

KI67 et indications de chimiothérapie

Nuclear antigen KI67 and role in decision of chemotherapy

M. ANTOINE *, J. GONIN, B. POULET
(Paris)

Résumé

Le Ki67 est un marqueur de prolifération étudié par les pathologistes en immunohistochimie à partir du prélèvement tissulaire qui permet le diagnostic, le typage histologique et le grading histopronostique ainsi que la recherche des marqueurs pronostiques et prédictifs : récepteurs hormonaux et HER2. Si son importance est indéniable en tant que facteur pronostique et prédictif de réponse à la chimiothérapie adjuvante ou néoadjuvante, la méthodologie utilisée n'est pas toujours superposable et les cut-offs publiés ne sont pas similaires. L'étude de ce marqueur doit bénéficier de recommandations internationales pour prouver sa reproductibilité et la validité avant d'être intégré dans la liste des biomarqueurs en pratique clinique. Il serait alors très compétitif en termes de médico-économie par rapport aux tests génomiques.

Mots clés : Ki67, cancer du sein, prolifération, chimiothérapie, immunohistochimie

Hôpital Tenon - AHP - Service d'anatomie-pathologique - 4 rue de la Chine -
75020 Paris

* Correspondance : martine.antoine@tnn.aphp.fr

Abstract

Ki67 is a marker of proliferation and is evaluated by immunohistochemistry on the same sample used by pathologists to assess the diagnosis, the histopronostic grade as the value of established predictive and pronostic biomarkers: hormonal receptors, and HER2. Potential use includes prognosis, prediction of relative responsiveness or resistance to chemotherapy (or endocrinotherapy). However, variation in analytical practice requires methodological recommendations in terms of preanalytic, analytic, and scoring to improve reproducibility and define cut-off before it was included as a recommended biomarker in breast cancer guidelines. If proven to be of value, testing of Ki67 may be a major end-point in terms of practice and economical evaluation.

Keywords: Ki67, breast carcinoma, proliferation, chemotherapy, immunohistochemistry

Déclaration publique d'intérêt

Je soussignée, Dr Martine Antoine, déclare ne pas avoir d'intérêt direct ou indirect avec un organisme privé ou industriel ou commercial en relation avec le sujet présenté.

INTRODUCTION

La prolifération non contrôlée est un des caractères de la pathologie néoplasique et confère à la tumeur un avantage de survie. Elle peut être évaluée par de multiples méthodes morphologiques ou non morphologiques. Les méthodes morphologiques sont celles utilisées par les pathologistes de façon routinière lors du diagnostic pathologique : essentiellement estimation du compte des mitoses, et évaluation immunohistochimique du Ki67 ou antigène nucléaire, alors que d'autres évaluations en immunohistochimie sont beaucoup moins utilisées : PCNA (proliferating cell antigen), protéines du cycle testées également en paraffine. D'autres méthodes morphologiques ne peuvent

être utilisées en routine du fait de leur complexité : les techniques d'incorporation de nucléotides marqués à l'ADN, comme de la thymidine tritiée, ou du BrdU, techniques qui ne peuvent être utilisées que sur les prélèvements tumoraux frais en culture. Les méthodes non morphologiques reposent sur la cytométrie de flux, qui exige un broyat cellulaire de tissu frais ou congelé sans contrôle morphologique du tissu, et évalue la fraction des cellules en phase S [1].

