

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 964 744

②1 N° d'enregistrement national : **10 57220**

⑤1 Int Cl⁸ : **G 01 N 33/574 (2006.01)**

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 10.09.10.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la demande : 16.03.12 Bulletin 12/11.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : UNIVERSITE DE VERSAILLES-ST QUENTIN EN YVELINES — FR.

⑦2 Inventeur(s) : EMILE JEAN-FRANCOIS et ALLARD MARC-ANTOINE.

⑦3 Titulaire(s) : UNIVERSITE DE VERSAILLES-ST QUENTIN EN YVELINES.

⑦4 Mandataire(s) : CABINET REGIMBEAU.

⑤4 TEST PRONOSTIC DE L'EVOLUTION D'UNE TUMEUR SOLIDE PAR ANALYSE D'IMAGES.

⑤7 La présente invention concerne une méthode de pronostic de l'évolution d'une tumeur solide chez un individu, comprenant au moins les étapes suivantes: a) réaliser une lame virtuelle à partir d'un échantillon tumoral, sur laquelle un front tumoral est identifiable, b) quantifier sur ladite lame virtuelle réalisée à l'étape a) la densité en cellules et/ou en vaisseaux sanguins présents dans une zone continue recouvrant le front tumoral et s'étendant de part et d'autre du front tumoral sur une distance au moins égale à 0.5 mm, appelée « zone de quantification », et c) déduire de ladite quantification les risques de rechute postopératoire et/ou la sensibilité aux divers traitements anti-tumoraux et/ou les risques de développer des métastases chez ledit patient. De préférence, les cellules à quantifier sont des leucocytes tels que les lymphocytes T, les lymphocytes B, les macrophages, les cellules NK, les cellules dendritiques, ou des sous-populations de ces cellules immunitaires.

FR 2 964 744 - A1



Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire anormalement importante au sein d'un tissu normal de l'organisme, de telle manière
5 que la survie de ce dernier est menacée. Ces cellules dérivent toutes d'un même clone, cellule initiatrice du cancer qui a acquis certaines caractéristiques lui permettant de se diviser indéfiniment. Au cours de l'évolution de la maladie, certaines cellules peuvent former une tumeur maligne (un *néoplasme*) ou se propager à travers le corps et former des métastases.

10 Les facteurs de risques sont génétiques (mono- ou multigéniques) et environnementaux (alimentation, tabagisme, flore bactérienne, etc...). Plusieurs types de cancers semblent en augmentation, pour des raisons environnementales ou de modes de vie, ainsi que - pour une partie des cas seulement - en raison du vieillissement de la population. Les taux de cancers détectés augmentent dans chaque
15 tranche d'âge, une meilleure détection qu'autrefois ayant aussi un rôle dans cette augmentation.

En 2008, le cancer a causé la mort de 7,6 millions de personnes en 2008, surtout dans les pays en voie de développement, selon une étude du Centre international de recherche sur le cancer (CIRC, émanation de l'Organisation
20 mondiale de la santé). En 2008, 56% des 12,7 millions de nouveaux cas de cancer et 63% des 7,6 millions de décès associés à un cancer dans le monde sont survenus dans les pays en développement. Les cancers les plus fréquemment diagnostiqués dans le monde sont ceux du poumon (12,7%), du sein (10,9%) et le cancer colorectal (9,7%). Les décès les plus fréquents sont provoqués par le cancer du poumon
25 (18,2%), de l'estomac (9,7%) et le cancer du foie (9,2%). Les cancers du col utérin et du foie sont beaucoup plus fréquents dans les régions en développement, tandis que ceux de la prostate et du côlon-rectum sont plus fréquents dans les régions développées.

Même s'il existe plusieurs éléments permettant d'identifier un type de tumeur avec une grande probabilité, le diagnostic de la malignité d'une tumeur et le pronostic vital d'un patient ne se fait aujourd'hui que sur analyse au microscope (anatomopathologie) d'un échantillon de la tumeur. Cet échantillon vient soit d'une
5 biopsie (simple prélèvement d'un morceau de la tumeur) qui peut être faite, suivant la localisation, suivant différentes procédures (fibroscopie, ponction à travers la peau...), soit d'une pièce opératoire (tumeur enlevée par le chirurgien). L'échantillon est le plus souvent fixé de manière appropriée et des coupes sont prélevées. Ces coupes peuvent être colorées par des traitements classiques d'histochimie et si besoin
10 d'immunohistochimie afin de permettre au moins l'identification des différents types cellulaires et la délimitation du front tumoral.

Les observations d'un médecin spécialisé en anatomo-pathologie permet ensuite de classer l'échantillon tumoral selon des critères reconnus internationalement (la classification TNM), qui permettent d'estimer les chances de
15 survie du patient qui porte (ou portait) cette tumeur.

La classification TNM permet de grouper les patients selon l'extension anatomique de leur maladie. Elle a pour but i) d'évaluer le pronostic, ii) de guider l'indication thérapeutique, et iii) de comparer les résultats de différents protocoles thérapeutiques. Dans le système TNM défini par l'Union Internationale contre le
20 Cancer (UICC), le code T réfère à la taille et l'extension locale de la tumeur primitive, le code N à l'atteinte éventuelle des ganglions (node en anglais), le code M aux métastases. Chaque lettre est affectée d'un coefficient. Le regroupement des trois codes définit des stades, caractéristiques de l'évolution probable de la tumeur.

La lettre **T** symbolise l'extension locale de la tumeur primitive. Elle est cotée
25 de T0 (quand la lésion primitive n'est pas retrouvée) à T4 pour les tumeurs les plus étendues. Cette cotation dépend du volume tumoral, représenté par le diamètre maximum de la lésion et/ou de l'infiltration des tissus et organes voisins. La lettre **N**, de N0 à N3, dépend du territoire ganglionnaire, plus ou moins proche de la tumeur, des dimensions des adénopathies, de leur nombre et/ou de leur éventuelle fixation

aux tissus voisins. Enfin, la lettre **M** est cotée M0 en l'absence de métastases connues ou M1 en leur présence, quel que soit leur siège, unique ou multiple.

Cette classification a été conçue pour donner aux oncologues de tous les pays un langage commun qui facilite les échanges d'information entre médecins et chercheurs. Elle est périodiquement discutée et mise à jour par des spécialistes dans le cadre de l'UICC qui se charge de la diffuser dans le monde sous forme d'un Manuel explicatif. Elle contribue à codifier les indications de traitement. Selon les localisations tumorales la combinaison des trois repères TNM permet d'établir un stade (de I à IV) plus synthétique. Il existe cependant d'autres systèmes de classification, proposés par un institut ou à l'échelon d'un pays et de ses spécialistes, pour améliorer ou simplifier la caractérisation d'un cancer et le choix de traitement qui en découle. Par exemple, la classification anatomopathologique (ou pTNM) englobe des informations obtenues par l'examen pathologique de la tumeur primaire et des ganglions.

Cependant, la classification TNM a ses limites, car il est souvent difficile d'évaluer le volume des masses tumorales par l'imagerie (critère T), et l'ampleur des envahissements microscopiques. Par ailleurs, l'analyse de l'échantillon tumoral prélevé est uniquement visuelle et requiert les compétences de l'homme du métier médecin anatomo-pathologiste spécialiste des tumeurs. Cette analyse est donc essentiellement subjective, et prend beaucoup de temps.

Il existe donc un besoin d'une méthode de pronostic rapide et objective (donc plus fiable) de la malignité des tumeurs solides et donc des risques de récurrence chez ces patients. La méthode de pronostic de l'invention répond à ce besoin, en procurant une méthode objective d'évaluation du pronostic d'un cancer basée sur l'analyse d'une lame virtuelle par un logiciel informatique. La méthode de l'invention est donc plus fiable et plus rapide que les méthodes existantes pour évaluer le pronostic vital d'un patient portant une tumeur solide, notamment un cancer colorectal. Elle permet par ailleurs de compléter les méthodes actuelles afin de préciser le pronostic issu de la classification TNM.

Résumé de l'invention

La présente invention concerne une méthode de pronostic de l'évolution d'une tumeur solide chez un individu, comprenant au moins les étapes suivantes:

- 5 a) réaliser une lame virtuelle à partir d'un échantillon tumoral, sur laquelle un front tumoral est identifiable,
- b) quantifier sur ladite lame virtuelle réalisée à l'étape a) la densité en cellules et/ou en vaisseaux sanguins présents dans une zone continue recouvrant le front tumoral et s'étendant de part et d'autre du front tumoral sur une distance au moins égale à 0.5 mm, appelée « zone de quantification », de préférence une zone rectangulaire,
- 10 c) déduire de ladite quantification les risques de rechute postopératoire et/ou la sensibilité aux divers traitements anti-tumoraux et/ou les risques de développer des métastases chez ledit patient.

Dans un mode de réalisation particulier, la zone de quantification rectangulaire est telle que:

- 15 i) les médiatrices du petit côté et du grand côté de ce rectangle sont respectivement la normale et la tangente au front tumoral audit point d'intersection, et
- ii) le point d'intersection des médiatrices est un point du front tumoral.

De préférence, l'étape a) consiste au moins à numériser et enregistrer une image de
20 microscopie d'une coupe tissulaire marquée par immunohistochimie.

De préférence, l'étape b) de quantification est effectuée à l'aide d'un logiciel informatique et consiste à échantillonner la densité en cellules et/ou en vaisseaux sanguins dans un ensemble continu de zones rectangulaires de largeur prédéfinie, lesdites zones ayant pour longueur la largeur de la zone de quantification, et balayant
25 la zone de quantification de part et d'autre du front tumoral, sur toute la longueur de la zone de quantification.

De préférence, le résultat de ladite quantification est exprimé sur un graphique, dont l'analyse permet d'évaluer les risques de rechute postopératoire et/ou la sensibilité aux divers traitements anti-tumoraux et/ou les risques de développer des métastases chez ledit patient.

- 5 Dans un mode de réalisation particulier, ledit graphique est tel que :
- i) sur l'axe des abscisses est reportée la distance de part et d'autre du point du front tumoral,
 - ii) en ordonnée est reportée la densité en cellules et/ou en vaisseaux sanguins mesurée dans chaque zone échantillonnée.
- 10 De préférence, l'évaluation desdits risques s'effectue :
- i) En comparant la forme dudit graphique à un profil type, ou
 - ii) En calculant l'aire sous le graphique pour chaque zone pré- et post- front tumoral, et en la comparant à des valeurs-seuils,
 - iii) En mesurant les pentes de variation en deux points du graphique situés à
15 une distance déterminée de part et d'autre du front tumoral et les comparer à des valeurs-seuils, ou
 - iv) En comparant les valeurs obtenues en deux points du graphique situés à
une distance déterminée de part et d'autre du front tumoral à des valeurs-seuils.
- Plus précisément, la présente invention vise donc une méthode de pronostic de
20 l'évolution d'une tumeur solide chez un individu, comprenant les étapes suivantes :
- a) obtenir une lame virtuelle d'une coupe tissulaire d'une tumeur marquée par immunohistochimie, sur laquelle un front tumoral est identifiable,
 - b) quantifier sur cette lame virtuelle la densité en cellules et/ou en vaisseaux sanguins présents de part et d'autre du front tumoral, dans une zone continue

rectangulaire s'étendant de part et d'autre du front tumoral sur une distance au moins égale à 0.5 mm,

c) exprimer ces résultats sur un graphique dont l'axe des abscisses correspond à la distance par rapport au front tumoral, et en ordonnée la quantité de cellules ou de vaisseaux sanguins mesurée à cette distance dans une surface rectangulaire dont la
5 largeur le long de l'abscisse est prédéfinie, et dont la longueur est la largeur de la zone rectangulaire de quantification, et

d) Effectuer au moins une des opérations choisies parmi :

i) Comparer la forme dudit graphique à un profil type, ou

10 ii) Calculer l'aire sous le graphique pour chaque zone pré- et post-front tumoral, et la comparer à des valeurs-seuils,

iii) Mesurer les pentes de variation en deux points du graphique situés à une distance déterminée de part et d'autre du front tumoral et les comparer à des valeurs-seuils, ou

15 iv) comparer les valeurs obtenues en deux points du graphique situés à une distance déterminée de part et d'autre du front tumoral à des valeurs-seuils.

e) déduire de l'étape d) les risques de rechute postopératoire et/ou la sensibilité aux divers traitements anti-tumoraux et/ou les risques de développer des
20 métastases chez ledit individu.

