi une méthode qui permet de classer les histogrammes d'ADN d'une manière objective selon deux critères ayant une signification biologique: l'indice de ploïdie et l'indice de prolifération. La question se pose donc de savoir quelles relations existent entre ces paramètres et les données cliniques tels que le nombre de métastases axillaires, la taille de la tumeur et la présence de récepteurs hormonaux.

## 1. Activité de prolifération

L'activité de prolifération ne se traduisant pas directement dans l'histogramme d'ADN, nous avons utilisé comme indice de prolifération le pourcentage de cellules intermodales.

### a. Corrélation avec le nombre de métastases axillaires

Selon nos résultats, l'indice de prolifération des cas sans métastases n'est pas différent de celui des cas avec métastases.

Pour la formation de métastases les cellules malignes doivent être capable de se détacher de la tumeur primaire et de pénétrer dans les vaisseaux sanguins ou lymphatiques. A un lieu distant de la tumeur primaire, elles doivent pouvoir sortir du vaisseau sanguin, pénétrer dans les tissus, s'y fixer et se multiplier (Salomon, 1982).

La probabilité de former des métastases est donc liée à des propriétés cellulaires qui, selon nos résultats, ne dépendent pas nécessairement de l'activité de prolifération d'une tumeur.

Cette hypothèse est confirmée par les travaux de différents auteurs, qui ont examiné l'activité de prolifération par marquage à la thymidine tritié (Gentili et al., 1981 ; Meyer et Hixon, 1979 ; Moran et al., 1984): Aucune différence significative de l'indice de marquage entre les patients avec et sans métastases n'a été trouvée.

### b. Corrélation avec la taille de la tumeur

Nos résultats n'ont pas permis d'établir de corrélation entre la taille de la tumeur et l'activité de prolifération des populations tumorales.

Ceci est en accord avec de nombreux travaux ( Silvestrini et al., 1984 ; Meyer et Bauer, 1975 ; Gentili et al., 1981) pour lesquels l'activité de prolifération, généralement exprimée par l'indice de marquage à la thymidine tritiée , ne s'est pas révélée corrélée avec la taille de la tumeur. Ainsi la taille de la tumeur ne serait pas une conséquence directe de l'activité de prolifération. Effectivement, la perte de cellules par dissémination et nécrose peut modifier grandement le nombre final de cellules corrélées à la taille de la tumeur. La taille étant déterminée lors du premier diagnostic (taille clinique) ou lors de l'opération de la tumeur (taille histologique), elle dépend en grande partie du délai de détection: ainsi l'âge d'une tumeur de 1 cm de diamètre peut varier de quelques mois à quelques années. Les activités de prolifération des cellules dans ces deux cas sont certainement différentes.

#### c. Corrélation avec le taux des récepteurs hormonaux

Nos résultats n'ont pas permis de constater de corrélation entre l'activité de prolifération et le taux des récepteurs aux oestrogènes. Par contre, plusieurs auteurs (Kute et al., 1981 ; Meyer et al., 1978 et 1984 ; Meyer et Lee, 1980 ; Silvestrini et al., 1984) ont décrit une corrélation négative entre ces deux paramètres. La présence ou l'absence de récepteurs hormonaux est due à l'activation ou à l'inactivation des gènes correspondants par la transformation maligne. Ainsi la perte des récepteurs hormonaux est le signe d'une dédifférenciation du tissu, elle-même souvent accompagnée par une augmentation de l'activité de prolifération. Il existerait donc une relation indirecte entre les deux paramètres mais selon des modalités probablement complexes.

## 2. Aneuploïdie

### a. Corrélation avec le nombre de métastases axillaires

La répartition des cas selon l'indice de ploïdie ne montre pas de différence évidente entre les cas avec ou sans métastases. L'analyse discriminante (tableau 13) montre, que ce sont plutôt les pourcentages de cellules dans les classes de ploïdie élevée (6c, 7c, 8c) qui distinguent les cas avec métastases des cas sans métastase.

Les travaux concernant les corrélations entre l'aneuploïdie et le nombre de métastases axillaires sont controversés. Les auteurs qui n'ont pas trouvé une telle corrélation (Ewers et al., 1984 ; Bedrossian et al., 1981) présentent des résultats aussi significatifs que ceux qui en ont trouvé (Hedley et al., 1984 ; Cornelisse et al., 1984). Sur le plan biologique, une corrélation positive entre le nombre de métastases axillaires et la présence d'une aneuploïdie signifierait que l'agressivité des cellules, c'est-à-dire leur capacité de former des métastases, augmente, si les changements caryologiques deviennent plus importants au sens de la quantité d'ADN mise en cause.

### b. Corrélation avec la taille de la tumeur

Les résultats que nous avons obtenus n'ont pas fait apparaître de relation entre l'aneuploïdie et la taille de la tumeur.

Une analyse discriminante entre les tumeurs de petite taille et les tumeurs de grande taille n'a pas conduit à une bonne séparation sur la base des pourcentages de cellules dans les dix classes de ploïdie. De plus, cette analyse n'a pas sélectionné les pourcentages de cellules



ayant un contenu aneuploïde (2,5c ou 3c) mais les pourcentages de cellules ayant une ploïdie élevée (7c ou >8c).

Les résultats obtenus par divers auteurs concernant une éventuelle corrélation entre la taille de la tumeur et une aneuploïdie sont divergents. Quelques auteurs trouvent une corrélation entre ces deux paramètres (Fallenius et al., 1986 ; Ewers et al., 1984) et pas d'autres (Jakobsen et al., 1984 ; Bedrossian et al., 1981).

Les fondements biologiques d'une telle corrélation sont difficiles à envisager. Fallenius a émis l'hypothèse d'une dédifférenciation et d'une malignité croissante pendant le développement de la tumeur, hypothèse contredite par des travaux de Bedrossian et al. (1981) et Auer et al. (1984) qui constataient au contraire une grande stabilité dans le temps du degré de ploïdie des cancers du sein: le type d'histogramme d'ADN de la tumeur primaire et celui des métastases apparues jusqu'à plus de dix ans après la tumeur primaire sont généralement très similaires.

#### c. Corrélation avec le taux des récepteurs hormonaux

Nos résultats n'ont pas montré de corrélation entre le taux des récepteurs aux oestrogènes et l'aneuploïdie. L'analyse discriminante entre les groupes de cas avec et sans récepteurs était fondée sur le pourcentage de cellules ayant une ploïdie élevée (8c et >8c) et aboutissait à une séparation correcte de 86% des cas en considérant les classes de haute ploïdie (8c et >8c).

Des corrélations entre l'indice d'ADN, qui exprime le degré d'aneuploïdie, et le taux des récepteurs aux oestrogènes ont déjà été rapportées (Cornelisse et al., 1984 ; Fossa et al., 1982 ; Olszewski et

al., 1981 ; Raber et al., 1982). Les corrélations restent cependant faibles. De plus, des taux élevés de récepteurs peuvent être trouvés dans des tumeurs très aneuploïdes, de même que des taux faibles dans des tumeurs diploïdes (Cornelisse et al., 1984).

La formation des récepteurs hormonaux pourrait donc être sous la dépendance de changements chromosomiques non détectables par les méthodes utilisées (i.e. translocation ou augmentation faible du matériel génétique).

### 3. Corrélation avec le pronostic

#### a. Les données cliniques

Comme nous l'avons constaté dans l'étude rétrospective les données cliniques ne se sont relevées que faiblement corrélées au pronostic. Ainsi des tumeur atteignant 6 cm ou associées à un nombre élevé (jusqu'à 10) de métastases axillaires se rencontre chez des patientes ayant une longue survie. Corrélativement, des patientes à courte survie sans métastase ou avec des petites tumeurs (<3cm) sont également rencontrés.

La principale conclusion de nos résultats est donc que la prolifération cellulaire et l'aneuploïdie ne montrent que des corrélations faibles avec les données cliniques.

#### b. Aneuploïdie et activité de prolifération

Des cas de cancers du sein qui montrent une prolifération augmentée et une anomalie caryologique étendue (aneuploïdie) sont réputés de mauvais

pronostic. Nos résultats concernant les cas rétrospectifs confirment cette hypothèse: la plupart des cas à courte survie ont un indice de ploïdie faible et un indice de prolifération élevé ; corrélativement, la plupart des cas à longue survie ont un indice de ploïdie élevé et un indice de prolifération bas.

Mais pour les deux séries de cas les exceptions sont fréquentes. La corrélation de ces deux paramètres avec le pronostic n'est donc pas suffisante pour affirmer un pronostic sur un cas donné.

Une explication possible de ces résultats est que l'agressivité d'une tumeur n'est pas liée aux propriétés cellulaires mais à des relations tumeur-hôte: une même cellule se développerait donc différemment dans des hôtes différents. Les données cliniques, comme la taille de la tumeur, la présence de métastases axillaires et le temps de survie dépendraient principalement de facteurs internes comme l'état immunologique des malades plutôt que des anomalies cellulaires.

Cette hypothèse a été réfutée par des expériences de Fidler et Kripke (1977) qui ont montré, par injection intraveineuse de cellules provenant de clones, que le nombre de métastases formées par des cellules dépendait du clone d'origine et pas de l'hôte (expériences réalisées chez la souris).

Une autre explication possible du manque de corrélation entre le pronostic et le contenu en ADN des cellules est que ce dernier ne suffit pas à caractériser le degré d'anomalie associable à l'agressivité des cellules. Comme nous l'avons montré, des histogrammes d'ADN très similaires peuvent être trouvés chez des patientes présentant des évolutions très différentes de leur tumeur.

En supposant que l'agressivité d'une cellule ait une base cytologique,

l'activité génétique d'une cellule agressive doit être différente de celle d'une cellule non-agressive. L'activité génétique se traduit dans la structure chromatinienne d'une cellule (Smith et al., 1982), nous avons donc examiné les relations entre les données cliniques et la texture chromatinienne des cellules tumorales (étude prospective) ainsi que les relations entre le pronostic et la texture chromatinienne des cellules tumorales (étude rétrospective).



D. ANALYSE DE LA TAILLE ET DE LA TEXTURE NUCLEAIRE

=====

D.I. RESULTATS

D.I.I. DIVERSITE DES TUMEURS

1. Matrice de corrélation

La matrice de corrélation entre les 15 paramètres calculés par noyau sur l'ensemble des cellules acquises pour l'étude prospective est donnée dans le tableau 15.

Entre différents paramètres de fortes corrélations sont observées. On considère comme forte corrélation des coefficients de corrélation supérieur à 0,6.

Les paramètres calculés à partir de la matrice de longueurs de sections sont corrélés entre eux et avec les paramètres DIFMO (contraste) et IOD. Le coefficient de corrélation entre IOD et GLD est de 0,55.

Tous les paramètres MARKOVIEN de texture sont corrélés avec la surface, sauf le paramètre LM. Celui-ci ne montre pas de corrélation avec d'autres paramètres.

Le paramètre IOD est corrélé avec la surface nucléaire. Il ne montre pas de corrélation avec les paramètres calculés à partir de la matrice de co-occurrence où avec les autres paramètres densitométriques.

Le paramètre NA (surface nucléaire) ne montre pas non plus d'autres corrélations avec les paramètres densitométriques.

Les paramètres MOD, SODH, SDODH et KODH ne montrent pas de corrélation entre eux où avec les paramètres MARKOVIEN de texture, sauf une forte

corrélation entre MOD et SDOH.

En ce qui concerne les paramètres Z et CVAR il est à noter qu'ils sont corrélés entre eux et avec les paramètres LRE et GLD. Le paramètre Z est en plus corrélé avec le paramètre RPC.

La matrice de corrélation calculée pour les cellules de l'étude rétrospective est donnée dans le tableau 16. Les corrélations entre les paramètres sont en général proches de celles obtenues dans l'étude prospective.

## 2. Analyse monoparamétrique

### 2.1. Histogrammes

Les histogrammes des paramètres NA, SODH, LM et RLD pour les populations totales de l'étude rétrospective et pour l'étude prospective sont présentés dans la figure 22.

Le paramètre NA (surface du noyau) montre une distribution monomodale. L'histogramme est asymétrique, la distribution est déplacée vers le gauche. Le pic est plus bas pour les cellules de l'étude prospective et il est déplacé vers des valeurs plus élevées.

Le paramètre SODH présente un histogramme plutôt symétrique. Dans l'histogramme avec des intervalles de 12 u.a. la colonne centrale est - 12/-24 dans l'étude prospective et - 36/-48 dans l'étude rétrospective.

Le paramètre LM montre une distribution pratiquement symétrique, centrée autour de 550 u.a. pour les cellules prospectives et 520 u.a. pour les cellules rétrospectives.

Le paramètre RLD montre une distribution asymétrique. Le pic est plus

bas et décalé vers des hautes valeurs pour les cellules de l'étude prospective.

Tous les autres paramètres montrent des histogrammes monomodaux. Les pics sont généralement asymétriques. La forme des histogrammes est toujours similaire pour les deux études.

## 2.2. Moyennes et écart-types des paramètres nucléaires

Le tableau 17 montre les moyennes et les écart-types des 15 paramètres pour l'ensemble des cellules de l'étude rétrospective (8175 cellules) et pour l'ensemble des cellules de l'étude prospective (57211 cellules). Les différences entre les deux études sont significatives pour tous les paramètres. Pour les paramètres MARKOVIENS de texture, les moyennes obtenues dans l'étude rétrospective sont plus faibles que celles obtenues dans l'étude prospective. Il en est de même pour les moyennes des paramètres NA (surface nucléaire) et SODH. Les quatre autres paramètres (IOD, MOD, SDODH et KODH) ont des moyennes plus élevées dans l'étude rétrospective. Il a été vérifié que les moyennes calculées sur l'ensemble des cellules de l'étude rétrospective ou prospective n'étaient pas significativement différentes des moyennes des paramètres par cas. Pour l'étude rétrospective les moyennes sont ainsi calculées sur 41 valeurs et sur 117 valeurs pour l'étude prospective.

Pour comparer les paramètres nucléaires des cas présentant des tumeurs malignes avec ceux présentant des tumeurs bénignes, nous avons calculé les moyennes et les écart-types des paramètres sur l'ensemble des cas des deux groupes. Le résultat est présenté dans le tableau 18. On



constate que la plupart des paramètres sont significativement différents entre les deux groupes. Seuls les paramètres MOD, SDODH, KODH, Z et CVAR ne montrent pas de différence significative entre les deux groupes de cas.

### 3. Analyse multiparamétrique par une ACP

#### 3.1. Différents plans d'ACP

La figure 23 montre la projection des images nucléaires de quelques cellules dans les trois plans d'ACP calculés à partir de différentes combinaisons de paramètres pour les deux premières variables. Les vecteurs précisent la fonction des paramètres dans les variables représentées.

La figure 23 a montre la distribution des cellules dans un plan défini par l'ensemble des quinze paramètres nucléaires. Les cellules sont bien dispersées indiquant que les deux variables représentées ne sont pas corrélées.

Les cellules sont classées selon leur taille de gauche (grosses cellules) à droite (petites cellules). Sur la moitié supérieure du plan se trouvent des cellules avec une texture grossière. Les cellules de la partie inférieure du plan ont une texture finement granulaire.

La répartition des cellules sur le plan correspond donc bien à l'impression visuelle concernant leur taille et la structure de leur chromatine.

La figure 23 b montre la distribution des cellules dans un plan défini par les paramètres MARKOVIENS de texture. La position des cellules indique une corrélation entre les deux variables représentées. Bien que

le paramètre NA (taille nucléaire) ne soit pas parmi les paramètres considérés pour le calcul des axes factorielles, on constate une augmentation de la taille nucléaire de gauche à droite. Ce phénomène est dû à la dépendance des paramètres de texture de la taille des noyaux. Cette dépendance est probablement purement mécanique, la taille d'un noyau dépendant directement de l'arrangement de la chromatine.

La matrice de corrélation entre les paramètres et leur distribution dans la population cellulaire permet de sélectionner trois paramètres nucléaires aussi indépendants que possibles: SODH, CVAR et RLD. La projection des images nucléaires dans le plan défini par ces trois paramètres (figure 23 c) montre que les deux informations taille et structure nucléaire sont suffisamment décrites par ces trois paramètres. La taille des noyaux augmente de la région inférieure gauche vers la région inférieure droite du plan. La structure nucléaire est aussi bien représentée: les cellules qui sont proches sur le plan présentent une texture similaire.

Ce dernier plan calculé sur la base des trois paramètres SODH, CVAR, RLD et qui représente fidèlement les différences de faciès nucléaire a été retenu pour une analyse plus approfondie des différences de texture des populations cellulaires.

### 3.2. Analyse du plan d'ACP impliquant les paramètres SODH, CVAR et RLD

La figure 24 montre des nuages de points obtenus pour six tumeurs différentes. Chaque point représente une cellule de la tumeur projetée dans le plan défini par les paramètres SODH, CVAR et RLD. On constate,

que les tumeurs correspondent à des nuages variés occupant des régions différentes du plan.

La figure 25 montre les histogrammes de surface du rectangle d'encadrement pour les études rétrospectives et prospectives respectivement. La moyenne de la surface est de 56 u.a. pour l'étude prospective et de 38 u.a. pour l'étude rétrospective. La surface varie de 7 à 393 u.a. pour l'étude prospective et de 11 à 175 u.a. pour l'étude rétrospective. La distribution est asymétrique avec un décalage vers des valeurs élevées de surface.

Ceci signifie que les cas rétrospectifs ont en général des populations cellulaires plus homogènes que les cas prospectifs.

La figure 26 montre la distribution des cas en fonction des moyennes des deux variables de l'ACP. Chaque cas est donc représenté par un point qui correspond au centre de gravité de la projection de ses cellules dans le plan de l'ACP. Les deux paramètres ne sont pas corrélés ( $r=0,34$ ). La distribution des cas diffère selon l'étude: les cas prospectifs sont compris entre -1,5 et 1,7 pour l'axe x (moyenne = 0,04) et entre -0,8 et 1,0 pour l'axe y (moyenne = 0,03). Les cas rétrospectifs sont compris entre -1,5 et 1,0 pour l'axe x (moyenne = -0,6) et entre -0,7 et 2,4 pour l'axe y (moyenne = 0,4).

La surface du rectangle d'encadrement est faiblement corrélée avec la moyenne de la variable 1 ( $r=0,47$ ): la surface du rectangle d'encadrement est plus grande pour les cas ayant des valeurs élevées de la moyenne de la variable 1.

La figure 27 représente les frontières choisies selon les critères

donnés en B.I.2.3.2. Le tableau 19 porte les pourcentages minimaux, moyens et maximaux de cellules par cas dans chacune des cinq régions du plan d'ACP pour l'étude rétrospective et pour l'étude prospective. Les corrélations entre les pourcentages dans les zones ont été calculées pour l'étude prospective. Des corrélations négatives existent entre les pourcentages dans les groupes B et C et entre les pourcentages dans les groupes B et D. Une corrélation positive est observée entre les pourcentages dans les groupes C et D. Les coefficients de corrélation pour les autres groupes restent inférieurs à 0,6.

Pour les deux séries de cas, la zone B du plan d'ACP est la région principale. Elle contient la majorité des cellules (42% pour l'étude prospective et 47% pour l'étude rétrospective). Pour l'étude rétrospective suivent la zone E (23% des cellules), la zone A (16% des cellules), la zone C (8% des cellules) et la zone D (6% des cellules). Pour l'étude prospective suivent la zone A (18% des cellules), la zone C (17% des cellules), la zone D (12% des cellules) et la zone E (11% des cellules).

La repartition des cellules dans le plan d'ACP défini par les trois paramètres SODH, CVAR et RLD est donc différente selon la nature rétrospective ou prospective de l'étude. Les cas rétrospectifs s'étalent plutôt vers des valeurs élevées de la variable 2 (zone E), alors que les cas prospectifs s'étalent vers des valeurs élevées de la variable 1 (zone C et D). Il est à noter que les valeurs minimales pour les cinq zones sont toujours très faibles.

La troisième méthode d'analyse du plan d'ACP est la séparation objective des cellules en sous-groupes. Le programme CLASSIF a créé six groupes de cellules. Ce programme a utilisé en première étape le

paramètre CVAR pour une séparation des cellules en trois groupes. A la deuxième étape le paramètre SODH est utilisé pour subdiviser chaque groupe cellulaire en deux sous-groupes. Une subdivision des groupes cellulaires résultant de la deuxième étape par le paramètre RLD n'améliorait pas la partition.

Le programme a donc créé six groupes nucléaires nommés I à VI. Leur projection dans le plan d'ACP est donnée dans la figure 28. Les cellules des groupes I, II et III sont regroupées ; il s'agit donc de groupes homogènes. Les cellules des groupes IV, V et VI sont plus dispersées.

La répartition des cellules dans les différents groupes, calculée par un programme d'analyse discriminante décisionnelle, est donnée dans le tableau 20 où sont notés les pourcentages minimaux, moyens et maximaux des cellules de ces six groupes par tumeur.

Les groupes III, IV et VI sont très peu représentés dans les deux études. Ces groupes collectent en moyenne moins que dix pourcent des cellules. Aucune tumeur n'a plus de 50% de ses cellules dans un de ces groupes.

Pour l'étude rétrospective le groupe I est le groupe majoritaire avec 58% des cellules en moyenne. Il est suivi du groupe II avec en moyenne 29% des cellules. Pour l'étude prospective le groupe majoritaire est le groupe II qui contient en moyenne 44% des cellules suivi du groupe I qui contient en moyenne 36% des cellules. Les coefficients de corrélation pour l'appartenance aux six groupes ont été calculés pour l'étude prospective. La plus forte corrélation a été trouvée entre les groupes IV et VI ( $r=0,87$ ). Ces deux groupes voisins sont situés sur la

partie inférieure droite du plan d'ACP. La corrélation entre les groupes III et V qui sont situés sur la partie supérieure droite du plan est également élevée ( $r=0,74$ ). Les deux groupes situés à l'extrémité droite du plan (valeurs élevées de la variable 1) sont également corrélés ( $r=0,72$ ).

Une comparaison des groupes I à VI créés automatiquement avec les groupes A à E créés subjectivement montre que la zone A correspond principalement aux cellules du groupe II. La zone B comprend des cellules des groupes I et II. La zone C contient principalement des cellules du groupe II et IV. La zone D contient des cellules des groupes III, IV, V et VI. La zone E contient des cellules des groupes I et III.

Ces relations sont reflétées par les coefficients de corrélation calculés entre les groupes cellulaires définis subjectivement et les groupes définis d'une manière automatique: des coefficients de corrélation supérieurs à 0,8 sont trouvés entre la zone A et le groupe I, entre la zone C et le groupe IV et entre la zone D et les groupes III et IV.

## D.I.II. SIGNIFICATION CLINIQUE

### 1. Etude rétrospective

#### 1.1. Analyse monoparamétrique

##### 1.1.1. Corrélations

Le tableau 21 porte les coefficients de corrélation entre les moyennes par cas des quinze paramètres cellulaires et les données cliniques connues pour les cas rétrospectifs: l'âge des patientes, la taille de la tumeur, le nombre de ganglions axillaires métastatisés, le type histologique de la tumeur et le temps de survie de la malade.

Les corrélations entre l'âge des patients et les paramètres cellulaires sont toujours très faibles, le coefficient de corrélation restant inférieur à 0,20 pour tous les paramètres de texture.

La taille de la tumeur montre les plus fortes corrélations avec le paramètre DIFMO qui exprime le contraste chromatinien ( $r = 0,32$ ). Une faible corrélation négative est trouvée entre la taille de la tumeur et la surface nucléaire ( $r = -0,30$ ). Le coefficient de corrélation reste inférieur à 0,30 pour tous les autres paramètres de texture.

Le nombre de métastases axillaires est corrélé avec aucun paramètre de texture, le coefficient de corrélation le plus élevé étant observé avec la surface nucléaire ( $r = 0,28$ ).

Les corrélations les plus fortes entre texture et type histologique sont observées pour les paramètres Z et CVAR calculés à partir de la matrice de co-occurrence ; cependant, les coefficients de corrélation

ne sont que de 0,29.

La seule corrélation statistiquement significative est observée entre le temps de survie et le paramètre LM ( $r=0,43$ ).

#### 1.1.2. Histogrammes

La comparaison entre les histogrammes de quelques paramètres cellulaires pour l'ensemble des cellules acquises pour les cas à longue survie (3606 cellules) et ceux obtenus pour l'ensemble des cellules acquises pour les cas à courte survie (4570 cellules) est présentée dans la figure 29.

Les deux histogrammes du paramètre NA (surface nucléaire) montrent la même forme caractérisée par un pic légèrement asymétrique centré autour de 350 u.a.. Le pic est légèrement plus large pour les cellules des cas à courte survie. Une observation similaire peut être faite pour le paramètre RLD. Pour les paramètres SODH et LM les histogrammes des deux séries de cellules sont très semblables.

#### 1.1.3. Moyennes et écart-types

La plupart des paramètres nucléaires ont des histogrammes monomodaux et symétriques. Il est donc possible de comparer les moyennes des paramètres par cas pour trouver des différences dans la distribution de ces paramètres.

Dans le tableau 22 sont portés les moyennes et les écart-types des paramètres nucléaires pour les cas à longue survie par comparaison avec les cas à courte survie. La différence entre les deux séries de cas a été analysée par le test de STUDENT.



Une différence significative, au seuil de probabilité de 95%, a été trouvée pour le paramètre LM. La moyenne était de 514 u.a. pour les cas à longue survie et 542 u.a. pour les cas à courte survie. Les autres paramètres ne présentent pas de différences statistiquement significatives.

### 1.2. Analyse multiparamétrique

La figure 30 montre les histogrammes de fréquence de la surface du rectangle d'encadrement calculés sur le plan d'ACP des paramètres SODH, CVAR et RLD (cf. D.I.3.).

Bien que le nombre de cas représentés soit faible (21 cas à longue survie et 20 cas à courte survie), une tendance vers une surface de rectangle d'encadrement plus élevée pour les cas à courte survie est à noter. La moitié des cas a une surface du rectangle d'encadrement supérieure à 32 u.a. (10 cas sur 20) ce qui ne s'observe que pour un quart seulement des cas à longue survie (5 cas sur 21).

La figure 31 montre la position du centre de gravité des nuages de points dans le plan d'ACP analysé. Cinq cas à courte survie et un cas seulement à longue survie ont des valeurs positives de la variable 1. La variable 2 ne fait apparaître aucune différence entre les cas à courte et longue survie.

Dans la figure 32 chaque cas est représenté par un symbole correspondant à son groupe clinique. Aucun regroupement des cas appartenant au même groupe clinique n'est observé.

L'occupation des cinq zones du plan d'ACP pour les cas à longue et courte survie est donnée dans le tableau 23. La seule différence statistiquement significative est observée pour la zone D.

La repartition des cellules des cas à courte et longue survie dans les six groupes créés automatiquement est donnée dans le tableau 24. On constate une différence statistiquement significative concernant le groupe I (64% en moyenne pour les cas à longue survie et 52% en moyenne pour les cas à courte survie). Le groupe IV, qui montre également une différence significative, ne concerne qu'un petit nombre de cellules par cas.

Pour l'analyse d'un plan d'ACP trois méthodes ont été développées:

la première méthode conduisait à trois paramètres (la surface du rectangle d'encadrement, la moyenne de la variable 1 et la moyenne de la variable 2);

la deuxième méthode conduisait à cinq paramètres (les pourcentages dans les cinq zones du plan d'ACP) et

la troisième méthode conduisait à six paramètres (les pourcentages de cellules appartenant aux six types cellulaires).

Les corrélations entre ces 14 paramètres et les données cliniques sont portées dans le tableau 25. Les coefficients de corrélation concernant l'âge des malades sont tous inférieurs à 0,30 ; la taille de la tumeur n'est corrélée que faiblement avec le pourcentage de cellules dans le groupe I ( $r = 0,31$ ). Une corrélation négative de  $r = -0,36$  est trouvée avec la moyenne de la variable 1. Le nombre de métastases axillaires et le type histologique ne montrent pas de corrélation positive supérieure à  $r = 0,30$ . Par contre un coefficient de corrélation  $r = -0,46$  est observée entre le type histologique et le pourcentage de cellules dans le groupe III. La corrélation avec le pourcentage de cellules dans le groupe V est également significative ( $r = -0,34$ ).

La corrélation la plus élevée avec le temps de survie est observée pour le pourcentage de cellules dans le groupe IV ( $r=0,34$ ). Cependant, l'interprétation des coefficients de corrélation avec le temps de survie est limitée par le fait que seule deux valeurs (5 ou 10) ont été utilisées.

