

MISE AU POINT

Le « tumor budding » ou bourgeonnement tumoral dans les cancers colorectaux

Tumor budding in colorectal cancers

Magali Svrcek, Jean-François Fléjou

Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, AP-HP, Hôpitaux Universitaires Paris Est, Hôpital Saint-Antoine, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, F-75571 Paris cedex 12
magali.svrcek@sat.aphp.fr

■ Résumé

Le « tumor budding » est défini comme la présence, au niveau du front d'invasion de la tumeur, de cellules isolées ou groupées en petits amas de 5 cellules tumorales au maximum se détachant du reste de la tumeur. On peut traduire en français ce terme par celui de bourgeonnement tumoral, mais nous emploierons dans cette mise au point le terme anglais consacré dans la littérature. Cette caractéristique morphologique, qui s'observe dans un grand nombre de cancers colorectaux (CCR), est considérée comme la traduction morphologique du phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), étape-clé dans le processus d'invasion tumorale et dans la dissémination métastatique. Au cours de ces

dernières années, le « tumor budding » est clairement apparu comme un facteur pronostique péjoratif dans le CCR, en particulier le CCR de stade II (i.e. sans métastase ganglionnaire), raison pour laquelle l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC), dans sa dernière version, a proposé d'inclure ce critère pour porter l'indication d'un traitement adjuvant. Cependant, il apparaît que les méthodes de détermination et de quantification du « tumor budding » varient considérablement d'une étude l'autre. C'est pourquoi un effort important doit être fait dans ce sens, de la part des pathologistes, avant d'inclure ce critère dans la décision thérapeutique pour les malades atteints de CCR.

Mots-clés

Tumor budding ; Cancer colorectal ; Transition épithélio-mésenchymateuse

■ Abstract

"Tumor budding" is defined by the presence, at the invasive tumor front, of isolated neoplastic cells or clusters of up to 5 neoplastic cells, detaching from the rest of the tumor. The term "tumor budding" is also used in French. This morphological feature, which is observed in a large number of colorectal cancers (CRC), is closely related to the epithelial-mesenchymal transition (EMT), a key component of the tumoral invasion process and of metastatic scattering. During the past years, strong consistent evidence shows that "tumor budding" is an

adverse prognostic factor, mostly in stage II CRC (i.e. without lymph node metastasis). That is why the International Union against Cancer (UICC) in its last version suggested to include this criteria for the management of adjuvant chemotherapy. Nevertheless, the scoring systems of "tumor budding" are still lacking standardization and inter-observer reproducibility. Consensus has to be reached by pathologists before this feature can be implemented as part of the therapeutic decision-making.

Keywords

Tumor budding; Colorectal cancer; Epithelial-mesenchymal transition

■ Introduction

Le « tumor budding » est une caractéristique morphologique qui s'observe dans un grand nombre de cancers colorectaux (CCR). Ce terme, qu'on peut traduire en français par celui de « bourgeonnement tumoral », a été utilisé la première fois par les pathologistes prenant en charge les pièces chirurgicales afin de traduire l'existence de cellules tumorales isolées ou groupées en petits amas qui se détachaient du reste de la tumeur et qu'ils observaient au niveau du front d'invasion des CCR, la plupart du temps au sein d'un stroma desmoplastique [1].

Puisque ce phénomène et ce qui le sous-tend d'un point de vue biologique a rapidement dépassé le champ de la pathologie, d'autres termes que « tumor budding » ont été utilisés dans la littérature pour décrire ce phénomène, tels que « dédifférenciation focale », « dissociation des cellules tumorales » ou encore « transition épithélio-mésenchymateuse » (TEM). Bien qu'on puisse traduire ce terme en français par celui de « bourgeonnement tumoral », c'est généralement le terme anglais qui est utilisé dans les comptes-rendus anatomo-pathologiques, et que nous emploierons dans cet article.

Le « tumor budding » est considéré comme la traduction morphologique du phénomène de TEM, étape-clé dans le processus d'invasion tumorale et dans la dissémination métastatique [2].

À l'heure actuelle, la classification TNM constitue le « gold standard » des facteurs pronostiques du CCR, le taux de survie à 5 ans des malades atteints de CCR étant largement corrélé au stade TNM [3]. Le stade TNM est utilisé également pour l'indication d'une chimiothérapie adjuvante après résection chirurgicale carcinologique d'un CCR. En effet, le bénéfice d'une chimiothérapie adjuvante est démontré chez les malades présentant un envahissement ganglionnaire sur la pièce de résection chirurgicale (stade III UICC) [4]. En revanche, le bénéfice de cette chimiothérapie dans les stades II (i.e. sans envahissement ganglionnaire) fait encore l'objet de débats. Bien que le traitement adjuvant ne soit pas recommandé chez les malades opérés d'un CCR de stade II, il apparaît que l'évolution de 20 % d'entre eux sera défavorable [5]. Par conséquent, d'autres facteurs pronostiques, morphologiques, mais aussi moléculaires, semblent nécessaires pour une prise en charge optimale des malades atteints de CCR. Au cours de ces dernières années, le « tumor budding » est apparu comme un facteur de risque de mauvais pronostic dans le CCR de stade II, après chirurgie curatrice, indépendant de l'extension locale, du statut ganglionnaire et de la présence de métastases à distance [6]. C'est la raison pour laquelle l'AJCC (American Joint Committee on Cancer), dans sa dernière version (7^e édition), a proposé d'inclure ce critère dans la décision d'indication de traitement adjuvant [3].