Dans un mode de réalisation préféré, les cellules à quantifier sont des leucocytes tels que les lymphocytes T, les lymphocytes B, les macrophages, les cellules NK, les cellules dendritiques, ou des sous-populations de ces cellules immunitaires.

Dans un mode de réalisation encore plus préféré, les cellules à quantifier sont
25 marquées par immunohistochimie et sont positives pour les marqueurs CD3, CD4, CD8, CD45RO, FoxP3, CD68.

Légendes des figures

La figure 1 représente, sur une lame virtuelle représentant une coupe d'une tumeur colorectale marquée par immunohistochimie avec un anticorps anti-CD3 de sorte à marquer les cellules immunitaires d'intérêt (lymphocytes), le positionnement d'une zone de quantification rectangulaire de part et d'autre du front tumoral, utilisable dans la méthode de l'invention (A, avec, à gauche, la zone tumorale, et à droite le tissu non tumoral), la zone de quantification au sens de la présente invention, située de part et d'autre du front tumoral (B, le front tumoral étant identifié par une flèche noire), et enfin un graphique représentant la quantification automatique de la densité de cellules CD3⁺ de part et d'autre du front tumoral dans la zone de quantification définie en A par analyse de l'image grâce au logiciel Visilog[®] (C).

La figure 2 représente, sur une lame virtuelle représentant une coupe d'une tumeur colorectale marquée par immunohistochimie avec un anticorps anti-CD3 de sorte à marquer les cellules immunitaires d'intérêt (A), le positionnement de trois zones de quantifications différentes de part et d'autre du front tumoral (B), et un graphique représentant la densité de cellules CD3⁺ de part et d'autre du front tumoral dans les différentes zones de quantification définies en B par analyse de l'image grâce au logiciel Visilog[®].

La figure 3 représente, sur une lame virtuelle représentant une coupe d'une tumeur colorectale marquée par immunohistochimie avec un anticorps anti-CD3 de sorte à marquer les cellules immunitaires d'intérêt (A), le positionnement de trois zones de quantifications différentes de part et d'autre du front tumoral (B), et un graphique représentant la densité de cellules CD3⁺ de part et d'autre du front tumoral dans les différentes zones de quantification définies en B par analyse de l'image grâce au logiciel Visilog[®].

La figure 4 représente différents profils de graphiques obtenus à partir d'échantillons de tumeurs colorectales. Sur chacun des 3 graphes une courbe correspond à 1 patient. Les patients ont été regroupés en fonction du profil des courbes :

A : profil 3, dit « faible », associé à un mauvais pronostic vital

B : profil 2, dit « pic fort », à l'extérieur de la tumeur, associé à un bon pronostic vital

C : profil 1, dit « infiltrat tumoral fort », associé à un bon pronostic vital

5 La figure 5 représente le front d'extension tumoral qui est aisément détectable dans la grande majorité des cas (quelle que soit la coloration), mais qui peut parfois être dépassé par des phénomènes de bourgeonnement tumoral (*budding*). Les photographies ont été réalisées après un double marquage en immunohistochimie, avec la tumeur en rouge (anti-cytokératine AE1/AE3) et les lymphocytes en marron
10 (anti-CD3).

A : Sur cette tumeur, le front tumoral (c'est-à-dire l'interface entre les zones rouges et non rouges) est aisément repérable. On détecte au plus fort grossissement (image de droite) de nombreux lymphocytes positifs pour CD3 à l'extérieur et à l'intérieur de la tumeur.

15 B : Sur cette autre tumeur, le front tumoral est également aisément repérable. On détecte au plus fort grossissement (image de droite) que peu de lymphocytes sont positifs pour CD3.

C. Sur cette troisième tumeur, le front tumoral est défini par les plus larges
20 amas tumoraux compacts (délimités par un trait noir au centre). On détecte au plus fort grossissement (image la plus à droite), outre 2 plus petits amas tumoraux, de nombreuses cellules tumorales isolées. Sur cette coupe, les lymphocytes CD3 positifs sont nombreux.

La figure 6 présente deux courbes-test obtenues en faisant varier les bornes de détection du rouge (A) ou du bleu (B) pour un même échantillon, dans un même
25 rectangle de quantification (voir point 5 de la partie expérimentale). Les seuils et les réglages préférés pour la détection des deux couleurs ont été établis à partir de ces courbes étalons.

La figure 7 illustre le profil type 1 dit « infiltrat tumoral fort » : pour un même échantillon de tumeur colorectale (un même patient), trois zones de quantifications différentes ont été utilisées (mesures 1, 2 et 3 sur image A) puis la présence de l'infiltrat lymphocytaire (cellules positives pour CD3) dans chaque zone a été
5 quantifiée grâce à la méthode de l'invention puis représentée sous forme de graphique (B).

La figure 8 illustre le profil type 4 dit « infiltrat faible » : pour un même échantillon de tumeur colorectale (un même patient), deux zones de quantifications différentes ont été utilisées (mesures 1 et 2) sur image A) puis la présence de l'infiltrat
10 lymphocytaire (cellules positives pour CD3) dans chaque zone a été quantifiée grâce à la méthode de l'invention puis représentée sous forme de graphique (B).

La figure 9 illustre le profil type 2 dit « pic fort » : pour un même échantillon de tumeur colorectale (un même patient), trois zones de quantifications ont été différentes utilisées (mesures 1, 2 et 3 sur image A) puis la présence de l'infiltrat
15 lymphocytaire (cellules positives pour CD3) dans chaque zone a été quantifiée grâce à la méthode de l'invention puis représentée sous forme de graphique (B).

Description détaillée de l'invention

La méthode de pronostic de l'invention est réalisée *ex vivo* et permet d'évaluer les risques de rechute postopératoire et/ou la sensibilité aux divers traitements anti-tumoraux et/ou les risques de développer des métastases chez un patient auquel tout
20 ou partie d'une tumeur a été prélevé.

Elle comprend au moins les étapes suivantes :

- a) réaliser une lame virtuelle à partir d'un échantillon tumoral, sur laquelle un front tumoral, est identifiable,
- 25 b) quantifier sur ladite lame virtuelle réalisée à l'étape a) la densité en cellules et/ou en vaisseaux sanguins présents dans une zone continue recouvrant le front tumoral et

s'étendant de part et d'autre du front tumoral sur une distance au moins égale à 0.5 mm, appelée « zone de quantification »,

- c) déduire de ladite quantification les risques de rechute postopératoire et/ou la sensibilité aux divers traitements anti-tumoraux et/ou les risques de développer des métastases chez ledit patient.

Au sens de la présente invention, on entend par « lame virtuelle » une image numérique d'un échantillon de tissu fixé sur une lame de verre. Pour que cette lame virtuelle offre la même résolution que l'on peut obtenir en regardant dans l'oculaire d'un microscope, des milliers d'images de l'échantillon fournies par l'objectif du microscope à son agrandissement maximum sont acquises de manière sérielle, puis réarrangées, pour reconstruire totalement l'échantillon. Trois étapes sont nécessaires pour réaliser une lame virtuelle :

- 1) focalisation : à une position donnée (repérée par ses coordonnées en X et Y), l'échantillon est déplacé en hauteur (direction Z), jusqu'à ce que le programme de balayage décide que l'image fournie par l'objectif est aussi nette que possible.
- 2) Numérisation de l'image : le capteur d'image numérique acquiert la photographie et la stocke sur le disque dur de l'ordinateur, avec ses informations en X et Y
- 3) Déplacement de l'échantillon : déplacer l'échantillon dans les directions X et Y à la position suivante, de sorte que la prochaine image puisse être précisément localisée par rapport aux autres images.

Les techniques d'acquisition de lames virtuelles sont désormais bien connues de l'homme du métier. De nombreuses sociétés proposent des logiciels ou des plateformes microscopiques capables de générer de telles lames (exemples : scanner de lames Mirax, Aperio, Hamamatsu et Leica).

Ces lames virtuelles présentent de nombreux avantages en comparaison avec les lames réelles (« classiques ») portant les échantillons : d'une part, la qualité d'une lame virtuelle ne peut pas s'altérer au cours du temps. D'autre part, l'analyse des lames peut s'effectuer à tout moment, et à distance, puisque les lames virtuelles
5 peuvent être partagées, envoyées, et consultées par tous ceux qui le souhaitent, au moyen d'un ordinateur simplement muni d'un logiciel de lecture d'image. De nombreux logiciels de lecture d'image sont connus et utilisés en routine dans les laboratoires : NIH Image, Visilog, Metamorph, Histolab, etc...

L'échantillon tumoral que l'on peut utiliser pour établir un pronostic selon la
10 méthode de l'invention est prélevé chez un patient qui a subi une biopsie ou une opération chirurgicale, puis traité de sorte à pouvoir être coupé en minces tranches par un microtome. Ce traitement consiste à fixer les constituants de l'échantillon les uns par rapport aux autres, de sorte à solidifier l'ensemble et permettre la découpe. Les techniques communément utilisées pour ce traitement dans les laboratoires sont
15 notamment : la fixation dans du formol (ou d'autres fixateurs) ou la cryopréservation. Après la découpe, les minces tranches d'échantillon tumoral sont déposées sur des lames, puis traités par les techniques très répandues d'histologie, histochimie et/ou immunohistochimie de sorte à révéler : les différents types tissulaires, cellulaires, les vaisseaux sanguins, le front tumoral, la densité cellulaire,
20 etc...

Avantageusement, la méthode de pronostic selon l'invention est donc caractérisée en ce que l'étape a) consiste à au moins à numériser et enregistrer une image de microscopie d'une coupe tissulaire marquée par immunohistochimie.

Au sens de la présente invention, on entend par « front tumoral » la limite entre le
25 tissu tumoral et le tissu non tumoral. Dans la grande majorité des tumeurs, et notamment dans les carcinomes, cette limite est facilement identifiable avec des colorations usuelles histologiques ou immunohistochimique. Au-delà (à l'extérieur) du front tumoral il peut exister, dans certaines tumeurs, quelques cellules isolées correspondant à un phénomène de bourgeonnement (*budding*) tumoral (cf.
30 figure 5C).

Par ailleurs, dans la zone de quantification définie dans la méthode de l'invention, le front tumoral doit être assimilable à un arc de cercle dont le centre est situé à l'intérieur de la tumeur, qui correspond au lissage de la zone d'interface entre la tumeur et les tissus non tumoraux.

