



UNIVERSITÉ DE LILLE
FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG
Année : 2018

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN MÉDECINE

**Etude du budding tumoral et de la transition épithélio-
mésenchymateuse dans l'adénocarcinome canalaire infiltrant du
pancréas**

Présentée et soutenue publiquement le 08 juin 2018 à 16 h
au Pôle Formation
Par Marie JEANNEAU

JURY

Présidente :

Madame le Professeur Emmanuelle LETEURTRE

Assesseurs :

Madame le Professeur Stéphanie TRUANT

Monsieur le Docteur Jérôme CROS

Directrice de Thèse :

Madame le Docteur Florence RENAUD

AVERTISSEMENT

La faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

AJCC : american joint committee on cancer

BT : budding tumoral

CAF : cancer associated fibroblasts

CAP : college of American pathologists

CCR : cancer colorectal

CK : cytokératines

CSC : cellule souche cancéreuse

ESMO : European society of medical oncology

FT : facteur de transcription

FOLFIRINOX : acide folinique, fluorouracile, irinotecan, oxaliplatine

HES : hémalun éosine safran

HPF : high power field

ICC : coefficient de corrélation intra-classe

ITBCC : international tumor budding consensus conference

PDAC : adénocarcinome canalaire infiltrant du pancréas

RCP : Royal college of pathologists

SFP : société française de pathologie

TEM : transition épithélio-mésenchymateuse

TMA : tissue microarray

TME : transition mésenchymato-épithéliale

TNM : tumor-node-metastasis

UICC : union for international cancer control

ZEB1 : zinc finger E-box binding homeobox 1

Table des matières

RESUME	13
INTRODUCTION.....	14
MATERIELS ET METHODES.....	21
1. POPULATION ET STRATEGIE D'ETUDE	21
2. EVALUATION DU BUDDING TUMORAL	24
2.1. Méthode 1 : selon Karamitopoulou et coll.	24
2.2. Méthode 2 : selon l'ITBCC	25
3. ETUDE IMMUNOHISTOCHEMIE	27
4. EVALUATION DE LA TEM : E-CADHERINE / VIMENTINE / ZEB1	28
5. EVALUATION DE L'INDEX DE PROLIFERATION KI67	29
6. ANALYSES STATISTIQUES	30
RESULTATS.....	31
1. CARACTERISTIQUES DE LA POPULATION ETUDIEE	31
2. EVALUATION DU BUDDING TUMORAL	33
2.1. Méthode 1 : selon Karamitopoulou et coll.	33
2.2. Méthode 2 : selon l'ITBCC	37
3. EVALUATION DE LA TEM : E-CADHERINE / VIMENTINE / ZEB1	37
4. CORRELATION ENTRE LE BUDDING TUMORAL ET LA TEM	41
4.1. Méthode 1 : selon Karamitopoulou et coll.	41
4.2. Méthode 2 : selon l'ITBCC	42
5. CORRELATION DU BT ET DE LA TEM AUX AUTRES PARAMETRES CLINICO-PATHOLOGIQUES ET A LA SURVIE	45
6. EVALUATION DE L'INDEX DE PROLIFERATION KI67	46
DISCUSSION.	50
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	61
RÉFÉRENCES.....	62
ANNEXE	71

RESUME

Introduction : alors que l'évaluation du budding tumoral (BT) est standardisée et recommandée en routine dans l'adénocarcinome colorectal pour lequel il a une valeur pronostique péjorative, sa valeur pronostique dans l'adénocarcinome canalaire infiltrant du pancréas (PDAC) est controversée. Les résultats des études antérieures montrent une association variable au phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), et sont difficiles à extrapoler en raison 1- de populations hétérogènes quant aux traitements reçus 2- de méthodes d'évaluation hétérogènes pour le BT et la TEM. Les objectifs de notre étude étaient de comparer deux méthodes d'évaluation du BT dans le PDAC puis de corrélérer les résultats au phénotype TEM et au pronostic sur une population homogène de patients opérés sans traitement néoadjuvant.

Méthode : l'analyse a porté sur une série rétrospective monocentrique de 75 patients. Le BT était évalué sur lames entières de pièces opératoires par coloration HES selon deux méthodes, de façon indépendante par 2 pathologistes. La méthode 1 était réalisée sur 10 HPF au x40 (Karamitopoulou et coll. 2013), la méthode 2 selon la conférence internationale de consensus sur 1 HPF au x20 (ITBCC, Lugli et coll. 2017). Le phénotype épithélial ou mésenchymateux était déterminé par étude immunohistochimique, en péri et intra-tumoral, par E-Cadhérine, vimentine et ZEB1. Les résultats ont été corrélés aux paramètres clinico-pathologiques, à la survie globale et sans récurrence.

Résultats : le BT se répartissait de la façon suivante : selon la méthode 1 : bas grade 56% et haut grade 44%, selon la méthode 2 : bas grade 47%, grade intermédiaire 37% et haut grade 16%. La méthode 1, était fastidieuse et associée à une mauvaise concordance inter-observateur. Au contraire, la méthode 2 était simple à réaliser et caractérisée par une excellente concordance inter-observateur. Un phénotype mésenchymateux était observé dans 52% des PDAC. En analyse univariée, le BT de haut grade, selon les 2 méthodes, était significativement associé au phénotype mésenchymateux ($p=0,006$ et $p=0,004$, respectivement), mais pas aux autres paramètres clinico-pathologiques ni à la survie.

Conclusion : notre étude montre que le budding tumoral peut être évalué de façon simple et reproductible selon la méthode de l'ITBCC dans l'adénocarcinome du pancréas. Dans notre expérience, le haut grade de budding est un reflet du phénotype mésenchymateux mais n'a pas d'impact pronostique pour les patients opérés sans traitement néoadjuvant.

Mots clés : adénocarcinome canalaire infiltrant du pancréas, budding tumoral, transition épithélio-mésenchymateuse, marqueur pronostique, chimiorésistance

INTRODUCTION

L'adénocarcinome du pancréas est caractérisé par un pronostic particulièrement sombre, avec un taux de survie à 5 ans de 8% (1). Ceci s'explique par une découverte à un stade localement avancé ou métastatique dans 80% des cas (2), un fort potentiel métastatique et une importante chimio et radiorésistance (3–5). En France, l'incidence est actuellement de 12 000 nouveaux cas par an (6). Le taux de décès par cancer du pancréas est en permanente augmentation et il deviendra selon les estimations la seconde cause de décès par cancer en 2030, notamment aux Etats-Unis (1,7).

Le seul traitement curatif à ce jour est la résection chirurgicale, mais uniquement 20% des patients présentent une forme localisée au diagnostic, éligible à un traitement chirurgical (8). La séquence thérapeutique actuelle des tumeurs résécables repose sur la chirurgie suivie d'une chimiothérapie adjuvante (gemcitabine, capecitabine, protocole FOLFIRINOX associant acide folinique, fluorouracile, irinotecan et oxaliplatine), la médiane de survie est alors de 26 mois avec une survie à 5 ans de 30% (9–11). Toutefois, tous les patients n'ont pas accès à cette séquence, notamment en raison d'un mauvais état général ou de complications post-opératoires. De plus, l'efficacité de la chimiothérapie est limitée du fait de la forte chimiorésistance de l'adénocarcinome canalaire infiltrant du pancréas (PDAC) (3).