Dans cette mini-revue, nous aborderons successivement les aspects morphologiques, biologiques, moléculaires et immunohistochimiques du « tumor budding », en explicitant ses relations avec la TEM, son rôle pronostique dans certains types de CCR, ainsi que ses différentes méthodes de quantification.

Les aspects anatomo-pathologiques du « tumor budding »

Le « tumor budding » s'observe de façon prédominante, mais non exclusive, comme nous le verrons plus tard au cours de cette revue, au niveau du front d'invasion des CCR. De façon arbitraire, le « tumor budding » a été défini comme la présence, au niveau du front d'invasion de la tumeur, de cellules isolées ou groupées en petits amas de 5 cellules tumorales au maximum, se détachant du reste de la tumeur », comme des bourgeons tumoraux (« buds » en anglais) (Fig. 1). Cette définition est la plus fréquemment utilisée dans la littérature, bien que, dans les publications japonaises, la limite soit plus volontiers de 4 cellules tumorales. De plus, ces bourgeons tumoraux sont souvent associés et en contact direct avec des protrusions cytoplasmiques de type pseudopodes [7].

Une description détaillée du « tumor budding », d'un point de vue morphologique et ultra-structural, a été faite par Gabbert *et al.* il y a plus de 20 ans [8]. Dans un modèle expérimental de CCR chez des rats Wistar, ces auteurs ont pu observer, au niveau du front d'invasion des CCR bien et moyennement différenciés, la présence de glandes tumorales irrégulièrement réparties. À la place, ils ont pu voir des petits cordons de cellules tumorales ou des cellules tumorales isolées se détachant du reste de la tumeur, de façon discontinue. En microscopie électronique, ces petits amas de cellules tumorales ou ces cellules isolées n'avaient pas de complexes jonctionnels, avaient souvent des desmosomes incomplets, la membrane basale était absente ou rudimentaire et il n'y avait pas de bordure en brosse ou elle était incomplète. De façon intéressante, la conclusion des auteurs a été que ces CCR dédifférenciés avaient acquis, focalement, au niveau de leur front d'invasion, le phénotype de CCR indifférenciés. Ainsi, était né le concept de dédifférenciation au niveau du front d'invasion d'une tumeur, ce qui a donné naissance au terme de « dédifférenciation focale », autre terme utilisé pour désigner le « tumor budding ». À partir de ces constatations morphologiques, Gabbert *et al.* ont émis l'hypothèse que la migration des cellules tumorales se faisait à partir de la dédifférenciation observée au niveau du front d'invasion. Ces auteurs ont également noté, dans les bourgeons tumoraux (i.e. dans les secteurs de dédifférenciation), la présence de protrusions cytoplasmiques, comme des pseudopodes, qui étaient en contact direct avec le tissu interstitiel adjacent [8].

Il est important de distinguer le « tumor budding » d'autres caractéristiques anatomo-pathologiques, telles que le grade de la tumeur en particulier. Le grade de la tumeur, tel que défini par l'OMS, tient compte du degré de différenciation de la tumeur. Toutefois, un faible degré de différenciation d'une tumeur (i.e. une tumeur de haut grade) doit être distingué du « tumor budding », à la fois d'un point de vue morphologique, mais aussi conceptuel. Un faible degré de différenciation, qui implique l'absence complète ou quasi-complète de structures glandulaires au sein de la tumeur, concerne la totalité de la surface de la tumeur, tandis que les « bourgeons tumoraux » ne sont présents qu'au front d'invasion de la tumeur (Fig. 1). C'est pourquoi la plupart des CCR ayant un haut niveau de « tumor budding » sont en fait des CCR bien ou moyennement différenciés, qui représentent la majorité

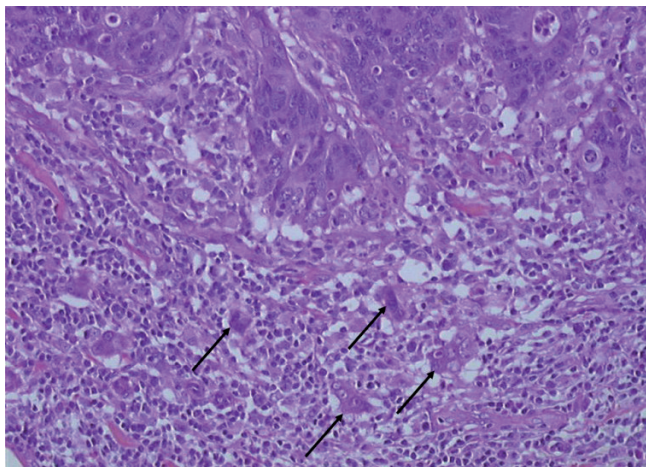


Figure 1
Présence de cellules tumorales isolées (flèches) au niveau du front d'invasion d'un cancer colorectal avec stroma inflammatoire (Hématéine Eosine Safran, grossissement $\times 200$)

des CCR. Par ailleurs, dans les CCR de haut grade, les cellules tumorales s'agrègent souvent en amas contenant plus de 5 cellules tumorales. Ainsi, par définition, ces amas carcinomateux peu différenciés ne sont pas considérés comme des « bourgeons tumoraux ». Ce n'est toutefois pas le cas pour les rares CCR de forme diffuse, au niveau desquels les cellules tumorales sont dissociées les unes des autres et souvent organisées en cellules isolées ou en petits amas de cellules tumorales. Dans ce cas particulier, le phénomène de « tumor budding » est considéré comme élevé [9]. Le « tumor budding » ne doit pas être confondu avec un front d'invasion de type infiltrant. Cette dernière caractéristique morphologique, initialement décrite par Jass *et al.* [10], – et qui s'oppose à un front d'invasion de type expansif –, s'observe dans environ 25 % des CCR et se traduit par une dissection des faisceaux de la musculuse, par la prolifération tumorale, avec peu de stroma (Fig. 2A et 2B). Cet aspect peut ne s'observer que