- 5 En d'autres termes, dans la méthode de l'invention, la zone de quantification est choisie de façon particulière, de telle sorte qu'elle recouvre un front tumoral qui a une courbure régulière, c'est-à-dire un front ayant une courbure telle qu'une tangente puisse être tracée en au moins un point de ce front.

La zone de quantification de l'invention doit contenir le front tumoral et doit
10 s'étendre de part et d'autre de celui-ci sur une distance au moins égale à 0,3 mm, de préférence 0,5 mm, de manière encore plus préférée au moins égale à 0,6 mm. Cette zone peut avoir n'importe quelle forme du moment qu'elle est continue (c'est-à-dire qu'il est possible de relier deux points quelconques de la zone sans en sortir). De telles zones continues sont par exemple les cercles, les triangles, les losanges, les
15 carrés, les rectangles, etc.

De préférence, la zone de quantification est rectangulaire, et sélectionnée de la façon suivante : premièrement, une partie régulière du front tumoral est identifiée sur la lame virtuelle (on entend par « partie régulière du front tumoral » une interface tumeur/stroma qui est assimilable à un arc de cercle dont le centre est situé à
20 l'intérieur de la tumeur). Deuxièmement, on définit un point sur cette partie régulière du front tumoral, pour lequel on trace la tangente au front tumoral, ainsi que la normale au front tumoral passant par ce point. Enfin, la zone de quantification est choisie de façon telle que :

i) les médiatrices du petit côté et du grand côté de ce rectangle sont
25 respectivement la normale et la tangente au front tumoral audit point d'intersection, et

ii) le point d'intersection des médiatrices est ledit point défini sur le front tumoral.

Des exemples de zones de quantification utilisables dans la méthode de l'invention sont présentés dans les figures de la demande (cf. figures 1,2 et 3).

Dans la méthode de l'invention, la médiatrice du petit côté doit s'étendre de part et d'autre du front tumoral sur une distance au moins égale à 0,3 mm, de préférence
5 0,5 mm, de manière encore plus préférée au moins égale à 0,6 mm.

De manière préférée, la zone de quantification a une surface de 2 mm², de manière encore plus préférée de 3 mm². De manière préférée, lorsque la zone de quantification est un rectangle, la longueur dudit rectangle est au moins de 0,6 mm, et la largeur dudit rectangle est au moins 0,2 mm.

10 La deuxième étape (étape b) de la méthode de pronostic selon l'invention consiste à quantifier, dans la zone de quantification sélectionnée de la façon décrite ci-dessus, la densité d'un élément tissulaire (vaisseaux, fibres de collagène,...) ou cellulaire (lymphocyte, macrophage,...) identifiable par sa forme, sa taille et/ou sa coloration, mesurée de part et d'autre du front tumoral.

15 La densité est ici définie comme étant la quantité d'élément mesurée, rapportée à une unité de surface, par exemple le mm² ou le µm².

De préférence, la densité en cellules et/ou en vaisseaux sanguins présents dans la zone de quantification (telle que définie ci-dessus) est mesurée. De manière encore plus préférée, la densité en certaines cellules du système immunitaire, présentes dans
20 ladite zone ou dans des sous-ensembles de ladite zone, est mesurée. Ces cellules sont par exemple les leucocytes tels que les lymphocytes T, les lymphocytes B, les macrophages, les cellules NK, les cellules dendritiques, ou des sous-populations de ces cellules immunitaires.

Selon la méthode de l'invention, ces cellules sont avantageusement marquées par
25 immunohistochimie et sont positives pour les marqueurs CD3, CD4, CD8, CD45RO, FoxP3, et/ou CD68.

Le marquage immunohistochimique est révélé par un substrat de la peroxydase (diaminobenzidine) dans les exemples indiqués, mais il est possible d'utiliser un autre substrat coloré ou une autre enzyme (phosphatase alcaline) ou un substrat fluorescent, ou même une combinaison de ces méthodes.

- 5 En effet, de nombreuses études ont clairement établi que le système immunitaire est fortement impliqué dans le contrôle des tumeurs et que la densité de l'infiltrat immunitaire au sein des tumeurs est souvent associée à un bon pronostic vital des patients opérés d'une tumeur solide (Naito Y et al, *Cancer Research* 1998, Uppaluri R et al, *Cancer immunity* 2008, Salama P et al, *Journal of clinical Oncology* 2009, 10 Galon J, et al, *Science* 2006, Badoual et al, *Clinical Cancer Research*, 2006).

A ce sujet, il est à noter que les techniques de quantification de ces cellules immunitaires (lymphocytes T, T régulateurs, etc.) dans les études réalisées jusqu'à présent consistaient à comparer le nombre de cellules immunitaires présent dans des zones tumorales de surface variable (spots de TMA (tissue-microarrays) ou champs 15 au fort grossissement de microscopes). Ces zones étaient le plus souvent choisies soit de façon aléatoire, soit sans méthodologie clairement décrite concernant notamment la position et la surface des zones de comptage. Les travaux de l'équipe de J. Galon ont distingués les infiltrats au front et à l'intérieur de la tumeur, mais n'indique pas si les prélèvements du front sont situés à l'intérieur ou au contraire à l'extérieur de la 20 tumeur. Les comptages réalisés sur des spot complets de TMA (généralement 0.6 mm de diamètre), sont trop étendus pour permettre de faire apparaître un pic, et une faible variation de la position de la carotte de TMA peut être responsable d'une importante variation de mesure. Bien que l'information concernant la présence et le nombre de cellules immunitaires au sein ou en périphérie des tumeurs soit reconnue 25 comme étant un indice pronostic très fiable du risque de récurrence de la tumeur, aucune étude n'a jusqu'ici proposé d'établir un profil objectif et continu du nombre de cellules immunitaires autour du front tumoral.

D'autre part, la méthode de l'invention peut être également très fiable en quantifiant le nombre de vaisseaux sanguins traversant la zone de quantification, ces vaisseaux 30 pouvant être marqués par immunohistochimie, par exemple en révélant les

marqueurs CD34 ou CD31 (Couvelard et al, *Br J Cancer* 2005 ; Couvelard et al, *Mod. Pathol.* 2009).

De manière préférée, la tumeur solide dont on cherche à évaluer le pronostic est un cancer du colon ou un cancer du rectum. Le cancer du côlon se développe à partir de la muqueuse du « gros intestin » ou côlon. Les cancers du côlon et du rectum étant assez semblables, on les regroupe sous le terme de « cancer colorectal ». Il s'agit toujours d'une tumeur maligne. C'est le second cancer, en termes de fréquence, chez la femme (après le cancer du sein) et le troisième chez l'homme (après le cancer du poumon et celui de la prostate). Les cancers coliques ont une fréquence élevée en France : chaque jour, 100 personnes apprennent qu'elles ont un cancer colorectal. Chez les non-fumeurs, ils sont la deuxième cause de mortalité par cancer. Les hommes sont un peu plus touchés que les femmes (taux d'incidence de 40 et 27 pour cent-mille, respectivement). Il s'agit essentiellement d'un cancer de l'âge mûr, près de 85 % des cas survenant après 65 ans. Sa fréquence semble augmenter.

La seule classification utilisée en préopératoire est la classification TNM dont la 7^{ème} version date de 2010. À partir des données de la classification TNM, les cancers du côlon sont classés en 4 stades. Les chances de guérison varient considérablement du stade I au stade IV. La stratégie thérapeutique est également adaptée à chacun de ces stades.

En ce qui concerne les tumeurs colorectales, la densité en cellules T (T mémoire, T régulateur, et/ou T CD8+), a souvent été associée à un bon pronostic (Galon J, et al, *Science* 2006, Salama P et al, *J. Clinical Oncol* 2009, Pagès F et al, *N. Engl. J.Med* 2005).

De préférence, la quantification prévue à l'étape b) de la méthode pronostique de l'invention est effectuée à l'aide d'un logiciel informatique. Il existe de nombreux logiciels informatiques permettant de mesurer le marquage de lames virtuelles marquées en immunohistochimie. Parmi eux on peut citer : NIH Image, Visilog, Metamorph, Histolab, etc. En réglant de façon adéquate les seuils et les paramètres

des marquages à étudier, la quantité précise de cellules marquées présentes dans la zone de quantification est évaluée.

Le paramétrage du logiciel d'analyse d'image pour permettre l'identification puis le comptage des cellules ou des structures tissulaires est à adapter aux techniques de coloration des lames. Dans les exemples présentés, les réglages ont été fixés tels qu'ils puissent être utilisés sans modification entre plusieurs lames colorées selon la même technique, et tels qu'une modification de faible amplitude de chacun de ces réglages n'induit qu'une faible modification du graphe obtenu (cf. figure 6).

Avantageusement, l'étape b) de la méthode pronostique de l'invention consiste à échantillonner la densité en cellules et/ou en vaisseaux sanguins dans un ensemble continu de zones rectangulaires de largeur prédéfinie, lesdites zones ayant pour longueur la largeur de la zone de quantification, et balayant la zone de quantification de part et d'autre du front tumoral, sur toute la longueur de la zone de quantification.

Dans ce cas précis, le logiciel informatique comptabilise les éléments à mesurer (cellules et/ou vaisseaux) dans des « tranches » de la zone de quantification, ces « tranches » ayant une largeur prédéfinie, comprise entre 2 et 20 μm , et de préférence 5 μm . Cette étape d'échantillonnage est une étape classique pour les analyses de traitement d'image, et le seul paramètre à définir est la largeur de la tranche de quantification. La densité à quantifier dans l'étape b) de la méthode de l'invention est donc ici définie comme étant la quantité, par unité de surface, de cellules et/ou de vaisseaux sanguins détectés dans ces sous-ensembles de la zone de quantification.

De manière préférée, le résultat de cette quantification est exprimé sur un graphique (cf. figures 1C, 2C, 3C et 4).

Ce graphique est défini de préférence de la façon suivante :

i) sur l'axe des abscisses est reportée la distance de part et d'autre du point du front tumoral défini qui est le point d'intersection des médiatrices du rectangle de quantification,

ii) en ordonnée est reportée la densité en cellules et/ou en vaisseaux sanguins mesurée dans chaque zone échantillonnée.

De manière préférée, l'axe des abscisses de ce graphique est centré sur le point du front tumoral qui est à l'intersection des médiatrices du rectangle de quantification, et de part et d'autre est reportée la distance des tranches de quantification par rapport à ce point.

Le « zéro » de l'axe des abscisses peut être défini :

- soit à l'une des extrémités du rectangle (auquel cas les graduations sur cet axe correspondent à la distance des tranches par rapport à ce point extrême, et il convient d'indiquer sur le graphique en quelle position se situe le point du front tumoral, par un trait ou une flèche par exemple, cf. figures 1C, 2C, 3C et 4 A,B,C),
- soit au point du front tumoral (auquel cas les graduations sur cet axe seront des valeurs relatives par rapport à ce point central).

Ces graphiques permettent donc de visualiser rapidement la répartition des cellules et/ou vaisseaux autour du front tumoral. Quatre profils distincts intéressants et prédictifs de la survie du patient portant la tumeur ont été identifiés par les présents Inventeurs:

Profil 1 : Les lymphocytes sont abondants à l'intérieur de la tumeur et également à l'extérieur à proximité du front. Plus on s'éloigne du front, plus l'infiltrat disparaît.