## 2. Etude prospective

### 2.1. Analyse monoparamétrique

#### 2.1.1. Corrélations

La matrice de corrélation entre les moyennes des paramètres par cas et les données cliniques connues est donnée dans le tableau 26. Pour le nombre des cas analysés (92 cas), un coefficient de corrélation de  $r=0,20$  est statistiquement significatif au seuil de probabilité de 95%. Il n'existe donc pas de corrélation entre les paramètres nucléaire et l'âge des malades. Concernant la taille de la tumeur, les paramètres IOD, Z et CVAR présentent des corrélations significatives. Ces mêmes paramètres, et en outre les paramètres SODH et LM, sont corrélés avec le nombre de métastases axillaires. Le type histologique montre une corrélation négative avec le paramètre SDODH et une corrélation positive avec le paramètre KODH. Deux paramètres (MOD et SDODH) montrent des corrélations négatives avec le taux des récepteurs aux oestrogènes. En ce qui concerne le taux des récepteurs à la progestérone, des corrélations négatives sont trouvées avec les paramètres IOD et SDODH et une corrélation positive avec le paramètre SODH.

### 2.1.2. Histogrammes

Pour trouver une différence éventuelle concernant la distribution d'un paramètre de texture entre populations cellulaires différentes, nous avons comparé les histogrammes de distribution, des paramètres cellulaire.

Deux groupes cliniques ont été choisis: le groupe GC-001 et le groupe GC-110.

Le premier groupe comprend les cas ayant les plus petites tumeurs contenant des récepteurs aux oestrogènes et qui présentent moins de trois métastases axillaires: le pronostic de ces cas est réputé le plus favorable.

Le deuxième groupe comprend les cas ayant de grandes tumeurs ne contenant pas de récepteurs aux oestrogènes et présentant plus de trois métastases axillaires: le pronostic de ces cas est réputé le plus défavorable.

Le groupe GC-001 comprend 43 cas représentés par 23007 cellules. Le groupe GC-110 comprend seulement sept cas représentés par 3011 cellules. Les histogrammes correspondant à ces deux groupes pour les paramètres NA (surface nucléaire), SODH et RLD sont présentés dans la figure 33. Le pic de l'histogramme du paramètre NA est plus aplati pour le groupe GC-110. Ce phénomène a été également observé pour les cas à courte survie dans l'étude rétrospective. Le pic est décalé vers la droite pour le groupe GC-110. Les histogrammes du paramètre SODH sont très similaires pour les deux populations cellulaires: il s'agit d'histogrammes monomodaux avec un pic symétrique centré sur 0. L'histogramme du paramètre RLD est plus étalés pour le groupe GC-110 mais pour les deux séries ces histogrammes sont monomodaux et asymétriques.

Les histogrammes des autres paramètres nucléaires ne présentent pas de différences significatives.

### 2.2.2. Moyenne et écart-types

Le tableau 27 montre les moyennes et les écart-types des paramètres cellulaires pour les deux populations GC-001 et GC-110. Des différences statistiquement significatives au seuil de probabilité de 95% sont observées pour les paramètres IOD, Z et CVAR.

### 2.2. Analyse multiparamétrique

Dans le tableau 28 sont notés les valeurs minimales, moyenne et maximales de la surface du rectangle d'encadrement pour les huit groupes cliniques. Dans tous les groupes, les variances sont très grandes. Des différences significatives existent entre les groupes GC-001 et GC-110, entre les groupes GC-101 et GC-100 et entre les groupes GC-101 et GC-110.

La figure 34 montre le centre de gravité des nuages de points dans le plan d'ACP analysé pour les huit groupes cliniques. Bien que les effectifs de la plupart des groupes soient faibles on peut constater les tendances suivantes: les groupes GC-100 et GC-011 occupent de préférence la moitié droite du plan. Par contre le groupe GC-101 occupe principalement la moitié gauche. Pour les autres groupes (GC-110, GC-111, GC-010, GC-000 et GC-001) il n'apparaît pas de localisation préférentielle.

La répartition des cellules dans les cinq zones du plan d'ACP est donnée dans le tableau 29 qui porte les pourcentages minimaux, moyens et maximaux par groupe clinique. Le tableau 30 montre les zones pour

lesquelles les différences entre les groupes cliniques considérés deux à deux sont statistiquement significatives au seuil de probabilité de 95%.

Les groupes GC-001 et GC-110 ne montrent pas de différence concernant ces cinq paramètres.

Le tableau 31 montre la répartition des cellules des huit groupes cliniques dans les six groupes cellulaires.

Le tableau 32 montre les types cellulaires pour lesquels les pourcentages moyens de cellules sont significativement différents entre les groupes cliniques considérés deux à deux. Les deux groupes avec des pronostics très différents (GC-001 et GC-110) sont différents concernant les types cellulaires V et VI. Pour l'interprétation des résultats il convient de considérer que les types cellulaires III à IV sont très peu représentés.

Les coefficients de corrélation entre les 14 paramètres extraits du plan d'ACP analysé et les données cliniques connues pour l'étude prospective, sont portés dans le tableau 33.

L'âge des malades, le type histologique et le taux des récepteurs aux oestrogènes montrent aucune corrélation significative avec les 14 paramètres analysés. La taille de la tumeur est corrélée avec le pourcentage de cellules dans le groupe V. Le nombre de métastases axillaires montre des corrélations avec plusieurs paramètres ; les plus fortes sont obtenues avec la surface du rectangle ( $r=0,35$ ) et le pourcentage de cellules dans le groupe VI ( $r=0,26$ ). Le taux des récepteurs à la progestérone est corrélé avec les pourcentages de cellules dans les zones B et D et les pourcentages de cellules des types I et IV.

## D.II. DISCUSSION

### D.II.I. DIVERSITE DES TUMEURS

Le cytopathologiste qui diagnostique une préparation cytologique se fonde sur des critères morphologiques tels que la taille des cellules et des noyaux, le rapport nucléo-cytoplasmique et l'organisation de la chromatine. Ce dernier critère traduit le stade de différenciation et la malignité éventuelle d'une cellule. La distribution anormale de la chromatine est la caractéristique la plus importante du noyau malin (Hughes et al., 1968). Ces critères sont à mettre en relation avec le fait que la différenciation et la transformation maligne sont directement dépendants de l'expression des gènes (Smith et al., 1982). Ainsi, l'activation et l'inactivation des gènes est accompagnée de changements dans l'état de condensation de la chromatine et donc d'altérations de la texture nucléaire puisque les processus de compaction de la molécule d'ADN mettent en jeu à la fois les histones et les protéines acides qui constituent la plus grande partie du matériel nucléaire (Valencia, 1982-1983 ; Nagl, 1985).

Il apparaît de plus en plus probable que la régulation de l'activité des gènes implique des réactions de méthylation et d'acétylation des histones ; par contre, cette régulation ne concerne que les gènes susceptibles d'être exprimés. Les mécanismes qui rendent un gène susceptible, ou non, d'être régulé, sont vraisemblablement sous la dépendance des protéines non-histones et de l'ADN hautement répétitif non transcrit. Cette interaction qui aboutit à l'inactivation sélective et irréversible caractéristique de la différenciation dépend

probablement des mêmes mécanismes que celle qui aboutit à l'activation anormale de certains gènes dans les cellules malignes. La transcription de ces gènes anormalement activés se déroule alors en l'absence des mécanismes régulateurs correspondants.

Enfin, il apparaît de plus en plus clairement que l'organisation supra-moléculaire du noyau cellulaire place les chromatides dans une interdépendance spatiale fixée par les protéines non-histoniennes (HMG notamment) et les protéines de la lamina de l'enveloppe nucléaire. Il n'est donc pas surprenant que la condensation ou la décondensation de petites sections de la molécule d'ADN se traduise par des remaniements de l'ensemble de l'édifice nucléaire. Ces altérations deviennent alors visibles au microscope optique. Pour les cytologistes il ne fait aucun doute que la texture de chromatine d'une cellule de l'épithélium galactophore est différente de celle d'une cellule stromale ou d'un lymphocyte et que la transformation maligne, même discrète (dysplasie légère), est principalement perçue à travers les changements de l'organisation nucléaire (Bradbury et al., 1981).

#### 1. Analyse de la texture de la chromatine

L'observation de la chromatine à travers le microscope conduit à des conclusions subjectives et peu reproductibles. Afin de mieux appréhender l'organisation chromatinienne, divers approches ont été utilisées.

Les méthodes biochimiques se fondent sur la sensibilité de la chromatine à divers enzymes (Smith et al., 1982) : la chromatine est d'autant plus sensible qu'elle est moins condensée. Les résultats obtenus par ces méthodes fournissent le rapport entre chromatine



condensée et décondensée mais représentent des moyennes pour le tissu étudié. Ces données ne peuvent pas être obtenues au niveau des noyaux considérés individuellement et ne permettent donc pas d'établir de relation avec l'expérience visuelle des cytologistes et leurs diagnostics cellule à cellule. Par contre, les méthodes d'analyse d'image permettent de rendre objective et quantitative la notion de texture, pour chaque cellule considérée individuellement.

Nous avons appliqué des méthodes numériques de représentation de la texture adaptées au cas des noyaux cellulaires en utilisant d'une part l'approche mono-dimensionnelle à partir de l'histogramme de densité optique, et d'autre part l'approche stochastique bi-dimensionnelle fondée sur la construction de matrices (Chassery, 1980 ; Brugal, 1984).

#### A. Paramètres déduits de l'histogramme des densités optiques

Les paramètres déduits de l'histogramme des densités optiques de l'image nucléaire et qui sont dépendants de la texture de la chromatine sont les suivants:

Le paramètre MOD correspond au contenu en ADN par unité de surface. Il exprime donc la concentration moyenne de la chromatine du noyau.

Le paramètre SDODH est l'écart-type de la densité optique du noyau qui exprime l'hétérogénéité de la condensation de la chromatine des valeurs les plus basses aux valeurs les plus hautes. Ce paramètre est indépendant de l'organisation spatiale de la chromatine.

Les paramètres KODH et SODH décrivent la forme de l'histogramme des densités optiques par noyau et dépendent de la fréquence relative des

différentes valeurs de densité optique. Ils sont donc dépendants de la distribution des différents niveaux de condensation de la chromatine mais indépendants de leurs positions respectives dans le noyau.

#### B. Paramètres stochastiques de texture

Ils concernent l'organisation spatiale des différents niveaux de gris du noyau. Chaque point de l'image contribue à la valeur d'un paramètre ; ce sont donc des "mesures globales de texture".

B.1. Les paramètres déduits de la matrice de co-occurrence dépendent des fréquences d'association des différents niveaux de gris topographiquement voisins rencontrés dans le noyau.

Les correspondances entre les valeurs de ces paramètres et l'impression visuelle de la texture de la chromatine n'est pas facile à établir.

La figure 23 permet de constater que:

Le paramètre LM exprime le degré de condensation de la chromatine. Il croît quand le degré de condensation diminue.

Les paramètres Z et CVAR, qui sont très corrélés, expriment plutôt l'homogénéité de répartition de la chromatine.

Le paramètre DIFMO dépend du contraste de l'image et permet de distinguer les textures finement granulées des textures avec de larges amas de chromatine très condensée.

B.2. Les paramètres calculés à partir de la matrice de longueurs des sections dépendent de la relation topographique entre les points de l'image qui ont le même niveau de gris. La longueur et le niveau de gris des sections du noyau ayant le même niveau de gris servent à

calculer les différents paramètres de texture.

Les valeurs du paramètre SRE sont élevées pour les textures finement granulées et faibles pour les textures homogènes.

Le paramètre LRE se comporte de façon inverse: sa valeur est élevée pour les textures homogènes.

Le paramètre GLD s'élève si certains niveaux de gris sont prédominants dans l'image; sa valeur est faible si tous les niveaux de gris sont représentés uniformément.

Le paramètre RLD croît lorsque certaines longueurs de sections apparaissent de façon plus fréquente. Il exprime donc la régularité de la texture.

Le paramètre RPC s'élève si le nombre de sections différentes augmente ; la texture est dans ce cas plus grossières.

## 2. Représentation de la texture par tumeur

Afin de pouvoir représenter chaque noyau d'une tumeur en fonction de tous les paramètres qui le caractérisent, nous avons utilisé l'analyse en composante principale. Pour comparer les tumeurs par l'analyse des différences entre les nuages de points qui représentent leurs cellules nous avons utilisé deux approches:

a. La première approche a consisté à calculer les moyennes des deux premières variables de l'ACP pour chaque tumeur analysée. Ces moyennes correspondent au centre de gravité du nuage de points formé par les cellules de la tumeur dans le plan analysé mais elles ne représentent pas la distribution des cellules. Nous avons donc ajouté à ces deux paramètres la surface du rectangle qui recouvre tous les points du

nuage. Cette surface donne une évaluation de l'hétérogénéité de la population examinée mais ce paramètre est très sensible aux artefacts puisque un objet artéfactuel situé en dehors du nuage de points correspondant à des cellules augmente la surface du rectangle d'encadrement.

b. Afin de réduire l'effet des artefacts éventuels et de mieux caractériser la distribution des points dans le rectangle, celui-ci a été découpé en différentes régions. Le problème qui se pose alors est de définir les frontières des différentes zones considérées. Nous avons comparé un découpage subjectif avec un découpage objectif et montré que les régions définies par les deux méthodes étaient très voisines.

### 3. Influence de la préparation et de la fixation sur la texture

La réaction de Feulgen est stoechiométrique pour l'ADN. La réaction est précédée par une hydrolyse acide de l'ADN qui est toujours accompagnée par une perte de désoxyribonucléotides. La température et le pH de l'acide utilisé influencent la réaction. A partir de courbes d'hydrolyse il a été constaté que les meilleurs résultats sont obtenus après hydrolyse avec l'acide chlorhydrique 6N à une température de 20°C (Deitch et al., 1968). Nous avons donc choisi cette méthode.

L'intensité de la réaction dépend aussi du fixateur utilisé. Comme le montre le tableau 8, tous les paramètres cellulaires mesurés (taille nucléaire, contenu en ADN et texture de la chromatine) sauf le paramètre Z, sont différents selon que les cellules ont été fixées par l'éthanol/éther ou par le liquide de Boehm-Sprenger. Nous avons contrôlé que cette différence n'est pas due à la coloration initiale de Papanicolaou.

Ces résultats démontrent que la structure de la chromatine des cellules fixées est déterminée par la méthode de fixation comme le confirme les travaux de Fraschini et al. (1981). Une fixation favorable pour une analyse de la texture chromatinienne provoque des modifications spécifiques de la structure native de la chromatine. Les méthodes d'analyse de la texture décrites ici peuvent être appliquées indépendamment de la méthode de fixation ; cependant, une comparaison entre les cas prospectifs et rétrospectifs n'est pas possible car les deux méthodes de fixation utilisées provoquent des altérations différentes de la texture de la chromatine.

#### D.II.II. SIGNIFICATION CLINIQUE

Il est aujourd'hui généralement admis que les paramètres qui décrivent la texture nucléaire permettent de déterminer l'état fonctionnel d'une cellule. Sans et De la Torre (1979) ont constaté que l'analyse de la texture de la chromatine, à partir de frottis colorés par la réaction de Feulgen, permet de déterminer le potentiel de prolifération des cellules avant même que l'indice de marquage et l'indice mitotique n'atteignent des valeurs significatives. Des changements de la chromatine apparaissent avant que les cellules entrent en cycle et permet donc de distinguer les cellules en phase G0 des cellules en phase G1.

Des changements de la texture chromatinienne apparaissent liés à la transformation néoplasique des cellules (Nicolini, 1980). Komitowski et Zinser (1985) ont étudié les différences de taille et d'arrangement des amas d'hétérochromatine de cellules normales par comparaison avec des

cellules maligne dans le foie. Leurs résultats suggèrent que l'apparition d'une classe additionnelle d'amas d'hétérochromatine (qui sont définis par leur distribution spatiale et leur densité optique) accompagne la transformation maligne.

D'autre part, King et al. (1984) ont montré que les paramètres cellulaires obtenus par analyse d'image permettent de distinguer entre différents types de précurseurs des tumeurs du sein (tumeurs bénignes, non-proliférative, hyperplasiques, dysplasiques et cancers). Si, dans les cancers du sein, les données cliniques (taux des récepteurs hormonaux, nombre de métastases, taille de la tumeur) sont le résultat d'activités cellulaires particulières, celles-ci doivent être corrélées aux paramètres cellulaires qui semblent être la manifestation morphologique de ces activités. Nos résultats montrent effectivement une corrélation entre le taux des récepteurs aux oestrogènes et les paramètres nucléaires mesurés par analyse d'image. Pour le nombre de métastases axillaires et la taille de la tumeur, la corrélation est plus faible. Ces facteurs ne semblent donc pas le résultat des seules propriétés cellulaires ; ils pourraient dépendre également de l'état immunologiques des patientes et des mécanismes complexes encore mal connus qui président à la relation hôte-tumeur. Dans le cas de l'étude rétrospective, la corrélation entre texture de la chromatine et pronostic était faible. Ceci pourrait être dû à la mauvaise qualité du matériel rétrospectif fixé selon des méthodes mal adaptées à une exploitation par analyse d'image et variables au cours de la longue période de recrutement (1972-1984).

Tous ces problèmes ont été évités dans l'étude prospective: la fixation, la préparation et la coloration de ces cas étaient standardisés et adaptés à l'exploitation par analyse d'image. Cette

étude n'ayant commencé qu'en 1983, l'évolution des cas n'est pas encore connue. Les données cliniques comme la taille des tumeurs, le type histologique, le taux des récepteurs hormonaux et le nombre de métastases axillaires se révèlent cependant des indicateurs de pronostic peu fiables.

Une analyse des corrélations entre le temps de survie des malades et la repartition de ses cellules dans les différents types cellulaires permettra après plusieurs années (au moins dix ans) de savoir si certains types cellulaires sont, par leur présence dans les tumeurs, d'une signification pronostique reproductible.

## E. CONCLUSIONS ET HYPOTHESES

=====

Les méthodes d'analyse d'image permettent une représentation quantitative des faciès nucléaires dans des populations cellulaires en se fondant sur les paramètres de taille nucléaire, de contenu en ADN et de texture de la chromatine.

Une caractérisation objective des histogrammes de distribution des cellules d'une tumeur en fonction de leur quantité d'ADN est rendue possible par le calcul des pourcentages de cellules dans 10 classes de ploïdie. Ces distributions peuvent être comparées entre différentes populations cellulaires par analyse multivariée dans une espace définie une fois pour toute par des histogrammes de référence.

Parmi les cas de tumeur du sein analysés dans cette étude deux principaux groupes apparaissent: les cas avec un pic majeur vers 2c ou 2,5c et les cas avec un pic majeur vers 4c ou 5c.

Les corrélations entre les pourcentages de cellules dans les différentes classes de ploïdie et les données cliniques sont faibles. Les classes de contenu élevé en ADN montrent une corrélation avec la taille de la tumeur dans l'étude prospective et avec un temps court de survie dans l'étude rétrospective.

L'hétérogénéité des cellules d'une population de cancer du sein concernant les caractères nucléaires peut être représentée sur un plan canonique après une ACP. La réduction du nombre de paramètres mesurés est possible sans perte significative d'information. Différentes méthodes d'analyse du plan obtenu peuvent être appliquées et notamment une méthode fondée sur la détermination automatique de types nucléaires



et le calcul des pourcentages de cellules appartenant à ces types.

Les corrélations entre les moyennes des paramètres nucléaires mesurés dans une population cellulaires et les données cliniques concernant la taille de la tumeur, l'âge des malades, le nombre de métastases axillaires et le taux des récepteurs hormonaux sont faibles. Cependant, une différence significative existe, pour de nombreux paramètres, entre des cellules tumorales bénignes et malignes.

Trois seulement des 15 paramètres nucléaires mesurés montrent une différence significative entre deux groupes de cas ayant des pronostics très différents par référence aux données cliniques.

Les corrélations entre la fréquence de certains types cellulaires dans une population tumorale et les données cliniques concernant la patiente correspondante sont faibles dans tous les cas étudiés.

Il convient cependant de remarquer que:

(1) Le manque de corrélation entre les données cliniques et les paramètres quantitatifs dans l'étude rétrospective peut s'expliquer par la qualité inégale des frottis analysés puisqu'ils n'avaient pas été préparés en vue d'une exploitation automatique.

(2) Les informations pronostiques les plus fiables (temps de survie) ne sont pas disponibles dans le cas de l'étude prospective pour laquelle le recul est insuffisant.

(3) Les corrélations entre les paramètres nucléaires et les données cliniques conventionnelles ne méritent pas d'être plus approfondies en raison de la signification pronostique très discutable de ces indicateurs conventionnels.

Une reprise de l'étude dans plusieurs années bénéficierait de plus de renseignements cliniques sur le traitement, de la connaissance des

temps de rémission et de survie des patientes et permettrait de déterminer s'il existe des corrélations objectives et fiables entre la présence de certains types cellulaires définis par analyse d'image et l'évolution biologique des tumeurs du sein.

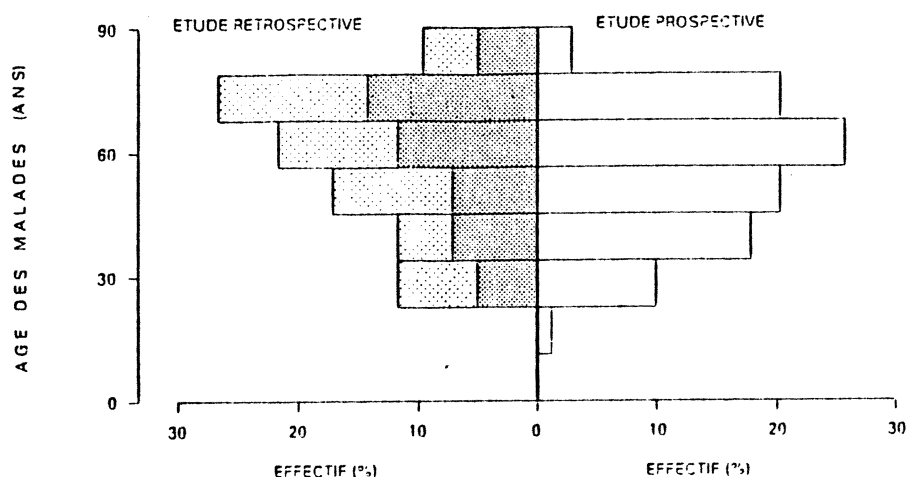


**FIGURES ET TABLEAUX**



ETAPE	SOLUTION	TEMPS
HYDRATATION	ALCOOL 95%	2 MINUTES
	ALCOOL 80%	2 MINUTES
	ALCOOL 70%	2 MINUTES
	ALCOOL 50%	2 MINUTES
	EAU DISTILLEE	2 MINUTES
COLORATION	HEMATOXYLINE	6 MINUTES
RINCAGE	EAU DISTILLE	2 MINUTES
	EAU ACIDE (HCl 0.5%)	30 SECONDES
	EAU COURANTE	10 MINUTES
DESHYDRATATION	ALCOOL 50%	2 MINUTES
	ALCOOL 70%	2 MINUTES
	ALCOOL 80%	2 MINUTES
	ALCOOL 95%	2 MINUTES
COLORATION	ORANGE G6 (BDH Chemicals Ltd Poole)	6 MINUTES
RINCAGE	ALCOOL 95%	2 MINUTES
	ALCOOL 95%	2 MINUTES
COLORATION	E.A. 36 (BDH Chemicals Ltd Poole) LIGHT GREEN (10 gr dans 100 ml)	4 MINUTES
DESHYDRATATION	ALCOOL 95%	2 MINUTES
	ALCOOL 100%	2 MINUTES
	ALCOOL 100%	2 MINUTES
	ALCOOL 100%	2 MINUTES
	ALCOOL 100%	2 MINUTES
	ALCOOL 100%	2 MINUTES
	XYLOL	5 MINUTES

**Tableau 1:**  
Protocole de la coloration de Papanicolaou.



**Figure 1:**

Distribution de l'âge des malades.

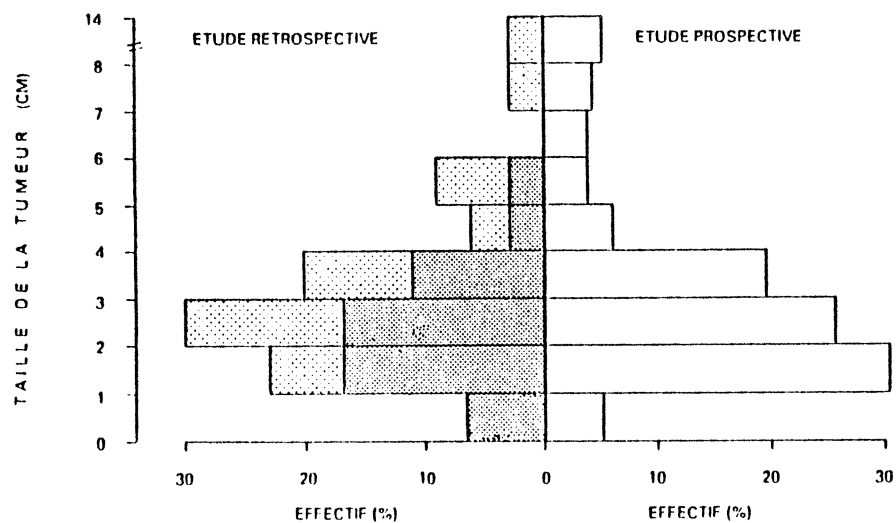
A gauche: étude rétrospective (N=41)

survie < 5 ans (N=20)

survie > 10 ans (N=21)

Les pourcentages sont calculés par colonnes, pronostics confondus.

A droite: étude prospective (N=117)



**Figure 2:**

Distribution de la taille des tumeurs.

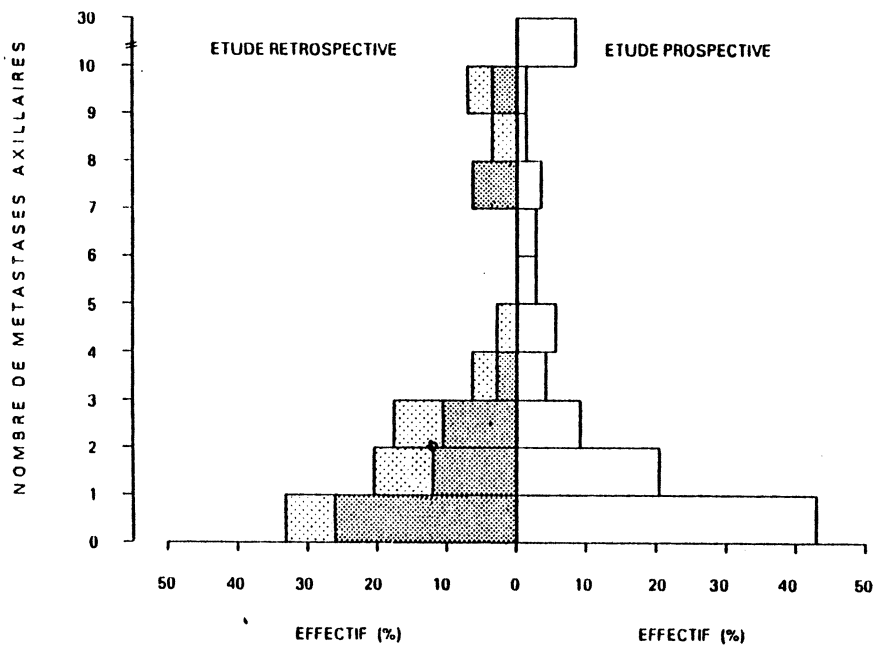
A gauche: étude rétrospective (N=35)

survie < 5 ans (N=15)

survie > 10 ans (N=20)

Les pourcentages sont calculés par colonnes, pronostics confondus.