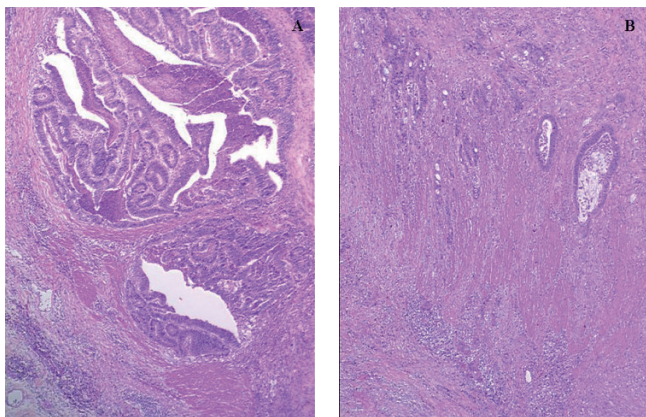


Figure 2
(A) Front d'invasion d'un cancer colorectal de type expansif
(B) Front d'invasion de type infiltrant (HES, grossissement $\times 50$)

dans une partie de la tumeur. Un front d'invasion de type infiltrant se définit à faible grossissement, contrairement au « tumor budding » qui s'observe, lui, à fort grossissement. Le « tumor budding » peut s'observer à la fois dans les CCR de type infiltrant et expansif. Toutefois, le « tumor budding » est plus souvent associé à un front d'invasion de type infiltrant [11]. C'est pourquoi les pathologistes doivent être particulièrement attentifs à rechercher un phénomène de « tumor budding » en cas de front d'invasion de type infiltrant.

■ Le « tumor budding » : lien avec le concept de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).

Aspects biologiques, moléculaires et immunohistochimiques

La TEM est considérée comme le mécanisme biologique sous-tendant l'acquisition d'un phénotype malin par les cellules épithéliales [12]. Au cours de la TEM, une cellule polarisée, qui interagit normalement avec une membrane basale, acquiert un phénotype mésenchymateux caractérisé par une augmentation de sa capacité de migration, de son invasivité, une augmentation de sa résistance à l'apoptose et une production accrue des constituants de la matrice extra cellulaire (MEC) [12]. Les cellules ayant subi une TEM issue des cellules tumorales présentes au niveau du front d'invasion de la tumeur sont considérées comme celles impliquées dans les étapes ultérieures d'invasion et de dissémination à distance. De plus, il a été montré que ces cellules étaient capables d'établir des colonies secondaires à distance et que ces colonies avaient un aspect morphologique semblable à la tumeur primitive [13].

Lorsqu'elles subissent une TEM, les cellules épithéliales, à un stade précoce, diminuent les contacts intercellulaires (impliquant la E-cadhérine), ainsi que les contacts avec la MEC (impliquant les intégrines) et réorganisent leur cytosquelette pour former, notamment, des protrusions du cytoplasme (filopodia), étape faisant intervenir l'actine et la myosine. Plus tard s'effectue la dégradation de la matrice péri-cellulaire, grâce aux métalloprotéinases et à l'activateur du plasminogène (uPA) [14]. Dans un CCR, la TEM va se traduire par une cassure des jonctions intercellulaires impliquant la E-cadhérine et par une dissociation des complexes de cellules tumorales. La réorganisation du cytosquelette d'actine permet aux cellules d'émettre des expansions pour leur migration ; les intégrines (en particulier $\alpha 3 \beta 1$) situées au niveau de ces expansions permettent un nouvel ancrage à la MEC. Ensuite, la MEC est alors dégradée.

L'étude de la TEM et des voies de signalisation qui sont impliquées dans ce phénomène a permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et événements génétiques sous-tendant l'apparition du « tumor budding » dans le CCR. Trois principales voies de signalisation sont impliquées dans les CCR : (i) la voie RAS/RAF/MAPkinase ; (ii) la voie Wnt ; (iii) la voie du TGF

beta. La voie RAS/RAF/MAPK est une voie de signalisation intracellulaire qui intervient dans la régulation de la prolifération, de la survie, de la différenciation, de la migration cellulaire et de l'angiogenèse, après une cascade de phosphorylations successives. Les principaux récepteurs de facteurs de croissance capables d'activer cette voie de signalisation sont l'EGFR (ou HER1) (Epidermal Growth Factor Receptor) et les autres membres de la famille HER, l'IGFR (Insulin-like Growth Factor Receptor) et le PDGFR (Platelet Derived Growth Factor Receptor). La fixation du ligand sur le récepteur aboutit, après homo- ou hétérodimérisation, à une autophosphorylation au niveau de résidus tyrosine spécifiques situés sur son domaine intracellulaire. Ces résidus phosphorylés servent ensuite de point d'ancrage à des protéines intracellulaires à domaine SH2 qui jouent un rôle central dans la transmission de voies de signalisation. Les deux principales voies de signalisation sont : (i) la voie des MAP (Mitogen-Activated Protein) kinases, à laquelle appartiennent les protéines KRAS et BRAF ; (ii) la voie PI3K (Phosphoinositide 3-kinase)/PTEN (phosphatase protein homolog to tensin)/AKT. La voie MAPK intervient dans la prolifération cellulaire, et la voie PI3K/PTEN/AKT, dans la survie et la motilité cellulaires. La TEM fait intervenir des facteurs de croissance et des signaux provenant des cellules du stroma [en particulier hepatocyte growth factor (HGF), epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF) et transforming growth factor-beta (TGF-beta) [13].