Plusieurs études rétrospectives ont suggéré un bénéfice des traitements néoadjuvants par radio-chimiothérapie ou chimiothérapie seule sur la survie globale (12), permettant une amélioration de la résécabilité (13,14), et un meilleur contrôle de

l'évolution loco-régionale. Ainsi, des essais prospectifs randomisés européens de phase II (15,16) évaluent actuellement l'intérêt des traitements néoadjuvants, qui pourraient devenir le nouveau standard de traitement des PDAC résécables ou à la limite de la résécabilité (11,13). Les thérapies ciblées ont montré des résultats décevants liés à une importante hétérogénéité tumorale et à l'abondance du stroma, comportant de nombreux types cellulaires, qui limitent l'accessibilité de la tumeur aux traitements (10,11).

Après une résection chirurgicale, plusieurs facteurs sont reconnus comme des facteurs pronostiques : la taille tumorale, la présence de métastase ganglionnaire, le stade pTNM et des marges saines (17–20). Les progrès récents de la biologie ont permis de faire émerger des classifications basées sur le transcriptome (6,21–25), mettant en évidence plusieurs sous-types dont le plus péjoratif est appelé « basal-like ». Leur application en pratique diagnostique courante reste aujourd'hui limitée notamment en raison de l'absence de marqueurs simples pour mettre en évidence ces sous-types. Il paraît ainsi nécessaire et urgent d'identifier des marqueurs de stratification pronostique afin de mieux cibler les patients qui pourront bénéficier d'une intensification thérapeutique. Parmi eux le budding tumoral, qui a fait l'objet de nombreuses études dans le cancer colorectal (CCR) ces vingt dernières années, est un potentiel marqueur d'intérêt pour le cancer du pancréas.

Le budding tumoral (BT), qui peut se traduire en français par bourgeonnement tumoral, est souvent considéré comme un marqueur histopathologique d'agressivité tumorale. Il a été initialement décrit par l'équipe de Imai T. et coll. en 1954 comme une « excroissance (« sprouting ») » au front d'invasion tumoral. Le BT est défini par la présence d'une cellule ou d'un amas de 2 à 4 cellules tumorales. Il s'observe

préférentiellement au front d'invasion tumoral (budding péri-tumoral) mais peut être observé au cœur de la tumeur (budding intra-tumoral) (26).

La valeur pronostique péjorative du BT est démontrée dans le CCR, pour lequel il est également associé à un stade pTNM plus élevé, à un grade tumoral péjoratif et à la présence d'emboles vasculaires tumoraux (27–30). Le BT correspondrait à une sous-population tumorale agressive capable de détruire le tissu conjonctif péri-tumoral, d'échapper à la réponse de l'hôte, puis d'envahir les vaisseaux, ainsi associée à une dissémination locale et à distance. Dans le CCR de stade I, le BT est l'un des arguments qui justifient une résection chirurgicale (31). Les stades II avec BT ont une survie sans récurrence plus courte, ce qui justifie l'indication d'un traitement adjuvant (32). De plus, la détection d'un BT dans le CCR sur des biopsies pré-opératoires pourrait permettre de cibler les patients ayant besoin d'un traitement néoadjuvant (33,34). L'évaluation du BT dans le CCR est standardisée depuis la conférence de consensus internationale de 2016 (ITBCC : international tumor budding consensus conference) (31). La description du BT dans les comptes-rendus d'anatomo-pathologie est désormais recommandée en routine pour le CCR par plusieurs sociétés savantes telles que l'American joint committee on cancer (AJCC, 8ème édition) (35), le collège des pathologistes américains (CAP, college of American pathologists) (36), la société européenne d'oncologie médicale (ESMO, European society of medical oncology) (37), le collège des pathologistes britanniques (RCP, royal college of pathologists) et par la société française de pathologie pour les lésions infiltrantes précoces traitées par exérèse endoscopique (38).

En dehors du CCR, le BT a été étudié dans d'autres carcinomes du tractus gastro-intestinal notamment l'œsophage, l'estomac, l'ampoule de Vater et le

pancréas. Il semble globalement être un marqueur de mauvais pronostic, toutefois les méthodes d'évaluation sont nombreuses et non standardisées (26).

Dans le PDAC, l'évaluation du BT ne fait pas partie du compte-rendu d'anatomo-pathologie et n'est pas recommandée par les sociétés savantes bien qu'il ait été suggéré comme marqueur d'agressivité ou facteur pronostique péjoratif dans plusieurs études (39–46). Son intérêt pronostique n'est en fait pas clairement démontré en raison notamment d'une absence de standardisation des méthodes d'évaluation et de populations d'étude hétérogènes, ce qui rend l'extrapolation des résultats délicate. En effet, les méthodes d'évaluation rapportées sont diverses et hétérogènes sur les paramètres suivants : analyse par coloration hémalum éosine safran (HES) et/ou immunohistochimie avec les cytokératines, définition de la zone à analyser, nombre de champ(s) sur le(s)quel(s) réaliser le compte, surface de champ etc. (annexe 1). De plus, les séries rapportées sont globalement hétérogènes sur la population d'étude quant aux traitements reçus. Certaines études portent sur des patients ayant reçu de la chimiothérapie néoadjuvante (44), et parfois l'administration d'une éventuelle chimiothérapie néoadjuvante n'est pas clairement précisée (41,43,46). La tumeur résiduelle post-chimiothérapie serait riche en cellules tumorales chimiorésistantes exprimant les marqueurs mésenchymateux (4,5,47), dans lesquelles le BT a pu être modifié ou acquis sous traitement. D'autres études se sont intéressées au BT « inné » dans le PDAC chez des patients naïfs de traitement néoadjuvant, soit sur un secteur tumoral réduit du fait d'une analyse par tissu microarray (TMA) (45,48), soit sur lames entières mais avec des critères d'évaluation hétérogènes (39,40,42,43,46). En ce qui concerne les rares études rétrospectives réalisées sur une population homogène sans traitement d'induction, les résultats sont contradictoires. Ainsi Kohler et coll. (39) ne montrent pas d'impact pronostique du BT

alors que l'équipe d'Eva Karamitopoulou (42) a tout récemment rapporté un impact pronostique péjoratif du budding de haut grade déterminé selon la méthode de l'ITBCC (31). Devant ces résultats discordants, il nous a semblé nécessaire d'évaluer dans un premier temps la reproductibilité des méthodes d'évaluation du BT déjà rapportées dans le PDAC, au sein d'une population homogène.