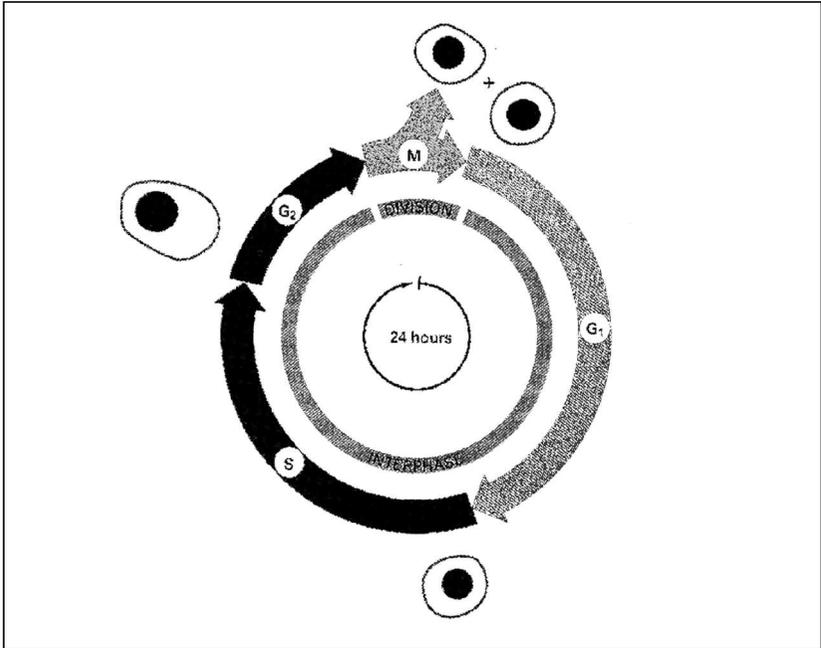
Le Ki67 est donc un marqueur de prolifération étudié par les pathologistes en immunohistochimie à partir du même prélèvement tissulaire qui permet le diagnostic, le typage histologique et le grading histopronostique, et la recherche des marqueurs pronostiques et prédictifs : récepteurs hormonaux et HER2. Nous rappellerons dans cet article le « gold standard » que représente l'évaluation du compte mitotique, les principes méthodologiques de mesure du Ki67 dans ses critères pré-analytiques, analytiques et la méthode de scoring. Nous détaillerons le rôle de ce marqueur dans la décision de chimiothérapie adjuvante et néoadjuvante et l'appréciation de la réponse. Les gènes associés à la prolifération ont un poids majeur dans les signatures génomiques, même si les gènes étudiés ne sont pas les mêmes en fonction du type de signature [2]. Ainsi, 5 gènes sur 16 sont associés à la prolifération dans la signature Oncotype DX [3]. Ce marqueur morphologique a-t-il encore une place dans les schémas décisionnels de l'oncologue à l'heure des profils d'expression génomique et du grade génomique [4, 5] ?

I. « GOLD STANDARD » : ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ MITOTIQUE

La prolifération cellulaire comporte différentes phases cellulaires : les cellules en G0 (ou phase restante ou hors cycle) sont stimulées pour entrer dans la phase active du cycle (ou phase cyclante) qui comporte plusieurs étapes : la première étape est la phase G1. Durant cette période cyclante après G1, les cellules préparent la synthèse d'ADN pendant la phase S, qui est suivie par la phase G2, relativement inactive qui précède la mitose (M) où les chromatides se séparent (Figure 1). Les cellules en fin de cycle peuvent retourner en phase hors cycle G0 ou rester en phase cyclante pour se rediviser de nouveau [1].

L'aspect caractéristique des chromosomes pendant la métaphase permet de reconnaître en morphologie les mitoses et de les compter

Figure 1 - Le cycle cellulaire



sur une préparation histologique. La prolifération est évaluée dans le cancer du sein et représente le troisième item du grading histopronostique de Scarff Bloom et Richardson (SBR) [6] redéfini en 1968 (architecture, anisocaryose, mitoses), grading reformulé avec les mêmes items précisés par Elston et Ellis en 1991 (EE) [7] dans un but d'améliorer la reproductibilité. Le compte mitotique est le compte des mitoses sur 10 champs successifs à fort grossissement ($\times 400$ ou objectif 40) ou **nombre de mitoses total** sur les 10 champs successifs, dans le grading EE et a remplacé le **nombre de mitoses par champ** observé au même grossissement sur 10 champs dans le grading SBR (nombre maximal de mitoses par champ), précisé par Contesso en 1987. La zone tumorale recommandée est celle la plus densément cellulaire, et la plus mitotique repérée au faible grossissement, habituellement située en périphérie de la tumeur. Le compte mitotique est affecté d'un score de 1 à 3, score déterminé grâce à des abaques dépendant de la surface du champ ou du diamètre du champ qui varie sur les microscopes en fonction de l'oculaire (la variation peut être de l'ordre de 1 à 6 fois). Le compte mitotique est ainsi standardisé en fonction de la surface. Le

compte mitotique dépend de la qualité de la fixation (délai, temps, pénétration), de la nature du fixateur (les fixateurs plus coagulants comme l'AFA ou alcool-formaféhyde-acide acétique donnent une meilleure morphologie), de la qualité de la préparation histologique (coupe, coloration), et du temps passé sur l'examen de la lame ! En pratique, l'ouverture de la pièce opératoire par le pathologiste après son exérèse chirurgicale permet la bonne fixation de la tumeur. Les mitoses doivent être différenciées de corps apoptotiques et la variabilité peut être liée à l'hétérogénéité de la tumeur.