La voie Wnt est activée lors de la fixation de son ligand, un facteur sécrété, au récepteur Frizzled (Fz) et au co-récepteur LRP 5/6 [15]. Les protéines de la famille disheveled (Dsh ou dvl) interagissent alors avec les récepteurs Fz. Ces interactions ont pour conséquence d'inhiber le complexe formé par les molécules APC, AXIN et GSK-3 β (Glycogène synthase kinase-3 β). Le complexe APC/AXIN/GSK-3 β joue normalement un rôle dans la phosphorylation et la dégradation de la β -caténine. Lors de l'activation du proto-oncogène Wnt, la GSK-3 β est inhibée, entraînant l'accumulation de la β -caténine qui n'est plus dégradée. La β -caténine libre se lie alors dans le cytosol à différentes molécules comme le facteur d'activation des lymphocytes (LEF pour Lymphoid Enhancer Factor) et le facteur cellulaire T (pour T Cell factor), principalement TCF-4 dans la muqueuse colique. Cela a pour conséquence une inhibition de l'expression de la E-cadhérine. Dans le CCR, les mutations du gène *apc* (qui, dans 95 % des cas, sont des mutations somatiques non-sens conduisant à l'apparition d'un codon-stop et à la synthèse d'une protéine tronquée) ont les mêmes conséquences que celles obtenues après l'activation de la voie Wnt/Wingless, c'est-à-dire une accumulation de la β -caténine libre intracellulaire. L'activation de la voie wnt, telle qu'on l'observe *in vitro* dans la TEM, semble très liée au phénomène de « tumor budding » dans les CCR. En effet, la majorité des CCR, de type CIN (pour Chromosomally INstable) ou MSS (pour MicroSatellite Stable, par opposition aux CCR MSI pour Microsatellite Instable) résultent d'une inactivation de cette voie. Ainsi, une accumulation nucléaire de la β -caténine est typiquement observée dans les CCR MSS, en particulier au niveau du front d'invasion, au sein des bourgeons tumoraux,

conjointement à une perte d'expression membranaire de la E-cadhérine. À l'inverse, les CCR MSI ne présentent typiquement ni mutation du gène *apc*, ni phénomène de « tumor budding » [16]. Les protéines SMAD, qui sont impliquées dans la voie du TGF- β , sont régulées par leur niveau de phosphorylation. Elles jouent un rôle-clé dans la transduction du signal, déclenché par l'activation, à la surface de la cellule, des récepteurs du TGF- β . Ce dernier permet la phosphorylation de SMAD2 qui interagit avec SMAD4. Ce complexe se dirige ensuite vers le noyau, où il induit la transcription de gènes impliqués dans l'arrêt de la croissance cellulaire. Le TGF- β et le récepteur du TGF- β sont exprimés dans la majorité des CCR, en particulier les CCR présentant un important phénomène de « tumor budding » [17].

Les études immunohistochimiques ont joué un rôle important dans l'amélioration de nos connaissances sur le « tumor budding », comme montré dans une revue récente [16]. Un « tumor budding » important est souvent lié à une expression accrue, **dans le centre de la tumeur**, de marqueurs protéiques intimement liés à la dégradation de la MEC, tels que uPA (urokinase Activator Plasminogen) et uPAR (urokinase Activator Plasminogen Receptor), matrylisine ou métalloprotéinases (MMPs), ainsi qu'à une expression accrue des marqueurs associés à une augmentation de la prolifération, tels que TGF- β , EGFR et p53 [16]. Les marqueurs d'adhésion cellulaire et de migration tels que la E-cadhérine (ou le syndecan-1) sont diminués, ainsi que la protéine phospho-AKT, impliquée dans la survie cellulaire (par inhibition de l'apoptose) [18]. Ce phénomène fait également intervenir le système immunitaire, puisque les lymphocytes intra-tumoraux CD8+ sont en nombre nettement diminué dans ce cas.

Entre le centre de la tumeur et le front d'invasion, on peut voir une diminution de l'expression membranaire de plusieurs marqueurs, impliqués en particulier dans l'adhésion cellulaire, qui sont la E-cadhérine, CD44, CD44v6, EpCAM et CD166. Ces différents marqueurs ne sont souvent pas exprimés par les cellules constituant le « tumor budding » [19-21]. Au niveau des cellules du « tumor budding » elles-mêmes, on peut observer un marquage nucléaire intense et uniforme de la β -caténine et une perte d'expression membranaire de la E-cadhérine, à l'instar de ce qui est décrit au cours de la TEM [22]. De plus, une surexpression des protéines dégradant la MEC (MMP-2 et -9, uPAR et laminine5 γ 2) a été rapportée [16]. Il semble également exister un lien entre le « tumor budding » et une expression accrue de marqueurs décrits pour identifier les cellules souches, CD133 et ABCG5 [23,24]. En revanche, l'index de prolifération est habituellement bas au niveau des bourgeons tumoraux [25].