Sur le plan physiopathologique, le BT est souvent considéré comme la traduction morphologique du phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (49,50). La TEM est un phénomène initialement décrit dans le développement embryonnaire et la cicatrisation, qui permettrait le passage d'une cellule d'un phénotype épithélial à un phénotype mésenchymateux, via l'expression de facteurs de transcription, tels que *ZEB1*, *SNAIL*, *SLUG* et *TWIST* qui seraient des répresseurs transcriptionnels du gène *CDH1* codant pour la E-Cadhérine. Les cellules tumorales perdraient alors leurs caractéristiques épithéliales telles que les jonctions intercellulaires, la polarité apico-basale, l'expression membranaire de la E-Cadhérine et obtiendraient à la place des caractéristiques mésenchymateuses telles qu'une morphologie fusiforme « fibroblastoïde » et l'expression de marqueurs mésenchymateux, par exemple la vimentine. La TEM pourrait induire des phénotypes cellulaires distincts dans les cellules tumorales épithéliales et stromales. Ce phénomène serait notamment à l'origine d'une sous-population tumorale aux propriétés de cellules souches, particulièrement mobiles ce qui faciliterait leur passage dans la circulation sanguine et la formation de localisations secondaires (51,52). A leur arrivée dans l'organe à distance, les cellules tumorales mésenchymateuses redeviendraient alors épithéliales grâce au phénomène inverse de transition mésenchymato-épithéliale (TME) (47,53,54). Ces cellules souches cancéreuses acquerraient un phénotype anti-apoptotique et des capacités accrues

de réparation de l'ADN double brin à l'origine de leur chimiorésistance (55–57). De plus, lorsque les cellules tumorales devenues mésenchymateuses par phénomène de TEM sont en migration, les modifications de leur cytosquelette seraient incompatibles avec leur capacité de division cellulaire (58,59), ce qui expliquerait leur chimiorésistance accrue (60).

L'association entre BT et TEM a été particulièrement décrite dans le CCR dans lequel des cellules dédifférenciées au front d'invasion seraient caractérisées par une altération des propriétés d'adhésion de la protéine E-Cadhérine, une translocation nucléaire de la β -Caténine, ainsi qu'une perte de la polarité cellulaire avec l'acquisition d'une morphologie fusiforme (61). Dans le PDAC, le rôle de la TEM dans le processus métastatique et dans la chimiorésistance a fait l'objet de nombreuses études (5,47,56,60,62) et de controverses (63). Plusieurs équipes ont étudié son impact pronostique (39,40,48,64), mais ces résultats sont peu extrapolables car les méthodes pour évaluer la TEM sont hétérogènes quant aux anticorps utilisés, et reposent sur des seuils de définition arbitraire, et des scores complexes non adaptés à la routine. De plus, son évaluation est rendue difficile par l'importante hétérogénéité intra-tumorale du PDAC, notamment au sein du stroma tumoral, qui associe plusieurs types cellulaires tels que des fibroblastes associés au cancer (CAF), des constituants de la matrice extra-cellulaire, des cellules inflammatoires (65). Ainsi, dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la TEM sur le plan morphologique et phénotypique, et avons évalué son lien avec le BT sur cette même série de PDAC.

Notre hypothèse de travail était de confirmer la valeur pronostique péjorative du BT dans notre série de PDAC, puis d'évaluer la TEM et le lien entre ces deux paramètres.

Au total, devant l'enjeu que représente l'identification de marqueurs histopronostiques simples dans le PDAC et les résultats contradictoires publiés dans la littérature sur l'impact pronostique du BT et sur son lien avec la TEM, les objectifs de notre étude étaient :

1- de comparer deux méthodes d'évaluation du budding tumoral dans le PDAC.

2- puis de corrélérer les résultats au phénotype TEM, aux données cliniques et anatomo-pathologiques afin d'évaluer son intérêt pronostique sur une population homogène de patients opérés sans traitement néoadjuvant.

MATERIELS ET METHODES

1. Population et stratégie d'étude

Les patients opérés par duodéno-pancréatectomie ou spléno-pancréatectomie caudale pour adénocarcinome canalaire infiltrant du pancréas dans le service de Chirurgie Digestive et Transplantation du CHRU de Lille (Professeur FR Pruvot, Professeur S Truant), en France, entre 2000 et 2015 et n'ayant pas reçu de traitement néoadjuvant, ont été inclus dans l'étude de façon rétrospective et consécutive. Au total 93 patients n'ayant pas reçu de chimiothérapie ou de radiothérapie néoadjuvantes avaient été opérés pendant la période d'inclusion.

Toutes les lames colorées par HES intéressant la tumeur sur la pièce opératoire, pour chacun des patients, ont été désarchivées (deux à sept lames par patient). Elles étaient relues par un pathologiste (MJ) et une lame représentative de la tumeur était sélectionnée. Le bloc paraffiné correspondant était désarchivé à l'Institut de Pathologie du CHRU de Lille. Quatorze patients n'ont pas pu être inclus dans l'étude car les blocs paraffinés n'ont pas été retrouvés. De plus, une métastase d'un cancer du sein, un adénocarcinome à cellules indépendantes et deux carcinomes adéno-squameux ont été exclus.

Les informations cliniques et anatomo-pathologiques recueillies pour tous les patients étaient l'âge au diagnostic, le sexe, le type de chirurgie, la date d'intervention, la taille tumorale, le nombre et le statut métastatique des ganglions

régionaux, le stade tumoral selon l'UICC (pTNM, 7^{ème} édition), la présence d'embolies vasculaires tumorales, la présence d'engainements périnerveux tumorales, l'état des marges de résection chirurgicale (duodénale, gastrique, biliaire, pancréatique, veineuse/artérielle, postérieure), la date de chimiothérapie adjuvante, le type de chimiothérapie, la date de récurrence afin de calculer la survie sans récurrence, et la date du décès afin de calculer la survie globale. Lorsque le patient n'était pas décédé, nous avons recueilli la date des dernières nouvelles. Le stade pTNM selon la 8^{ème} édition UICC a été déduit de la taille tumorale et du statut ganglionnaire quand ces données étaient disponibles dans les comptes rendus anatomo-pathologiques de chaque patient.

Les patients étaient revus en consultation pour évaluation clinique avec un bilan biologique à 1 mois de la chirurgie puis tous les 3 mois pendant 2 ans, puis tous les 6 mois pendant 3 ans puis tous les ans. Un scanner thoraco-abdomino-pelvien était réalisé une fois par an. Les données cliniques ont été obtenues en collaboration avec le service de Chirurgie Digestive et Transplantation (Professeur FR Pruvot, Professeur S Truant).

La stratégie d'étude est représentée sur la figure 1. Les analyses histologiques ont été réalisées en aveugle des données cliniques.

Cette étude a été approuvée par le Comité de Protection des Personnes Nord-Ouest (HP 16/46) et les données collectées ont fait l'objet d'une déclaration à la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés de France (CNIL, DEC16-279).