Profil 2 : les cellules immunitaires sont concentrées avec un pic situé juste à l'extérieur du front tumoral. Dans la tumeur il n'y a qu'à peine plus de cellules qu'à l'extérieur à distance du front

Profil 3 : les cellules immunitaires sont peu nombreuses et à l'extérieur et à l'intérieur de la tumeur, mais on distingue un pic à l'extérieur du front tumoral. Ce pic est cependant très faible.

Profil 4 : la courbe ne présente aucun pic, et la densité moyenne de cellules est très faible de part et d'autre du front tumoral.

Des exemples de tels profils sont fournis sur les figures 4 A (profil 3), B (profil 2), et C (profil 1).

- 5 Les présents Inventeurs ont pu démontrer que ces profils sont reproductibles au sein au sein d'une même tumeur, c'est-à-dire indépendant de la zone analyse et de l'opérateur (cf. figures 7, 8 et 9).

Ils ont également démontré qu'à ces différents types de graphique sont associés un pronostic plus ou moins bon et qu'il suffit donc d'établir ce graphique pour améliorer
10 l'évaluation des risques de rechute postopératoire et/ou la sensibilité aux divers traitements anti-tumoraux et/ou les risques de développer des métastases chez un patient auquel tout ou partie d'une tumeur a été prélevé.

Plus précisément, les travaux des présents Inventeurs ont permis d'établir que la répartition cellulaire obtenue sur les profils 1 et 2 est associée à un taux de récurrence
15 significativement plus faible chez les patients opérés pour un adénocarcinome de stade II et de stade III. L'immunohistochimie avec le CD3 paraît être le marqueur le plus performant.

Il est donc possible d'obtenir un pronostic rapide, objectif et fiable de la survie d'un patient atteint d'une tumeur grâce à la méthode de l'invention en comparant la forme
20 dudit graphique à un profil type tel que défini ci-dessus, ou en calculant l'aire sous le graphique pour chaque zone pré- et post- front tumoral, et en la comparant à des valeurs-seuils, ou en mesurant les pentes de variation en deux points du graphique situés à une distance déterminée de part et d'autre du front tumoral et les comparer à des valeurs-seuils, ou encore en comparant les valeurs obtenues en deux points du
25 graphique situés à une distance déterminée de part et d'autre du front tumoral à des valeurs-seuils.

La présente invention vise également un procédé de traitement d'image d'une lame virtuelle obtenue par microscopie, sur laquelle un front tumoral est visualisé, comprenant les étapes suivantes :

- 5 a) obtenir une lame virtuelle d'une coupe tissulaire d'une tumeur marquée par immunohistochimie, sur laquelle un front tumoral est identifiable,
- b) quantifier sur cette lame virtuelle la densité en cellules et/ou en vaisseaux sanguins situés de part et d'autre du front tumoral, dans une zone continue rectangulaire, et s'étendant de part et d'autre du front tumoral sur une distance au moins égale à 0.5 mm,
- 10 c) exprimer ces résultats sur un graphique dont l'axe des abscisses correspond à la distance par rapport au front tumoral, et en ordonnée la quantité de cellules ou de vaisseaux sanguins mesurée à cette distance dans une surface rectangulaire dont la largeur le long de l'abscisse est prédéfinie, et dont la longueur est la largeur de la zone rectangulaire de quantification, et
- 15 d) Effectuer au moins une des opérations comparatives suivantes :
 - i) Comparer la forme dudit graphique à un profil type, ou
 - ii) Calculer l'aire sous le graphique pour chaque zone pré- et post-front tumoral, et la comparer à des valeurs-seuils,
 - iii) Mesurer les pentes de variation en deux points du graphique situés
20 à une distance déterminée de part et d'autre du front tumoral et les comparer à des valeurs-seuils, ou
 - iv) Comparer les valeurs obtenues en deux points du graphique situés à une distance déterminée de part et d'autre du front tumoral à des valeurs-seuils.

e) Estimer le risque de rechute postopératoire et/ou le risque de développer des métastases du patient à qui la tumeur étudiée sur la lame virtuelle a été prélevée.

De préférence, la zone de quantification mentionnée à l'étape b) du procédé de traitement d'image de l'invention est choisie de façon telle que :

i) les médiatrices du petit côté et du grand côté de ce rectangle sont respectivement la normale et la tangente au front tumoral audit point d'intersection, et

ii) le point d'intersection des médiatrices est ledit point défini sur le front tumoral.

La demande vise en outre la méthode de pronostic de l'évolution d'une tumeur solide chez un individu, comprenant lesdites étapes a) à e) du procédé de traitement d'image de l'invention.

Les profils types y sont définis comme indiqué plus haut.

De préférence, c'est la densité en certaines cellules du système immunitaire présentes dans ladite zone ou dans des sous-ensembles de ladite zone de quantification, qui est mesurée. Ces cellules sont par exemple les leucocytes tels que les lymphocytes T, les lymphocytes B, les macrophages, les cellules NK, les cellules dendritiques, ou des sous-populations de ces cellules immunitaires. Ces cellules sont avantageusement marquées par immunohistochimie et sont positives pour les marqueurs CD3, CD4, CD8, CD45RO, FoxP3, et/ou CD68.

EXEMPLES :1. Cohortes :

Les tumeurs ont été prélevées chez des patients porteurs d'adénocarcinomes colorectaux du colon et du haut rectum opérés à l'hôpital Ambroise Paré entre
5 janvier 1998 et décembre 2005. Les critères d'inclusion étaient les patients classés
stade II (T2 à T4 , N0). Les critères de non inclusion étaient la présence d'un
envahissement ganglionnaire ou de métastase à distance, la localisation au moyen ou
au bas rectum, les tumeurs perforées, les antécédents de cancer, les cancers
développés sur polypose ou syndrome de Lynch, les patients perdus de vue ou
10 décédés dans le mois suivant l'intervention ou ayant reçu une chimiothérapie
adjuvante et enfin les patients pour lesquelles la résection n'était pas
macroscopiquement complète (R1 ou R2). Le stade II a été choisi car il regroupe des
patients avec des pronostics différents et pour lesquels la mise au point d'un facteur
pronostique discriminant serait d'un grand intérêt.

15

80 patients ont été inclus selon ces critères. Toutes les données
anatomopathologiques (classification TNM, embolus vasculaires veineux,
engainement périnerveux, nombre de ganglions examinés, *budding*) ont été
consignées dans une base de données APIX déclarée. Les données cliniques étaient
20 disponibles dans le dossier clinique informatisé FSD.

2. Autres types de cancer étudiés :

Outre les tumeurs colorectales mentionnées ci-dessus, d'autres tumeurs ont été
25 également étudiées afin de valider l'intérêt de la méthode de l'invention sur une
grande variété de tumeurs. Ainsi, la méthode de l'invention a été testée sur des
carcinomes urothélial vésical (n = 5), des adénocarcinomes pancréatiques (n = 5), des
carcinomes rénaux à cellules claires (n = 5), et des mélanomes nodulaires invasifs
cutanés (n = 10).

30

3. Prélèvement, découpe, traitement et coloration des échantillons tumoraux

Les échantillons tumoraux des patients ont été conservés en paraffine au sein du laboratoire d'anatomo-pathologie. Les lames de chaque patient ont été relues par un
5 anatomopathologiste expert en oncologie digestive afin de vérifier ou de compléter les données histologiques étudiées et afin de sélectionner un bloc de paraffine permettant de réaliser l'IHC. Le bloc choisi dans ce dernier cas contenait le prélèvement tumoral présentant la plus grande interface tumeur-environnement péri-tumoral.

10

Les blocs ainsi sélectionnés ont été coupés au microtome *Microm* en lame de 3µm d'épaisseur. Les lames ont ensuite été conservées dans une étuve à 60°C pendant 24 heures.

15 L'immunohistochimie (IHC) a été réalisée à l'aide d'un automate *Bond Max, Leica Microsystems* en simple marquage, avec les anticorps suivants:

- anticorps monoclonal anti-CD3 (marqueurs des lymphocytes T : CD3 Pan T Cell, Dako France, dilution au 1/50^{ème})
- anticorps monoclonal anti-CD8 (marqueurs des lymphocytes T
20 cytotoxiques : CD8 Pan T Cell, Dako France, dilution 1/25^{ème})
- anticorps monoclonal anti-CD45R0 (marqueurs des lymphocytes mémoires : Dakocytomation, dilution 1/400^{ème})
- anticorps monoclonal anti-Foxp3 (marqueurs des lymphocytes T régulateurs : Abcam, dilution 1/100^{ème})

25

Ces 4 anticorps ont été retenus dans cette étude car ce sont les seuls anticorps mentionnés dans la littérature pour lesquels un impact pronostic a été démontré.

Tous les anticorps primaires ont été révélés avec le kit Bond Polymer Refine
30 Detection (Leica, Biosystems, Newcastle Ltd), dans l'automate Bond-Max (Leica).

4. Analyse d'image

Les lames ont été scannées à l'aide d'un scanner de lame haute résolution MIRAX
DESK, Zeiss. Les lames virtuelles obtenues dans un format MRX ont constitué le
5 support de travail du logiciel d'analyse d'image (VISILOG 6.0) mis au point par la
société Noesis (Saclay, France). Une application de ce logiciel a été développée
spécifiquement pour mesurer l'infiltration lymphocytaire. Les cellules d'intérêt,
marquées, colorées en marron sont reconnues lors de l'analyse de la lame virtuelle.
On dispose d'une surface rectangulaire aux dimensions variables au sein de laquelle
10 les lymphocytes marquées seront comptabilisées.

5. Réglages des contrastes : détermination des seuillages critiques de détection du bleu et du rouge

15 L'immunohistochimie fait apparaître les éléments porteurs de l'antigène d'intérêt en
marron. La contre-coloration à l'hématoxyline apparaît en bleu, et permet de mieux
visualiser les différents constituants tissulaires et cellulaires. Le logiciel Visilog
sépare chaque élément de la lame virtuelle de manière binaire en fonction de leurs
couleurs: rouge ou bleu.

20

L'intensité de rouge et de bleu est représentée par le logiciel en une grandeur
numérique sans valeur allant de 0 (plus forte) à 255 (plus clair). Il est possible de
régler les seuils de détection de chaque élément. Les bornes du seuillage rouge et
bleu vont de 0 à 255. Ces réglages permettent d'identifier un élément en fonction de
25 l'intensité de sa coloration. En effet, un lymphocyte marqué présente un marquage
cytoplasmique et/ou membranaire, et un noyau qui restera faiblement bleu en raison
de l'absence de marquage nucléaire. Ce réglage est fait de telle manière à ce que la
composante bleue du noyau d'un lymphocyte marqué soit négligée et que le
lymphocyte marqué soit reconnu comme un élément rouge. Pour FoxP3, le marquage
30 est nucléaire.

Les seuils de détection du rouge

Si on fixe les paramètres de détection de la couleur rouge de 0 à 255, le logiciel reconnaîtra toute la gamme d'intensité des rouges. L'avantage de ce réglage est que
5 tous les éléments rouges seront reconnus, et que la sensibilité de détection des lymphocytes sera de 100%. L'inconvénient est que ce réglage prendra également en compte le bruit de fond, ce qui fera baisser la spécificité.