Le phénomène de « tumor budding » varie en fonction du type de CCR. Qu'ils soient sporadiques ou héréditaires, les CCR MSI ne présentent généralement pas de « tumor budding » ou un niveau faible [26]. Les études *in vitro* montrent d'ailleurs que la TEM est moindre dans les CCR MSI comparés aux CCR MSS. Les CCR MSI sont également décrits comme donnant moins de métastases que les CCR MSS et de meilleur pronostic, à stade TNM égal. L'une des explications est probablement la présence, dans les CCR MSI, d'un abondant infiltrat inflammatoire, riche en

lymphocytes T cytotoxiques, ces tumeurs induisant une grande immunogénicité. Ces lymphocytes cytotoxiques joueraient un rôle de « défenseur », au niveau du front d'invasion, contre l'attaque des « buds » [16].

■ Intérêt du « tumor budding » en pratique clinique

Le tumor budding : un marqueur pronostique dans le CCR

Les facteurs pronostiques morphologiques identifiés dans le CCR sont, outre la classification TNM, les embolies lymphatiques et veineux, le grade de la tumeur, les engainements péri-nerveux et l'aspect du front d'invasion de la tumeur (infiltrant *versus* expansif). Plusieurs études ont montré que l'existence d'un niveau élevé de « tumor budding » constituait un facteur de risque indépendant de dissémination locale [27], de métastases ganglionnaires [28,29] et de métastases à distance [6,30], d'embolies lymphatiques et vasculaires (notamment veineux) [31,32], de récurrence locale [33,34] et de mauvais pronostic après chirurgie curatrice [35,36]. Sur ce dernier point, seule une étude a montré des résultats contradictoires, avec une association entre « tumor budding » et mauvais pronostic en analyse univariée, association non retrouvée en analyse multivariée [37].

Des données quantitatives de « tumor budding » ont permis d'établir également un lien avec le statut mutationnel de *KRAS* (mutations observées dans environ 30 % des CCR) [38]. L'absence de « tumor budding » est corrélée à la présence de lymphocytes intra-tumoraux (TILs dans la littérature anglo-saxonne) et de lymphocytes péri-tumoraux, suggérant ainsi le rôle d'une immunité anti-tumorale impliquée dans la destruction des nids tumoraux, ayant pour conséquence un meilleur pronostic [39]. Il est intéressant de noter que les lymphocytes intra- et péri-tumoraux sont en nombre généralement augmenté dans les CCR de phénotype MSI, cancers pour lesquels nous avons déjà mentionné que le phénomène de « tumor budding » était rare.

L'existence d'un phénomène de « tumor budding » est un critère qualitatif de mauvais pronostic sur les pièces de polypectomie sur lesquelles on découvre un cancer, qui doit inciter à faire pratiquer une colectomie ou une proctectomie complémentaire, en vue de réaliser un curage ganglionnaire [28].

Le « tumor budding » s'observe de façon prédominante au niveau du front d'invasion des CCR, mais peut s'observer également au centre de la tumeur. Une seule étude a évalué la présence d'un phénomène de « tumor budding », non pas au niveau du front d'invasion de la tumeur, mais au centre de celle-ci, sur les biopsies pré-opératoires de 112 malades atteints d'un cancer du rectum [40]. Pour 40 de ces malades, la pièce de résection chirurgicale avait pu être analysée. Il semble que le « tumor budding » au centre de la tumeur soit hautement corrélé au « tumor budding » au niveau du front d'invasion du cancer. De plus, une association entre un nombre élevé de bourgeons tumoraux sur la biopsie pré-opératoire et l'existence d'embolies lymphatiques et de ganglions métastatiques a été observée.

Plus récemment, une autre étude, non encore publiée, ayant porté sur 215 malades atteints de CCR, a montré qu'il existait une corrélation entre le « tumor budding » intra-tumoral et le stade TNM, le grade de différenciation de la tumeur et les embolies vasculaires, ce qui rendrait intéressante la détermination du tumor budding intra-tumoral sur les biopsies pré-opératoires et aurait un rôle potentiel dans la prise en charge thérapeutique des malades à la fois en pré et post-opératoire [Karamitopoulou *et al.*, *soumis*].

Pour finir, en plus d'un rôle pronostique dans le CCR, le « tumor budding » pourrait avoir un rôle prédictif dans la réponse aux thérapies ciblées anti-EGFR chez les malades atteints d'un CCR métastatique. En effet, dans une étude rétrospective, l'existence d'un « tumor budding » élevé seul pouvait prédire la non-réponse au traitement dans 68 % des cas (même pourcentage de malades que *KRAS* seul) et dans 80 % des cas, en association avec le statut mutationnel de *KRAS* [41].

Les différentes méthodes de quantification du « tumor budding »

Pour qu'une variable puisse être déterminée en pratique quotidienne, sa méthode de détermination doit être facile et reproductible. À l'heure actuelle, la définition et la méthode d'évaluation du « tumor budding » ne sont pas standardisées. Le nombre de lames de tumeur utilisées pour l'évaluation varie. Tanaka *et al.* ont utilisé une seule lame HPS, correspondant au front d'infiltration maximal de la tumeur [33], tandis que Nakamura *et al.* ont utilisé les dimensions maximales de toute la tumeur [6]. La méthode de quantification du « tumor budding » varie également selon les études. Schématiquement, deux systèmes différents de scores ont été proposés : un système subjectif d'une part et un système quantitatif (donc plus objectif), d'autre part. Historiquement, le système proposé par Hase *et al.* était basé sur un score à deux niveaux (absent ou minime *versus* modéré ou important), fonction de l'aspect morphologique prédominant [1]. Dans le même esprit, le système proposé par Nakamura utilisait un score à 4 niveaux tenant compte de la proportion du front d'invasion de la tumeur présentant un phénomène de « tumor budding » : absence de « tumor budding », « tumor budding » minime si $< 1/3$ du front d'invasion est concerné par ce phénomène, « tumor budding » modéré (entre $1/3$ et $2/3$) et sévère ($> 2/3$) [6,42]. Parmi les systèmes quantitatifs, il faut citer les deux proposés par le groupe de Ueno, qui consistent à compter les îlots tumoraux dans les zones de plus haute densité de « tumor budding » repérées à faible grossissement sur les lames HPS : 1) en utilisant un objectif $\times 20$ ($0,785 \text{ mm}^2$), un « tumor budding » important est défini par la présence d'au moins 5 îlots tumoraux par champ ; ou 2) un objectif $\times 25$ ($0,385 \text{ mm}^2$) et un cut-off de 10 bourgeons tumoraux [28,43]. Enfin, il faut noter que dans certaines études, les méthodes de quantification du « tumor budding » ne sont pas toujours présentées en détail [44,45].