La reproductibilité du grade de EE a été appréciée [8] avec un coefficient de corrélation à 0,91. Le grade histopronostique et donc le compte mitotique sont appliqués à tous les types de carcinome invasif. Il est évalué sur microbiopsies et pièces opératoires mais la discordance entre ces estimations est liée au compte mitotique.

Le compte mitotique, intégré dans le grade histopronostique est combiné avec le statut ganglionnaire et la taille tumorale dans l'index pronostique de Nottingham qui classe les patientes en 5 groupes pronostiques avec une survie à 5 ans de 42, 75, 85, 93 à 97 % respectivement.

II. KI67 : MÉTHODE D'ÉVALUATION

Le Ki67 est un antigène nucléaire. C'est une protéine non histone qui a été décrite dans une lignée cellulaire dérivée de cellules lymphomateuses hodgkiniennes en Allemagne (Kiel = Ki, 67 : numéro du clone). Le gène correspondant est localisé sur le chromosome 10q21-ter. Cet antigène est exprimé par les noyaux de toutes les cellules en phase cyclante hors G0, et mesure une population cellulaire plus importante que le compte mitotique. L'harmonisation de la méthodologie d'évaluation et de comptage est souhaitable pour utiliser ce marqueur comme facteur pronostique ou prédictif [9].

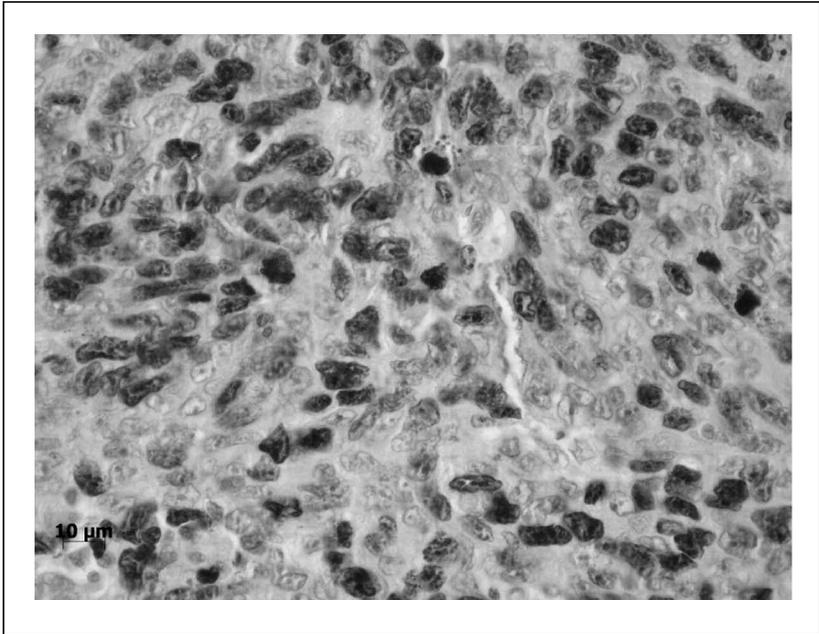
Plusieurs **facteurs pré-analytiques** sont responsables d'une variation du Ki67. Le type de prélèvement (lié à la représentation tumorale), la fixation (délai, type de fixateur, temps de fixation, conservation du matériel d'évaluation, c'est-à-dire blocs ou lames coupées) influent sur les résultats de l'immunomarquage. Ainsi, un délai de fixation trop long (nuit), une congélation préalable, la décalcification du prélèvement et certains fixateurs (fixateurs alcooliques) diminuent l'expression de ce marqueur même si celui-ci est robuste dans son expression par rapport à d'autres immunomarquages. La

fixation en formol tamponné permet d'obtenir les meilleurs résultats, et le temps de fixation influe alors peu sur le résultat, et la consigne de fixation (8-72 heures de fixation en formol tamponné) utilisée pour l'estimation des récepteurs hormonaux est alors adéquate. La réalisation de la technique doit être faite sur des coupes fraîchement réalisées ou stockées à 4°, car il existe une perte d'antigénicité si les coupes étalées à l'avance sur des lames de verre sont stockées de façon prolongée (plusieurs semaines) et à température ambiante.