Les zones rouges très foncées correspondent à des réactions immunohistochimiques
10 de forte intensité, donc très spécifiques des lymphocytes d'intérêt. Il a donc été choisi de fixer la borne inférieure du seuil de détection du rouge à 0, c'est-à-dire à prendre en compte les intensités les plus fortes. Des tests ont été réalisés pour déterminer le niveau de rouge clair permettant de prendre en compte tous les lymphocytes, mais sans bruit de fond.

15

Une lame virtuelle présentant une large interface tumeur-zone péri-tumorale sans décollement a été choisie pour déterminer les seuils. 5 mesures ont été réalisées de manière consécutive en respectant une surface d'analyse identique. La longueur de l'analyse était fixée à 1800 μm . Chaque mesure ne différait que par la borne
20 supérieure de détection du rouge, la borne inférieure étant fixée à 0. Avec une borne de détection du rouge supérieure à 100, les courbes deviennent superposables et le seuil de détection du rouge n'est plus un paramètre critique. Le bruit de fond apparaissant en rouge très clair est détecté par le logiciel lorsque le réglage de la borne supérieure de détection du rouge est au-delà de 210. Les bornes de détection
25 du rouge retenues sont donc de 0 à 200.

Pour l'ensemble de l'étude, les bornes de détection du rouge ont donc été fixées de 0 à 200.

30

Les seuils de détection du bleu

Fixer les bornes de détection du bleu est également indispensable. En effet, pour le logiciel, tous les éléments reconnus en bleu sont éliminés c'est-à-dire non comptabilisés. 8 mesures d'une surface identique ont été réalisées en faisant varier
5 les deux bornes de détection du bleu. La densité de l'infiltrat lymphocytaire de la zone mesurée était très faible dans la région péri-tumorale et forte dans la région allant du front tumoral vers le centre tumoral. En observant les courbes correspondant aux différents seuillages de détection du bleu (voir la figure 6), il est
10 apparu que la courbe la plus représentative de l'infiltrat lymphocytaire est celle obtenue avec les bornes du bleu fixées de 100 à 250.

Toutes les mesures de la suite de l'étude ont donc été faites avec les bornes de détection du rouge et du bleu respectivement fixées à 0 - 180 et à 100 - 250.

15

6. Constitution des profils et des groupes

L'infiltrat lymphocytaire de la région péri-tumorale au centre de la tumeur a été mesuré selon la technique décrite ci-dessus pour les 20 premiers patients de la
20 cohorte.

Les 20 courbes obtenues ont été classées en sous-groupes selon le profil général de la courbe par rapport au front tumoral, c'est-à-dire les variations de densités lymphocytaires de la périphérie au centre tumoral. Les critères utilisés pour classer
25 les profils sont :

- 1) l'existence d'un pic de densité lymphocytaire,
- 2) son intensité,
- 3) sa densité dans la région péri-tumorale et intra-tumorale.

30

Profil de type 1 : « Infiltrat intra-tumoral fort »

La densité lymphocytaire est croissante. Dans la région intra-tumorale, la densité moyenne est au moins deux fois supérieure à la densité moyenne dans la région péri-tumorale (voir figure 4C)

5

Profil de type 2 : « Pic de densité lymphocytaire fort au front tumoral »

Ce pic est défini comme une densité lymphocytaire à un point donné de la bande d'analyse supérieur à 3 fois la densité moyenne de la région péri-tumorale. La courbe présente un pic de densité lymphocytaire à une distance inférieure à 300µm du front d'extension tumoral (voir figure 4B). Ce pic est dit fort car il dépasse la densité de 6 lymphocytes détectés sur une longueur de 5 µm pour une largeur de 1000µm. Le seuil de 6 lymphocytes a été défini uniquement pour les courbes révélant les lymphocytes positifs pour CD3 (ce seuil est à 4 pour les lymphocytes CD8⁺, à 2,5 pour les lymphocytes Foxp3⁺ et à 7 pour les CD45R0⁺)

10
15

Profil de type 3 : « Pic de densité lymphocytaire faible au front tumoral »

La courbe présente un pic de densité lymphocytaire à une distance inférieure à 300µm du front d'extension tumoral. Ce pic est dit faible car il reste inférieur au seuil de densité de 6 lymphocytes détectés sur une longueur de 5 µm pour une largeur de 1000µm (cf. figure 4A).

20

Profil de type 4 : « Infiltrat global faible »

La courbe ne présente aucun pic. La densité moyenne de lymphocytes est inférieure au seuil de 2 pour les CD3, et CD45R0, et de 1 pour Foxp3 et CD8.

25

7. Homogénéité et reproductibilité des mesures

L'hypothèse que les mesures de l'infiltrat lymphocytaire ne diffèrent pas en différents points de mesure d'une même lame a été testée de la manière suivante : 2 à 4 mesures ont été réalisées sur 5 lames consécutives en fonction de la taille de l'interface tumeur- région péri-tumorale. Les courbes obtenues à chaque mesure ont

30

été classés en type 1 à 4 selon les profils décrits ci-dessus. Aucune différence de type de courbes n'a été observée entre les mesures d'un même patient, comme en témoignent les figures 7B, 8B et 9B.

5 8. Résultats : impact pronostic

Les profils de courbes de plusieurs mesures pour un même patient étant identique, 1 seule mesure a été réalisée par patient. L'infiltrat lymphocytaire de tous les patients de la cohorte a été mesuré. Les 80 courbes ainsi obtenues pour l'anticorps CD3 ont
10 toutes pu être classées selon les profils types définis précédemment.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 1 de contingence pour les profils de courbes obtenus (marqueur : CD3)

15 Tableau 1 :

	Récidives	Non récidives	
Type 1	0	18	18
Type 2	3	37	40
Type 3	1	11	12
Type 4	8	2	10
	12	68	80

Ces valeurs sont significatives (χ^2 corrigé Yates = 31.68, 3 ddl, $P < 0.001$) et démontrent sans ambiguïté que le profil de type 1 est associé à un pronostic de non-récidive (dans 100% des cas pour cette étude), les profils de type 2 et 3 sont associés
20 à un pronostic moins bon (récidive dans 7,7% des cas pour cette étude), tandis que le profil 4 est associé à 40% de récurrence dans cette étude.

Références bibliographiques

- Badoual et al, *Clinical Cancer Research*, 2006 ; 12 :465-72
- Couvelard A, et al. *Br J Cancer*. 2005 ; 92(1):94-101.
- Couvelard A, et al.. *Mod Pathol*. 2009 ; 22(2):273-81
- 5 Galon J, et al, *Science* 2006 ; 313 (5795) :1960-4
- Jass et al, *Human Pathol* 2007, 38(4) : 537-545
- Naito Y et al, *Cancer Research* 1998 ; 58, 3491-4
- Pagès F et al, *N. Engl. J.Med* 2005 ; 353(25) :2654-66
- Ropponen et al, *J.Pathol* 1997, 182(3) : 318-24
- 10 Salama P et al, *Journal of clinical Oncology* 2009, 27(2) :186-92
- Uppaluri R et al, *Cancer immunity* 2008 ; 8 : 16 (review)

Revendications

1. Méthode de pronostic de l'évolution d'une tumeur solide chez un individu, comprenant au moins les étapes suivantes:
 - a) réaliser une lame virtuelle à partir d'un échantillon tumoral, sur laquelle un front tumoral est identifiable,
5
 - b) quantifier sur ladite lame virtuelle réalisée à l'étape a) la densité en cellules et/ou en vaisseaux sanguins présents dans une zone continue recouvrant le front tumoral et s'étendant de part et d'autre du front tumoral sur une distance au moins égale à 0.5 mm, appelée « zone de quantification »,
10
 - c) déduire de ladite quantification les risques de rechute postopératoire et/ou la sensibilité aux divers traitements anti-tumoraux et/ou les risques de développer des métastases chez ledit patient.
2. Méthode de pronostic selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'étape a) consiste au moins à numériser et enregistrer une image de microscopie d'une coupe
15 tissulaire marquée par immunohistochimie.
3. Méthode de pronostic selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'étape b) de quantification est effectuée à l'aide d'un logiciel informatique.
4. Méthode de pronostic selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite zone continue est une zone rectangulaire.
- 20 5. Méthode de pronostic selon la revendication 4, caractérisée en ce que la zone rectangulaire est telle que:
 - i) les médiatrices du petit côté et du grand côté de ce rectangle sont respectivement la normale et la tangente au front tumoral audit point d'intersection, et
 - 25 ii) le point d'intersection des médiatrices est un point du front tumoral.

6. Méthode de pronostic selon les revendications 4 et 5, dans laquelle l'étape b) consiste à échantillonner la densité en cellules et/ou en vaisseaux sanguins dans un ensemble continu de zones rectangulaires de largeur prédéfinie, lesdites zones ayant pour longueur la largeur de la zone de quantification, et balayant la zone de
5 quantification de part et d'autre du front tumoral, sur toute la longueur de la zone de quantification.

7. Méthode de pronostic selon la revendication 1, caractérisée en ce que le résultat de ladite quantification est exprimé sur un graphique.

8. Méthode de pronostic selon la revendication 7, caractérisée en ce que l'analyse
10 dudit graphique permet d'évaluer les risques de rechute postopératoire et/ou la sensibilité aux divers traitements anti-tumoraux et/ou les risques de développer des métastases chez ledit patient.

9. Méthode de pronostic selon les revendications 7 ou 8, caractérisée en ce que ledit graphique est tel que :

15 i) sur l'axe des abscisses est reportée la distance de part et d'autres du point du front tumoral défini à la revendication 5,

ii) en ordonnée est reportée la densité en cellules et/ou en vaisseaux sanguins mesurée dans chaque zone échantillonnée.

10. Méthode de pronostic selon la revendication 9, caractérisée en ce que
20 l'évaluation desdits risques s'effectue :

i) En comparant la forme dudit graphique à un profil type, ou

ii) En calculant l'aire sous le graphique pour chaque zone pré- et post- front tumoral, et en la comparant à des valeurs-seuils,

25 iii) En mesurant les pentes de variation en deux points du graphique situés à une distance déterminée de part et d'autre du front tumoral et en les comparant à des valeurs-seuils, ou

iv) En comparant les valeurs obtenues en deux points du graphique situés à une distance déterminée de part et d'autre du front tumoral à des valeurs-seuils.

11. Méthode de pronostic de l'évolution d'une tumeur solide chez un individu, comprenant les étapes suivantes :

5 a) obtenir une lame virtuelle d'une coupe tissulaire d'une tumeur marquée par immunohistochimie, sur laquelle un front tumoral est identifiable,

b) quantifier sur cette lame virtuelle la densité en cellules et/ou en vaisseaux sanguins présents de part et d'autre du front tumoral, dans une zone continue rectangulaire telle que définie dans la revendication 5, et s'étendant de part et d'autre
10 du front tumoral sur une distance au moins égale à 0.5 mm,

c) exprimer ces résultats sur un graphique dont l'axe des abscisses correspond à la distance par rapport au front tumoral, et en ordonnée la quantité de cellules ou de vaisseaux sanguins mesurée à cette distance dans une surface rectangulaire dont la largeur le long de l'abscisse est prédéfinie, et dont la longueur est la largeur de la
15 zone rectangulaire de quantification, et

d) Effectuer au moins une des opérations telles que définies à la revendication 10,

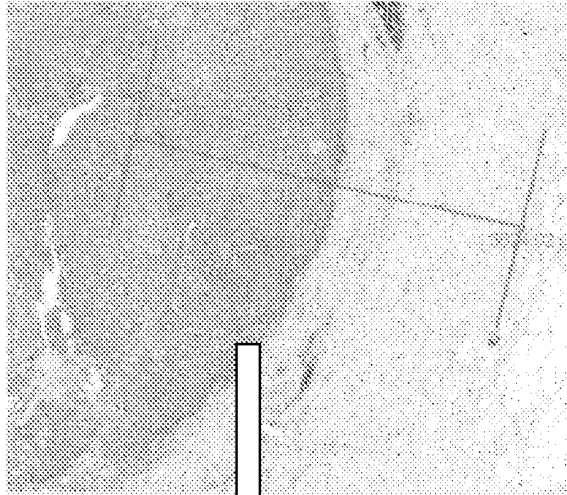
e) Dédire de l'étape d) les risques de rechute postopératoire et/ou la sensibilité aux divers traitements anti-tumoraux et/ou les risques de développer des
20 métastases chez ledit individu.