Théoriquement, la détermination du « tumor budding » se fait sur coloration standard (HPS). Cependant, une étude immunohistochimique à l'aide d'un anticorps anti-pan-cytokératine (anticorps anti-KL1 par exemple) peut être utile (Fig. 3), notamment

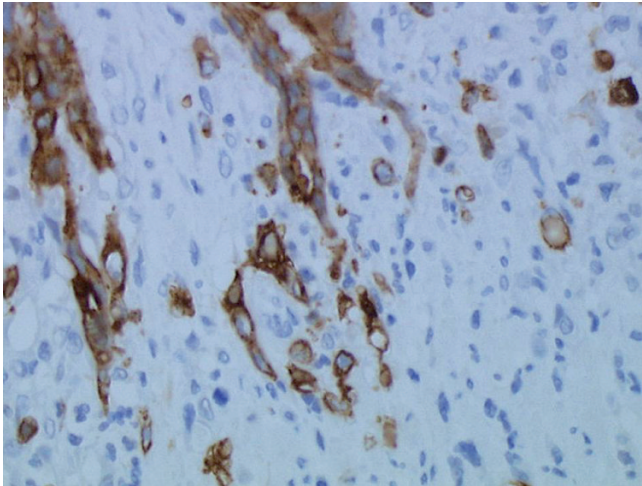


Figure 3

Étude immunohistochimique à l'aide de l'anticorps anti-KL1 permettant de mieux mettre en évidence des bourgeons tumoraux au niveau du front d'invasion du cancer (grossissement $\times 400$).

en cas de stroma très inflammatoire, car les cellules inflammatoires peuvent rendre difficile la visualisation des nids de cellules tumorales [11]. Ainsi, Prall *et al.* se sont aidés d'une étude immunohistochimique pour définir un « tumor budding » élevé [30] : plus de 25 bourgeons tumoraux à un objectif $\times 20$. Ce seuil, contrairement aux autres études citées précédemment, n'a pas été déterminé arbitrairement mais en s'aidant d'une analyse statistique.

Il est important de noter que l'intensité du « tumor budding » n'est pas forcément homogène au niveau du front d'invasion et qu'elle peut varier d'une lame à l'autre, d'où l'intérêt de l'apprécier au niveau de plusieurs lames. C'est cette méthode qui a été utilisée par l'équipe de Wang [36]. Trois lames différentes d'une même tumeur ont chacune été examinées dans 5 zones différentes à un fort grossissement ($\times 200$) (surface de 0,949 mm²). Les lames avaient initialement été regardées à faible grossissement ($\times 40$) afin de sélectionner celles avec la plus grande densité de bourgeons tumoraux. Le score de « tumor budding » correspondait à la moyenne de la somme de ces 15 zones. Dans la même étude, les auteurs proposaient une technique simplifiée, plus rapide, consistant à attribuer à chacune des 15 zones, non pas le nombre exact de bourgeons tumoraux, mais un score positif (si au moins un bourgeon tumoral était visible) ou nul. Une moyenne des 15 résultats obtenus était ensuite réalisée et un « tumor budding » élevé était la résultante d'un score positif dans plus de 50 % des 15 zones analysées.

La reproductibilité est un facteur important dans l'acceptation d'un facteur pronostique. Les rares études rapportées de reproductibilité de la détermination du « tumor budding » montrent qu'elle varie significativement, reflétant ainsi les différences dans la méthode de quantification du « tumor budding » [30,36,42]. Ueno *et al.* ont montré une relativement bonne concordance inter-observateur (valeur du kappa : 0,646) quand les malades étaient

classés en 4 groupes selon le degré de « tumor budding » [42]. Le taux de concordance augmente, avec un kappa à 0,84, lorsque les malades ne sont plus classés qu'en 2 groupes [42]. Le fait de s'aider d'une étude immunohistochimique à l'aide d'un anticorps anti-pan-cytokératine permet d'obtenir une bonne concordance intra-observateur (kappa : 0,874) [30]. Cependant, l'utilisation de l'immunohistochimie engendre un surcoût et un surcroît de temps, ce qui peut constituer un frein à son utilisation en pratique quotidienne. Il est envisageable de réserver l'utilisation de l'immunohistochimie aux cas difficiles.

La concordance inter-observateur était meilleure avec la technique de Wang simplifiée qu'avec la technique de Wang « classique » (kappa 0,75 *versus* 0,53) [36]. Cette technique simplifiée était également plus rapide (0,49 et 0,83 minute *versus* 1,3 et 1,7 minute, $p < 0,001$). De plus, il semble qu'il existe, comme pour beaucoup de techniques, une courbe d'apprentissage [36]. Après une période d'entraînement, la concordance inter-observateur était meilleure [36].