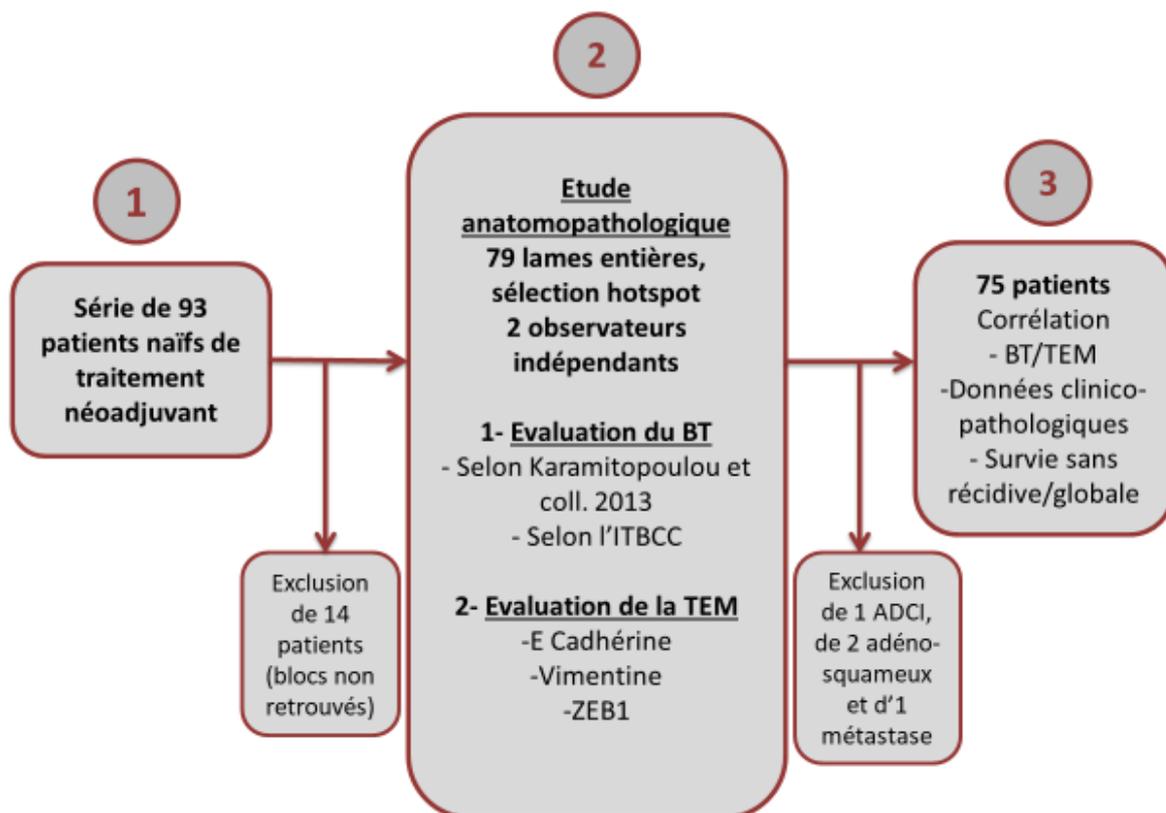


Figure 1 : stratégie d'étude

Le schéma représente notre stratégie d'étude en 3 étapes. Etape 1 : sélection de la population d'étude. Etape 2 : étude anatomopathologique : évaluation du budding tumoral (BT) selon deux méthodes et évaluation immunohistochimique des marqueurs de TEM. Etape 3 : corrélation des résultats obtenus aux données clinico-pathologiques et à la survie.

2. Evaluation du Budding Tumoral

Le BT était défini par la présence d'une cellule tumorale ou d'un amas non glandulaire de 4 cellules tumorales ou moins, isolés dans le stroma tumoral, aussi bien au centre qu'en périphérie de la tumeur. Il était évalué dans un premier temps selon une méthode utilisée dans plusieurs études antérieures menées sur l'adénocarcinome du pancréas (41,43) et initialement rapportée pour le CCR (66). Le BT était dans un second temps évalué d'après les recommandations établies par le consensus international de 2016 pour le CCR (31). Chaque méthode a été réalisée de façon indépendante.

2.1. Méthode 1 : selon Karamitopoulou et coll.

Les lames HES de chaque patient étaient relues et un « hot spot » était sélectionné, dans lequel le compte était réalisé par deux pathologistes (MJ, FR) de façon indépendante. Cette évaluation était réalisée à la fois sur les lames HES et sur les lames immunomarquées avec les cytokératines, pour une surface de champ de 0,38 mm², sur 10 champs consécutifs à l'objectif x40. La cytokératine AE1/AE3 (CKAE1/AE3) marquait de façon intense le cytoplasme des cellules tumorales. Le BT était ensuite classé selon les seuils publiés précédemment en bas grade (≤ 10 BT/10HPF) ou haut grade (> 10 BT/10HPF) (39,41,43,45,48) sur HES et lames marquées par la CKAE1/AE3, de façon indépendante. Le chiffre ensuite obtenu était normalisé pour une surface de 0,49 mm² (41,66). Tous les cas ont fait l'objet d'une

troisième lecture au microscope multi-têtes. La morphologie du budding de type épithélioïde ou fusiforme était également notée.

2.2. Méthode 2 : selon l'ITBCC

Sur l'HES le plus représentatif du BT, une lecture a été réalisée au grossissement x10 sur au moins 10 HPF en péri et intra-tumoral, afin de sélectionner le « hot spot » de BT, dans lequel le nombre de BT a été établi sur un champ au x20 (surface de champ de 0,785 mm² après normalisation). Le BT était ensuite classé en trois catégories selon les recommandations ITBCC (31) : bas grade de budding (BD 1) : 0-4, grade intermédiaire (BD 2) : 5-9 et haut grade (BD 3) : ≥10.

La figure 2 récapitule les deux méthodes de compte du BT utilisées dans l'étude.

**Méthode 1 selon Karamitopoulou
(Karamitopoulou et al 2013)**

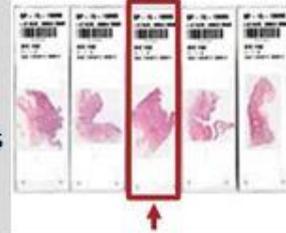
**Méthode 2 selon ITBCC
(Lugli et al 2017)**

Eye-piece FN Diameter (mm)	Specimen Area (mm ²)	Normalization Factor
18	0.636	0.810
19	0.709	0.903
20	0.785	1.000
21	0.866	1.103
22	0.950	1.210
23	1.039	1.323
24	1.131	1.440
25	1.227	1.563
26	1.327	1.690

Définition de la surface de champ au x20

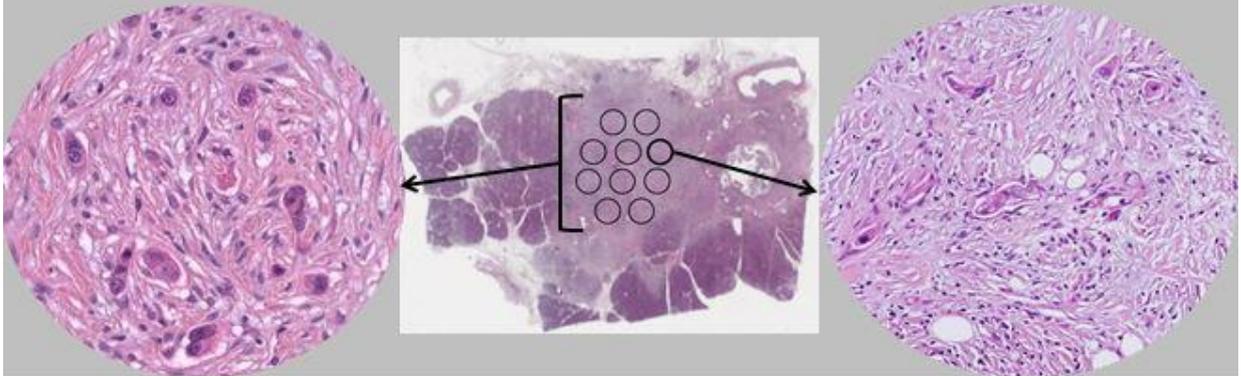
Sélection de l'HES d'intérêt

Lame avec le plus grand nombre de buds



Compte du nombre de buds sur 10 champs consécutifs au x40 (surface de 0,49 mm²)

Sélection du hot spot de buds sur 10 champs au x10, puis **compte du nombre de buds** sur un champ au x20.