Les facteurs analytiques de variations sont la nature de l'anticorps (clone), le type de restauration antigénique, la méthode de détection colorimétrique, et l'intensité de la contre-coloration à l'hématoxyline. L'anticorps (ac) le plus communément utilisé est le clone MIB 1 (ac monoclonal de souris), avec une restauration antigénique dans un tampon basique, à la chaleur plutôt qu'une méthode enzymatique. Un autre ac monoclonal de lapin (SP6) reconnaissant le même épitope que le Ki67 donne de bons résultats de marquage [10] et serait plus sensible. La méthode de détection colorimétrique est commune aux autres ac, et la méthode de contre-coloration nucléaire peut influencer le comptage : en particulier dans les évaluations d'analyse d'images où le résultat est calibré sur une coloration des noyaux en référence à la population non colorée.

L'interprétation du marquage repose sur un signal nucléaire (un signal cytoplasmique et/ou membranaire a été décrit de façon exceptionnelle dans des tumeurs de haut grade avec métaplasie squameuse). Le scoring évalue le pourcentage de cellules tumorales dont le noyau est marqué par rapport au nombre de cellules tumorales totales. Le contrôle interne (présent sur chaque lame testée) est la positivité des mitoses mais l'ac utilisé doit marquer un nombre plus élevé de noyaux que les cellules en mitose (car il détecte toutes les cellules cyclantes). Un contrôle externe ou système d'assurance qualité est proposé aux pathologistes européens par différentes modalités (AFAQAP, UKNEQAS) évaluant le signal obtenu sur des lames externes au laboratoire testé, et internes au laboratoire testé. Le comptage peut être semi-quantitatif à faible grossissement ($\times 2,5$). Le marquage est habituellement homogène sur l'ensemble de la lame avec toutefois comme pour les mitoses une population cellulaire plus active en périphérie de la tumeur ou dans les zones les plus densément cellulaires. Le comptage quantitatif est évalué sur les zones les plus actives en périphérie mais si la lame est plus hétérogène, il existe une variation du mode de comptage selon les séries. Le comptage quantitatif est effectué sur au moins 500 cellules à fort grossissement ($\times 40$) ou au mieux 1 000 cellules (Figure 2).

Figure 2 - Expression élevée du Ki67 avec 90 % des cellules marquées



Le comptage sur tissu arrays donne des valeurs généralement plus basses que celles observées sur lames entières et ne doit pas servir à l'établissement de cut-off secondairement utilisé sur lame entière pour des valeurs de seuil prédictives ou pronostiques. L'analyse d'images ne montre pas d'apport majeur dans l'interprétation car tous les noyaux marqués, quelle que soit leur intensité, sont interprétés comme positifs (ce qui est différent des récepteurs hormonaux pour lesquels l'intensité du marquage modifie le scoring d'Alred). Enfin, les proliférations paucicellulaires, la présence d'une population non tumorale intriquée, ou les caractères de la chromatine des noyaux tumoraux peuvent majorer la difficulté du scoring et diminuer sa reproductibilité.

La mesure du Ki67 suit une distribution normale [11]. Le cut-off ne fait toutefois pas l'objet de recommandations internationales et est largement discuté dans la littérature. Il est probable que les mêmes valeurs ne peuvent être utilisées pour des études pronostiques et prédictives, et que les cut-offs publiés ont des valeurs limitées en dehors des essais dans lesquels ils ont été estimés. La valeur toutefois la plus utilisée en termes pronostiques est le cut-off : supérieur ou égal à 20 %

pour considérer une tumeur proliférante, ou le cut-off en 3 scores : inférieur à 10 % pour prolifération faible, 10-20 % pour prolifération modérée et supérieur à 20 % pour prolifération forte [12].