A droite: étude prospective (N=108)



**Figure 3:**

Distribution du nombre de métastases axillaires:

A gauche: étude rétrospective (N=29)

    survie < 5 ans (N=11)

    survie > 10 ans (N=18)

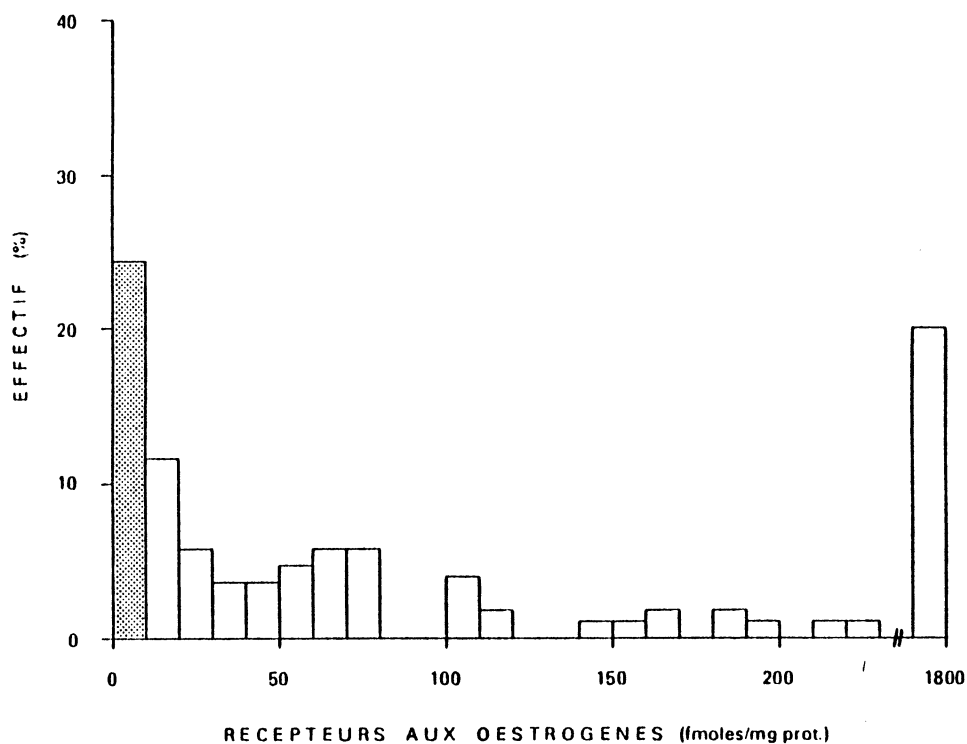
Les pourcentages sont calculés par colonnes, pronostics confondus.

A droite: étude prospective (N=92)

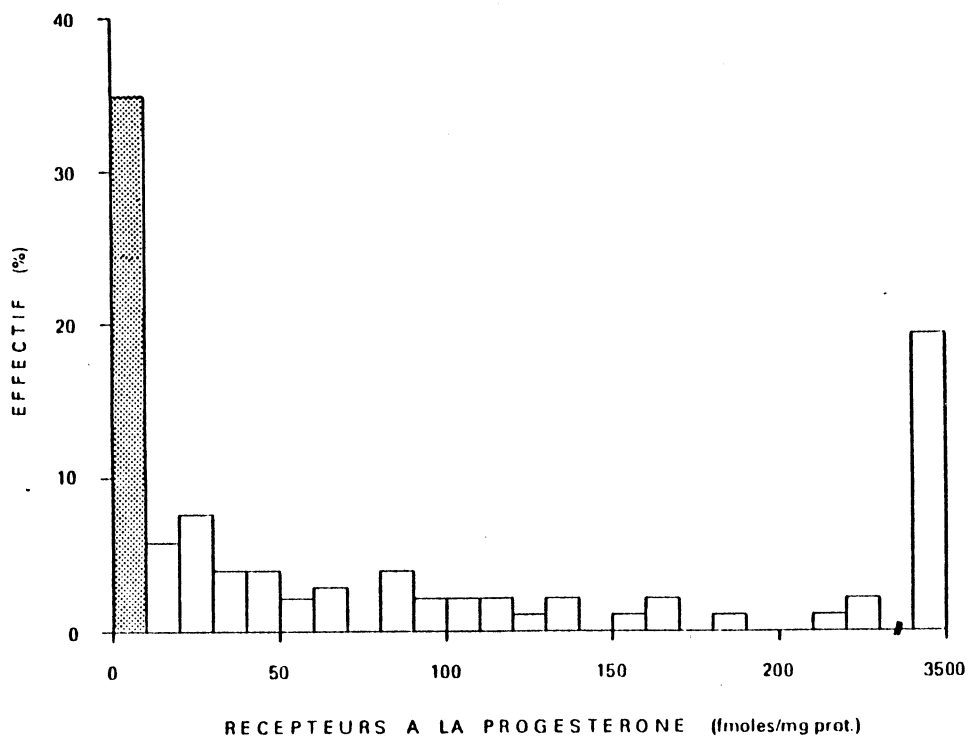


ETAPE	SOLUTION	TEMPS	TEMPERATURE
HYDRATATION	ALCOOL 95% ALCOOL 75% ALCOOL 50% EAU DISTILLEE	10 MINUTES 5 MINUTES 5 MINUTES 5 MINUTES	TEMPERATURE  AMBIANTE
HYDROLYSE	HCL 6 N HCL 6 N	1 MINUTES 60 MINUTES	20°C
RINCAGE	EAU DISTILLEE EAU DISTILLEE EAU DISTILLEE EAU DISTILLEE	1 MINUTES 1 MINUTES 1 MINUTES 1 MINUTES	TEMPERATURE  AMBIANTE
COLORATION	REACTIF DE SCHIFF (BDH Chemicals Ltd Poole) BAINS SULFUREUX BAINS SULFUREUX BAINS SULFUREUX BAINS SULFUREUX (5% HCl 1 N, 0.5% NA2S2O4)	60 MINUTES  1 MINUTES 1 MINUTES 1 MINUTES 1 MINUTES	20°C
RINCAGE	EAU COURANTE	10 MINUTES	TEMPERATURE AMBIANTE
DESHYDRATATION	EAU DISTILLEE ALCOOL 50% ALCOOL 75% ALCOOL 95% ALCOOL 95% ALCOOL 100% ALCOOL 100% XYLOL	3 MINUTES 5 MINUTES 5 MINUTES 5 MINUTES 10 MINUTES 10 MINUTES 10 MINUTES 10 MINUTES	TEMPERATURE  AMBIANTE

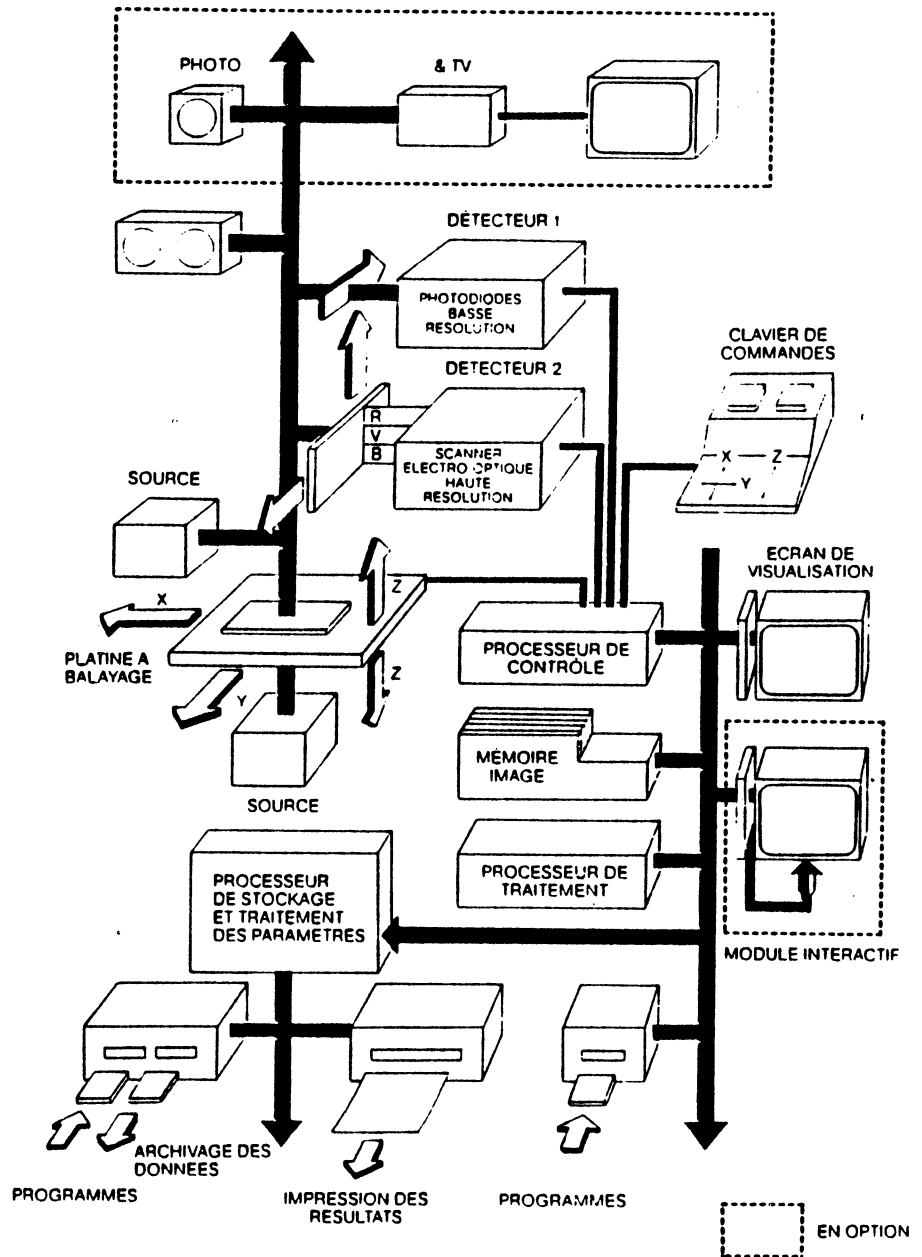
Tableau 2:  
Protocole de coloration par la réaction de Feulgen.



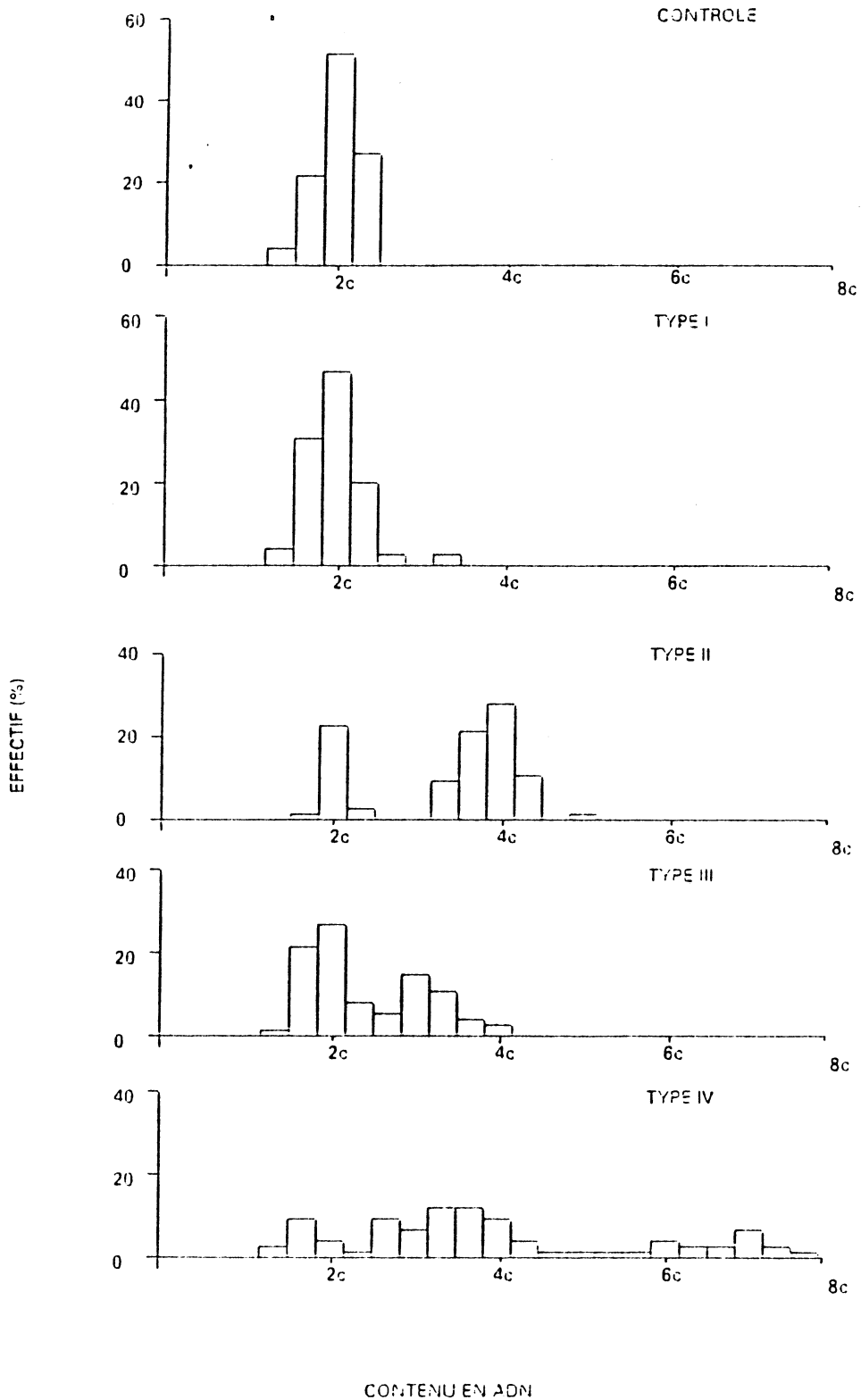
**Figure 4:**  
Distribution du taux de récepteurs aux oestrogènes dans l'étude prospective (N=105)  
■ : colonne représentant les cas ayant un taux de récepteurs aux oestrogènes  $\leq 10$  fmoles/mg protéine.



**Figure 5:**  
Distribution du taux de récepteurs à la progestérone dans l'étude prospective (N=104)  
■ : colonne représentant les cas ayant un taux de récepteurs à la progestérone  $\leq 10$  fmoles/mg protéine.



**Figure 6:**  
Schéma fonctionnel de l'analyseur d'image SAMBA 200 TM (TITN).



**Figure 7:**  
Exemples de quatre types d'histogrammes d'ADN définis par Auer et histogramme obtenu dans un tissu non-proliférant (contrôle).  
(D'après Auer et al., 1980)

CONTENU EN ADN	2c	2,5c	3c	3,5c	4c
INTERVALLE (U.A)	[2000-2400[	[2400-2800[	[2800-3200[	[3200-3600[	[3600-4400[
INTERVALLE (U.A)	400	400	400	400	800

CONTENU EN ADN	5c	6c	7c	8c	>8c
INTERVALLE (U.A)	[4400-5400[	[5400-6400[	[6400-7400[	[7400-8400[	[8400-20000[
INTERVALLE (U.A)	1000	1000	1000	1000	11600

**Tableau 3:**  
Frontières des intervalles de densité optique intégrée choisis pour définir dix classes de ploïdie.

		CLASSE DE PLOIDIE									
		2c	2.5c	3c	3.5c	4c	5c	6c	7c	8c	>8c
GROUPE 1	1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
	9	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
GROUPE 2	11	75	0	0	0	25	0	0	0	0	0
	12	0	75	0	0	0	25	0	0	0	0
	13	0	0	75	0	0	0	25	0	0	0
	14	0	0	0	75	0	0	0	25	0	0
	15	0	0	0	0	75	0	0	0	25	0
	16	0	0	0	0	0	75	0	0	0	25
GROUPE 3	17	56	9	8	7	20	0	0	0	0	0
	18	0	56	9	8	7	20	0	0	0	0
	19	0	0	56	9	8	7	20	0	0	0
	20	0	0	0	56	9	8	7	20	0	0
	21	0	0	0	0	56	9	8	7	20	0
	22	0	0	0	0	0	56	9	8	7	20
GROUPE 4	23	25	0	0	0	75	0	0	0	0	0
	24	0	25	0	0	0	75	0	0	0	0
	25	0	0	25	0	0	0	75	0	0	0
	26	0	0	0	25	0	0	0	75	0	0
	27	0	0	0	0	25	0	0	0	75	0
	28	0	0	0	0	0	25	0	0	0	75

**Tableau 4:**

Pourcentages de cellules dans les dix classes de ploïdie définissant 28 histogrammes de référence. Ces histogrammes ont été rassemblés en quatre groupes suivant leur forme:

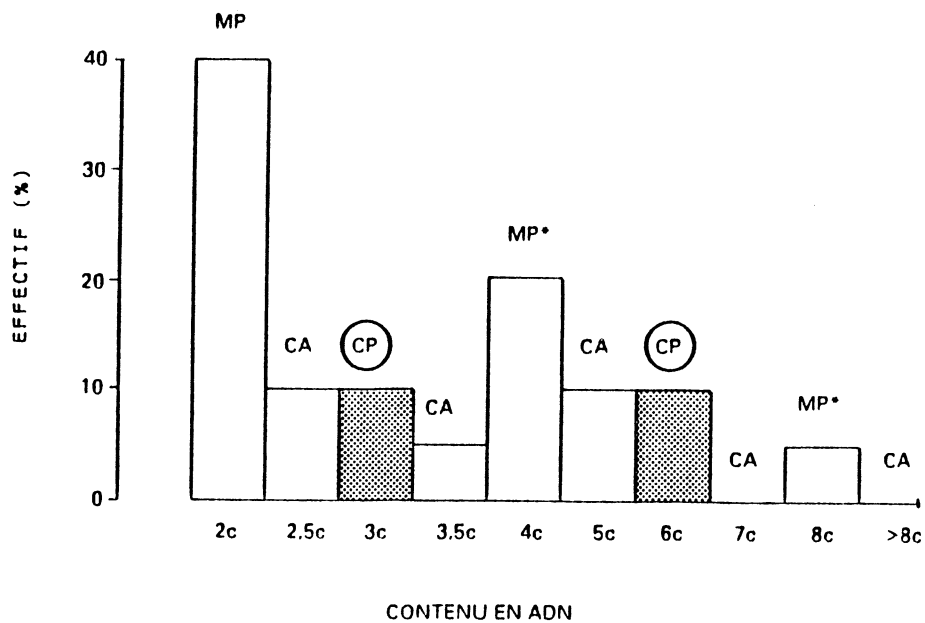
**Groupe 1:** histogrammes monomodaux;

**Groupe 2:** histogrammes bimodaux sans cellule intermédiaire, le premier mode étant le mode majeur;

**Groupe 3:** histogrammes bimodaux avec cellules intermédiaires;

**Groupe 4:** histogrammes bimodaux sans cellule intermédiaire le second mode étant le mode majeur.

EXEMPLE 1



EXEMPLE 2

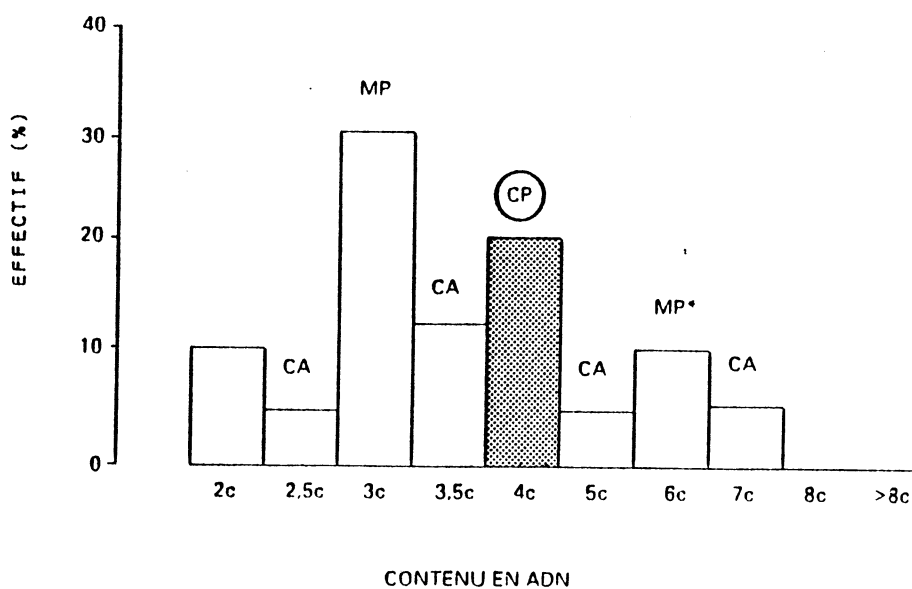


Figure 8:

Deux exemples de calcul de l'indice de prolifération.

**MP** : classe principale;

**MP\***: classe avec un contenu en ADN double ou quadruple de celui de la classe principale;

**CA** : classes adjacentes aux classes MP ou MP\*;

**CP** : classes intermodales retenues pour le calcul de l'indice de prolifération.

	N	TAILLE < 4 cm NBRE. META. < 4		TAILLE < 4 cm NBRE. META. ≥ 4		TAILLE ≥ 4 cm NBRE. META. < 4		TAILLE ≥ 4 cm NBRE. META. ≥ 4	
		N	%	N	%	N	%	N	%
CS	10	4	40	2	20	3	30	1	10
LS	18	10	56	3	17	5	28	0	0
GROUPE CLINIQUE		RS-00		RS-01		RS-10		RS-11	

**Tableau 5:**

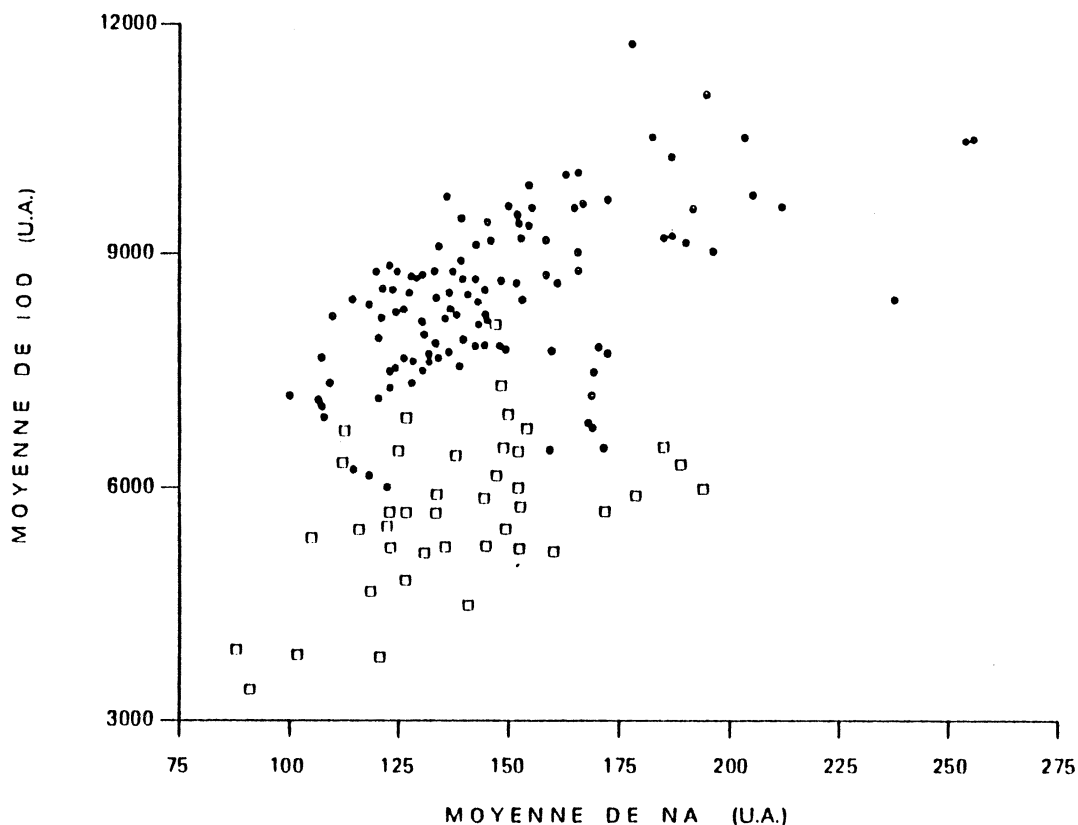
Distribution des cas à longue survie (LS) et des cas à courte survie (CS) dans quatre groupes cliniques définis selon le nombre de métastases axillaires et la taille de la tumeur. Seuls les cas où les deux données sont connues sont considérés.

	TAILLE DE LA TUMEUR (cm)		NBRE DE META.GGL.		TAUX DES RECEPTEURS AUX OESTROGENES (fmol/mg prot.)	
	< 4	≥ 4	< 4	≥ 4	≤ 10	> 10
GC-000	+		+		+	
GC-001	+		+			+
GC-010	+			+	+	
GC-100		+	+		+	
GC-011	+			+		+
GC-110		+		+	+	
GC-101		+	+			+
GC-111		+		+		+

**Tableau 6:**

Caractéristiques biologiques définissant les huit groupes cliniques de l'étude prospective.





**Figure 9:**  
 Distribution des lymphocytes selon la surface nucléaire (NA; axe x) et la densité optique intégrée (IOD; axe y)  
 Chaque cas est représenté par la moyenne de ces deux paramètres.

- cas rétrospectifs (N= 41)
- cas prospectifs (N=117)

		CLASSIFICATION PROPOSEE			
		I	II	III	IV
TYPE	I (N=24)	88	12	0	0
D'HISTOGRAMME	II (N=36)	25	63	4	8
LE PLUS	III (N=84)	2	27	59	13
PROBABLE	IV (N=96)	0	5	3	92

**Tableau 7:**  
 Répartition des histogrammes d'ADN selon les types I à IV de Auer. Pour chaque cas le type d'histogramme d'occurrence la plus élevée a été retenu comme le plus probable. Le résultat est exprimé en pourcentage.

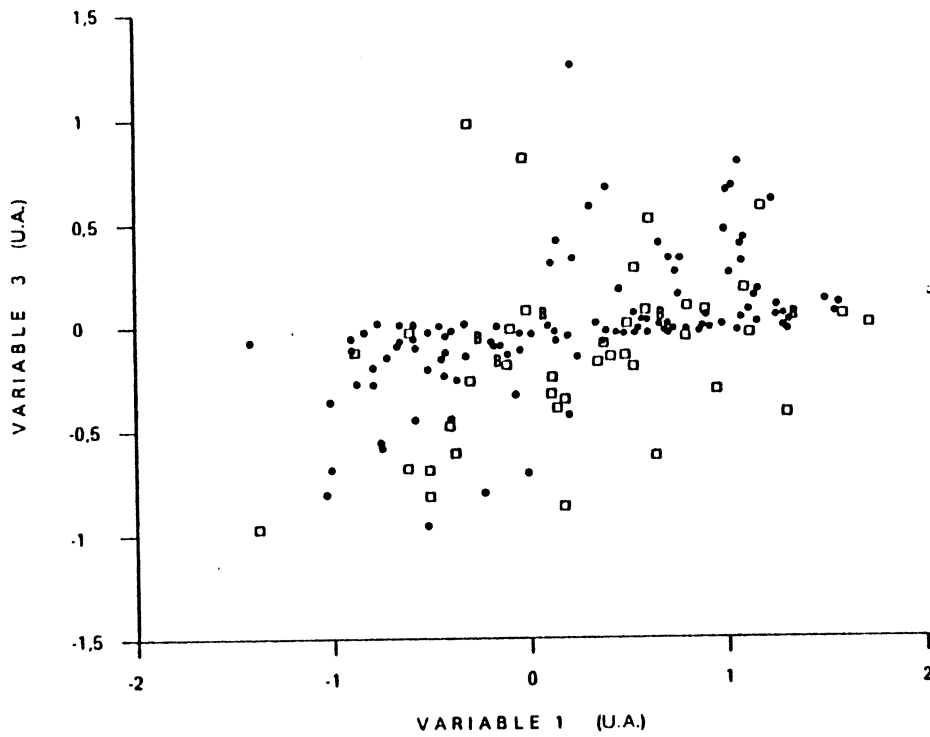


Figure 10 a

-----

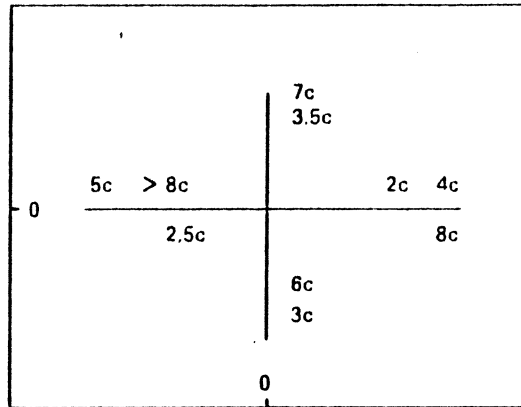


Figure 10 b

-----

**Figure 10:**

a. Projection des cas dans le plan défini par les variables 1 (axe x) et 3 (axe y) d'une ACP de 28 histogrammes synthétiques.