Normalisation pour une surface de 0,785 mm²

Classer le budding

- Bas grade ≤ 10 buds
- Haut grade > 10 buds

Classer le budding

- Bas grade (BD1) 0-4 Buds
- Grade intermédiaire (BD2) 5-9 Buds
- Haut grade (BD3) ≥ 10 Buds

Figure 2 : méthodes utilisées pour évaluer le budding tumoral dans notre étude.

1^{ère} colonne : méthode selon Karamitopoulou et coll. 2013, compte du BT sur 10 champs au x40 ; 2nd colonne : méthode selon l'ITBCC 2016, compte du BT sur 1 champ au x20

3. Etude immunohistochimique

Pour chaque tumeur, les lames HES ont fait l'objet d'une relecture anatomo-pathologique. La zone qui comportait la plus haute densité (« hotspot ») de BT (cf. définition paragraphe 2.2) était sélectionnée. Les blocs paraffinés correspondants étaient coupés à 4 µm manuellement en utilisant un microtome (Leica RM2245). Les coupes obtenues étaient immunomarquées avec les anticorps anti-cytokératine AE1/AE3 (DAKO-M3515 ; 1/100), vimentine (VENTANA ROCHE-790-2917 ; Prédilué), E-cadhérine (INVITROGEN-180223 ; 1/25), ZEB1 (NOVUSbio-NBP2-23484 ; 1/250) et Ki67 (DAKO-M7240 ; 1/30) de façon automatisée (automate BenchMark Ultra, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA).

L'ensemble des échantillons était déparaffiné (EZ prep) puis réhydraté. Les peroxydases endogènes étaient bloquées par l'ajout H₂O₂ pendant 4 minutes. L'incubation de l'anticorps primaire était réalisée à une température de 37°C pendant 32 ou 44 minutes. La révélation du complexe antigène-anticorps s'effectuait de façon indirecte à l'aide du kit ultraVIEW Universal DAB Detection (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) associant un anticorps anti-Ig de lapin/ anti-IgG de souris/anti-Ig M de souris à un multimère marqué par la peroxydase de raifort, permettant ainsi d'amplifier le signal. L'incubation avec l'anticorps secondaire durait 8 minutes à une température de 37°C. Enfin le substrat chromogène, la diaminobenzidine, était ajoutée, permettant de visualiser la formation de complexe antigène-anticorps par une couleur brune, grâce à une réaction enzymatique avec la peroxydase de raifort. Entre chaque étape du pré-traitement et de la réaction immunoenzymatique, la lame était rincée par un tampon (reaction buffer) et à chaque

étape de l'huile de paraffine était déposée pour éviter l'évaporation du liquide sur la lame. Une contre-coloration était réalisée par l'hématoxyline puis les lames rincées et une post contre-coloration au bluing reagent (solution aqueuse de carbonate de lithium tamponné) était effectuée. La négativité de chaque anticorps était vérifiée en réalisant une omission de l'anticorps primaire.

4. Evaluation de la TEM : E-cadhérine / Vimentine / ZEB1

L'expression des marqueurs de TEM était évaluée de façon semi-quantitative par deux pathologistes, sur lame entière. Dans la tumeur, un marquage aberrant pour la E-cadhérine était défini par la perte du marquage membranaire en cadre, ou par l'apparition d'un marquage cytoplasmique sans marquage membranaire. Un marquage aberrant pour la vimentine était défini par un marquage cytoplasmique des cellules épithéliales tumorales. Un marquage aberrant de ZEB1 était défini par un marquage nucléaire des cellules épithéliales tumorales. Un marquage ambigu de ZEB1 était défini par un marquage uniquement de la membrane nucléaire et/ou par un marquage cytoplasmique, sans marquage nucléaire. Le marquage ambigu était considéré comme positif. Pour chaque anticorps, un marquage aberrant était présent s'il intéressait au moins 10% des cellules tumorales. Pour l'interprétation de l'anticorps anti-E-Cadhérine, les cellules épithéliales constituant les îlots pancréatiques normaux ou les massifs de cellules tumorales, constituaient des témoins internes positifs. Pour l'anticorps anti-vimentine, les cellules musculaires lisses des vaisseaux, les fibroblastes et pour l'anticorps anti-ZEB1, les cellules endothéliales et les fibroblastes constituaient des témoins positifs internes.

L'expression de la E-cadhérine était évaluée d'une part sur la tumeur principale et d'autre part sur le BT. L'expression de la vimentine et celle de ZEB1 étaient évaluées sur la tumeur principale.

La tumeur était ensuite classée selon un phénotype mésenchymateux ou épithélial, le phénotype mésenchymateux complet était défini par la présence d'une expression aberrante des trois marqueurs réunis (perte de la E-cadhérine, expression de la vimentine et de ZEB1), le phénotype mésenchymateux incomplet était défini par la présence d'au moins un marqueur aberrant parmi la E-Cadhérine, la vimentine et ZEB1. Le phénotype épithélial était défini par l'absence d'expression aberrante de ces trois marqueurs (E-cadhérine conservée, vimentine et ZEB1 négatifs).

5. Evaluation de l'index de prolifération Ki67

L'index de prolifération Ki67 était évalué de manière semi-quantitative pour chaque patient par estimation du pourcentage de cellules tumorales marquées sur une lame représentative de la tumeur.

6. Analyses statistiques

Les paramètres catégoriels ont été décrits par la fréquence et le pourcentage. Les paramètres continus ont été exprimés par la médiane et l'étendue. La distribution des paramètres quantitatifs a été étudiée graphiquement et par le test de Shapiro-Wilk.

La concordance inter-observateur a été évaluée par le coefficient de corrélation intra-classe (ICC).

Pour la méthode ITBCC, les analyses statistiques ont été réalisées en regroupant les grades intermédiaires et haut grade (BD2/BD3).

L'association entre le BT et la présence d'un phénotype mésenchymateux a été évaluée par le test du Chi-deux ou le test exact de Fisher. Les mêmes tests ont été utilisés pour évaluer le lien entre le BT et les facteurs pronostiques connus (stade pTNM selon la 7^{ème} et 8^{ème} édition, le statut ganglionnaire métastatique, la présence d'emboles vasculaires tumoraux, d'engainements périnerveux tumoraux).

L'impact du BT sur la survie globale et la survie sans récurrence a été étudié par le test du Log-rank et la méthode de Kaplan-Meier.

L'association entre l'index de prolifération (Ki67) et les marqueurs de la TEM a été évaluée par le test U de Mann-Whitney.

Le niveau de significativité a été fixé à 5%. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel SAS (SAS Institute version 9.4) et du logiciel GraphPad Prism v7.