La prolifération est utilisée pour différencier dans les profils d'expression moléculaire les sous-types luminaux A et B dans les tumeurs récepteurs hormonaux positifs [13] et le cut-off proposé est de 13 %. Il existe aussi un lien entre le Ki67 et les autres marqueurs pronostiques, une négativité de ER et positivité de HER2 sont associés habituellement à une prolifération forte, qui caractérisent les sous-types HER2 et triple négatif.

III. KI67 ET THÉRAPIE ADJUVANTE

Les travaux sur le rôle prédictif du Ki67 pour la réponse à la thérapeutique sont rares et basés sur des études réalisées dans des laboratoires différents avec des méthodologies différentes. Ils intéressent soit des situations en adjuvant, ou en néo-adjuvant ou en métastatique, et des protocoles de chimiothérapie ou d'endocrinothérapies.

Trois études s'intéressent au rôle du Ki67 comme marqueur prédictif de la réponse à la chimiothérapie en adjuvant : BCIRG001, PACS 01 et BR9601. Dans l'étude du BCIRG001 (TAC *versus* FAC) de patientes N+, le régime associant des taxanes montre un bénéfice : HR 0,66 [95 % CI 0,46-0,95] $p = 0,025$, au sous-type luminal B, défini par un Ki67 supérieur à 11 % et/ou HER2 positif. Ainsi, le Ki67 peut être considéré comme prédictif de la réponse aux taxanes [14]. Mais la définition du type luminal B ne fait pas l'unanimité. Le bénéfice de cette chimiothérapie par taxane n'est pas observée dans le sous-groupe luminal A. Le cut-off de 30 % du Ki67 est corrélé à la survie sans récurrence et à la survie [15]. Dans l'étude du PACS 01 (FEC *versus* FEC suivi par doxétaxel), le cut-off de 20 % pour le Ki67 identifie dans les tumeurs récepteurs hormonaux positifs un groupe de patientes avec une tendance au bénéfice des taxanes : HR = 0,51 [95 % CI 0,26-1,01] [16]. Dans l'étude BR9601 (CMF *versus* E-CMF), le Ki67 n'est pas prédictif de la réponse aux anthracyclines avec un cut-off de 13 % [17].

Deux études négatives ont été rapportées comprenant un traitement adjuvant de chimiothérapie et endocrinothérapie : IBCSG VIII (goséréline *versus* CMF *versus* CMF + goséréline) et IX (Tam *versus* Tam + CMF) respectivement réalisées chez des femmes pré- ou

post-ménopausiques. Dans ces études, le cut-off de 19 % ne montre pas de caractère prédictif au bénéfice avec les différents traitements et en particulier de façon significative pour les bras chimiothérapie [18].

IV. KI67 ET THÉRAPIE NÉO-ADJUVANTE

Les protocoles de chimiothérapie néo-adjuvante qui désignent la chimiothérapie préopératoire permettent de tester de façon optimale sur la tumeur en place l'efficacité de ces drogues et d'évaluer le rôle d'un marqueur biologique, histologique ou moléculaire en comparant leur variation avant et après l'administration de la thérapie en fonction de la réponse clinique et pathologique (pCR : réponse complète pathologique). Le rôle du Ki67 a été plus évalué comme facteur prédictif dans les études d'endocrinothérapie que dans les études de chimiothérapie en néo-adjuvant. De plus ces études évaluant le Ki67 et la chimiothérapie néo-adjuvante sont des études rétrospectives dont une seule était randomisée. Aucune de ces études ne permet d'évaluer le Ki67 par rapport à une drogue spécifique [19].

Parmi 9 études réalisant une étude univariée, 7 d'entre elles montrent que le Ki67 est un facteur prédictif de réponse clinique ou pathologique, et dans 4 d'entre elles un marqueur prédictif de réponse indépendant en analyse multivariée [20-28] (Tableau 1). Les protocoles de chimiothérapie décrits sont multiples et ne sont pas pour certains le reflet des pratiques actuelles.

Au sein des tumeurs triple négatif, une population avec un Ki67 élevé (toutefois avec un cut-off à 10 % ce qui paraît faible dans une population de tumeurs de ce profil phénotypique) aurait un plus mauvais pronostic malgré une probabilité de pCR plus élevée dans une étude non randomisée rétrospective, et dans une population n'ayant reçu que 3 cycles de chimiothérapie néo-adjuvante (protocoles divers) avec un faible taux de pCR globale : 13 % [29].