12. Méthode de pronostic selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que les cellules à quantifier sont des leucocytes tels que les lymphocytes T, les lymphocytes B, les macrophages, les cellules NK, les cellules dendritiques, ou des sous-populations de ces cellules immunitaires.

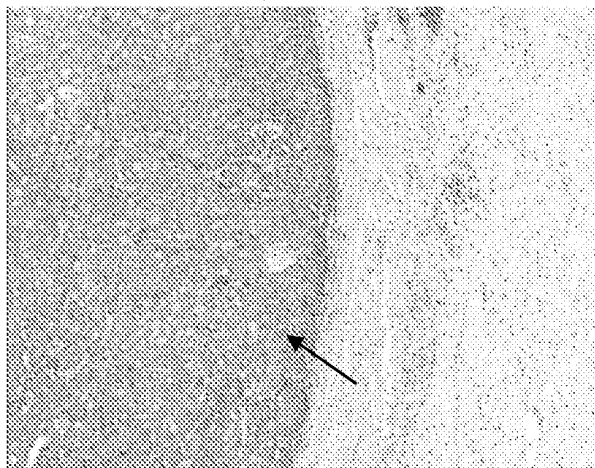
25 13. Méthode de pronostic selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que les cellules à quantifier sont marquées par immunohistochimie et sont positives pour les marqueurs CD3, CD4, CD8, CD45RO, FoxP3, CD68.

Figure 1

A



B



C

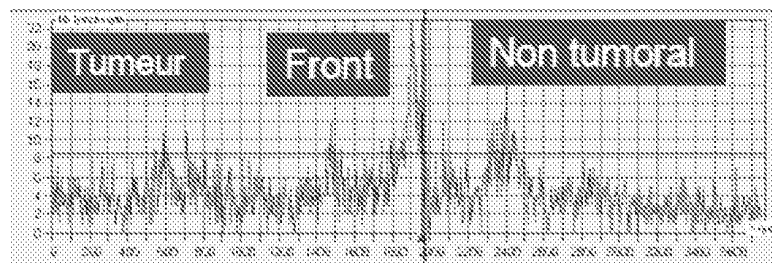


Figure 2

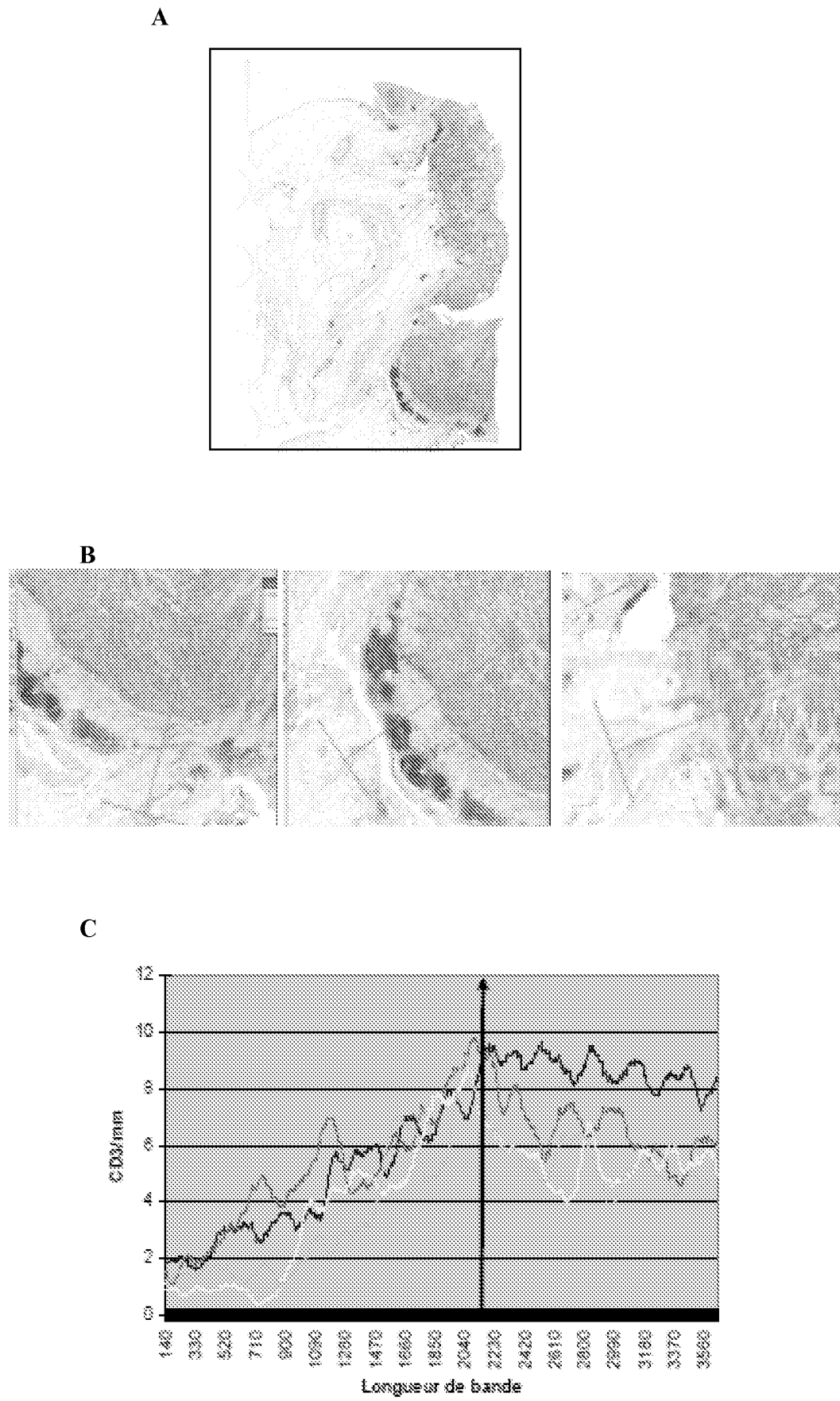


Figure 3

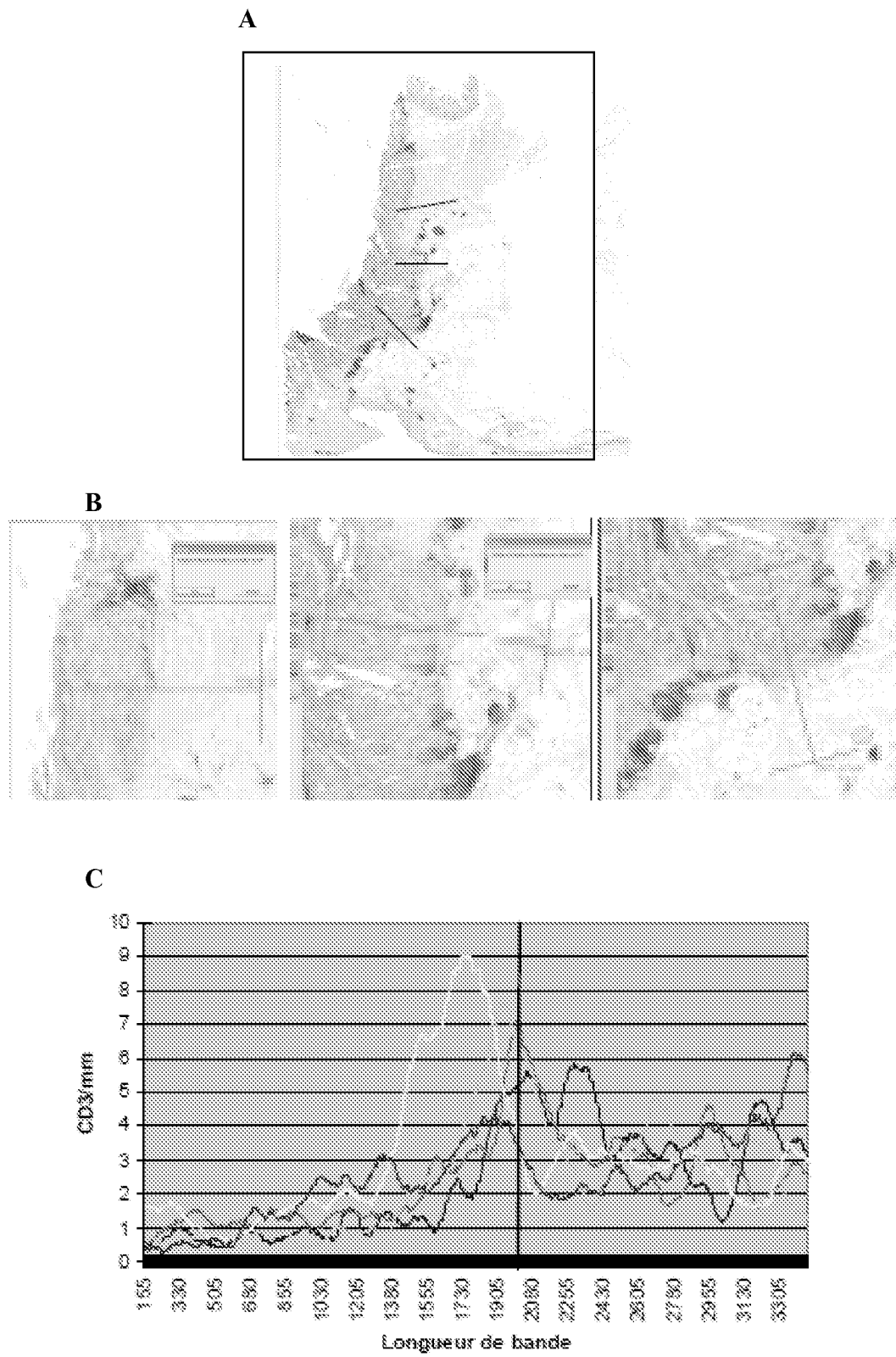
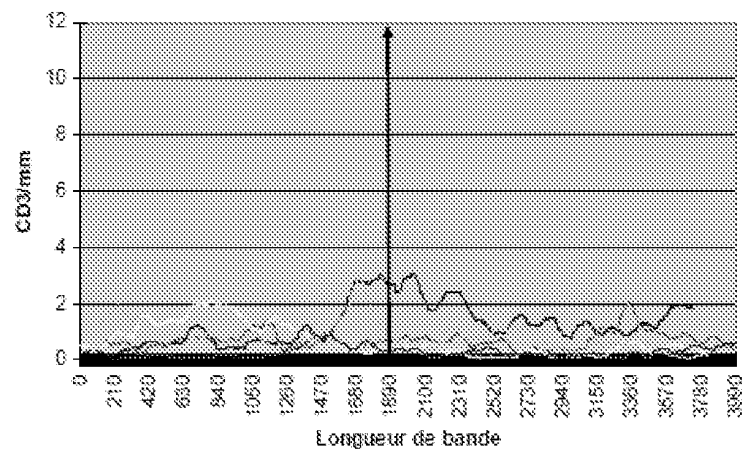
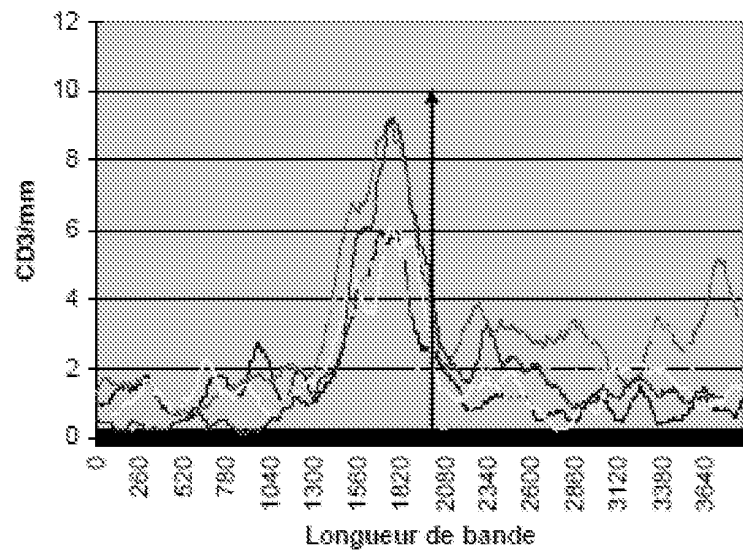