Ainsi, pour qu'un score soit applicable (et appliqué) en pratique quotidienne, il faut qu'il soit peu coûteux, rapide, d'apprentissage facile et d'intérêt pronostique. Le groupe de Berne, leader dans le domaine, propose de déterminer le « tumor budding » au niveau du front d'invasion de la tumeur, avec une méthode de comptage sur 10 grands champs (i.e à un grossissement $\times 400$), sur le bloc jugé le plus représentatif de la plus grande densité en bourgeons tumoraux (après examen préalable à faible grossissement de tous les blocs tumoraux) [46]. La détermination du « tumor budding » a été faite par 2 pathologistes expérimentés à partir d'une lame d'immunohistochimie (anticorps anti-AE1/AE3), sur une série de 215 CCR. Deux autres pathologistes ont mené cette étude sur un sous-groupe de 50 malades issus de cette cohorte. La corrélation inter-observateur s'est révélée excellente (kappa : 0,96). Cette étude a permis de confirmer la valeur pronostique du « tumor budding » dans le CCR, un nombre moyen > 10 bourgeons tumoraux pour 10 grands champs (« high grade budding ») étant significativement associé à un grade tumoral et à un stade TNM plus élevés, à une invasion vasculaire, à un front d'invasion de type infiltrant et à une survie diminuée. Les résultats de cette étude nous permettront peut-être de déboucher sur une proposition de méthode standardisée pour la détermination du « tumor budding » et son application en pratique clinique quotidienne.

■ Conclusion

L'ensemble de ces données semble suggérer l'intérêt de déterminer l'existence d'un « tumor budding » dans les CCR, en particulier de stade II, afin de reconnaître les malades à haut risque de récurrence après chirurgie curatrice, chez qui il peut être licite de proposer une chimiothérapie adjuvante.

Cependant, malgré la puissance pronostique du « tumor budding », son utilisation en pratique courante en pathologie chirurgicale colorectale reste limitée, notamment en raison du manque de standardisation de sa technique de quantification.

C'est pourquoi un effort important doit être fait dans ce sens, de la part des pathologistes, avant d'inclure ce critère dans la prise en charge thérapeutique des malades atteints de CCR.

Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et génétiques sous-tendant le phénomène de « tumor budding » permettra également de développer des cibles thérapeutiques potentielles.

Aucun lien d'intérêt déclaré

■ Références

- Hase K, Shatney C, Johnson D, Trollope M, Vierra M. Prognostic value of tumor "budding" in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1993;36:627-35.
- Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2005;5:744-9.
- Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. *Colon and Rectum. From American Joint Committee on Cancer staging manuel, seventh edition.* Eds Springer.
- Gill S, Loprinzi CL, Sargent DJ, et al. Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much? *J Clin Oncol* 2004;22:1797-806.
- Petersen VC, Baxter KJ, Love SB, Shepherd NA. Identification of objective pathological prognostic determinants and models of prognosis in Dukes' B colon cancer. *Gut* 2002;51:65-9.
- Nakamura T, Mitomi H, Kanazawa H, et al. Tumor budding as an index to identify high-risk patients with stage II colon cancer. *Dis Colon Rectum*. 2008;51:568-572.
- Shinto E, Mochizuki H, Ueno H, Matsubara O, Jass JR. A novel classification of tumour budding in colorectal cancer based on the presence of cytoplasmic pseudo-fragments around budding foci. *Histopathology* 2005;47:25-31.
- Gabbert H, Wagner R, Moll R, Gerharz CD. Tumor dedifferentiation: an important step in tumor invasion. *Clin Exp Metastasis* 1985;3:257-79.
- Prall F. Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology* 2007;50:151-62.
- Jass JR, Atkin WS, Cuzick J, et al. The grading of rectal cancer: historical perspectives and a multivariate analysis of 447 cases. *Histopathology* 1986;10:437-59.
- Compton CC. Optimal pathologic staging: defining stage II disease. *Clin Cancer Res* 2007;13:6862s-70s.
- Kalluri R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest* 2009;119:1417-9.
- Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, et al. Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs* 2005;179:56-65.
- Pyke C, Salo S, Ralfkiaer E, Rømer J, Danø K, Tryggvason K. Laminin-5 is a marker of invading cancer cells in some human carcinomas and is coexpressed with the receptor for urokinase plasminogen activator in budding cancer cells in colon adenocarcinomas. *Cancer Res* 1995;55:4132-9.
- Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 1997;11:3286-3305.
- Zlobec I, Lugli A. Epithelial mesenchymal transition and tumor budding in aggressive colorectal cancer: tumor budding as onco-target. *Oncotarget*. 2010;1:651-61.
- Guzinska-Ustymowicz K, Kemon A. Transforming growth factor beta can be a parameter of aggressiveness of pT1 colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2005; 28[11]:1193-5.
- Lugli A, Zlobec I, Minoo P, et al. Role of the mitogen-activated protein kinase and phosphoinositide 3-kinase/AKT pathways downstream molecules, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase, and phosphorylated AKT in colorectal cancer-a tissue microarray-based approach. *Hum Pathol*. 2006;37:1022-31.
- Coppola D, Hyacinthe M, Fu L, et al. CD44V6 expression in human colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 1998;29:627-35.
- Gosens MJ, van Kempen LC, van de Velde CJ, van Krieken JH, Nagtegaal ID. Loss of membranous Ep-CAM in budding colorectal carcinoma cells. *Mod Pathol*. 2007;20:221-32.
- Zlobec I, Güntherth U, Tornillo L, et al. Systematic assessment of the prognostic impact of membranous CD44v6 protein expression in colorectal cancer. *Histopathology* 2009;55:564-75.
- Hörkkö TT, Klintrup K, Mäkinen JM, et al. Budding invasive margin and prognosis in colorectal cancer--no direct association with beta-catenin expression. *Eur J Cancer* 2006;42:964-71.
- Li CY, Li BX, Liang Y, et al. Higher percentage of CD133+ cells is associated with poor prognosis in colon carcinoma patients with stage IIIB. *J Transl Med*. 2009;7:56.
- Hostettler L, Zlobec I, Terracciano L, Lugli A. ABCG5-positivity in tumor buds is an indicator of poor prognosis in node-negative colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol*. 2010;16:732-9.
- Jung A, Schrauder M, Oswald U, et al. The invasion front of human colorectal adenocarcinomas shows co-localization of nuclear beta-catenin, cyclin D1, and p16INK4A and is a region of low proliferation. *Am J Pathol* 2001;159:1613-7.
- Jass JR, Barker M, Fraser L, et al. APC mutation and tumour budding in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 2003;56:69-73.
- Yoshida K, Yoshimatsu K, Otani T, Yokomizo H, Ogawa K. The depth of tumor invasion beyond the outer border of the muscularis propria as a prognostic factor for T3 rectal/rectosigmoid cancer. *Anticancer Res*. 2008;28:1773-8.
- Ueno H, Mochizuki H, Hashiguchi Y, et al. Risk factors for an adverse outcome in early invasive colorectal carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;127:385-94.
- Kazama S, Watanabe T, Ajioka Y, Kanazawa T, Nagawa H. Tumour budding at the deepest invasive margin correlates with lymph node metastasis in submucosal colorectal cancer detected by anticytokeratin antibody CAM5.2. *Br J Cancer*. 2006;94:293-8.
- Prall F, Nizze H, Barten M. Tumour budding as prognostic factor in stage I/II colorectal carcinoma. *Histopathology* 2005;47:17-24.
- Lugli A, Karamitopoulou E, Panayiotides I, et al. CD8+ lymphocytes/ tumour-budding index: an independent prognostic factor representing a 'pro-/anti-tumour' approach to tumour host interaction in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2009;101:1382-92.
- Ishikawa, Akishima-Fukasawa Y, Ito K, Akasaka Y, Yokoo T, Ishii T; Toho Study Group for Cancer Biological Behavior. Histopathologic determinants of regional lymph node metastasis in early colorectal cancer. *Cancer* 2008 15;112:924-33.
- Tanaka M, Hashiguchi Y, Ueno H, Hase K, Mochizuki H. Tumor budding at the invasive margin can predict patients at high risk of recurrence after curative surgery for stage II, T3 colon cancer. *Dis Colon Rectum*. 2003;46:1054-9.