La réduction du Ki67 a été utilisée comme critère de réponse, et on suppose que les patientes avec un Ki67 faible de base vont être de mauvaises candidates ou être peu informatives. Enfin, la valeur du Ki67 est intégrée dans des nomogrammes de prédiction de réponse à la chimiothérapie [30, 31].

Tableau 1 - Ki67 facteur prédictif en situation néo-adjuvante. Études significatives en analyse univariée ou multivariée

Auteurs	N patients	Traitement	Ki67 cut-off	Patients Ki67 faible	Patients N-	Patients RE+	Objectif	Méthodologie statistique	Résultats
Penault-Llorca [20]	342	Protocoles variés	1	19	41	51	cCr pCr	X ² , statistique descriptive	Status Ki67 fort associé Rep CI p = 0,013 et pCr p = 0,02
MacGrogan [21]	127	Evm puis MTV	40	79	48	43	cCr pCr	Univarié Kaplan-Meyer/ Délai réponse Multivarié/survie	Univarié : Ki67 associé pCr ou cCr Multivarié indépendant pCr; cCr OR 4,1 [95 % CI 1,4-11,5] p = 0,007 T, grade, RH, HER2, p53, GSTpi
Petit [22]	99	FEC100	20	médiane 19	51	75	cCr pCr	X ² , Fisher test univarié Régression logistique multivariée/taux de réponse	pCr 23 % Ki67fort versus 4 % Ki67 faible Univarié Ki67 associé cCr et pCr p = 0,002 et 0,01 Multivarié indépendant cCr p = 0,003 mais pCr p = 0,49 RH, grade
Bozetti [23]	81	Chimiothérapie base anthracycline	20	57	39	66	cCr pCr	X ² univarié Régression logistique multivariée/taux de réponse	Univarié Ki67 prédictif réponse p = 0,033 Multivarié facteur prédictif unique OR 3,08 [95 % CI 1,1-8,5] Dose anthracycline, HER2, RH
Pohl [24]	62	CMF ou épirubicine ou docétaxel	Pas de cut-off	ND	40	60	Score Ki67	Mann Whitney U test réponse versus non réponse	% Ki67 significatif plus élevé patients pCr versus sans pCr p = 0,02 Médiane 40 % versus 20 %
Faneyte [25]	53	CE120F	20	60	0	68	cCr pCr réponse cCr + pCr	Fisher test univarié Régression logistique multivariée/taux de réponse	Univarié Ki67 fort prédictif réponse cCr p = 0,03 et non pCr mais cCr+pCr Multivarié facteur prédictif unique p = 0,04 ER, p53, Ki67, bcl2, HER2
Colleoni [26]	399	CMF/Tam versus épirubicine	20	31	ND	43 ER/PR+	pCr	Univarié et régression logistique multivariée/pCr	Univarié Ki67 associé pCr p < 0,0001 Multivarié non prédictif RH et grade, type chimiothérapie
Von Minckwitz [27]	196	Doxorubicine et docétaxel dose Dense avec ou sans Tam	0-15 16-30 > 30	38	50	56	pCr	Univarié et régression Logistique multivariée/pCr	Univarié cut-off 15 % OR 0,32 [95 % CI 0,09-1,15] Multivarié cut-off 15 % OR 0,43 [95 % CI 0,11-1,61 p = 0,208 meilleur résultat Tam si Ki67 faible]
Assersohn [28]	106	Tam ou chimiothérapie versus CT+Tam	Pas de cut-off	ND	75	59	cCr	Descriptif	Répondeurs avec chimio ou Tam ont Ki67 plus élevé que les non répondeurs Chimio+Tam : pas de différence

Mib1 est le clone utilisé dans les études ; ER : récepteur estrogène ; RH : récepteurs hormonaux ; pCr : réponse complète pathologique ; cCr : réponse complète clinique ; ND : non disponible ; OD : odds ratio ; HR : hazard ratio ; EVM : épirubicine 1 000 mg/m², vincristine, méthotrexate ; MTV : mitomycine, thiotépa, vindésine ; FEC100 : fluorouracile, épirubicine, cyclophosphamide ; CMF : cyclophosphamide, méthotrexate, fluorouracile ; CE120F : cyclophosphamide, épirubicine 120 mg/m², fluorouracile ; CT : chimiothérapie ; Tam : tamoxifène ; T : taille tumorale ; N : statut ganglionnaire