- cas rétrospectifs
- cas prospectifs, tumeurs malignes
- cas prospectifs, tumeurs bénignes

b. Représentation vectorielle de la contribution des dix paramètres de ploïdie aux axes du plan précédent.

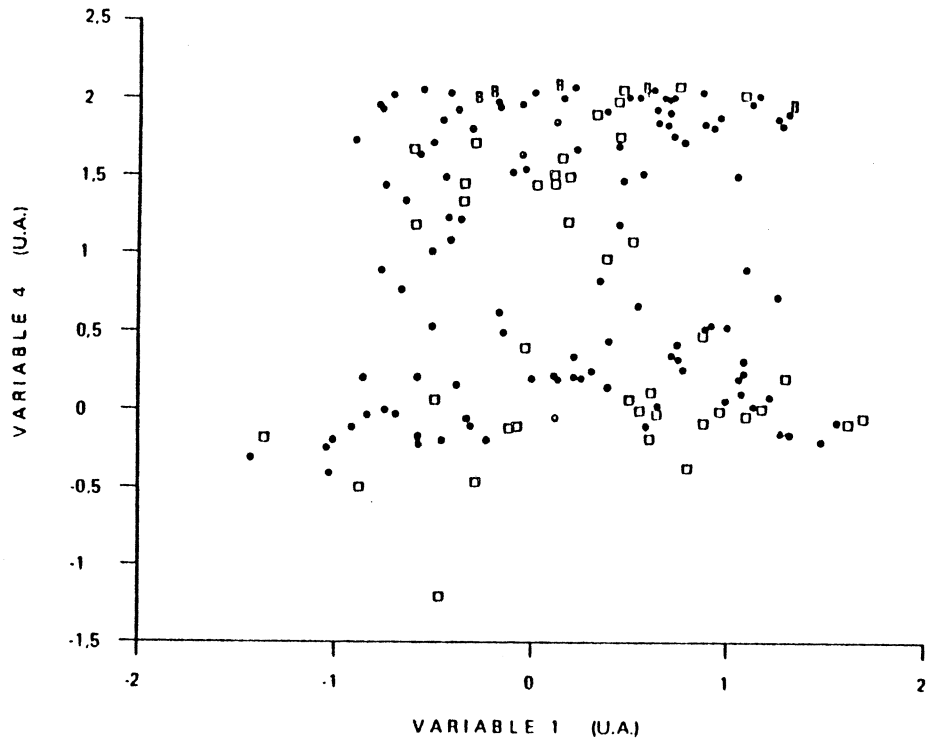


Figure 11 a

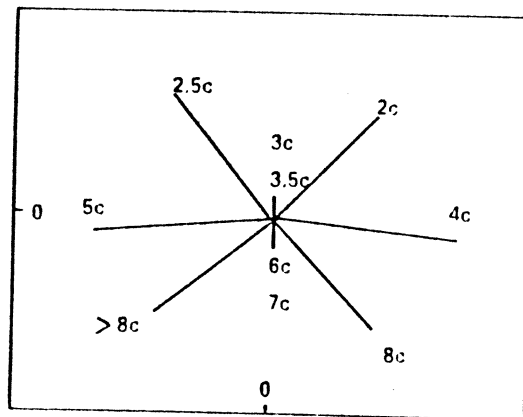


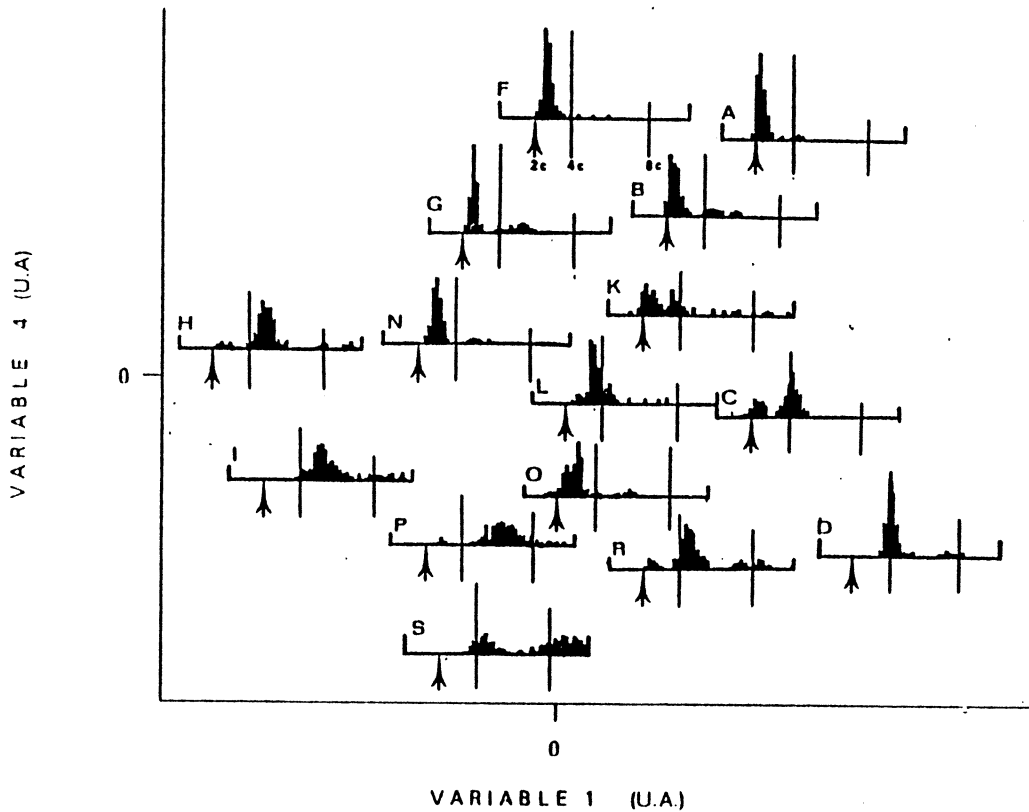
Figure 11 b

**Figure 11:**

a. Projection des cas dans le plan défini par les variables 1 (axe x) et 4 (axe y) d'une ACP de 28 histogrammes synthétiques.

b. Représentation vectorielle de la contribution des dix paramètres de ploïdie aux axes du plan précédent.

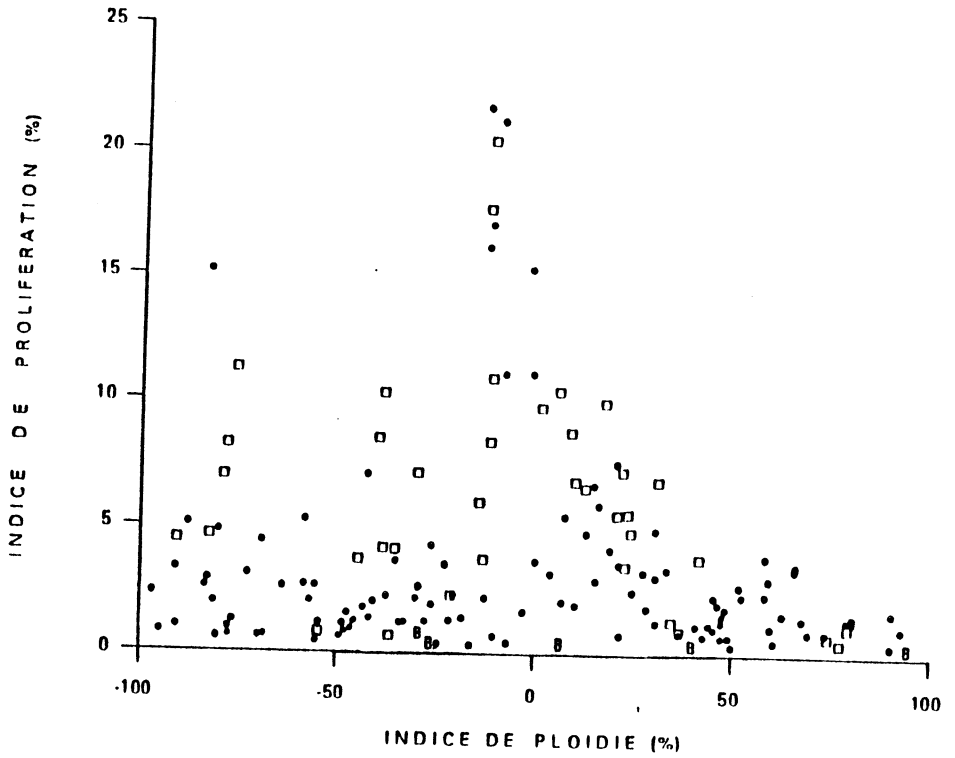
- o cas rétrospectifs
- cas prospectifs, tumeurs malignes
- cas prospectifs, tumeurs bénignes



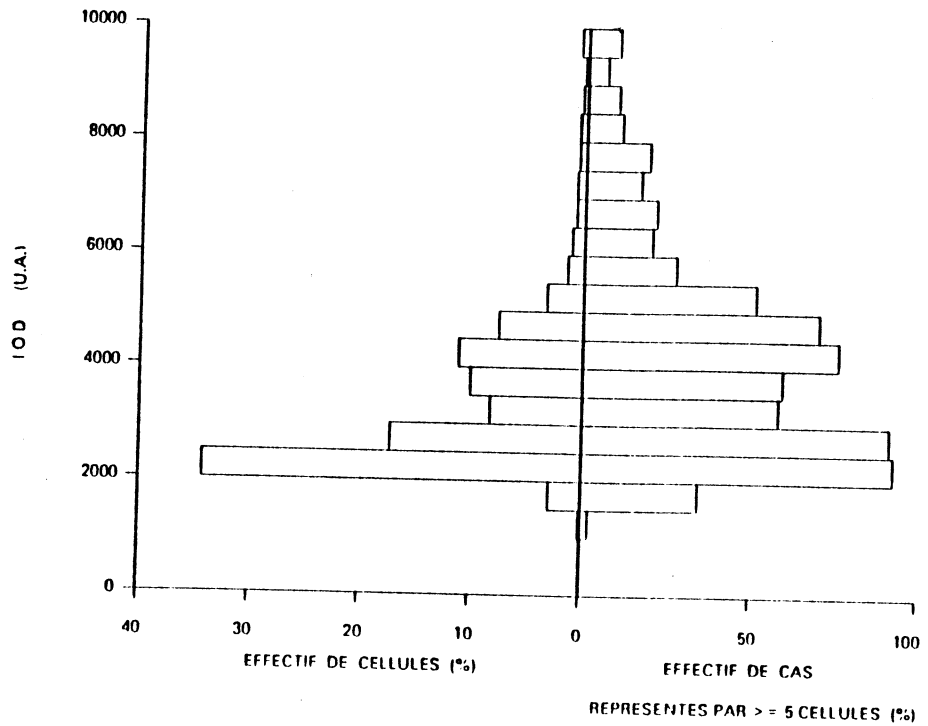
**Figure 12:**  
Projection de quelques histogrammes d'ADN dans le plan défini par les variables 1 (axe x) et 4 (axe y) de l'ACP de référence. (Les vecteurs du plan sont représentés dans la figure 11.)

		CONTENU EN ADN									
		2c	2.5c	3c	3.5c	4c	5c	6c	7c	8c	>8c
EFFECTIF	RS	19	17	7	7	25	13	5	3	2	2
(%)	PS	29	22	6	7	17	13	3	1	1	1

**Tableau 8:**  
Pourcentage de cellules dans les dix classes de ploïdie pour l'ensemble des cas rétrospectifs (RS; N=41) et des cas prospectifs (PS; N=117).



**Figure 13:**  
Distribution des cas rétrospectifs (□) et des cas prospectifs (• : tumeurs malignes, ◻ : tumeurs bénignes) selon l'indice de ploïdie (axe x) et l'indice de prolifération (axe y).



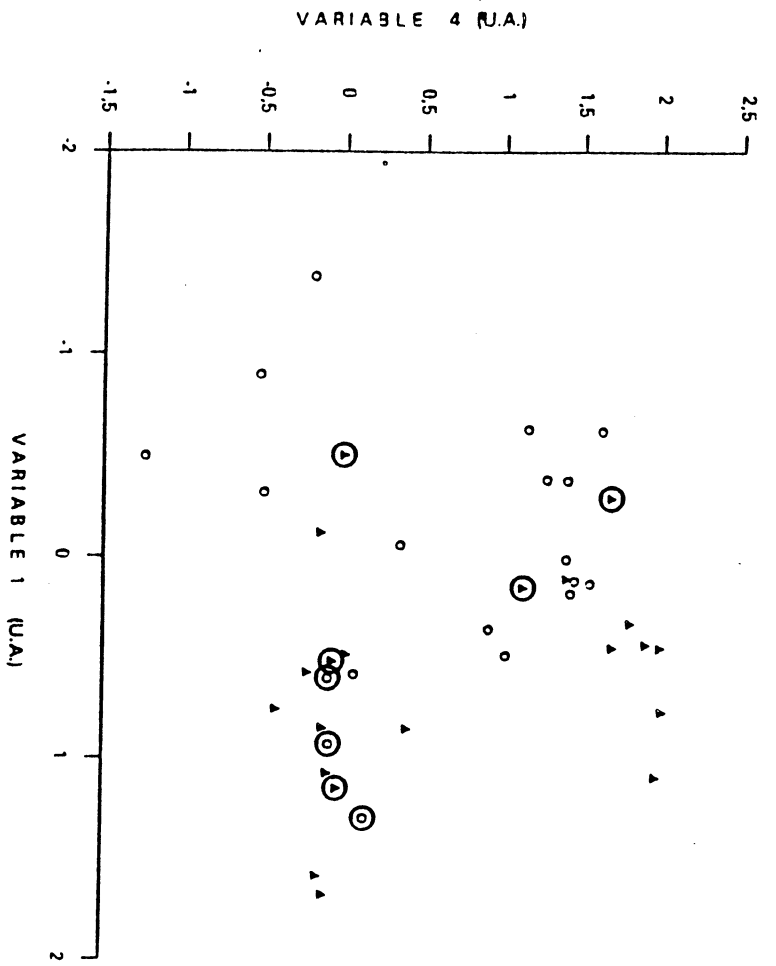
**Figure 14:**  
Distribution du paramètre IOD obtenu dans l'étude prospective.  
**A gauche:** distribution de l'ensemble des cellules en fonction de leur quantité d'ADN (57 212 cellules)  
**A droite:** fréquence des cas ayant au moins 5 cellules dans les intervalles de IOD représentés.

	TYPE D'HISTOGRAMME			
	I	II	III	IV
LS	20	25	10	45
CS	0	5	60	35

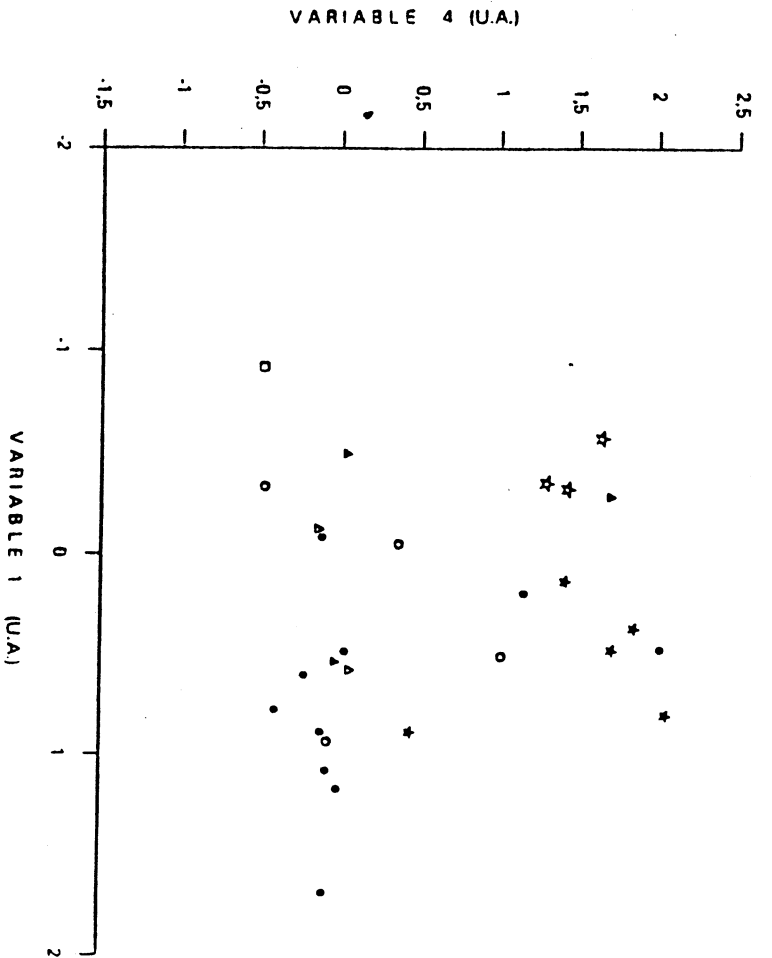
**Tableau 9:**  
Distribution des histogrammes types I à IV dans les cas à longue survie (LS) et les cas à courte survie (CS). Le résultat est exprimé en pourcentages.

ETAPE	PARAMETRE INCLUS	LS BIEN/MAL CLASSE	CS BIEN/MAL CLASSE	TAUX DE BONNE CLASSIFICATION
1	4c	11/10	15/5	63%
2	2c	16/5	15/5	76%
3	3,5c	16/5	17/3	80%

**Tableau 10:**  
Classification des cas à longue survie (LS) et courte survie (CS) dans les trois premières étapes d'une analyse discriminante fondée sur les pourcentages de cellules dans les 10 classes de ploïdie.



**Figure 15:**  
 Projection des cas à longue survie (▲) et des cas à courte survie (○) dans le plan des variables 1 à 4 d'une ACP des 28 histogrammes de référence. (Les vecteurs du plan sont représentés dans la figure 11).  
 Les cas mal classés par analyse discriminante sont entourés.



**Figure 16:**  
 Projection des cas rétropectifs dans le plan défini par les variables 1 et 4 de l'ACP des histogrammes d'ADN de référence.  
 Chaque cas est représenté par un symbole correspondant à son groupe clinique et permettant de distinguer entre les cas à longue survie (LS) et les cas à courte survie (CS).

LS	CS	
●	○	: RS-00
▲	△	: RS-01
★	☆	: RS-10
■	□	: RS-11

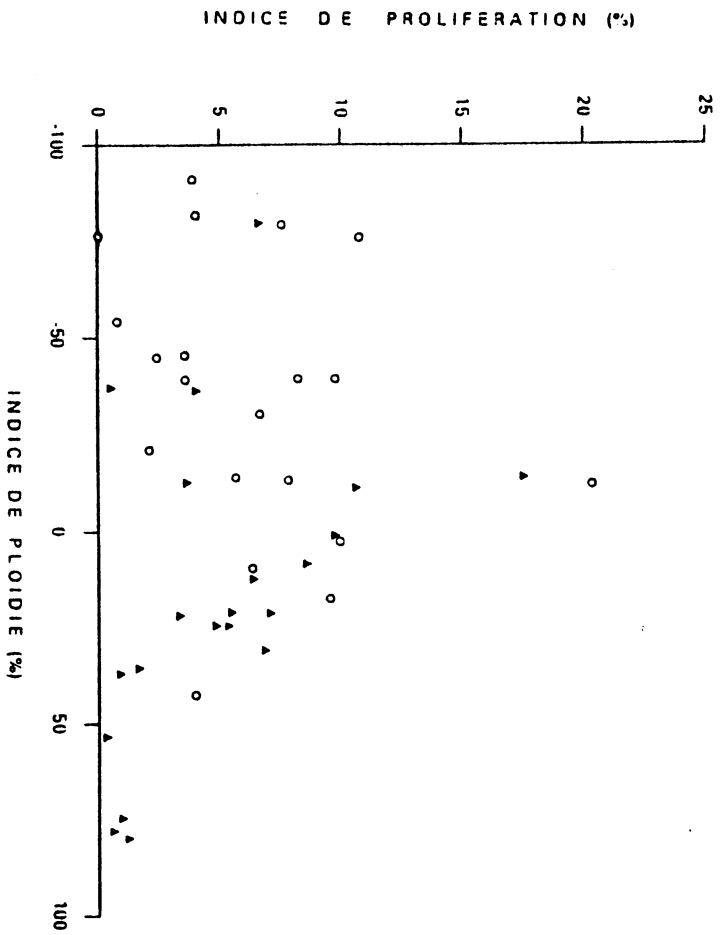


Figure 17:  
Distribution des cas à courte survie (o) et des cas à longue survie (Δ) en fonction de l'indice de ploïdie (axe x) et de l'indice de prolifération (axe y).

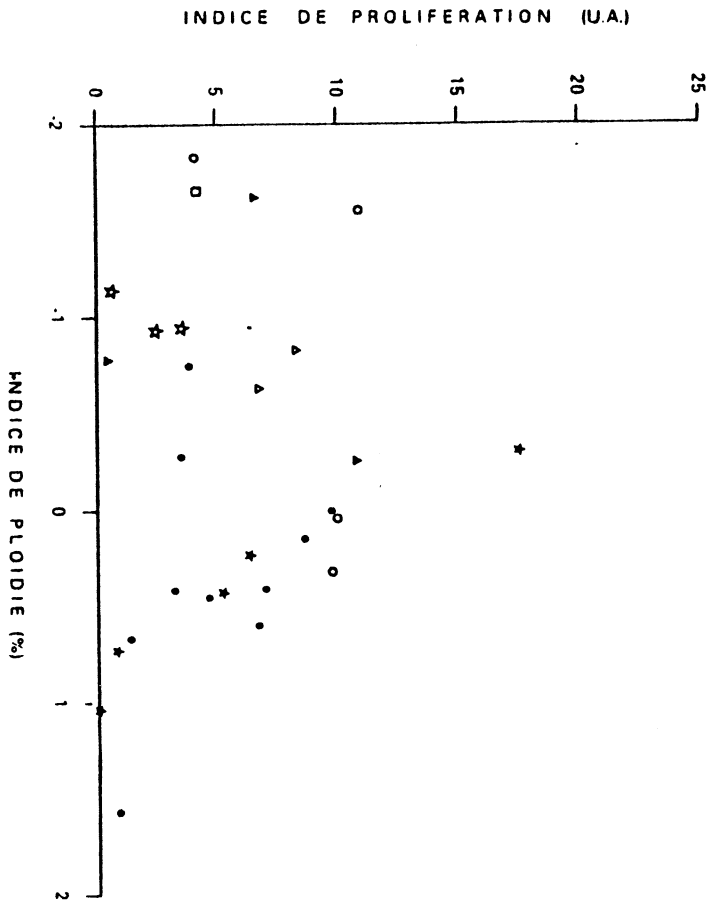


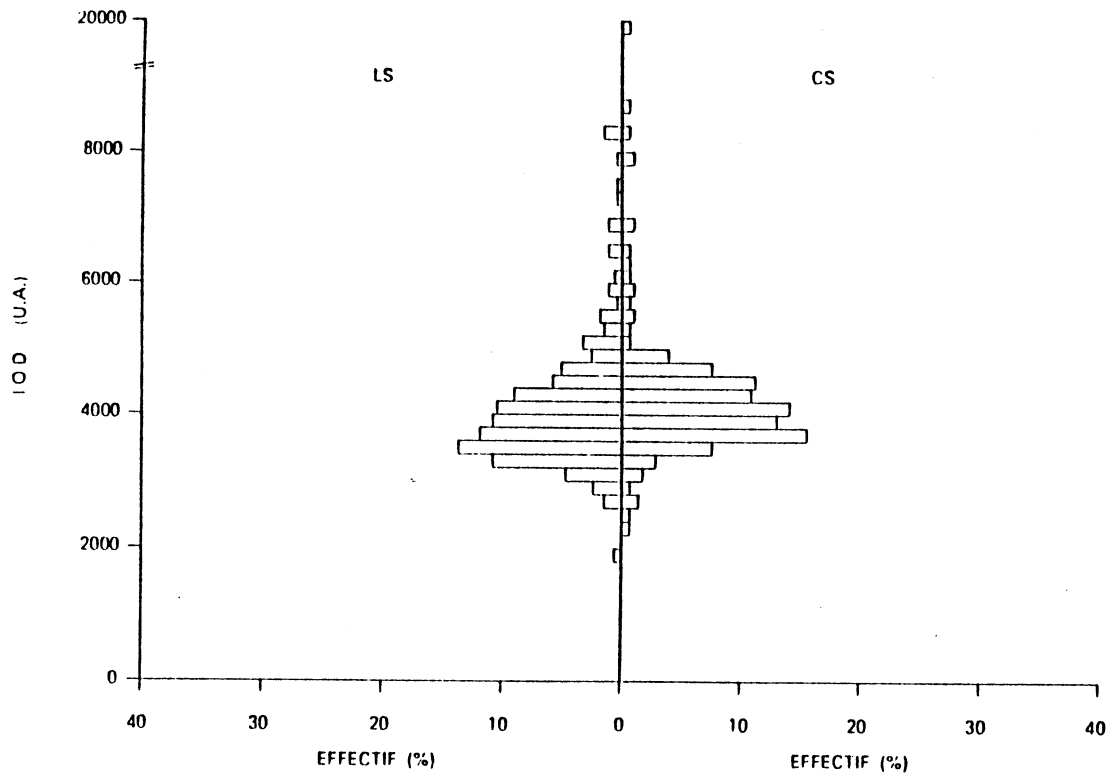
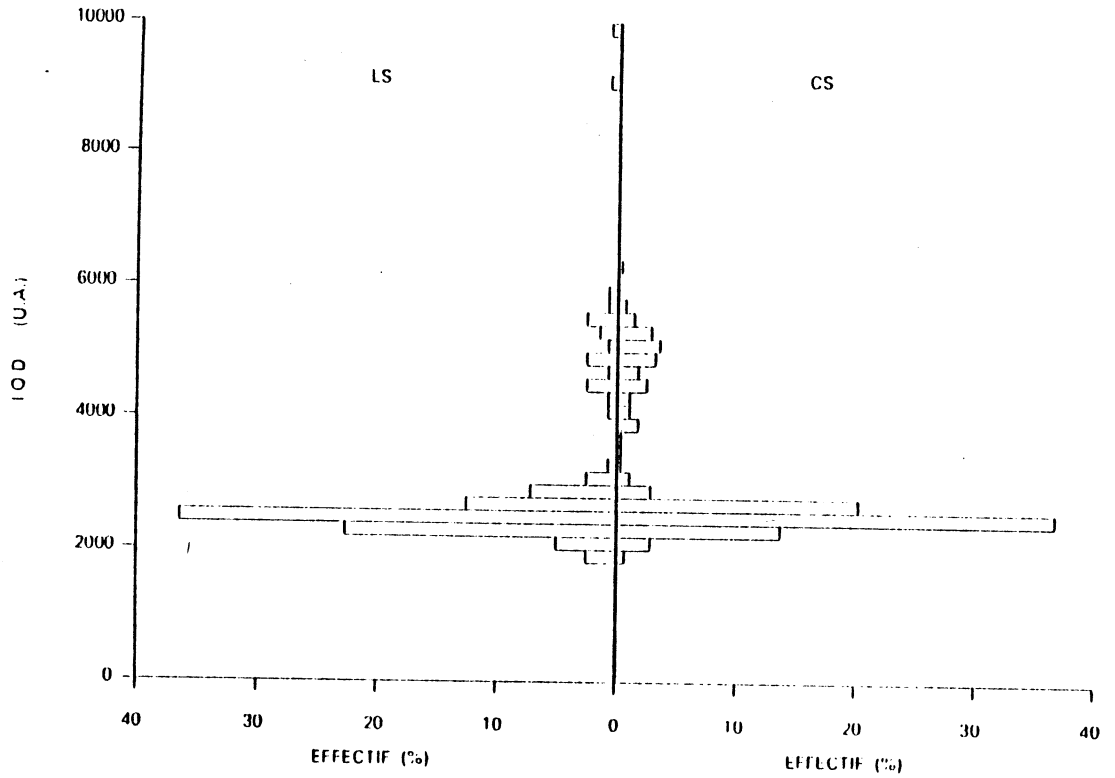
Figure 18:  
Répartition des quatre groupes cliniques de l'étude rétrospective en fonction de l'indice de ploïdie (axe x) et de l'indice de prolifération (axe y).  
Chaque cas est représenté par un symbole correspondant à son groupe clinique et permettant de distinguer entre les cas à longue survie (LS) et les cas à courte survie (CS).