RESULTATS

1. Caractéristiques de la population étudiée

L'âge médian dans la cohorte était de 65 ans. Il y avait une prédominance masculine (homme, n=40 ; femme, n=35). Douze patients (15%) ont été opérés par spléno-pancréatectomie caudale et 63 (84%) par duodéno-pancréatectomie céphalique. Des embolies vasculaires et des engainements péri nerveux tumoraux étaient observés dans 58% et 90% des cas, respectivement. La majorité des cancers étaient moyennement différenciés (67%). Parmi ces tumeurs, 62 (82%) étaient associées à des métastases ganglionnaires. Selon la classification pTNM UICC 7^{ème} édition, 10 tumeurs (13%) correspondaient à un stade IIA et 58 tumeurs (80%) à un stade IIB. Soixante-cinq tumeurs (89%) étaient de stade pT3-4 dont 2 tumeurs pT4. Selon la classification pTNM UICC 8^{ème} édition, 42 tumeurs (60%) correspondaient à un stade IIB et 16 tumeurs (23%) à un stade III. Onze tumeurs (16%) étaient de stade pT3-4 dont 2 tumeurs pT4. Aucun patient n'avait de métastase à distance. Quarante-trois patients (57%) ont reçu de la chimiothérapie adjuvante.

Parmi ces patients, aux dernières nouvelles (janvier 2018), 47 (67%) ont présenté une récurrence et 63 (84%) patients sont décédés. La médiane de suivi était de 68 mois. Le délai médian de survenue d'une récurrence était de 9 mois, le délai médian de survenue d'un décès était de 15 mois. Les caractéristiques de la population étudiée sont indiquées dans le tableau 1.

Tableau 1 : caractéristiques de la population étudiée

Caractéristiques	n = 75 (%)
Age au moment de la chirurgie , en année, médiane (range)	65 (39-82)
Sexe	
Femme	35 (46)
Homme	40 (53)
Taille tumorale (cm) , médiane (range)	2,6 (1.3-7)
Type de chirurgie	
Spleno-pancréatectomie	12 (16)
Duodéno-pancréatectomie céphalique	63 (84)
Marges de résection chirurgicale	
R0	64 (85)
R1	11 (14)
Stade pTNM (7^{ème} édition) (n=73)	
IA	2 (3)
IB	1 (1)
IIA	10 (13)
IIB	58 (80)
III	2 (3)
Stade pTNM (8^{ème} édition) (n=70)	
IA	3 (4)
IB	7 (10)
IIA	2 (3)
IIB	42 (60)
III	16 (23)
Statut ganglionnaire pN (7^{ème} édition)	
N0	12 (18)
N1	63 (82)
Emboles vasculaires tumoraux	
Non	31 (41)
Oui	44 (59)
Engainements péri nerveux tumoraux	
Non	08 (11)
Oui	67 (89)
Différenciation tumorale	
Peu différencié	07 (09)
Moyennement différencié	50 (67)
Bien différencié	18 (24)
Chimiothérapie adjuvante	
Absente	32 (43)
Gemcitabine	37 (49)
FOLFIRINOX	06 (08)
Médiane de suivi , en mois (range)	68 (29-118)
Délai de survenue de la récurrence , en mois, médiane (range) (n=47)	9 (0-66)
Délai de survenue des décès , en mois, médiane (range) (n=63)	15 (0- 75)

2. Evaluation du budding tumoral

2.1. Méthode 1 : selon Karamitopoulou et coll.

Etude sur HES :

Un BT était observé dans 100% des cas. Le pathologiste 1 (MJ) a classé 30 cas en bas grade de BT, 45 cas en haut grade. Le pathologiste 2 (FR) a classé 43 cas en bas grade de BT et 32 cas en haut grade. L'estimation finale du BT à l'issue de la troisième lecture (pathologistes 1 et 2) était 42 tumeurs (56%) classées en bas grade de BT et 33 (44%) en haut grade. Après comparaison des scores de BT, le coefficient de corrélation intra-classe (ICC) était de 0.49 (0.37-0.60), ce qui correspond à une mauvaise concordance.

La morphologie du BT était variable : épithélioïde dans la majorité des cas, soit 64 (85%) et fusiforme dans 11 cas (15%) (Fig. 3). Il était plus fréquemment observé au front d'invasion qu'au centre de la tumeur, localisé uniquement en périphérie de la tumeur dans 20 cas (27 %) et à la fois au centre et en périphérie de la tumeur dans 55 cas (73 %).

L'évaluation du BT sur HES était parfois difficile en raison de la présence de fibroblastes activés et de cellules inflammatoires dans le stroma. En particulier au front d'invasion, ces cellules pouvaient masquer ou être difficiles à différencier des cellules épithéliales tumorales. De plus, lorsque les cellules

tumorales étaient dotées d'un cytoplasme clair, ou mucosécrétantes, ou en présence de nécrose tumorale, le BT pouvait être difficile à repérer.

Etude avec anticorps anti-CKAE1/AE3 :

Le pathologiste 1 (MJ) a classé 8 cas en bas grade de BT et 67 cas en haut grade de BT. Le pathologiste 2 (FR) a classé 9 cas en bas grade de BT et 66 cas en haut grade de BT. L'estimation finale du BT à l'issue de la troisième lecture (pathologiste 1 et 2) était 7 tumeurs (10%) classées en bas grade de BT et 68 (90%) en haut grade. Après comparaison des scores de BT, le coefficient de corrélation intra-classe (ICC) était de 0.46 (0.26-0.63), ce qui correspond à une mauvaise concordance.

L'évaluation du BT avec l'anticorps anti-CKAE1/AE3 était parfois gênée par la présence de nécrose tumorale, qui pouvait comporter des cellules isolées marqués. L'immunohistochimie avec l'anticorps anti-CKAE1/AE3 révélait de nombreux BT non repérés sur HES.

La figure 4 illustre les différents grades de BT observés sur HES et sur CKAE1/AE3.