34. Guzińska-Ustymowicz K. The role of tumour budding at the front of invasion and recurrence of rectal carcinoma. *Anticancer Res* 2005;25:1269-72.
35. Ueno H, Price AB, Wilkinson KH, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. A new prognostic staging system for rectal cancer. *Ann Surg* 2004;240:832-9.
36. Wang LM, Kevans D, Mulcahy H, et al. Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 2009;33:134-41.
37. Sy J, Fung CL, Dent OF, Chapuis PH, Bokey L, Chan C. Tumor budding and survival after potentially curative resection of node-positive colon cancer. *Dis Colon Rectum*. 2010;53:301-7.
38. Prall F, Ostwald C. High-degree tumor budding and podia-formation in sporadic colorectal carcinomas with K-ras gene mutations. *Hum Pathol*. 2007;38:1696-702.
39. Zlobec I, Lugli A, Baker K, et al. Role of APAF-1, E-cadherin and peritumoral lymphocytic infiltration in tumour budding in colorectal cancer. *J Pathol*. 2007 ;212:260-8.
40. Morodomi T, Isomoto H, Shirouzu K, Kakegawa K, Irie K, Morimatsu M. An index for estimating the probability of lymph node metastasis in rectal cancers. Lymph node metastasis and the histopathology of actively invasive regions of cancer. *Cancer* 198;63:539-43.
41. Zlobec I, Molinari F, Martin V, et al. Tumor budding predicts response to anti-EGFR therapies in metastatic colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol* 2010;16:4823-31.
42. Nakamura T, Mitomi H, Kikuchi S, Ohtani Y, Sato K. Evaluation of the usefulness of tumor budding on the prediction of metastasis to the lung and liver after curative excision of colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2005;52:1432-5.
43. Ueno H, Murphy J, Jass JR, et al. Tumour "budding" as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology* 2002;40:127-132.
44. Okuyama T, Nakamura T, Yamaguchi M. Budding is useful to select high-risk patients in stage II well-differentiated or moderately differentiated colon adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum* 2003;46:1400-6.
45. Okuyama T, Oya M, Ishikawa H. Budding as a useful prognostic marker in pT3 well- or moderately-differentiated rectal adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 2003;83:42-7.
46. Karamitopoulou E, Zlobec I, Kölzer V, Kondi-Pafiti A, Patsouris ES, Gennatas K, Lugli A. Proposal for a 10-high-power-fields scoring method for 46. Karamitopoulou E, Zlobec I, Kölzer V, Kondi-Pafiti A, Patsouris ES, the assessment of tumor budding in colorectal cancer. *Mod Pathol* 2012;Sep 28. doi: 10.1038/modpathol.2012.155. [Epub ahead of print]