LS	CS
●	○
▲	△
★	☆
■	□

○	: RS-00
△	: RS-01
☆	: RS-10
□	: RS-11





**Figure 19:**  
Exemples d'histogrammes de ploïdie très semblables et indépendants de la durée de survie. (LS= cas à longue survie; CS= cas à courte survie).

	AGE	TAILLE	METASTASES AXILLAIRE	TYPE HISTOLOGIQUE	SURVIE
2c	-.07	.15	-.18	.10	-.25
2.5c	-.21	<u>.46</u>	-.14	-.19	.12
3c	.12	.00	-.06	.17	.14
3.5c	-.05	-.18	.15	.20	.24
4c	.21	-.31	-.20	.10	-.29
5c	.10	.08	.37	<u>-.47</u>	.10
6c	-.10	-.10	<u>.45</u>	.02	.32
7c	-.08	-.26	-.01	.07	.19
8c	.07	-.13	.03	-.03	-.07
>8c	-.16	.12	<u>.41</u>	-.07	.34

**Tableau 11:**

Matrice de corrélation entre les pourcentages de cellules dans les dix classes de ploïdie et les paramètres cliniques dans l'étude rétrospective. Les corrélations hautement significatives sont entourées.

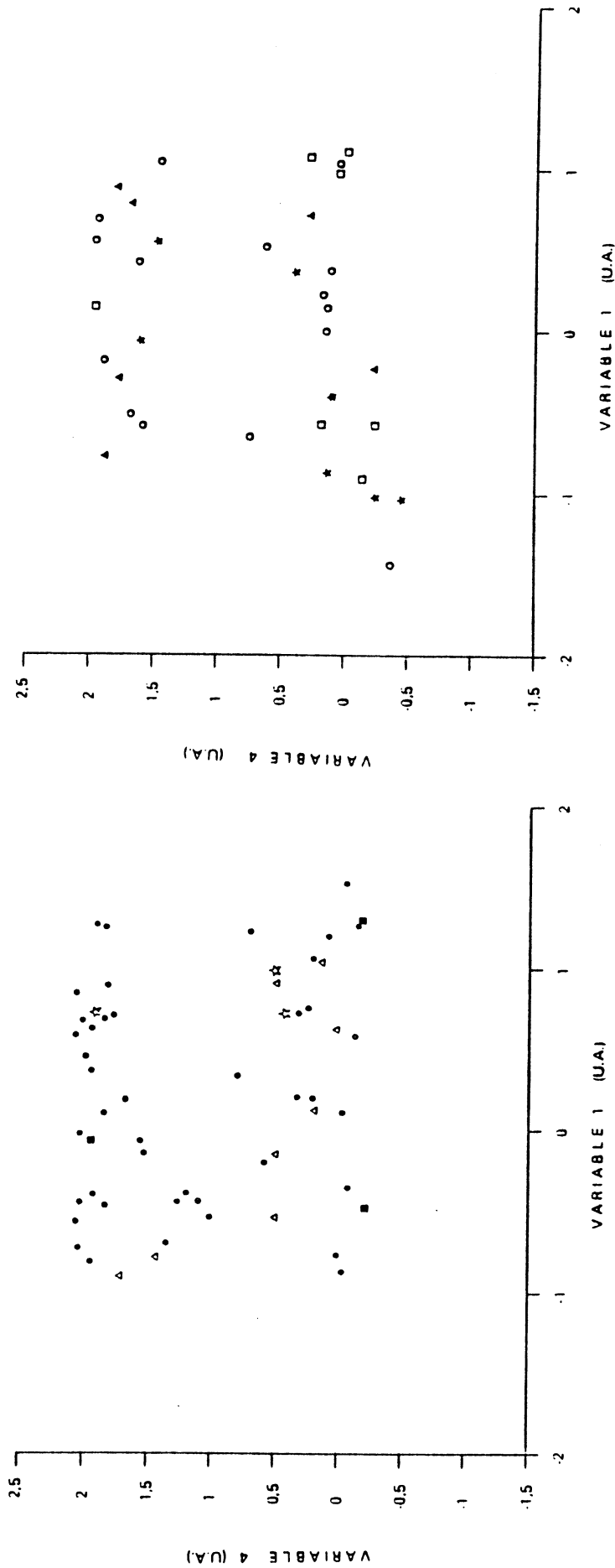


Figure 20 a:

- ★ GC-000
- GC-001
- GC-010
- ▲ GC-011

Figure 20 b:

- ★ GC-100
- GC-101
- GC-110
- ▲ GC-111

Figure 20:  
 Projection des cas prospectifs dans le plan défini par les variables 1 et 4 de l'ACP des histogrammes d'ADN de référence. Chaque cas est représenté par un symbole correspondant à son type clinique. (Les vecteurs du plan sont représentés dans la figure 11.)

ETAPE	PARAMETRE	GROUPE CLINIQUE										TAUX DE BONNE CLASS.(%)
		GC-000	GC-001	GC-010	GC-100	GC-011	GC-110	GC-101	GC-111			
1	8c	BIEN/MAL CLASSE	0/43	1/2	0/7	5/3	0/7	0/15	0/6	13%		
		BIEN/MAL CLASSE	22/21	1/2	3/4	3/5	5/2	0/15	0/6			
		BIEN/MAL CLASSE	32/11	1/2	3/4	1/7	4/3	2/13	1/5			
2	6c	0/3								37%		
3	7c	2/1								50%		

**Tableau 12:**  
 Classification obtenue aux trois premières étapes d'une analyse discriminante entre les huit groupes cliniques représentés par les pourcentages de cellules dans les 10 classes de ploïdie.

**Tableau 13:**

Classification obtenue aux premières étapes d'une analyse discriminante entre différents groupes cliniques.

ETAPE	PARAMETRE INCLUS	REC-H BIEN/MAL CLASSES	REC-B BIEN/MAL CLASSES	TAUX DE BONNE CLASS. (%)
1	8c	64/8	13/7	84
2	>8c	66/6	13/7	86

**Tableau 13 a:**

REC-H (N=72): cas avec un taux élevé (>10fmol/mg protéine) de récepteurs aux oestrogènes;  
 REC-B (N=20): cas avec un taux faible (<=10fmol/mg protéine) de récepteurs aux oestrogènes.

ETAPE	PARAMETRE INCLUS	TAI-H BIEN/MAL CLASSES	TAI-B BIEN/MAL CLASSES	TAUX DE BONNE CLASS. (%)
1	6c	10/25	5/6	66
2	>8c	10/25	5/5	67

**Tableau 13 b:**

TAI-H (N=35): tumeurs de grande taille (>=4cm)  
 TAI-B (N=57): tumeurs de petite taille (< 4cm)

ETAPE	PARAMETRE INCLUS	MET-H BIEN/MAL CLASSES	MET-B BIEN/MAL CLASSES	TAUX DE BONNE CLASS. (%)
1	8c	9/15	56/12	71
2	7c	12/12	54/14	72
3	6c	12/12	55/13	73

**Tableau 13 c:**

MET-H (N=24): patientes avec au moins 4 métastases axillaires;  
 MET-B (N=68): patientes avec moins que 4 métastases axillaires.

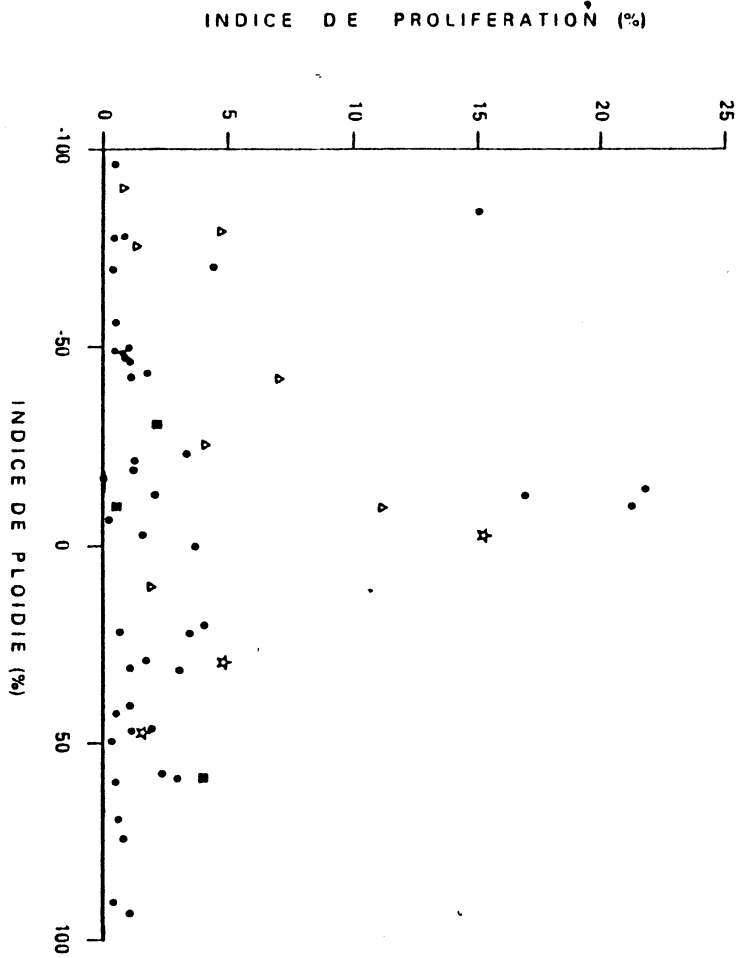


Figure 21 a:

- \* GC-000
- GC-001
- GC-010
- △ GC-011

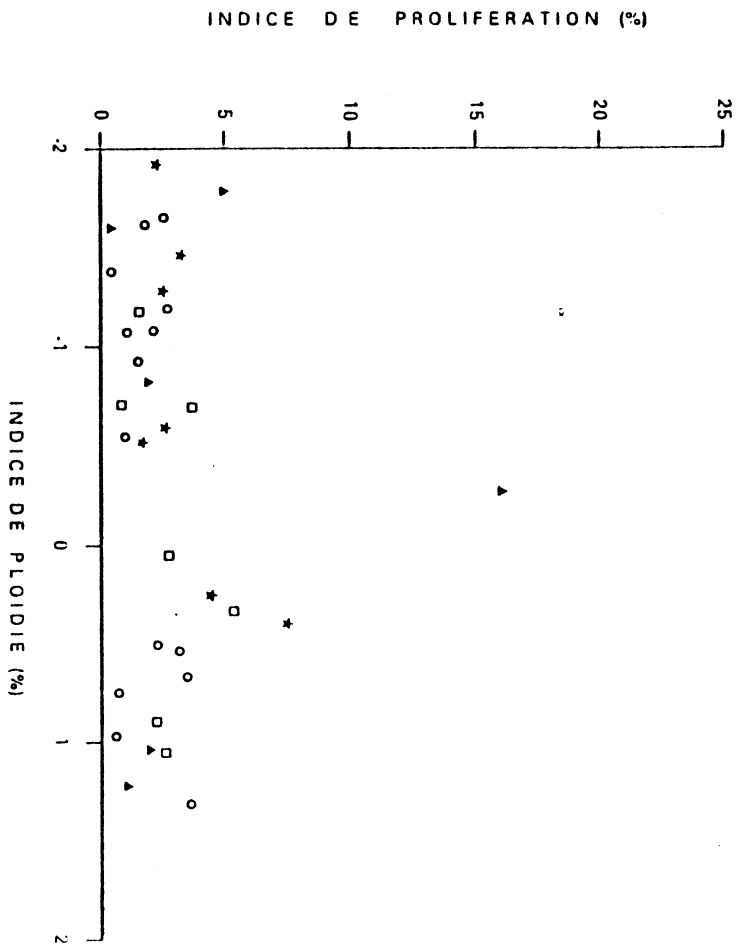


Figure 21 b:

- \* GC-100
- GC-101
- GC-110
- △ GC-111

Figure 21:  
Distribution des huit groupes cliniques de l'étude prospective, répartis en fonction de l'indice de ploïdie (axe x) et de l'indice de prolifération (axe y).

	AGE	TAILLE	METASTASES AXILLAIRES	TYPE HISTOLOGIQUE	RECEPTEURS AUX OESTROGENES	RECEPTEURS A LA PROGESTERONE
2c	-.03	<u>-.20</u>	-.15	.06	.02	.18
2.5c	-.17	-.12	-.08	-.16	<u>-.20</u>	<u>-.22</u>
3c	.09	-.01	-.05	-.01	-.01	.05
3.5c	<u>.25</u>	-.01	.00	.09	<u>.26</u>	-.03
4c	.04	.06	.10	<u>.21</u>	.19	-.18
5c	-.07	<u>.20</u>	.12	-.09	-.01	-.19
6c	.02	<u>.22</u>	.10	<u>-.20</u>	-.17	-.12
7c	.12	<u>.20</u>	<u>.25</u>	-.05	-.06	-.17
8c	.03	<u>.23</u>	.15	.01	-.14	-.18
>8c	.04	<u>.29</u>	.10	-.07	<u>-.23</u>	-.16

**Tableau 14:**  
**Matrice de corrélation entre les pourcentages de cellules dans les dix classes de ploïdie et les paramètres cliniques dans l'étude prospective. Les corrélations hautement significatives sont entourées.**

	NA	IOD	MOD	SODH	SDODH	KODH	LM	Z	CVAR	DIFMO	SRE	LRE	GLD	RLD	RPC
NA	1.00														
IOD	.71	1.00													
MOD	-.46	.21	1.00												
SODH	.19	.07	-.24	1.00											
SDODH	-.41	.20	.92	-.02	1.00										
KODH	.26	-.07	-.43	.34	-.44	1.00									
LM	.32	.04	-.44	.56	-.32	.38	1.00								
Z	.71	.42	-.34	.25	-.30	.42	.35	1.00							
CVAR	.65	.37	-.33	.26	-.28	.43	.35	1.00	1.00						
DIFMO	-.71	-.48	.52	-.28	.46	-.27	-.31	-.43	-.40	1.00					
SRE	.96	.70	-.45	.11	-.42	.18	.26	.58	.52	-.65	1.00				
LRE	.94	.66	-.44	.26	-.38	.32	.39	.86	.82	-.69	.84	1.00			
GLD	.93	.55	-.56	.27	-.52	.45	.38	.76	.71	-.67	.90	.90	1.00		
RLD	.92	.67	-.43	.07	-.42	.15	.22	.52	.46	-.60	.99	.78	.86	1.00	
RPC	.98	.71	-.46	.15	-.42	.21	.28	.63	.57	-.68	.99	.89	.92	.97	1.00

Tableau 15:

Matrice de corrélation calculée sur l'ensemble des cellules analysées dans l'étude prospective (57212 cellules). Les corrélations supérieures à  $r=0,60$  sont entourées.

	NA	IOD	MOD	SODH	SDODH	KODH	LM	Z	CVAR	DIFMO	SRE	LRE	GLD	RLD	RPC
NA	1.00														
IOD	.74	1.00													
MOD	-.33	.32	1.00												
SODH	.00	.04	-.03	1.00											
SDODH	-.31	.26	.87	.16	1.00										
KODH	.19	-.04	-.30	-.19	-.41	1.00									
LM	.21	.02	-.31	.42	-.21	.16	1.00								
Z	.75	.48	-.28	.04	-.26	.25	.27	1.00							
CVAR	.70	.43	-.27	.04	-.25	.26	.28	1.00	1.00						
DIFMO	-.69	-.50	.37	-.07	.26	-.14	-.10	-.43	-.40	1.00					
SRE	.96	.72	-.31	-.04	-.33	.17	.17	.62	.56	-.61	1.00				
LRE	.94	.67	-.32	.04	-.28	.19	.28	.88	.85	-.67	.82	1.00			
GLD	.94	.62	-.39	.01	-.42	.34	.23	.78	.74	-.62	.91	.87	1.00		
RLD	.93	.69	-.30	-.06	-.33	.16	.17	.55	.49	-.56	.99	.76	.87	1.00	
RPC	.99	.73	-.32	-.03	-.32	.18	.18	.67	.61	-.69	.99	.87	.93	.97	1.00

Tableau 16:

Matrice de corrélation calculée sur l'ensemble des cellules analysées dans l'étude rétrospective (8175 cellules). Les corrélations supérieures à  $r=0,60$  sont entourées.



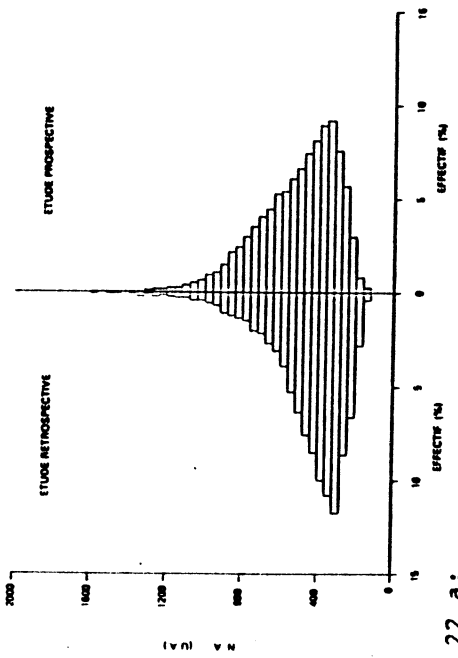


Figure 22 a:

surface nucléaire (NA)

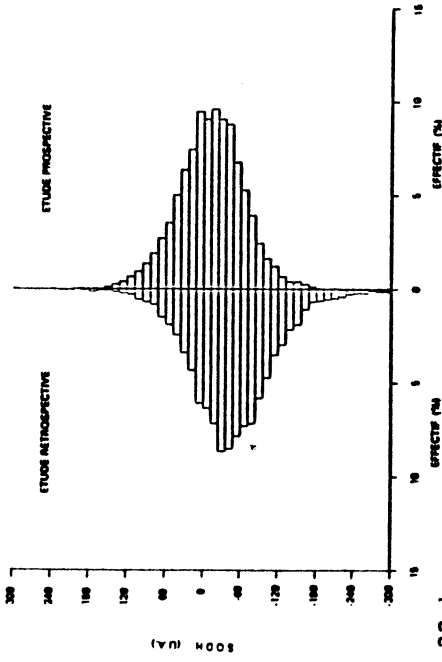


Figure 22 b:

l'écart-type de l'histogramme des densités optiques (SODH)

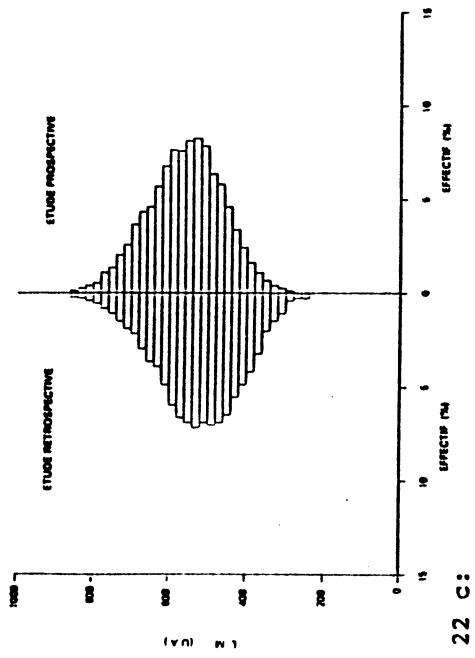


Figure 22 c:

moyenne local de la matrice de co-occurrence (LM)

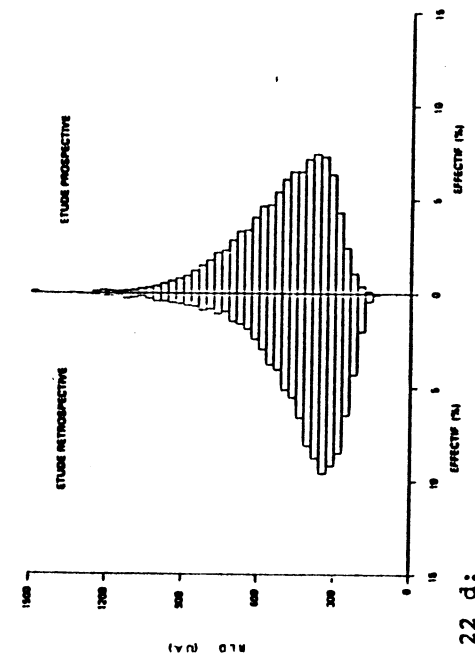


Figure 22 d:

distribution des longueurs de sections de la matrice de longueurs de sections (RLD)

Figure 22:

Distribution des cellules de l'étude rétrospective (à gauche) et prospective (à droite) en fonction de quelques paramètres.

PARAMETRE (U.A.)												
	NA	IOD	MOD	SODH	SDOHH	KODH						
	m	s	m	s	m	s	m	s	m	s		
RS	446	136	3806	1179	8.87	1.87	-48	31	303	78	391	72
PS	516	146	3362	921	6.70	1.36	-13	22	261	63	365	47
TEST DE STUDENT	P<0,05		P<0,05		P<0,05		P<0,05		P<0,05		P<0,05	

PARAMETRE (U.A.)																		
	LM	Z	CVAR	DIFMO	SRE	LRE	GLD	RLD	RPC									
	m	s	m	s	m	s	m	s	m	s	m	s	m	s				
RS	528	37	1196	912	988	785	18923	8965	2262	646	188	64	4340	1519	439	122	683	200
PS	558	40	1488	983	1212	834	14895	6408	2636	669	213	68	5063	1556	512	123	795	211
TEST DE STUDENT	P<0,05		P<0,05		P<0,05		P<0,05		P<0,05		P<0,05		P<0,05		P<0,05		P<0,05	

Tableau 17: Moyennes (m) et écart-types (s) des 15 paramètres calculés sur l'ensemble des cellules analysées dans l'étude rétrospective (RS; N= 8 175 cellules) par comparaison avec les résultats obtenus dans l'étude prospective (PS; N= 57 212 cellules). La signification statistique des différences a été évaluée par le test de comparaison de moyennes de STUDENT pour p< 0,05. (N.S.= différence non significative).

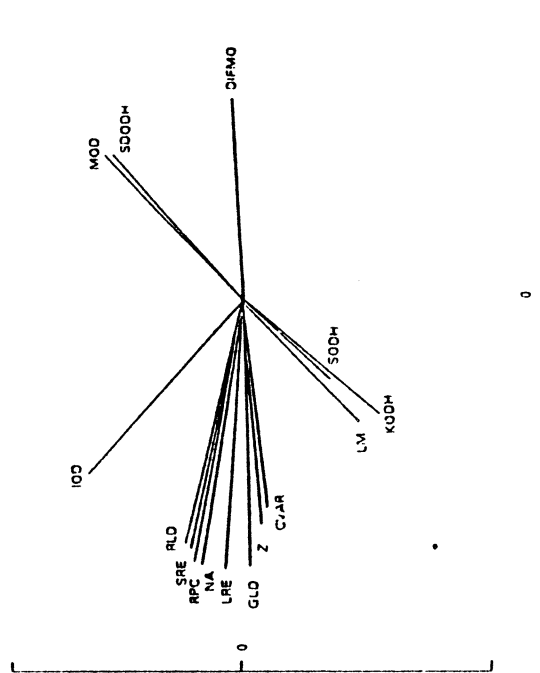
PARAMETRE (U.A.)										
	NA	IOD	MOD	SODH	SODH	SODH	SODH	KODH		
	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
MALIN (N= 112)	523	3402	6,68	1,36	-12,5	21,7	260	62	365	44
BENIN (N= 5)	352	2452	7,29	1,30	-34,2	34,8	287	66	361	84
TEST DE STUDENT	P < 0,05		N.S.		P < 0,05		N.S.		N.S.	

PARAMETRE (U.A.)																		
	LM	Z	CVAR	DIFMO	SRE	LRE	GLD	RLD	RPC									
	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m								
MALIN	559	37	1521	984	1238	835	14643	6302	2675	655	216	67	5141	1528	519	120	806	207
BENIN	518	65	750	597	631	540	20524	6169	1765	268	150	42	3326	1078	341	43	535	95
TEST DE STUDENT	P < 0,05		N.S.		N.S.		P < 0,05		P < 0,05		P < 0,05		P < 0,05		P < 0,05		P < 0,05	

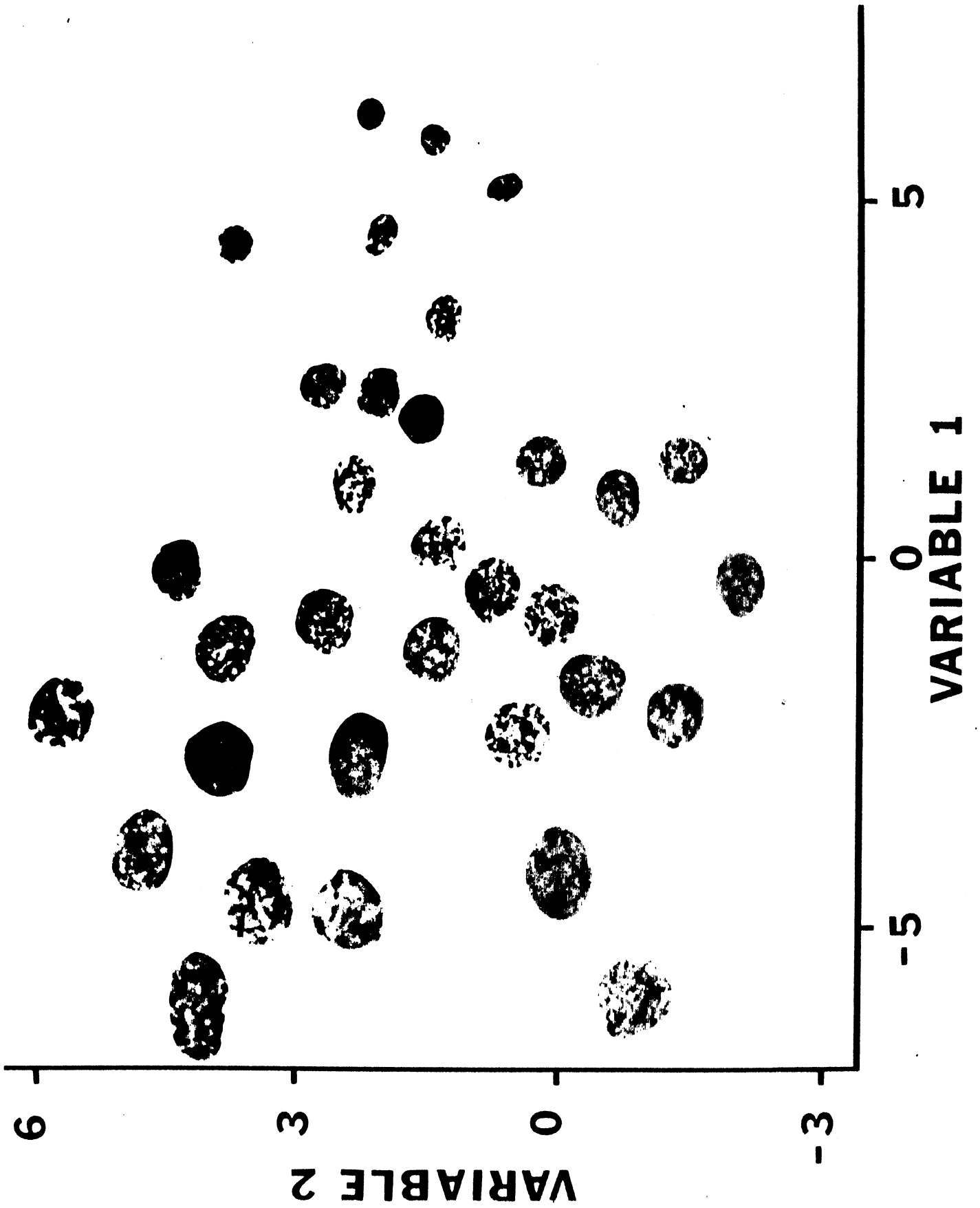
Tableau 18:  
Moyennes (m) et écart-types (s) des 15 paramètres nucléaires calculés sur l'ensemble des cas prospectifs présentant des lésions malignes (MALIN, 112 cas) par comparaison avec les résultats obtenus pour les cas présentant des lésions bénignes (BENIN, 5 cas). La signification statistique des différences a été évaluée par le test de comparaison de moyennes de STUDENT pour  $p < 0,05$ . (N.S. = différence non significative).