Figure 4

A



B



C

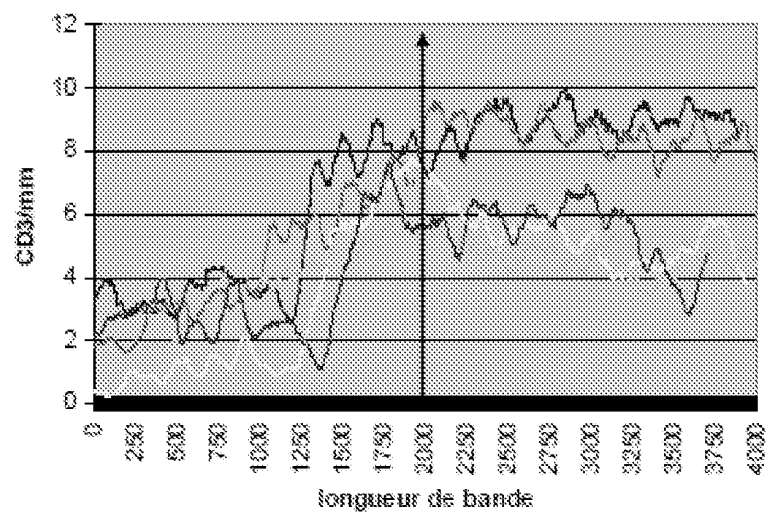
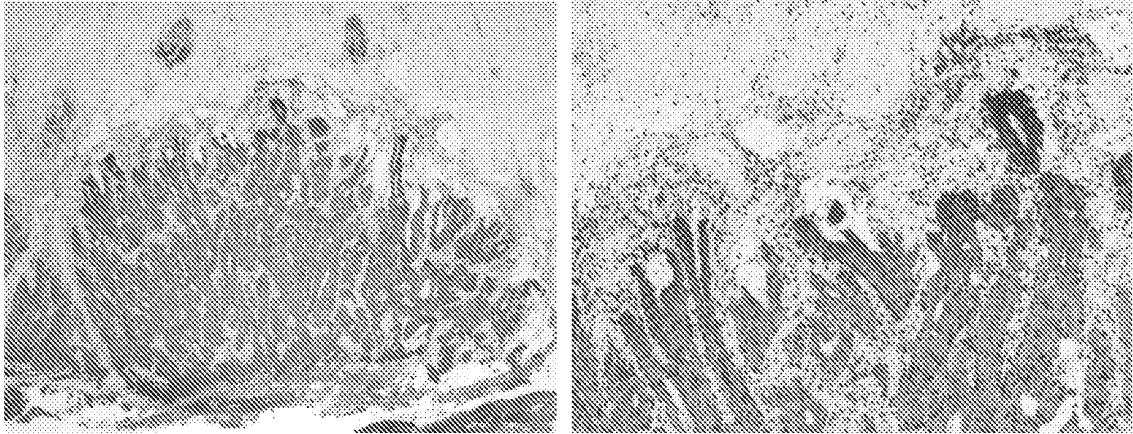
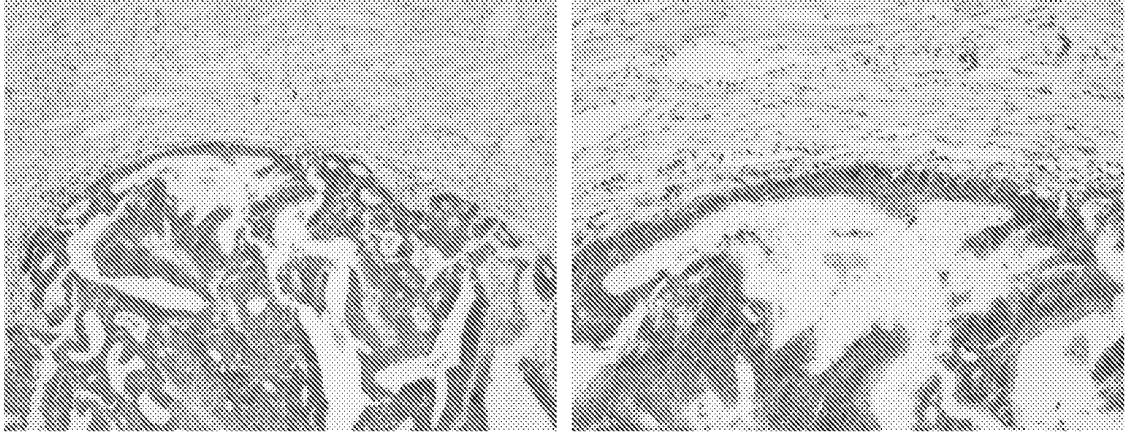


Figure 5

A



B



C

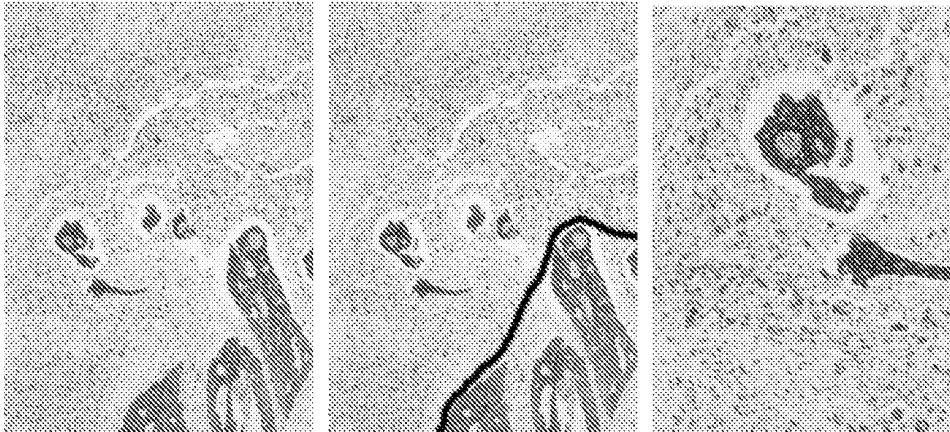
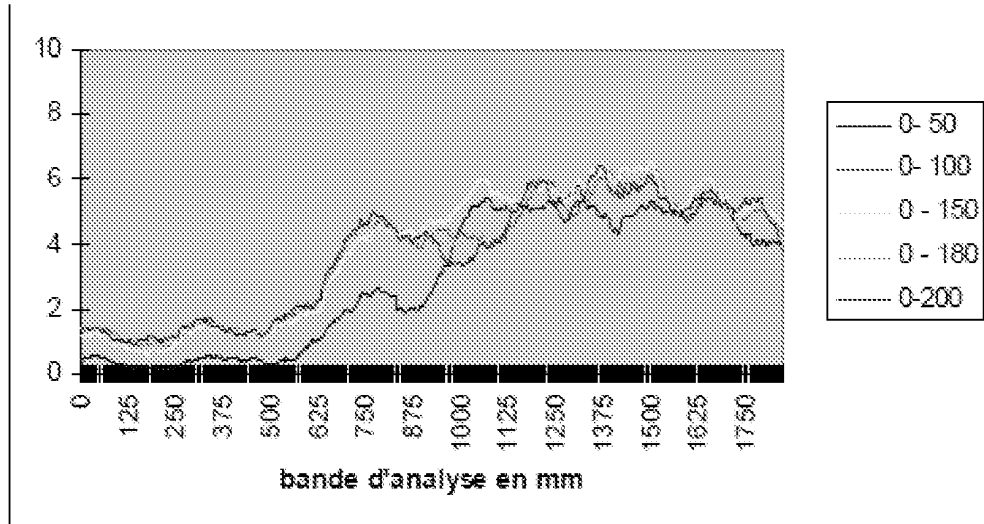
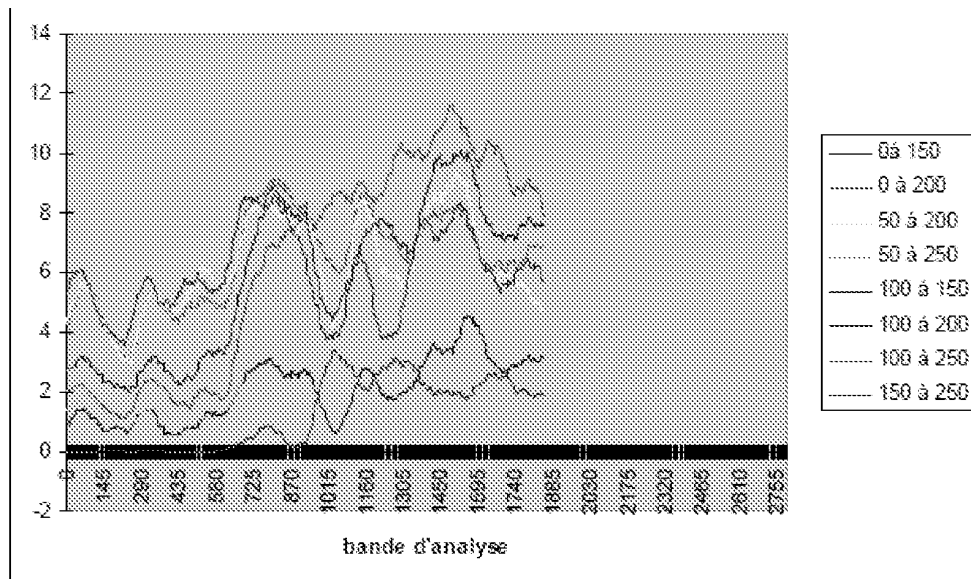