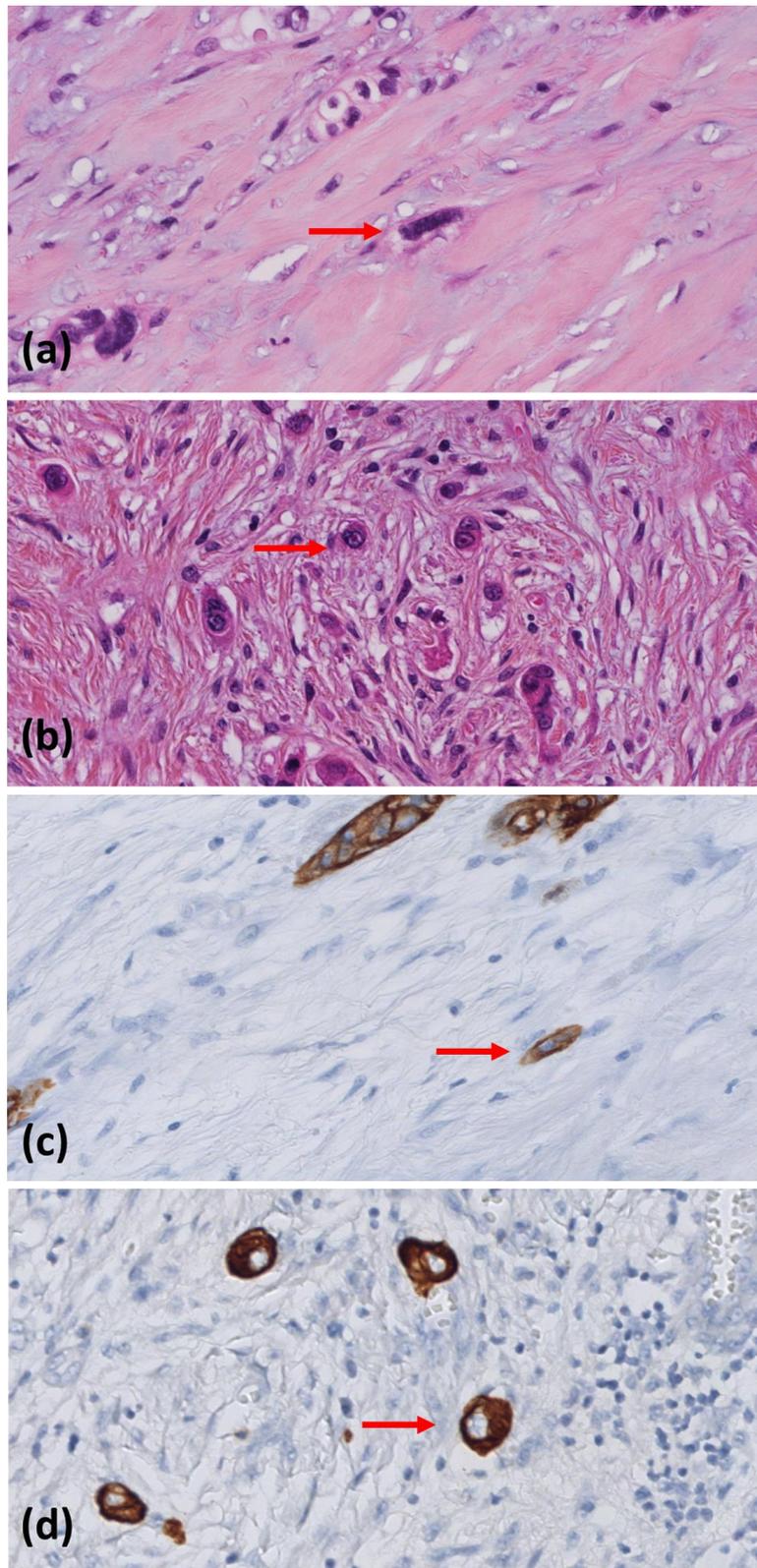


Figure 3 : variétés morphologiques du budding tumoral (BT) sur HES et par immunohistochimie avec la cytokératine AE1/AE3

(a) BT fusiforme sur HES (x40) (b) BT épithélioïde sur HES (x40) (c) BT fusiforme sur CKAE1/AE3 (x40) (d) BT épithélioïde sur CKAE1/AE3 (x40) (flèches rouges)

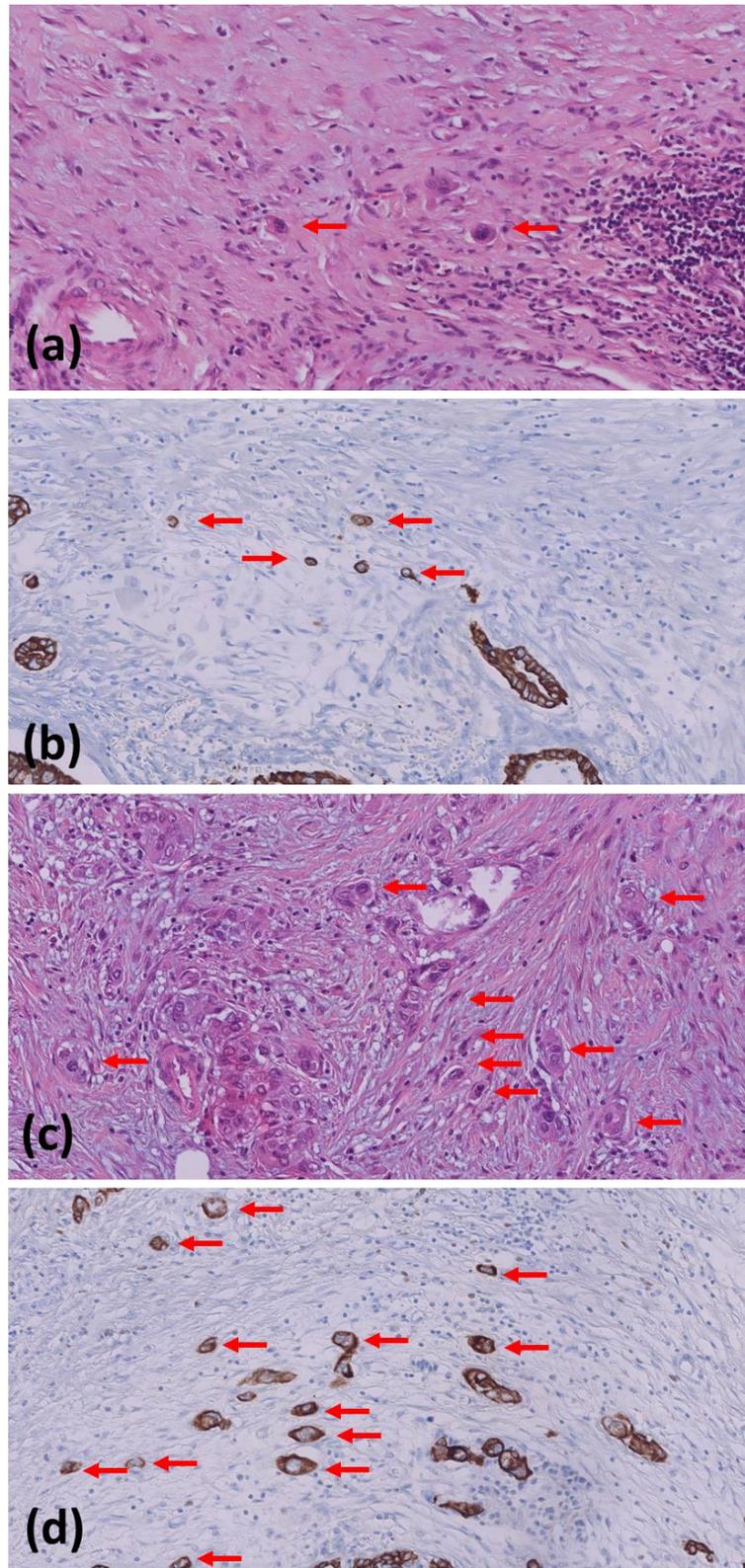


Figure 4 : grades de budding tumoral (BT) sur HES et par immunohistochimie avec la cytokératine AE1/AE3

(a) BT de bas grade sur HES (x20) (b) BT de bas grade sur Cytokératine AE1/AE3 (x20) (c) BT de haut grade sur HES (x20) (d) BT de haut grade sur Cytokératine AE1/AE3 (x20) (flèches rouges)

2.2. Méthode 2 : selon l'ITBCC

Un BT était observé dans 100% des cas. Le pathologiste 1 (MJ) a classé 38 cas en catégorie BD1 (bas grade de BT), 23 cas en BD2 (grade intermédiaire) et 14 cas en BD3 (haut grade de BT). Le pathologiste 2 (FR) a classé 36 cas en catégorie BD1 (bas grade de BT), 27 cas en BD2 (grade intermédiaire) et 12 cas en BD3 (haut grade de BT). L'estimation finale du BT à l'issue de la troisième lecture (pathologistes 1 et 2) était 35 tumeurs (47%) classées en bas grade de BT, 28 tumeurs (37%) en grade intermédiaire et 12 tumeurs (16%) en haut grade de BT. Après comparaison des scores de BT, le coefficient de corrélation intra-classe (ICC) était de 0.92 (0.88-0.95), ce qui correspond à une excellente concordance.