CONCLUSION

Le Ki67, marqueur de prolifération étudié en immunohistochimie, n'est pas encore intégré en routine dans le panel des marqueurs biologiques recommandé par l'American Society of Clinical Oncology [32]. Toutefois, l'étude d'un marqueur de prolifération (mitoses, Ki67) fait l'objet des recommandations de Saint Gallen de 2009. Même si les conditions techniques sont définies, ce marqueur doit encore faire l'objet de recommandations internationales pour l'établissement des modalités du scoring et de sa reproductibilité, et mettre en place une assurance qualité comme pour les autres marqueurs pronostiques et prédictifs. Si implicitement la notion de prolifération est utilisée pour la décision de chimiothérapie adjuvante ou néo-adjuvante, les études prédictives sont peu utilisables si l'estimation est faite sur tissu array. Il est encore nécessaire d'étudier sur des séries homogènes et randomisées le Ki67 pour établir des cut-offs qui peuvent être différents en termes pronostiques et prédictifs, en particulier pour déterminer la prédiction par rapport à une drogue spécifique. Si le Ki67 prouve sa robustesse en termes de qualité d'évaluation, il pourrait représenter un appoint diagnostique majeur en termes médico-économique du fait de son très faible prix de revient en comparaison des tests génomiques [4, 33].

Bibliographie

- [1] Beresford MJ, Wilson GD, Makris A. Measuring proliferations in breast cancer: practicalities and applications. *Breast Cancer Res* 2006;8:216.
- [2] Wirapati P, Sotiriou C, Kunkel S *et al.* Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. *Breast Cancer Res* 2008;10:R65.
- [3] Paik S, Shak S, Tang G *et al.* A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated node negative breast cancer. *N Eng J Med* 2004;351:2817-26.
- [4] Jonat W, Arnold N. Is the Ki67 labelling index ready for clinical use? *Ann Oncol* 2011 Mar;22(3):500-2.
- [5] Colozza M, Sidoni A, Piccart-Gebhart M. Value of Ki67 in breast cancer: the debate is still open. *Lancet Oncol* 2010;11(5):414-5.
- [6] Bloom HJG, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer. A study of 1 049 cancers of whom 359 have been followed 15 ans. *Br J Cancer* 1957;11:359-377.
- [7] Elston CW, Ellis IO. Pathological prognosis factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow up. *Histopathology* 1991;19:403-410.
- [8] Van Diest PJ, Baaj JP, Matze-Cok P, Wisse-Brekelmans EC, van Galen CM, Kurver PH *et al.* Reproducibility of mitoses counting in 2 469 breast cancer specimens: results from the multicenter Morphometric Mammary Carcinoma Project. *Human Pathol* 1992;23:603-607.
- [9] Dowsett M, Nielsen ON, A'Hern RA, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J *et al.* Assessment of Ki 67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in breast cancer Working Group. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:1-9.
- [10] Zabaglo L, Salter J, Anderson H, Quinn E, Hills M, Detre S, A'Hern R, Dowsett M. Comparative validation of the SP6 antibody to Ki67 in breast cancer. *J Clin Pathol* 2010; 63(9):800-4.
- [11] Jones RI, Salter J, A'Hern R *et al.* Relationship between estrogen receptor status and proliferation in predicting response and long-term outcome to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010;119(2):115-23.
- [12] Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32 835 patients. *Breast* 2008;17(4):324-334.
- [13] Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J. Ki67 index, Her 2 status and prognosis of patients with luminal B Breast Cancer. *J Nat Cancer Inst* 2009;101:736-50.
- [14] Hugh J, Hanson J, Cheang MC *et al.* Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG001 trial. *J Clin Oncol* 2009;27:1168-76.
- [15] Dumontet C, Krajewska M, Treilleux I, Mackey JR, Martin M, Rupin M, Lafanechère L, Reed JC. BCIRG 001 molecular analysis: prognostic factors in node-positive breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2010 Aug 1;16(15):3988-97.
- [16] Penault-Llorca F, André F, Sagan C *et al.* Ki67 expression and docetaxel efficacy in patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:2809-15.
- [17] Bartlett JM, Munro A, Cameron DA *et al.* Type 1 receptor tyrosine kinase profiles identify patients with enhanced benefit from anthracyclines in the BR9601 adjuvant breast cancer chemotherapy trial. *J Clin Oncol* 2008;44:2791-98.
- [18] Viale G, Regan MM, Mastropasqua MG *et al.* Predictive value of tumor Ki67 expression in two randomized trials of chemoendocrine therapy for node negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:207-12.
- [19] Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol* 2010;11(2):174-83.
- [20] Penault-Llorca F, Abrial C, Raoelfils I *et al.* Changes and predictive and prognostic value of the mitotic index Ki67, cyclin D1, and Cyclooxygenase 2 in 710 operable breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Oncologist* 2008;13:1235-45.