Figure 6

A



B



7/9

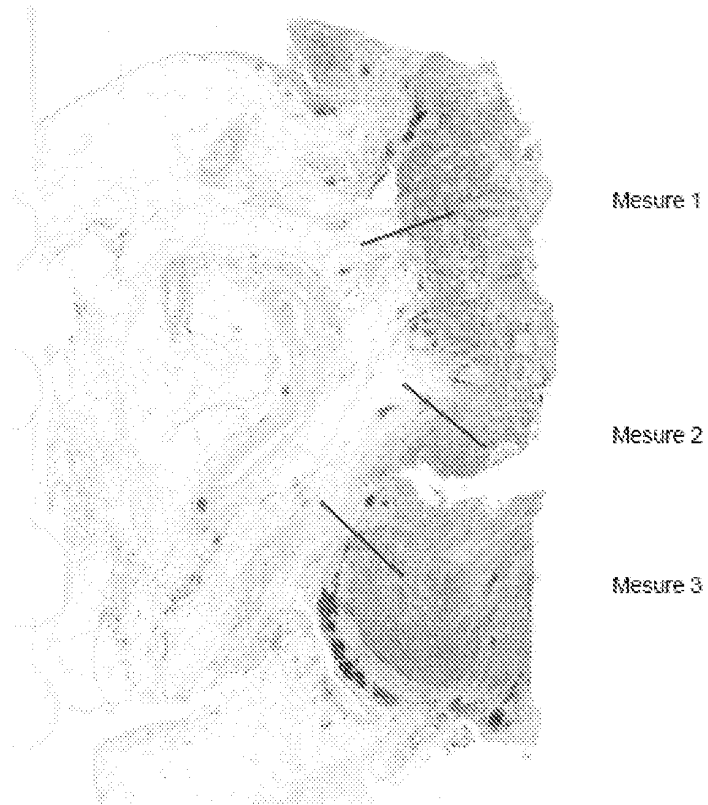
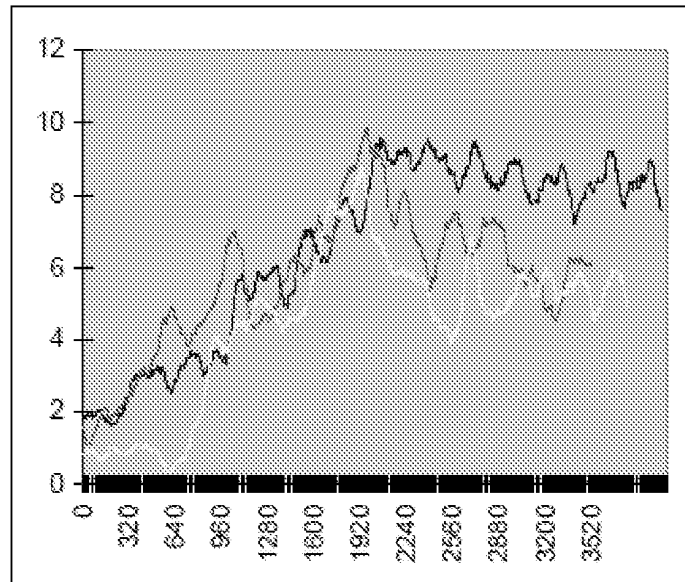
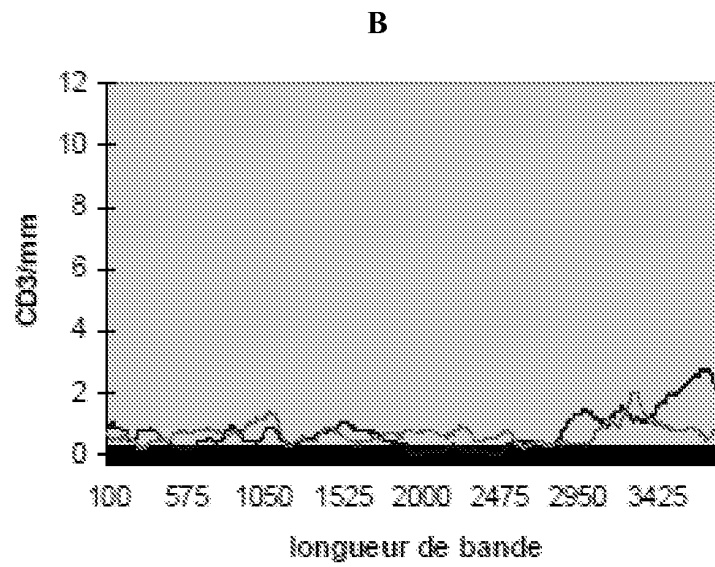
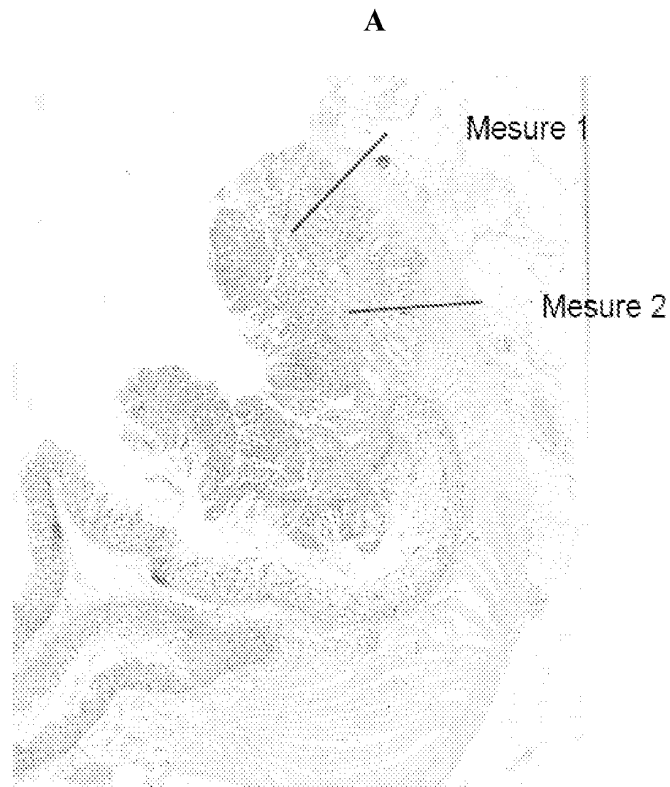
Figure 7**A****B**

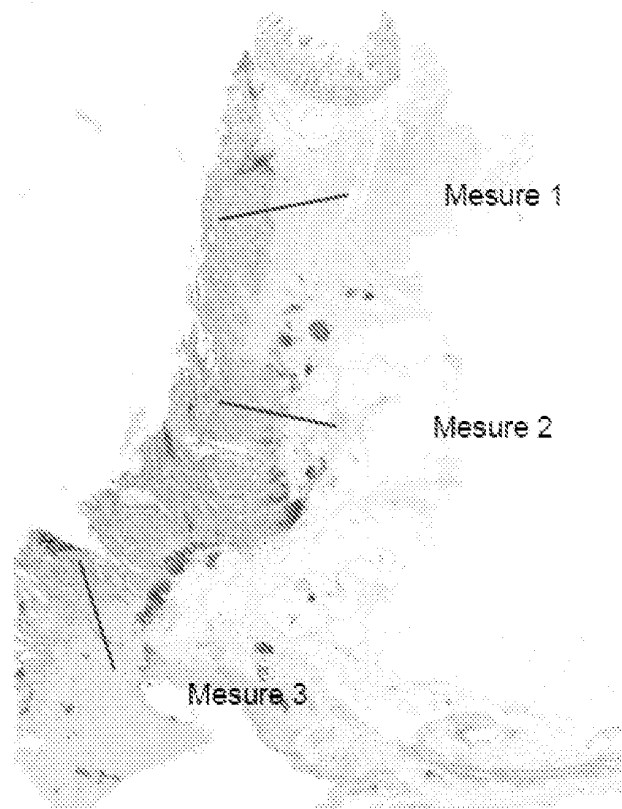
Figure 8



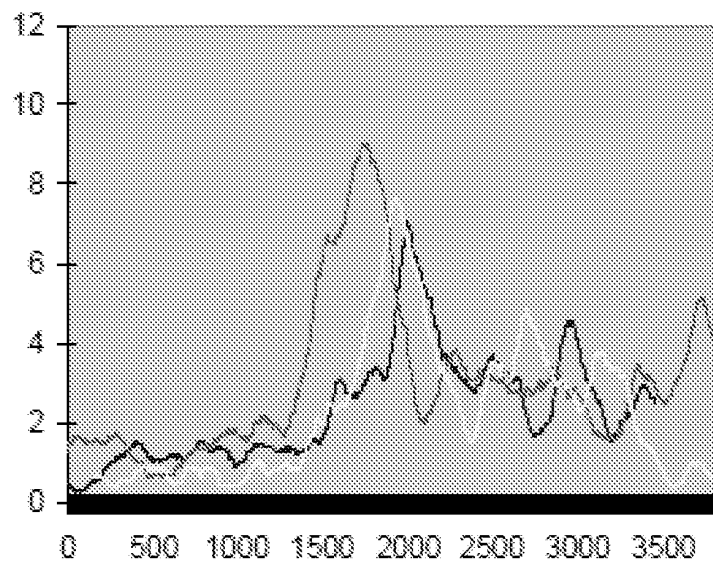
9/9

Figure 9

A



B





**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement national

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

FA 741754
FR 1057220

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	US 5 616 469 A (BRAWER MICHAEL K [US]) 1 avril 1997 (1997-04-01) * abrégé * * colonne 2, ligne 35 - ligne 57 * * colonne 6, ligne 63 - colonne 7, ligne 56 *	1-13	G01N33/574
A	US 2006/078926 A1 (MARCELPOIL RAPHAEL [FR] ET AL MARCELPOIL RAPHAEL [FR] ET AL) 13 avril 2006 (2006-04-13) * le document en entier *	1-13	
A	EP 1 908 404 A1 (KONICA MINOLTA MED & GRAPHIC [JP]) 9 avril 2008 (2008-04-09) * le document en entier *	1-13	
A	US 2003/050553 A1 (SAMOSZUK MICHAEL [US] ET AL) 13 mars 2003 (2003-03-13) * le document en entier *	1-13	
A	US 2004/013292 A1 (RAUNIG DAVID L [US]) 22 janvier 2004 (2004-01-22) * le document en entier *	1-13	
A	"Application of an Image Analysis System to the Quantitation of Tumor Perfusion and Vascularity in Human Glioma Xenografts", MICROVASCULAR RESEARCH, vol. 50, 1995, pages 141-153, XP002630325, * le document en entier *	1-13	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) G06T G01N A61B G06K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
30 mars 2011		Błaszczuk, Marek	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention	
X : particulièrement pertinent à lui seul		E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		D : cité dans la demande	
A : arrière-plan technologique		L : cité pour d'autres raisons	
O : divulgation non-écrite		
P : document intercalaire		& : membre de la même famille, document correspondant	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1057220 FA 741754**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **30-03-2011**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5616469	A	01-04-1997	AUCUN	

US 2006078926	A1	13-04-2006	AUCUN	

EP 1908404	A1	09-04-2008	CN 101227861 A	23-07-2008
			WO 2007013300 A1	01-02-2007
			US 2010284579 A1	11-11-2010

US 2003050553	A1	13-03-2003	AUCUN	

US 2004013292	A1	22-01-2004	AUCUN	