**Figure 23:**  
Projection de quelques images nucléaires dans le plan défini par les deux premières variables d'une ACP des différents paramètres.



**Figure 23 a:**  
Représentation vectorielle de la contribution des 15 paramètres nucléaires aux axes du plan et projection des images nucléaires ci-contre.



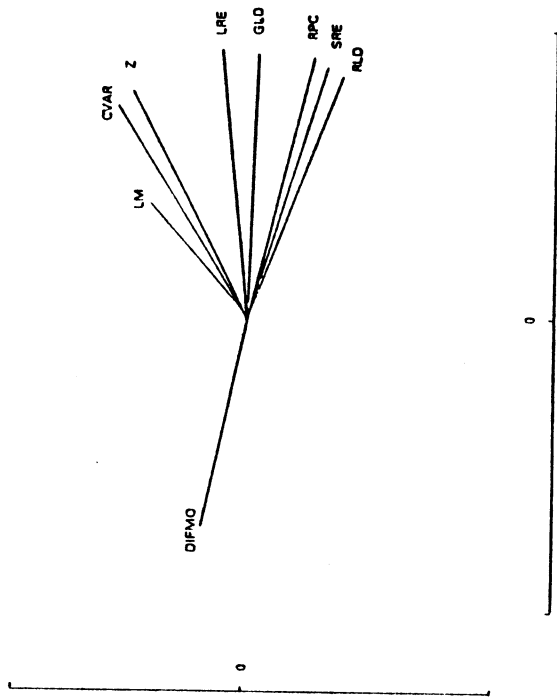
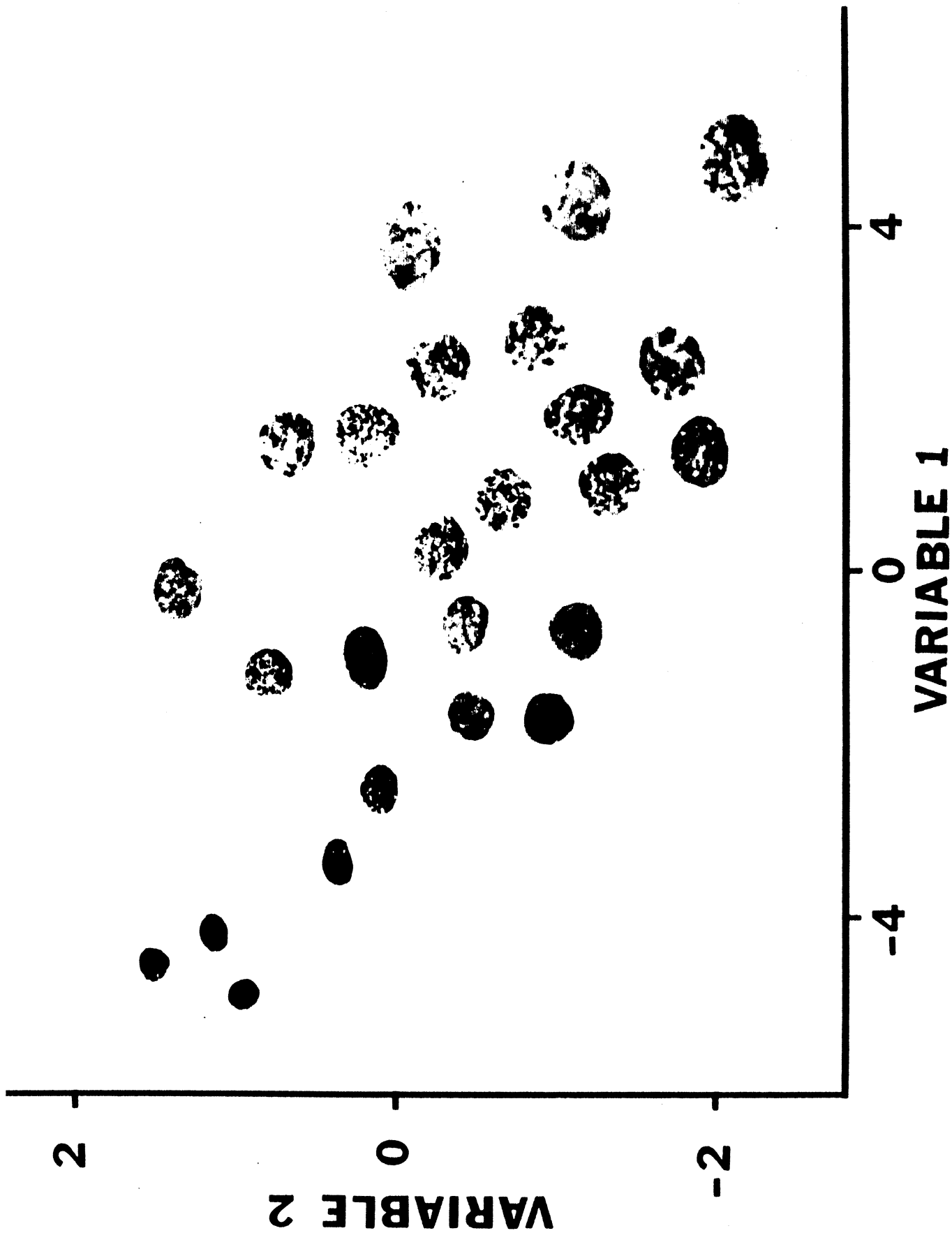


Figure 23 b:

Représentation vectorielle de la contribution des paramètres MARKOVIEN de texture aux axes du plan et projection des images nucléaires ci-contre.





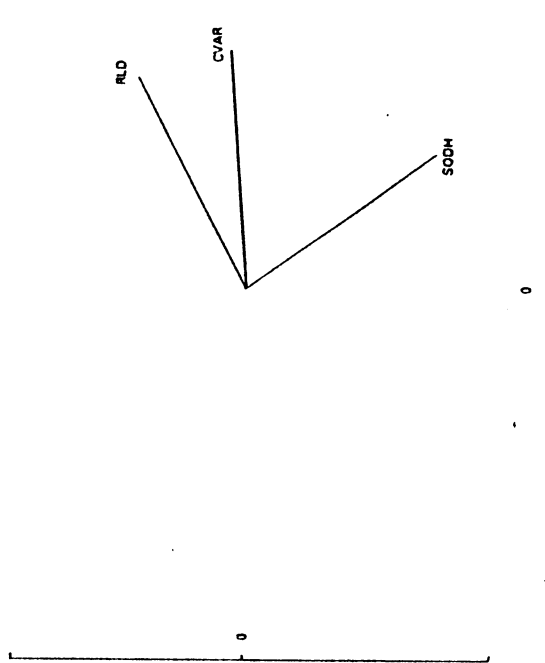
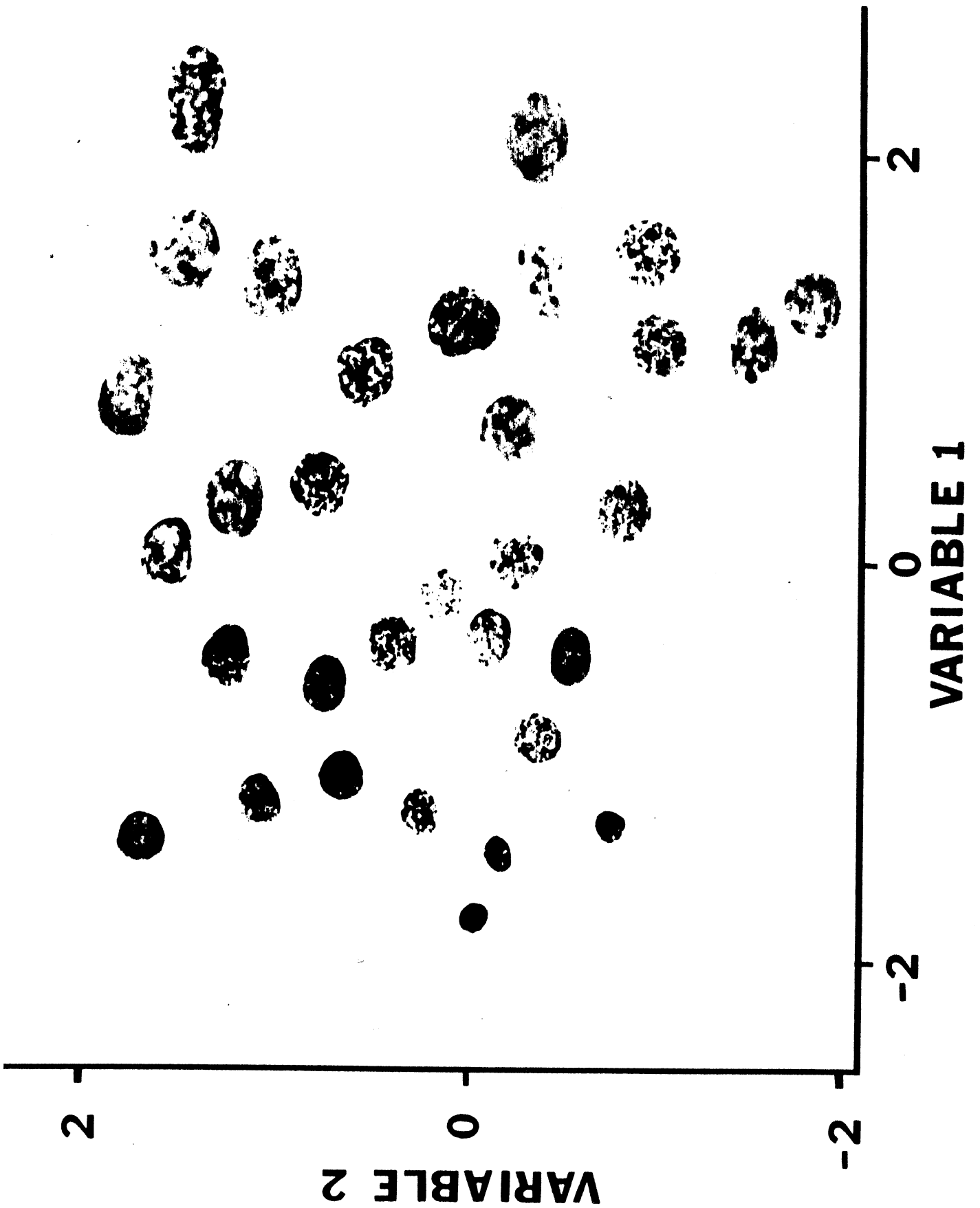
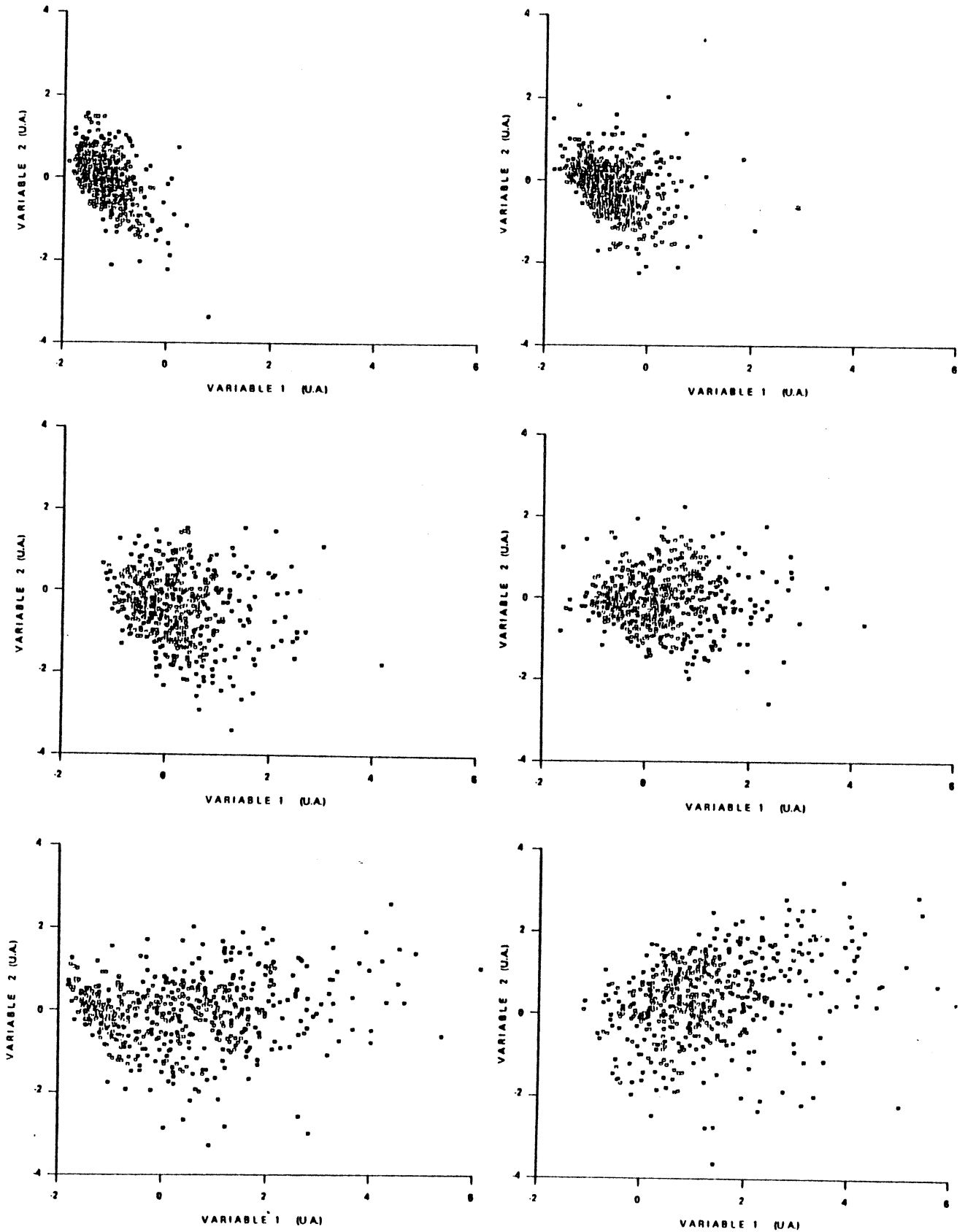


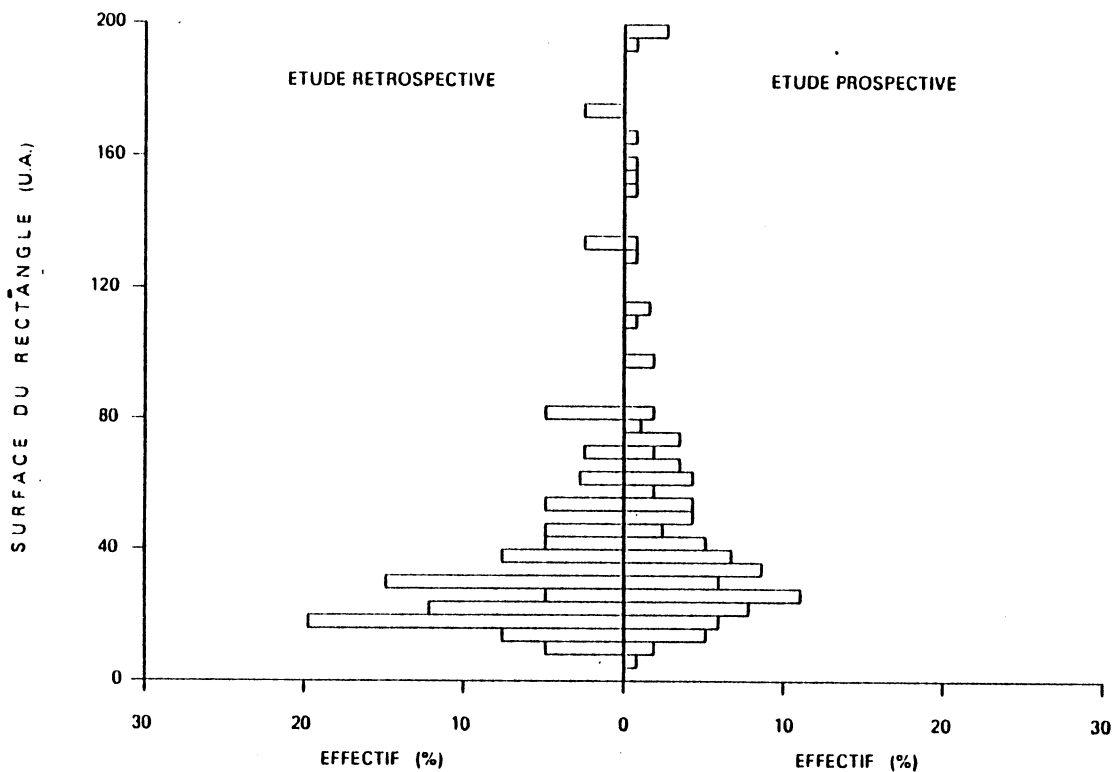
Figure 23 c:

-----  
Représentation vectorielle de la contribution des paramètres nucléaires SODH, CVAR et RLD aux axes du plan et projection des images nucléaires ci-contre.

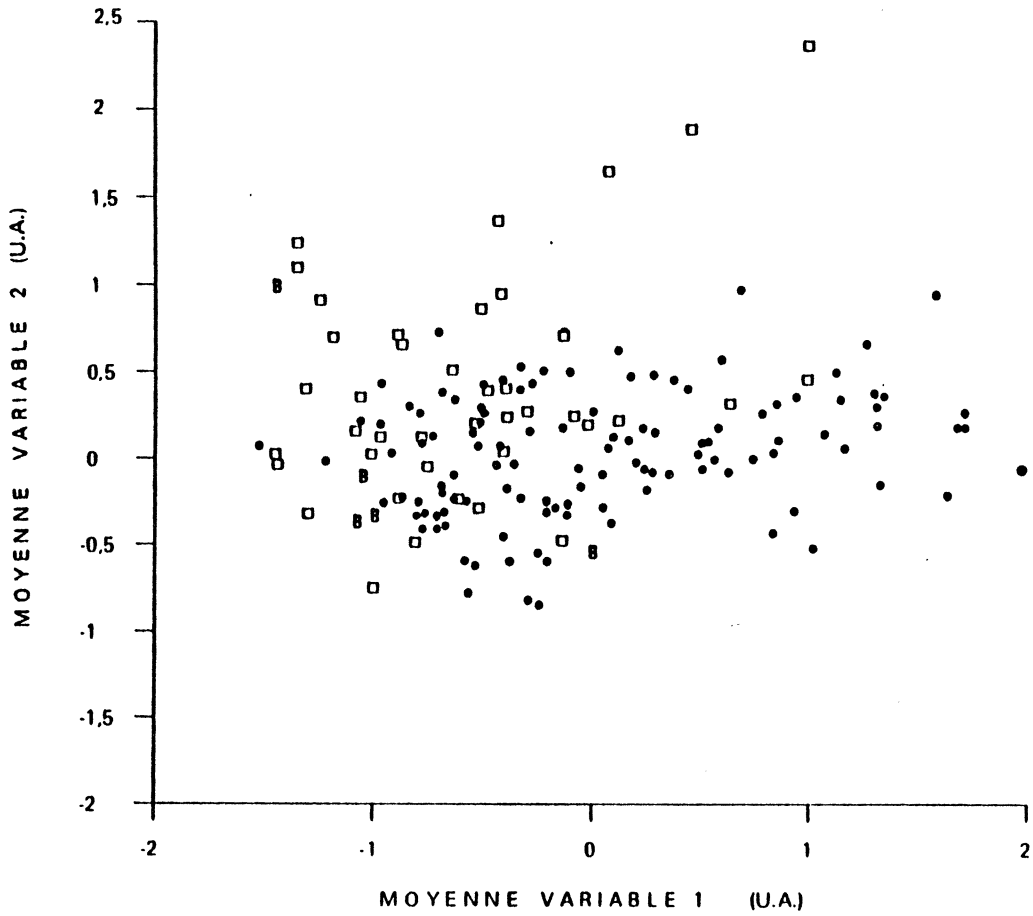




**Figure 24:**  
Exemples de nuages obtenus dans six tumeurs différentes.  
Chaque point représente une cellule de la tumeur dans le plan défini par les paramètres CVAR, RLD et SODH.



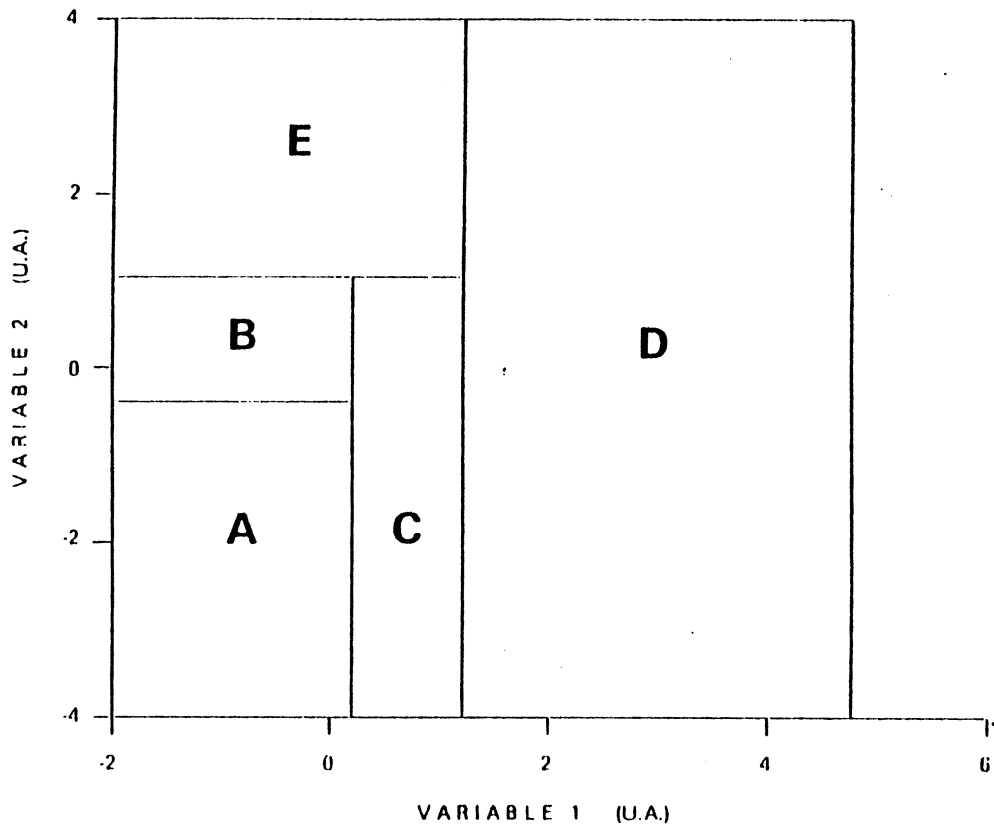
**Figure 25:**  
Distribution de la surface du rectangle d'encadrement dans l'étude rétrospective (à gauche; N= 41) et dans l'étude prospective (à droite; N=117).



**Figure 26:**

Distribution des cas analysés en fonction des moyennes des deux variables de l'ACP portant sur les paramètres SODH, CVAR et RLD.

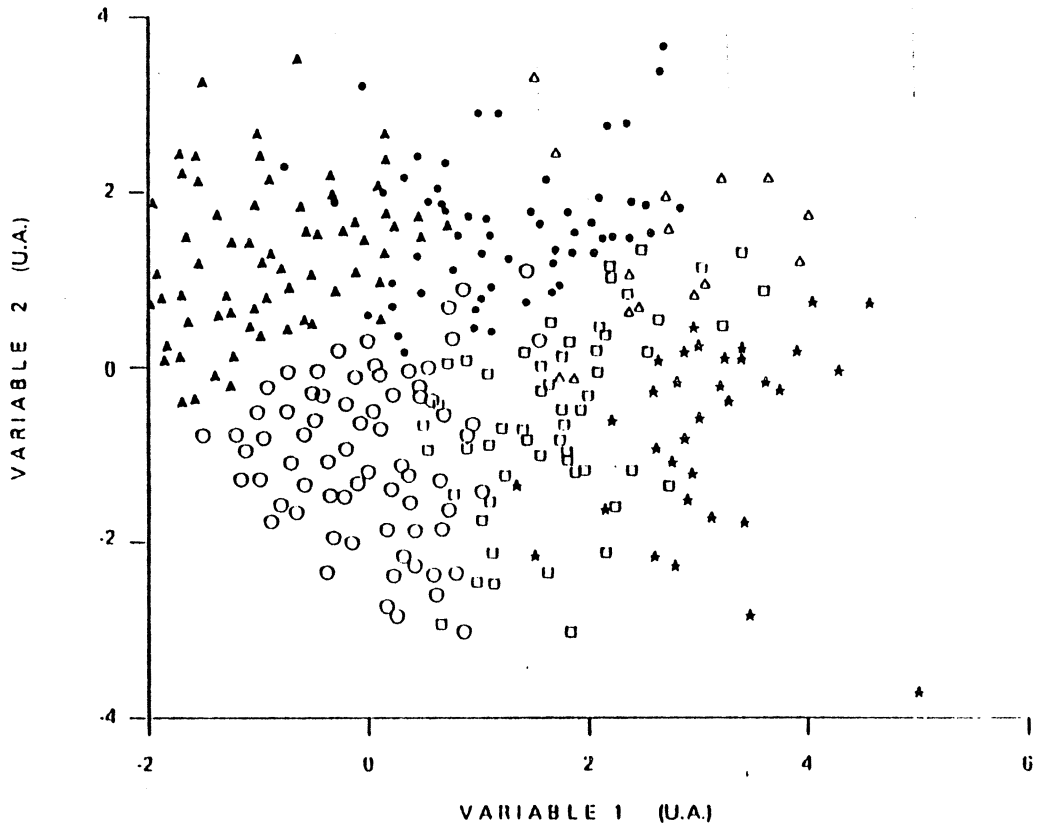
- cas rétrospectifs
- cas prospectifs, tumeurs malignes
- cas prospectifs, tumeurs bénignes



**Figure 27:**  
 Découpage du plan défini par les 2 premières variables d'une ACP des paramètres nucléaires SODH, CVAR et RLD (figure 23 c).

	ZONE DU PLAN D'ACP														
	A			B			C			D			E		
	MIN	MOY	MAX	MIN	MOY	MAX	MIN	MOY	MAX	MIN	MOY	MAX	MIN	MOY	MAX
RS	0	16	58	1	47	75	0	8	22	0	6	36	2	23	59
PS	0	18	62	7	42	80	0	17	43	0	12	58	1	11	47

**Tableau 19:**  
 Pourcentages minimaux, moyens et maximaux de cellules dans les cinq zones du plan d'ACP (figure 27) obtenus dans l'étude rétrospective (RS; N=41) et prospective (PS; N=117).



**Figure 28:**

Projection des 6 groupes cellulaires définis par le programme "CLASSIF" dans le plan défini par les 2 premières variables d'une ACP des paramètres SODH, CVAR et RLD (figure 23 c).

- ▲ groupe I
- groupe II
- groupe III
- groupe IV
- △ groupe V
- \* groupe VI

	GROUPE CELLULAIRE																	
	I			II			III			IV			V			VI		
	MIN	MOY	MAX	MIN	MOY	MAX	MIN	MOY	MAX	MIN	MOY	MAX	MIN	MOY	MAX	MIN	MOY	MAX
RS	21	58	94	1	29	60	0	7	49	0	3	15	0	3	18	0	1	7
PS	4	36	97	3	44	85	0	8	41	0	8	32	0	2	19	0	2	11

**Tableau 20:**

Pourcentages minimaux, moyens et maximaux de cellules par cas appartenant aux six groupes cellulaires (I à VI) définis par le programme "CLASSIF" dans l'étude rétrospective (RS) et prospective (PS).

	AGE	TAILLE	METASTASES AXILLAIRES	TYPE HISTOLOGIQUE	SURVIE
NA	.05	-.30	.13	-.23	.17
IOD	.04	-.20	.28	-.07	.18
MOD	.11	.14	.13	.11	.03
SODH	.10	-.27	.03	.13	.10
SODDH	.19	-.27	.03	.20	-.13
KODH	-.08	.27	-.11	-.03	.20
LM	.10	-.16	-.17	.21	<span style="border: 1px solid black;">.43</span>
Z	.11	-.18	.00	-.29	.23
CVAR	.11	-.17	-.01	-.29	.24
DIFMO	.13	.32	-.20	.05	-.02
SRE	.03	-.29	.14	-.20	.21
LRE	.07	-.28	.11	-.26	.13
GLO	.07	-.20	.09	-.18	.29
RLD	.03	-.28	.14	-.19	.24
RPC	.04	-.29	.14	-.22	.19

**Tableau 21:**

Matrice de corrélation entre les données cliniques et les 15 paramètres cellulaires pour l'étude rétrospective. Les corrélations hautement significatives sont entourées.