- [21] Mac Grogan G, Mauriac L, Durand M *et al.* Primary chemotherapy in breast invasive carcinoma: predictive value of the immunohistochemical detection of hormonal receptors, p 53, cerbB2, Mib1, PS2 and GSTpi. *Br J Cancer* 1996;74:1458-65.
- [22] Petit T, Wilt M, Velten M *et al.* Comparative value of tumor grade, hormonal receptors, Ki67, HER2 and topoisomérase II alpha status as predictive markers in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Eur J Cancer* 2004;40:205-11.
- [23] Bozzetti C, Musolino A, Camisa R *et al.* Evaluation of HER2/neu amplification and other biological markers as predictors of response to neoadjuvant based anthracycline chemotherapy in primary breast cancer: the role of anthracyclin dose intensity. *Am J Clin Pathol* 2006;29:171-77.
- [24] Pohl G, Rudas M, Taucher S *et al.* Expression of the cell cycle regulatory protein in breast carcinomas before and after preoperative chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 78:97-103.
- [25] Faneyte IF, Kristel PM, van de Vijver MJ. Multidrug resistance associated genes MRP1, MRP2, and MRP3 in primary anthracycline exposed breast cancer. *Anticancer Res* 2004;24:2931
- [26] Colleoni M, Viale G, Zahrieh D *et al.* Expression of ER, PgR, HER1, HER2, and response: a study of preoperative chemotherapy in human breast cancer. *Br J Cancer* 2008; 19:465-72.
- [27] Von Minckwitz G, Sinn HP, Raab G *et al.* Clinical response after two cycles compared to HER 2, Ki67, p53, and bcl2 in independently predicting a pathological response after preoperative chemotherapy in patients with operable carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res* 2008;10:R30.
- [28] Assersohn I, Salter J, Powles TJ *et al.* Studies of the potential utility of Ki67 as a predictive molecular marker of clinical response in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2003;82:113-23.
- [29] Keam B, Im SA, Lee KH, Han SW, Oh DY, Kim JH, Lee SH, Han W, Kim DW, Kim TY, Park IA, Noh DY, Heo DS, Bang YJ. Ki-67 can be used for further classification of triple negative breast cancer into two subtypes with different response and prognosis. *Breast Cancer Res* 2011 Mar 2;13(2):R22.
- [30] Rouzier R, Putzai L, Delaloge S *et al.* Nomograms to predict pathologic complete response and metastasis-free survival after preoperative chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:8331-9.
- [31] Colleoni M, Bagnardi V, Rotmensz N, Viale G, Mastropasqua M, Veronesi P, Cardillo A, Torrisi R, Luini A, Goldhirsch A. A nomogram based on the expression of Ki67, steroid hormone receptors status and number of chemotherapy courses to predict pathological complete remission after preoperative chemotherapy for breast cancer. *Eur J Cancer* 2010 Aug;46(12):2216-24.
- [32] Harris L, Fritsche H, Mennel R *et al.* Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25(33):5287-5312.
- [33] Sahebjam S, Aloyz R, Pilavdzic D, Brisson ML, Ferrario C, Bouganim N, Cohen V, Miller WH Jr, Panasci LC. Ki67 is a major, but not the sole determinant of Oncotype Dx recurrence score. *Br J Cancer* 2011 Oct 4.