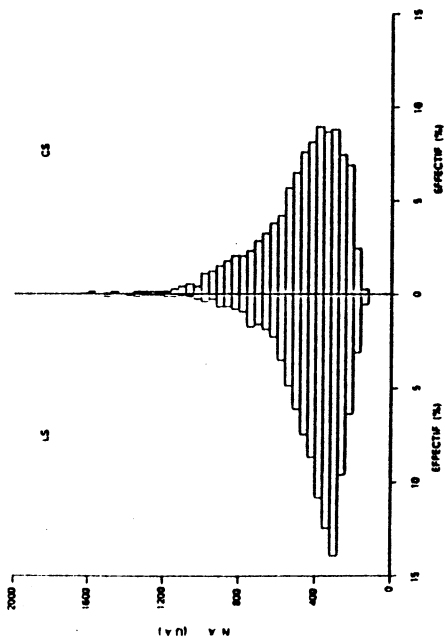


Figure 29 a:

surface nucléaire (NA)

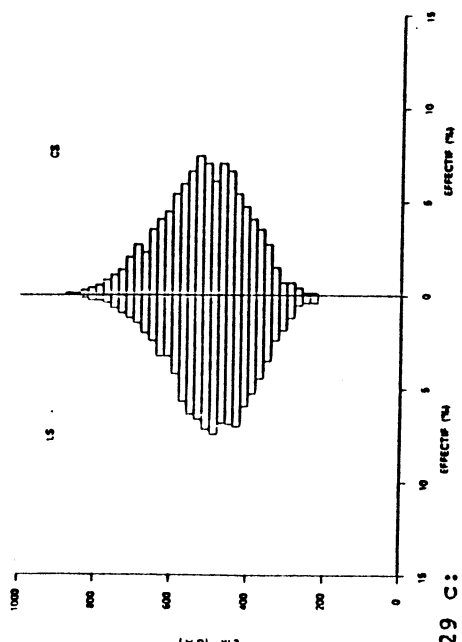


Figure 29 c:

moyenne local de la matrice de co-occurrence (LM)

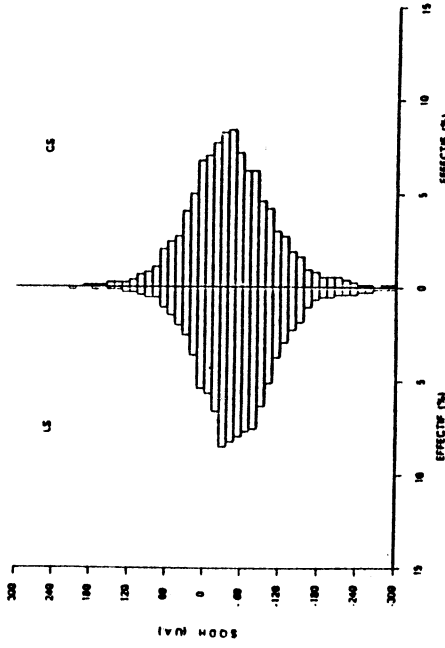


Figure 29 b:

l'écart-type de l'histogramme des densités optiques (SODH)

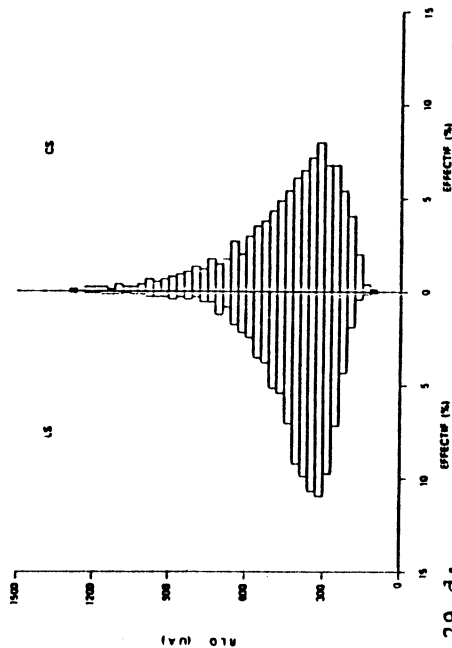


Figure 29 d:

distribution des longueurs de sections de la matrice de longueurs de sections (RLD)

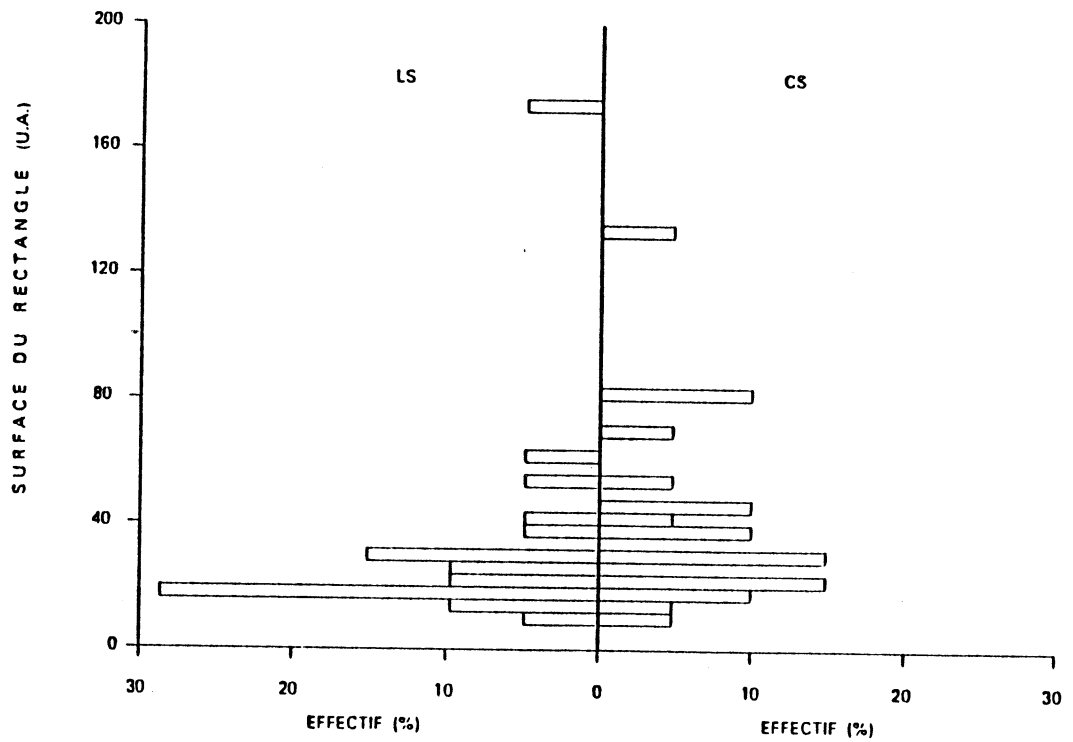
Figure 29:

Distribution de quelques paramètres cellulaires, dans les cas à longue survie (à gauche) et les cas à courte survie (à droite).

PARAMETRE (U.A.)												
	NA	IOD	MOD	SODH	SDOHH	KODH						
	m	s	m	s	m	s	m	s	m	s		
LS	421	118	3617	986	8,88	1,80	-53	31	310	80	377	65
CS	472	149	4004	1324	8,86	1,94	-43	31	295	75	406	76
TEST DE STUDENT	N.S.		N.S.		N.S.		N.S.		N.S.		N.S.	

PARAMETRE (U.A.)																		
	LM	Z	CVAR	DIFMO	SRE	LRE	GLD	RLD	RPC									
	m	s	m	s	m	s	m	s	m	s	m	s	s					
LS	514	31	989	763	809	654	18936	9575	2121	500	179	61	3917	1068	411	89	642	163
CS	542	37	1413	1001	1177	862	18911	8396	2411	742	198	65	4784	1775	469	143	725	226
TEST DE STUDENT	P < 0,05		N.S.		N.S.		N.S.		N.S.		N.S.		N.S.		N.S.		N.S.	

Tableau 22: Moyennes et écart-types des paramètres cellulaires dans les cas à longue survie (LS; N=21) et dans les cas à courte survie (CS; N=20). La signification des différences a été analysée par le test de comparaison de moyennes de STUDENT (N.S.= non significatif).



**Figure 30:**  
Distribution de la surface du rectangle d'encadrement dans les cas à longue survie (LS, à gauche) et les cas à courte survie (CS, à droite).

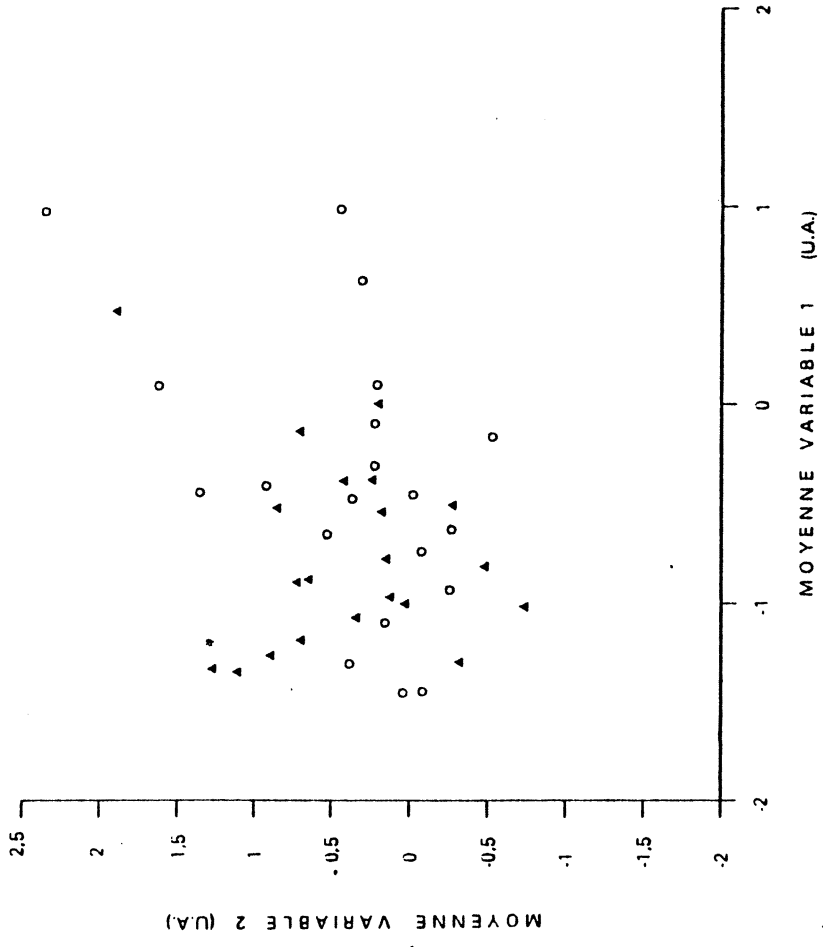


Figure 31:  
Distribution des cas à courte survie (o) et des cas à longue survie (▲) en fonction des moyennes des deux variables de l'ACP portant sur les paramètres SODH, CVAR et RLD. (Les vecteurs du plan sont représentés en figure 23 c.)

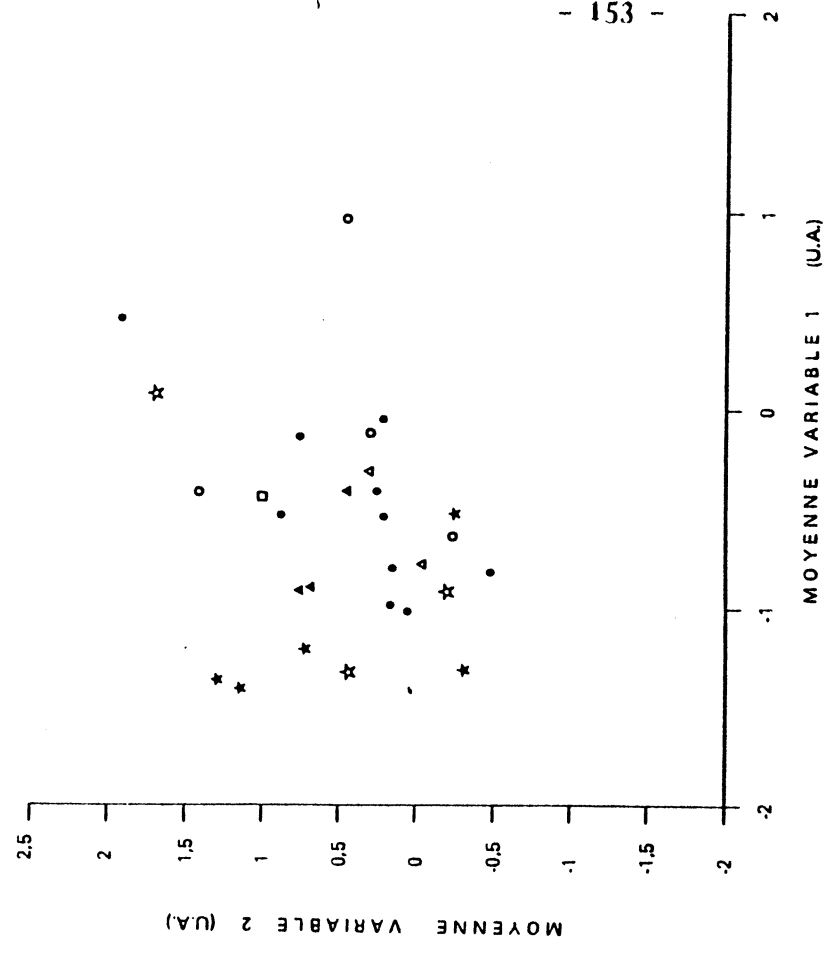


Figure 32:  
Position du centre de gravité des populations cellulaires des cas rétrospectifs dans le plan formé par les deux premières variables de l'ACP des paramètres SODH, CVAR et RLD (figure 23 c).  
Chaque cas est représenté par un symbole correspondant à son groupe clinique et permettant de distinguer entre les cas à longue survie (LS) et les cas à courte survie (CS).

LS	CS
o	: RS-00
▲	: RS-01
☆	: RS-10
◻	: RS-11

	ZONE DU PLAN D'ACP														
	A			B			C			D			E		
	MIN	MOY	MAX	MIN	MOY	MAX	MIN	MOY	MAX	MIN	MOY	MAX	MIN	MOY	MAX
LS	0	17	58	12	51	75	0	5	15	0	3	19	2	22	55
CS	0	16	32	1	43	65	0	8	22	0	9	36	3	22	59
TEST DE STUDENT	N.S.			N.S.			N.S.			P < 0,05			N.S.		

**Tableau 23:**

Pourcentages minimaux, moyens et maximaux de cellules dans les cinq zones (A à E) du plan de l'ACP des paramètres SODH, CVAR et RLD dans les cas à longue survie (LS; N=21) et dans les cas à courte survie (CS; N=20). (N.S.= non significativement différent par le test de STUDENT).

	GROUPE CELLULAIRE																	
	I			II			III			IV			V			VI		
	MIN	MOY	MAX	MIN	MOY	MAX	MIN	MOY	MAX	MIN	MOY	MAX	MIN	MOY	MAX	MIN	MOY	MAX
LS	36	64	94	1	27	60	0	8	43	0	1	7	0	2	18	0	1	2
CS	21	52	80	4	31	59	0	9	49	0	4	15	0	3	18	0	1	7
TEST DE STUDENT	P < 0,05			N.S.			N.S.			P < 0,05			N.S.			N.S.		

**Tableau 24:**

Pourcentages minimaux, moyens et maximaux de cellules dans les six groupes cellulaires (I à VI) définis à partir du plan de l'ACP des paramètres SODH, CVAR et RLD dans les cas à longue survie (LS; N=21) et dans les cas à courte survie (CS; N=20). (N.S.= non significativement différent par le test de STUDENT).

	AGE	TAILLE DE LA TUMEUR	METASTASES AXILLAIRES	TYPE HISTOLOGIQUE	SURVIE
SURFACE DU RECTANGLE	-.08	.10	-.07	-.03	.13
MOYENNE VARIABLE-1	.12	<b>-.36</b>	.08	-.19	.29
MOYENNE VARIABLE-2	-.07	.11	.05	-.20	.02
A	.21	.07	-.25	.06	-.04
B	-.05	-.06	.10	.25	-.28
C	-.13	-.27	.25	-.01	.24
D	-.01	-.21	-.10	-.19	.32
E	-.04	.13	.11	-.17	.06
I	-.20	.31	.14	.22	-.29
II	.09	-.12	-.12	.14	.11
III	.16	-.20	.02	<b>-.46</b>	.05
IV	-.15	-.25	.09	.04	<b>.34</b>
V	.18	-.08	-.13	<b>-.34</b>	.29
VI	-.08	-.11	-.15	.10	.30

**Tableau 25:**

Matrice de corrélation entre les données cliniques et les 14 paramètres utilisés pour la caractérisation des cas sur la base des paramètres de texture nucléaires dans l'étude rétrospective. Les corrélations hautement significatives sont entourées.

	AGE	TAILLE	METASTASES AXILLAIRES	TYPE HISTOLOGIQUE	RECEPTEUR AUX OESTROGENES	RECEPTEUR A LA PROGESTERONE
NA	.08	.17	.14	.06	.08	-.16
IOD	.05	<b>.30</b>	<b>.20</b>	-.06	-.07	<b>-.27</b>
MOD	-.07	.18	.07	-.17	<b>-.20</b>	-.14
SODH	.02	.16	<b>.25</b>	.09	.06	<b>-.21</b>
SODOH	-.06	.21	.05	<b>-.21</b>	<b>-.20</b>	<b>-.22</b>
KODH	.02	-.07	.17	<b>.20</b>	.04	.03
LM	.09	.10	<b>.25</b>	.18	.00	-.14
Z	.04	<b>.22</b>	<b>.21</b>	.05	.00	-.19
CVAR	.03	<b>.22</b>	<b>.22</b>	.06	-.01	-.19
DIFMO	-.12	-.12	-.14	-.10	-.15	.10
SRE	.09	.14	.11	.07	-.10	-.15
LRE	.07	.19	.16	.05	.05	-.18
GLD	.07	.14	.16	.10	.08	-.15
RLD	.09	.13	.10	.07	.11	-.14
RPC	.08	.15	.12	.07	.09	-.16

**Tableau 26:**

Matrice de corrélation entre les données cliniques et les 14 paramètres utilisés pour la caractérisation des cas sur la base des paramètres de texture nucléaire dans l'étude prospective. Les corrélations hautement significatives sont entourées.

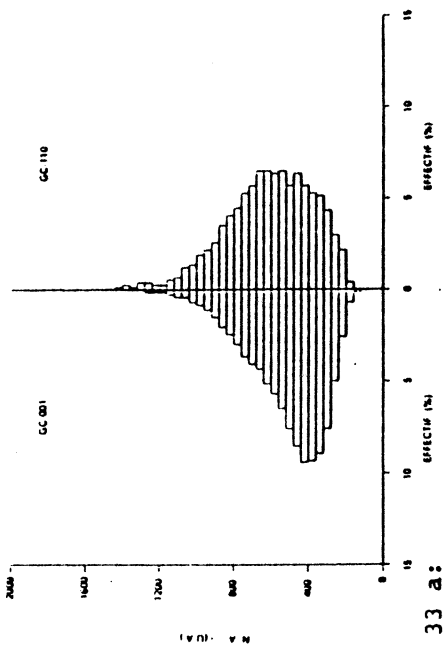


Figure 33 a:

surface nucléaire (NA)

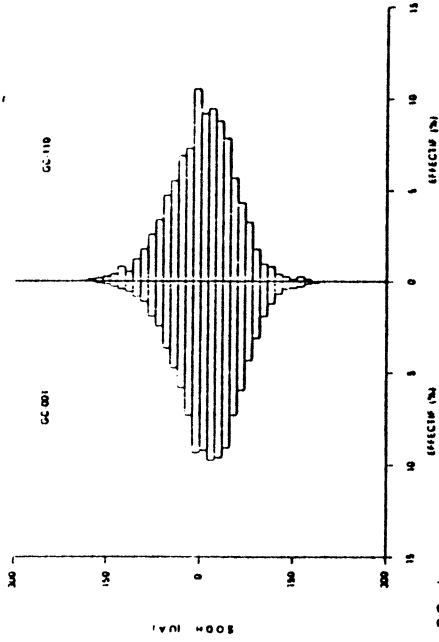


Figure 33 b:

l'écart-type de l'histogramme des densités optiques (SODH)

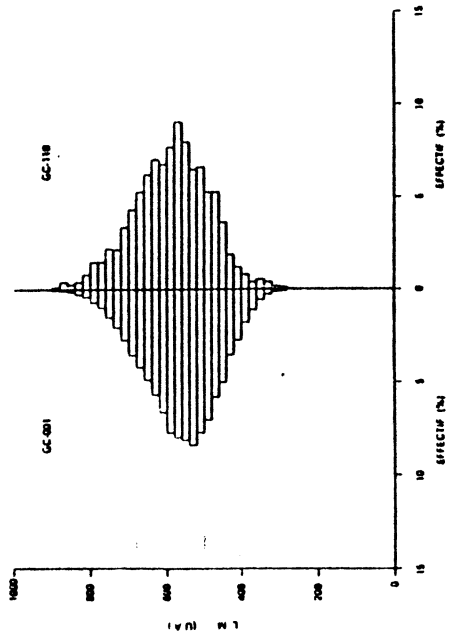


Figure 33 c:

moyenne local de la matrice de co-occurrence (LM)

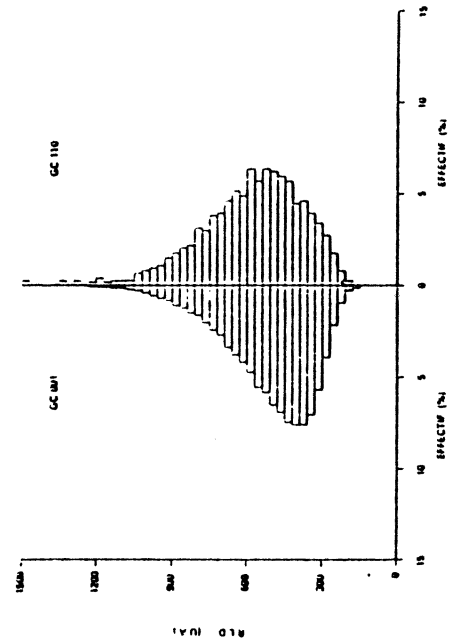


Figure 33 d:

distribution des longueurs de sections de la matrice de longueurs de sections (RLD)

Figure 33:

Distribution de quelques paramètres nucléaires de cellules de groupes cliniques très différents.

à gauche: GC-001 (cas dont les données cliniques sont considérées comme favorables pour le pronostic;

à droite: GC-110 (cas dont les données cliniques sont considérées comme défavorables pour le pronostic).



PARAMETRE (U.A.)										
	NA	IOD	MOD	SODH	SODDH	KODH				
	m	m	m	m	m	m	s	s	s	s
GC-001 (N=43)	508	3131	6,37	1,43	-16	21	245	65	370	47
GC-110 (N=7)	597	4146	7,18	1,34	-5	10	272	58	384	43
TEST DE STUDENT	N.S.	P < 0,05	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

PARAMETRE (U.A.)																
	LM	Z	CVAR	DIFMO	SRE	LRE	GLD	RLD	RPC							
	m	m	m	m	m	m	m	m	m	s	s					
GC-001 (N=43)	556	38	1371	834	14764	5415	2620	634	207	60	5041	1518	511	118	786	198
GC-110 (N=7)	580	23	2224	1047	11676	4598	2968	516	256	60	6001	1299	569	92	905	167
TEST DE STUDENT	N.S.	P < 0,05	P < 0,05	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Tableau 27:  
Moyennes et écart-types des paramètres cellulaires pour deux groupes cliniques très différents. (N.S.= non significativement différent par le test de STUDENT).

	SURFACE DU RECTANGLE (U.A)			
	N	MIN	MOY	MAX
GC-000	3	26	69	155
GC-001	43	13	51	290
GC-010	3	27	36	51
GC-100	7	35	73	133
GC-011	8	15	50	83
GC-110	7	19	121	327
GC-101	15	15	36	111
GC-111	6	22	74	166

**Tableau 28:**  
Surfaces minimales, moyennes et maximales du rectangle  
d'encadrement dans les huit groupes cliniques.

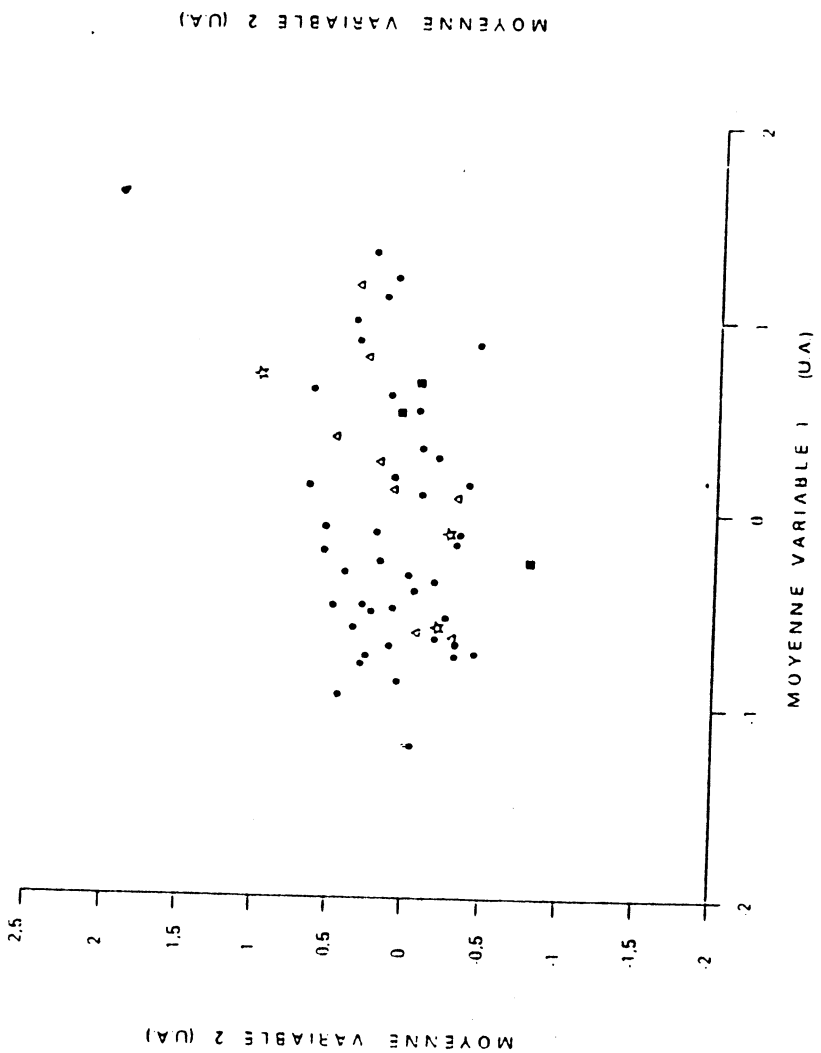


Figure 34 a:

- ☆ GC-000
- GC-001
- GC-010
- △ GC-011

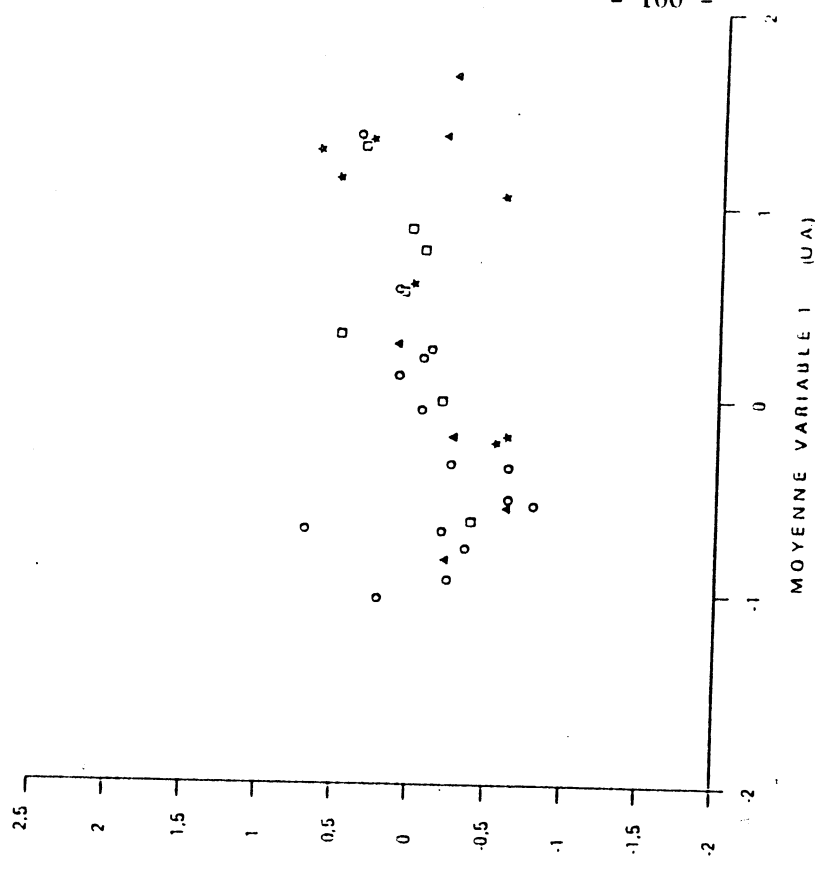


Figure 34 b:

- ☆ GC-100
- GC-101
- GC-110
- △ GC-111

Figure 34:  
 Position du centre de gravité des populations cellulaires des cas prospectifs dans le plan formé par les deux premières variables de l'ACP des paramètres SODH, CVAR et RLD (figure 23c). Chaque cas est représenté par le symbole de son groupe clinique.

		ZONE DU PLAN D' ACP														
		A			B			C			D			E		
	N	MIN	MOY	MAX	MIN	MOY	MAX	MIN	MOY	MAX	MIN	MOY	MAX	MIN	MOY	MAX
GC-000	3	9	20	32	23	42	55	6	14	23	1	10	22	3	11	25
GC-001	43	0	16	54	7	44	76	0	17	42	0	11	58	1	12	27
GC-010	3	7	24	50	24	31	39	18	27	43	2	14	21	1	3	5
GC-100	7	2	17	44	13	23	38	11	24	36	3	28	45	1	7	14
GC-011	8	3	15	37	17	38	67	4	23	40	0	13	34	5	10	16
GC-110	7	3	14	41	19	33	48	4	23	31	1	19	32	2	9	16
GC-101	15	2	26	62	12	44	70	2	14	35	0	8	42	1	8	34
GC-111	6	7	23	45	10	34	60	2	18	30	0	16	40	2	7	14

**Tableau 29:**

Pourcentages minimaux, moyens et maximaux de cellules dans les cinq zones (A à E) du plan d'ACP (figure 27) pour les huit groupes cliniques.

		GC-							
		000	001	010	100	011	110	101	111
GC-	000								
	001	.							
	010	.	E						
	100	B	B,D	.					
	011	.	.	D	D				
	110	.	.	.	.	.			
	101	.	A	.	B,D	.	.		
	111	.	.	.	.	.	.	.	

**Tableau 30:**

Zones du plan d'ACP pour lesquelles les pourcentages moyens de cellules sont significativement différents entre les groupes cliniques considérés deux à deux.

	GROUPE CELLULAIRE																		
	N	I			II			III			IV			V			VI		
		MIN	MOY	MAX	MIN	MOY	MAX	MIN	MOY	MAX	MIN	MOY	MAX	MIN	MOY	MAX	MIN	MOY	MAX
GC-000	3	24	34	47	26	48	66	1	9	24	1	5	7	0	4	11	0	1	3
GC-001	43	7	38	77	13	43	85	0	8	41	0	7	28	0	2	10	0	1	7
GC-010	3	8	14	22	53	67	84	0	5	10	2	10	17	0	2	4	0	2	4
GC-100	7	5	16	26	19	43	70	1	14	29	3	15	32	1	7	19	2	4	7
GC-011	8	11	29	48	27	45	59	1	13	28	0	8	17	0	3	12	0	2	5
GC-110	7	17	25	40	27	43	68	1	13	24	1	11	17	0	5	11	0	3	6
GC-101	15	6	35	81	15	52	82	0	6	21	0	6	25	0	1	4	0	1	3
GC-111	6	4	26	52	28	49	68	1	6	17	0	10	24	0	4	13	0	4	11

Tableau 31:

Pourcentages minimaux, moyens et maximaux de cellules par cas appartenent aux six groupes cellulaires I à VI pour les huit groupes cliniques.

		GC.							
		000	001	010	100	011	110	101	111
GC.	000								
	001	-							
	010	I	I,II						
	100	I,VI	I,IV V,VI	-					
	011	-	-	II	I				
	110	-	V,VI	II	-	-			
	101	-	-	-	III,IV V,VI	V	V,VI		
	111	-	V,VI	-	-	-	-	V,VI	

Tableau 32:

Groupes cellulaires pour lesquels les pourcentages moyens de cellules sont significativement différents entre les groupes cliniques considérés deux à deux.

	AGE	TAILLE DE LA TUMEUR	METASTASES AXILLAIRES	TYPE HISTOLOGIQUE	RECEPTEUR AUX OESTROGENES	RECEPTEUR A LA PROGESTERONE
SURFACE DU RECTANGLE	-.03	.13	.35	.03	-.10	-.13
MOYENNE VARIABLE-1	.06	.19	.20	.08	.04	-.19
MOYENNE VARIABLE-2	.05	-.02	-.12	-.02	.14	.06
A	-.04	-.01	.02	-.06	-.11	.00
B	-.05	-.15	-.20	-.11	-.05	.22
C	.05	.09	.16	.15	.11	-.16
D	.05	.17	.12	.04	.02	-.20
E	.00	-.18	-.15	.04	.17	.18
I	-.06	-.19	-.22	-.11	-.03	.25
II	.01	-.01	.07	.06	-.01	-.05
III	.04	.12	.06	.05	.12	-.15
IV	.05	.13	.14	.09	.02	-.20
V	.01	.30	.23	-.02	-.09	-.17
VI	.06	.17	.26	.04	-.11	-.19

Tableau 33:

Matrice de corrélation entre les données cliniques et les 14 paramètres utilisés pour la caractérisation des cas sur la base des paramètres de texture nucléaire dans l'étude prospective. Les corrélations hautement significatives sont entourées.



REFERENCES

=====

AHERNE, W.A.; CAMPLEJOHN, R.S.; WRIGHT, N.A. - In: An introduction to cell population kinetics - Edwaerd Arnold (Publishers) Ltd., The Pitman Press, Bath, Great Britain (1977)

ALBERTS, B., BAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. - The cell nucleus - In: Molecular Biology of the Cell - pp. 385 - 481 - Garland Publishing, Inc., New York (1983)

ATKIN, N.B. - Modal desoxyribonucleic acid value and survival in carcinoma of the breast - Brit. Med. J. 1: 271 - 272 (1972)

ATKIN, N.B.; KAY, R. - Prognostic significance of modal DNA value and other factors in malignant tumours, based on 1465 cases - Brit. J. Cancer 40: 210 (1979)

AUER, G.; CASPERSSON, T.O.; WALLGREN, A.S. - DNA content and survival in mammary carcinoma - Anal.Quant.Cytol. 2: 161 - 165 (1980 a)

AUER G.; CASPERSSON, T.O.; GUSTAFSSON, S.A.; HUMLA, S.A.; LJUNG, B.M.; NORDENSKJOELD, B.A.; SILVERSWAERD, C.; WALLGREN, A.S. - Relationship between nuclear DNA distribution and estrogen receptors in human mammary carcinomas - Anal.Quant. Cytol. 2: 280 - 284 (1980 b)

AUER, G.; FALLENIOUS, A.G.; ERHARDT, K.Y.; SUNDELIN, B.S:B: - Progression of mammary adenocarcinomas as reflected by nuclear DNA content - Cytometry 5: 420 - 425 (1984)

BARRES, D.R., DUHR, M.A., BOIVIN, Y.A. - Discrimination between precancerous and cancerous lesions of the uterine cervix by DNA measurements on tissue sections - Anal. Quant. Cytol. Histol. 7: 320 - 326 (1985)

BEDROSSIAN, C.W.M.; RABER, M.; BARLOGIE, B. - Flow cytometry and cytomorphology in primary resectable breast cancer - Analyt. Quant. Cytol. 3: 112 - 116 (1981)

BERRYMAN, J.; STERRETT G.T.; PAPADIMITRIOU, J.M. - Feulgen DNA cytophotometry in histologic sections of mammary neoplasms - Anal. Quant. Cytol. 6: 19 - 23 (1984)

BOECKING, A.; ADLER, C.P.; COMMON, H.H.; HILGARTH, M.; GRANZEN, B.; AUFFERMANN, W. - Algorithm for a DNA cytophotometric diagnosis and grading of malignancy - Anal. Quant. Cytol. 6: 1 - 8 (1984)

BLOOM, H.G.J.; RICHARDSON W.W. - Histological grading and prognosis in breast cancer - Brit. J. Cancer 11: 359 - 377 (1957)

BRADBURY, E. M.; MACLEAN, N.; MATTHEWS, H. R. - In: DNA, chromatin and chromosomes - pp. 191 - 192 - Blackwell Scientific Publications, Oxford, (1981)



BRUGAL, G.; CHASSERY, J.M. - Un nouveau système d'analyse densitométrique et morphologique des préparations microscopiques - Histochemistry 52: 241 - 258 (1977)

BRUGAL, G. - Image analysis of microscopic preparations - Meth. Achiev. Exp. Pathol. 11: 1 - 33 (1984)

BRUGAL, G.; GIROUD, F.; GABRIEL, A. - Analysis of the cell kinetics during planarian regeneration by means of SAMBA 200 cell image processor - Roux Arch. Devel. Biol. 194: 148 - 154 (1985)

BULBROOK, R.D. - Prognostic factors and tumour markers in early breast cancer; a commentary - Eur. J. Cancer Clin. Oncol 19: 1693 - 1697 (1983)

CHASSERY, J.M. - Texture analysis of biological images using a computerized scanning microphotometer: SAMBA - 3rd international conference on automation of diagnostic cytology and cell image analysis MUNICH (FRG), 23 - 24 mai (1980)

CHASSEVENT, A.; DAVER, A.; BERTRAND, G.; COIC, H.; GESLIN, J.; BIDABE M.-G.; GEORGE, P.; LARRA, F. - Comparative flow DNA analysis of different cell suspensions in breast carcinoma - Cytometry 5: 263 - 267 (1984)

CONTESSO, G.; ROUESSE, J., PETIT, J.-Y.; MOURIESSE, H. - Les facteurs anatomo-pathologiques du pronostic des cancers du sein - Bul. Cancer 64: 525 - 536 (1977)

CORNELISSE, C.J.; KONING, H.R.; MOOLENAER, A.J.; VAN DE VELDE, C.; PLOEM, J.S. - Image and flow cytometric analysis of DNA content in breast cancer - relation to estrogen receptor content and lymph node involvement - Anal. Quant. Cytol. 6: 9 - 18 (1984)

CORNELISSE, C.J.; VAN DRIEL-KULKER, A.M. - DNA image cytometry on machine-selected breast cancer cells and a comparison between flow cytometry and scanning cytophotometry - Cytometry 6: 471 - 477 (1985)

DEITCH, A.D.; WAGNER, D.; RICHART, R.M. - Conditions influencing the intensity of the Feulgen reaction - J. Histochem. Cytochem. 16: 371 - 379 (1968)

EWERS, S.B.; LANGSTROEM, E.; BALDETORP, B.; KILLANDER, D. - Flow cytometric DNA analysis in primary breast carcinomas and clinicopathological correlation - Cytometry 5: 408 - 419 (1984)

FALLENIIUS, A.; FRANZEN, S.; AUER, G. - Predictive value of nuclear DNA content in breast cancer in relation to clinical and morphologic factors. A retrospective study of 409 consecutive cases - In: DNA Content and Prognosis in Breast Cancer -. pp. VI/1 - VI/26. Fallenius, Stockholm (1986)

FEULGEN, R.; ROSSENBECK, H. - Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsaeure vom Typus der Thymonucleinsaeure und die darauf beruhende selektive Faerbung von Zellkernen in mikroskopischen Praeparaten - Hoppe-Seylers Z.,: 135- 203 (1924)

FIDLER, I.J.; KRIPKE, M.L. - Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor - Science 197: 893 - 895 (1977)

FISHER, E.R. - Pathologic findings from the national surgical adjuvant breast project - Cancer 51: 181 - 191 (1983)

FISHER, E.R. - The impact of pathology on the biologic, diagnostic, prognostic, and therapeutic considerations in breast cancer - Surg. Clin. N. Amer. 64: 1073 - 1093 (1984)

FOSSA, S.D.; MARTON, P.F.; KNUDSEN, O.S.; KAALHUS, O.; BORMER, O.; VAAGE, S. - Nuclear Feulgen DNA content and nuclear size in human breast carcinoma - Hum. Pathol. 13: 626 - 630 (1982)

FRASCHINI, A.; PELLICIARI, C.; BIGGIOGERA, M.; MANFREDI ROMANINI, M.G. - The effect of different fixatives on chromatin: cytochemical and ultrastructural approaches - Histochem. J. 13: 763 - 779 (1981)

FU, Y.S.; HALL, T.L. - DNA ploidy measurements in tissue sections - Anal. Quant. Cytol. Histol. 7: 90 - 95 (1985)

GALLAGER, H.S. - Pathologic types of breast cancer: their prognoses - Cancer 53: 623 - 629 (1984)

GENTILI, C.; SANFILIPPO, O.; SILVESTRINI, R. - Cell proliferation and its relationship to clinical features and relapse in breast cancers - Cancer 48: 974 - 979 (1981)

GERMAIN, D.; GENTILHOMME, O.; BRYON, P.-A.; COIFFIER, B. - In: Physiologie humaine, cellules sanguine et organes hématopoïétiques - p.217. Simep S.A., Villeurbanne (1981)

GIROUD, F. - Cell nucleus pattern analysis. Geometric and densitometric featuring, automatic cell phase identification - Biol. Cell 44: 134 - 140 (1982)

GUILLE, M. J.; ARNSTEIN, H. R. V. - The anti-oestrogen drug tamoxifen is an elongation inhibitor of eukaryotic protein biosynthesis - FEBS Letters 207: 121 - 126 (1986)

HAGER, J.C.; HEPPNER, G.H. - Breast cancer stem cells - in: 13th International cancer congress, part C: biology of cancer (2): pp 137 - 146 - Alan R. Liss, Inc. New York (1983)

HEDLEY, D.W.; RUGG, C.A.; Ng, A.B.P.; TAYLOR, I.W. - Influence of cellular DNA content on disease-free survival of stage II breast cancer patients - Cancer Res. 44: 5395 - 5398 (1984)

HOWART, J. M. T.; HARRIS, M.; SWINDELL, R.; BARNES, D. M. - The effect of oestrogen and progesteron receptors on recurrence and survival in patients with carcinoma of the breast - Brit. J. Cancer 51: 263 - 271 (1985)

HUGHES, H. E.; DODDS, T. C.; SYMINGTON, T.; In: Handbook of diagnostic cytology - p. 34 - E. & S. Livingstone Ltd., Edinburgh and London (1968)

JAKOBSEN, A.; SKOVGAARD POULSEN, H.; LINDEGAARD MADSEN, E.; ELLEBAEK PETERSEN, S.; SOMMER HANSEN H. - Ploidy level of human breast carcinoma - Acta Radiol. Oncol. 23: 103 - 107 (1984)

KASTEN, F.H.; KIEFER, G.; SANDRITTER, W. - Bleaching of Feulgen-stained nuclei and alteration of absorption curve after continuous exposure to visible light in a cytophotometer - J.Histochem.Cytochem. 10: 547 - 555 (1962)

KELSEY, J.L.; Hildreth, N.G. - Cancer of the breast: I. Magnitude of the problem in the U.S. - In: Breast and gynecologic cancer epidemiology - p. 5, CRC Press, Inc., Boca Paton, Florida (1983)

KING, E.B.; KROMHOUT, L.K.; CHEW, K.L.; MAYDALL, B.H.; PETRAKIS, N.L.; JENSEN, R.H.; YOUNG, J.T. - Analytical studies of foam cells from breast cancer precursors - Cytometry 5: 124 - 130 (1984)

KNIGHT, W.A.; ILL; LIVINGSTON, R.B.; GREGORY, E.J.; MCGUIRE, W.L. - Estrogen receptors as an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer - Cancer Res. 37: 4669 - 4671 (1977)

KOMITOWSKI, D.; ZINSER, G. - Quantitative description of chromatin structure during neoplasia by the method of image processing - Anal. Quant. Cytol. 7: 178 - 182 (1985)

KUTE, T.E.; MUSS, H.B.; CRUMB, K.; MILLER, B.; BURNS, D.; DUBE L.A. - Relationship of steroid receptor, cell kinetics, and clinical status in patients with breast cancer - Cancer Res. 41: 3524 - 3529 (1981)

LECLERC G. - Routine assays for steroid hormone receptors - In: Recent results in cancer research. Clinical interest of steroid hormone receptors in breast cancer - Leclercq, G.; Toma, S.; Paridaens, R.; Heuson, J.C. eds., pp. 12 - 17 Springer Verlag, Berlin (1984)

MAREEL, M.; VAN ROY, F. M. - Are oncogenes involved in invasion and metastasis? - Anticancer Res. 6: 419 - 436 (1986)

MEYER, J.S.; BAUER, W.C. - In vitro determination of tritiated thymidine labelling index (L.I.) - Cancer 36: 1374 - 1380 (1975)

MEYER, J. S.; BAUER, W. C.; RAMANATH, R. B. - subpopulations of breast carcinoma defined by S-phase fraction, morphology, and estrogen receptor content - Lab. Invest. 39: 225 - 235 (1978)

MEYER, J.S.; HIXON, B. - Advanced Stage and early relapse of breast carcinoma associated with high thymidine labelling indices - Cancer Res. 39: 4042 - 4047 (1979)

MEYER, J. S.; LEE, J. Y. - Relationships of S-phase fraction of breast carcinoma in relapse to duration of remission, estrogen receptor content, therapeutic responsiveness and duration of survival - Cancer Res. 40: 1890 - 1896 (1980)

MEYER, J.S.; FRIEDMANN E.; MCCRATE, M.; BAUER, W. - Prediction of early course of breast carcinoma by thymidine labeling - Cancer 51: 1879 - 1886 (1983)

- MEYER, J.S.; MICKO, S.; CRAVER, J.L.; McDIVITT, R. - DNA flow cytometry of breast carcinoma after acetic-acid fixation - Cell Tissue Kinet. 17: 185 - 197 (1984)
- MORAN, R.E.; BLACK, M.M.; ALPERT, L.; STRAUS, M.J. - Correlation of cell-cycle-kinetics, hormone receptors, histopathology and nodal status in human breast cancer - Cancer 54: 1586 - 1590 (1984)
- NAGL, W. - Chromatin organization and the control of gene activity - Int. Rev. Cytol. 94: 21 - 56 (1985)
- NEMOTO, T.; VANA, J.; BEDWANI, R.N.; BAKER, H.W.; MCGREGOR, F.H.; MURPHY, G. - Management and survival of female breast cancer: results of a national survey by the American College of Surgeons - Cancer 45: 2917 - 2924 (1980)
- NICOLINI, C. - Nuclear morphometry, quaternary structure and cell growth - J. Submicrosc. Cytol. 12: 475 - 505 (1980)
- OKAGAKI, T.; IZVO, M. - Correction of modal DNA values obtained by microspectrophotometry and tests for their shifts - J. Nat. Cancer Inst. 60: 1251 - 1258 (1978)
- OLSZEWSKI, W.; DARZYNKIEWICZ, Z.; ROSEN, P.P.; SCHWARTZ, M.K.; MELAMED, M.R. - Flow cytometry of breast carcinoma; I. Relation of DNA ploidy level to histology and estrogen receptor - Cancer 48: 980 - 984 (1981)
- OLSZEWSKI, W.; DARZYNKIEWICZ, Z.; ROSEN, P.P.; SCHWARTZ, M.K.; MELAMED, M.R. - Flow cytometry of breast carcinoma; II. Relation of tumor cell cycle distribution to histology and estrogen receptor - Cancer 48: 985 - 988 (1981)
- POUILLART, P.; MARIN, P. M.; MAGDELENAT, H. - The place of hormone receptors in the elaboration of a therapeutic strategy against breast cancer - In: Recent results in cancer research. Clinical interest of steroid hormone receptors in breast cancer - Leclercq, G.; Toma, S.; Paridaens, R.; Heuson, J.C. eds., pp. 268 - 276 ; Springer Verlag, Berlin, (1984)
- RABER H.N.; BARLOGIE, B.; LATREILLE, J.; BEDROSSIAN, C.; FRITSCHÉ, H.; BLUMENSCHÉIN, G. - Ploidy, proliferative activity and estrogen receptor content in human breast cancer - Cytometry 3: 36 - 41 (1982)
- RAO, P.N.; HANKS, S.K. - Chromatin structure during the prereplicative phases in the life cycle of mammalian cells - Cell Biophys. 2: 327 - 337 (1980)
- RODGERS, C.S.; HILL, S.M.; HULTEN, M.A. - Cytogenetic analysis in human breast carcinoma. I. Nine cases in the diploid range investigated using direct preparations - Cancer Genet. Cytogenet. 13: 95 - 119 (1984)
- ROSE, C.; MOURIDSEN, H. T. - Treatment of advanced breast cancer with tamoxifen - In: Recent results in cancer research. Clinical interest of steroid hormone receptors in breast cancer - Leclercq, G.; Toma, S.; Paridaens, R.; Heuson, J.C. eds., pp. 230 - 242, Springer Verlag, Berlin (1984)

SAEZ, S.; CHEIX, F.; MAYER, M. - Estrogen and progesterone receptors as prognostic factors in early breast cancer - In: Recent results in cancer research. Clinical interest of steroid hormone receptors in breast cancer - Leclerq, G.; Toma, S.; Paridaens, R.; Heuson, J.C. eds., pp. 192 - 198, Springer Verlag, Berlin (1984)

SALOMON, J.-C. - Les métastases des cancers - Recherche 129: 52 - 60 (1982)

SANS, J.; DE LA TORRE, C. - Proliferation index estimated by chromatine pattern analysis - Cell Biol. Int. Rep. 3: 227 - 235 (1979)

SCHIFFER, L.M.; BRAUNSCHWEIGER, P.G.; STRAGAND, J.J.; POULAKOS, L. - The cell kinetics of human mammary cancers - Cancer 43: 1707 - 1719 (1979)

SEARS, H.F.; JANUS, C.; LEVY, W.; HOPSON, R.; CREECH, R.; GROTZINGER, P. - Breast cancer without axillary metastases are there high risk biologic subpopulations? - Cancer 50: 1820 - 1827 (1982)

SHARKEY, F.E.; PAVLAK, R.J.; GREINER, A.S. - Morphometric analysis of differentiation in human breast carcinomas, Tumor Grading - Arch. Pathol. Lab. Med. 107: 406 - 410 (1983)

SILVESTRINI, R.; DAIDONE, M. G.; BERTUZZI, A.; DI FRONZE, G. - Relationship between estrogen receptors and cellular proliferation - In: Recent results in cancer research. Clinical interest of steroid hormone receptors in breast cancer - Leclerq, G.; Toma, S.; Paridaens, R.; Heuson, J.C. eds., pp. 163 - 168, Springer Verlag, Berlin, (1984)

SMITH, G. J.; MOIR, R. D.; DELUCA, C.; LUTZE, L. H. - Chromatin in neoplasia: Mechanisms and markers of neoplastic transformation - Cancer Forum 6: 192 - 200 (1982)

STOSIEK, V.; BREITBACH, G.P. - Prospektive Untersuchungen zur Cytoprognose beim Mammakarzinom, Korrelation zwischen cytologischem und histologischem Grading - Pathologie 4: 130 - 134 (1983)

STRAUSS, M.J.; MORAN, R.E. - The cell cycle kinetics of human breast cancer - Cancer 46: 2634 - 2639 (1980)

TRENT, J.M. - Cytogenetic and molecular biologic alterations in human breast cancer: a review - Breast Cancer Research and Treatment 5: 221 - 229 (1985)

VALENCIA, R. - Niveaux de condensation et d'activité de la chromatine - J. Physiol.- Paris 78: 653 - 664 (1982-1983)

VAN DRIEL-KULKER, A.M.J.; MESKER, W.E.; VAN VELZEN, J.; TANKE, FEICHTINGER, J.; PLOEM, J.S. - Preparation of monolayer smears from paraffin-embedded tissue for image cytometry - Cytometry 6: 268 - 272 (1985)

VASSILAKOS, P.; RIOTTON, G. - Ponction du sein à l'aiguille fine - Med. et Hyg. 42: 1853 - 1861 (1984)

WHANG-PENG, J.; LEE, E.C.; KAO-SHAN, C.S., SEIBERT, K.; LIPPMANN, M. -  
Cytogenetic studies of human breast cancer lines: MCF-7 and derived  
variant sublines - J. Nat. Cancer Inst. 71: 687 - 695 (1983)

WORLD HEALTH ORGANIZATION - International histological classification  
of tumors, no.2 : histological typing of breast tumours. - World  
health organization ed., Genève (1981)

ZDEB, M.S. - The probability of developing cancer - Amer. J.Epidemiol.  
106: 6 (1977)



AUTORISATION DE SOUTENANCE

DOCTORAT 3ème CYCLE, DOCTORAT-INGENIEUR, DOCTORAT USTMG

Vu les dispositions de l'Arrêté du 16 avril 1974,

Vu les dispositions de l'Arrêté du 5 juillet 1984,

Vu les rapports de M.onsieur E. SCHULTE .....

Monsieur SEIGNEURIN

M.onsieur P. VASSILAKOS .....

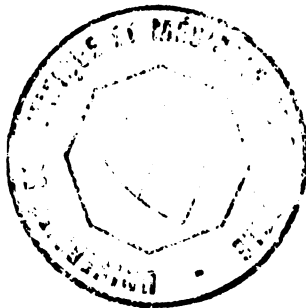
M.ELLE OPFERMANN Martina ..... est autorisé

à présenter une thèse en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT. USTMG

.....

Grenoble, le 12 JAN. 1987 .....

Le Président de l'Université Scientifique  
Technologique et Médicale



*M. Tanche*  
M. TANCHE





## RESUME

Les populations cellulaires de 158 tumeurs mammaires (41 cas rétrospectifs et 117 cas prospectifs) ont été caractérisées par analyse d'image de frottis colorés par la réaction de Feulgen. Dans chaque tumeur, 200 à 500 noyaux ont été représentés par 15 paramètres décrivant le contenu en ADN (ploïdie), la taille et la texture de la chromatine. Ces données ont permis de décrire de façon objective et quantitative les profils cytologiques des tumeurs du sein et de rechercher leurs corrélations avec les données cliniques conventionnelles (taille de la tumeur, âge des patientes, nombre de ganglions métastatisés, taux de récepteurs hormonaux). Diverses méthodes permettant de rendre les analyses multifactorielles usuelles indépendantes de l'échantillonnage ont été développées.

Ces travaux ont montré que l'histogramme de distribution des cellules tumorales en fonction de leur quantité d'ADN permet de classer correctement 86% des 41 cas rétrospectifs selon la durée de leur survie après le premier diagnostic (inférieure à 5 ans ou supérieure à 10 ans) ; cependant, certaines patientes ont des tumeurs de ploïdie identiques malgré la grande différence de leur durée de survie.

De grandes différences entre tumeurs ont aussi été observées à l'égard des caractères morphologiques et texturaux de la chromatine. Les corrélations entre les paramètres texturaux et les données cliniques sont en général faibles. Par contre, la fréquence de certains types nucléaires, définis par analyse multifactorielle non supervisée, est significativement corrélée ( $p < 0,05$ ) avec la durée de survie et le nombre de métastases axillaires.

En conclusion, l'analyse d'image est une méthode utile pour la caractérisation objective des populations cellulaires tumorales dans les cancers du sein. la prise en compte d'un nombre plus important de ces cas analysés selon des protocoles et des méthodes standardisés est nécessaire pour évaluer la signification pronostique des paramètres nucléaires ou de la fréquence de certains types nucléaires.

Mots-clés : Cancer du sein ; Analyse d'image , Texture de la chromatine ; Cytométrie ; Ploïdie.