3. Evaluation de la TEM : E-cadhérine / Vimentine / ZEB1

Une expression aberrante de la E-cadhérine était détectée dans 25 cas (33%) au niveau du budding (Fig. 5a et 5b), parmi lesquels 3 cas (12%) comportaient une expression aberrante associée dans la tumeur principale. Cette expression aberrante pouvait correspondre soit à une perte complète, soit à une perte partielle, c'est à dire une délocalisation du marquage membranaire vers le cytoplasme (Fig. 6).

La vimentine était exprimée dans 10 cas (13 %). En raison du faible nombre de cas positifs, du caractère focal et ubiquitaire (à la fois sur le budding et sur la masse tumorale), il n'a pas été possible de distinguer le marquage péri et intra tumoral pour la vimentine. La perte d'expression au niveau du BT était facile à mettre

en évidence, mais la présence d'une expression était plus difficile à visualiser en raison d'un marquage important du stroma adjacent (Fig. 5c et 5d).

ZEB1 était exprimé dans 24 cas (32%). Son expression aberrante était le plus souvent focale. Comme pour la vimentine, il n'a pas été possible pour ZEB1 de distinguer le marquage péri et intra-tumoral. De plus, en cas de marquage positif, il était difficile de différencier le BT du stroma adjacent (Fig. 5e et 5f). Nous avons observé un marquage ubiquitaire avec les anticorps anti-vimentine et anti-ZEB1.

Au total, le statut TEM par combinaison de ces trois marqueurs se répartissait de la façon suivante : 39 PDAC (52%) avaient un phénotype mésenchymateux et 36 (48%) un phénotype épithélial. Quand il était mésenchymateux, le phénotype était dans la majorité des cas incomplet, un marquage aberrant complet des trois anticorps était observé dans seulement 5 cas (7%).

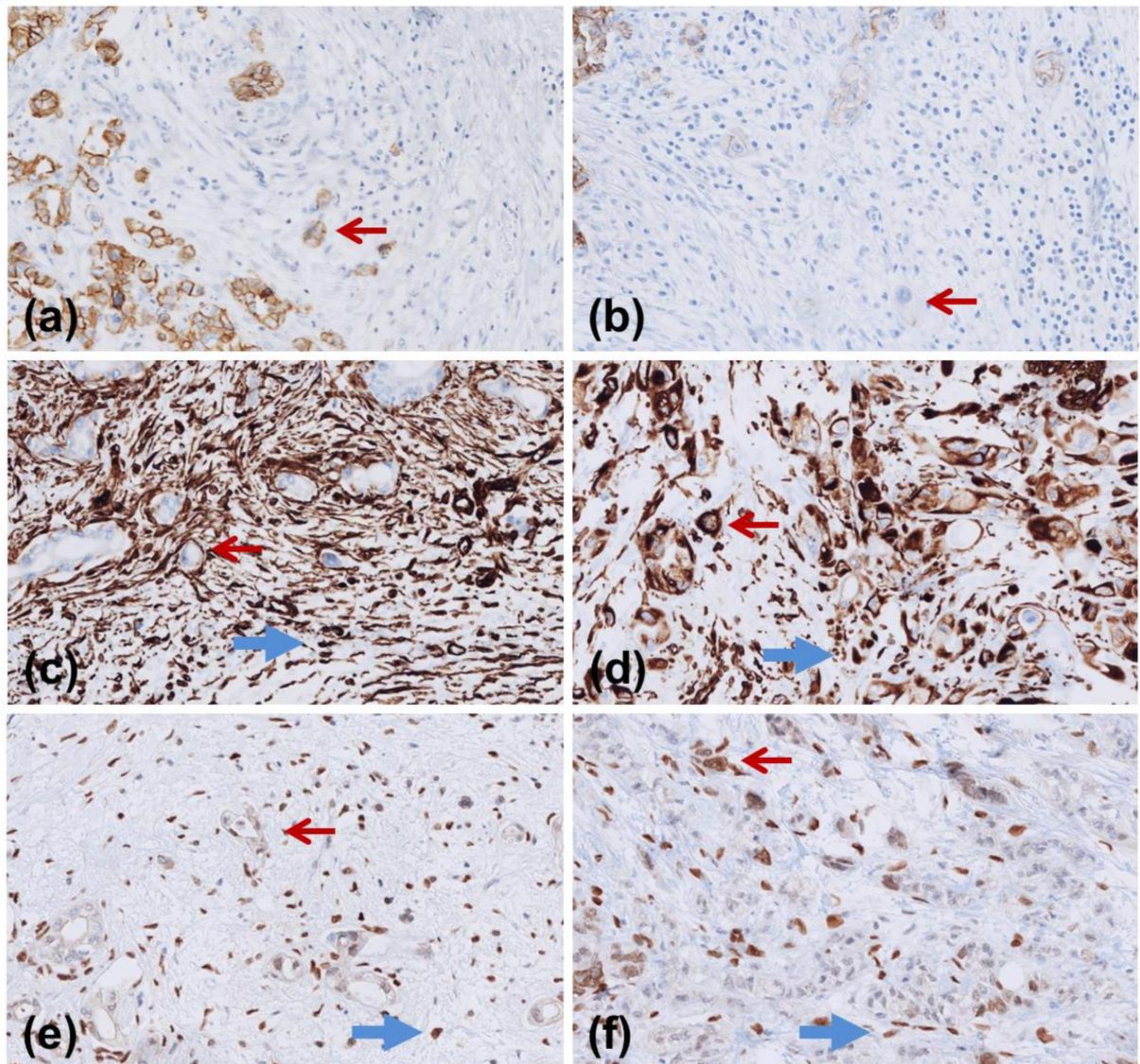


Figure 5 : expression immunohistochimique des marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)

(a) E-Cadhérine : marquage membranaire conservé (flèche rouge) (x30) (b) E-Cadhérine : perte du marquage membranaire au niveau du budding tumoral (flèche rouge) (x30) (c) Vimentine : absence de marquage des cellules tumorales (flèche rouge), marquage des cellules du stroma (flèche bleue) (x30) (d) Vimentine : marquage cytoplasmique des cellules tumorales (flèche rouge), marquage des cellules du stroma (flèche bleue) (x30) (e) ZEB1 : absence de marquage des noyaux des cellules tumorales (flèche rouge), marquage des cellules du stroma (flèche bleue) (x30) (f) ZEB1 : marquage nucléaire d'une cellule tumorale (flèche rouge), marquage des cellules du stroma (flèche bleue) (x30)

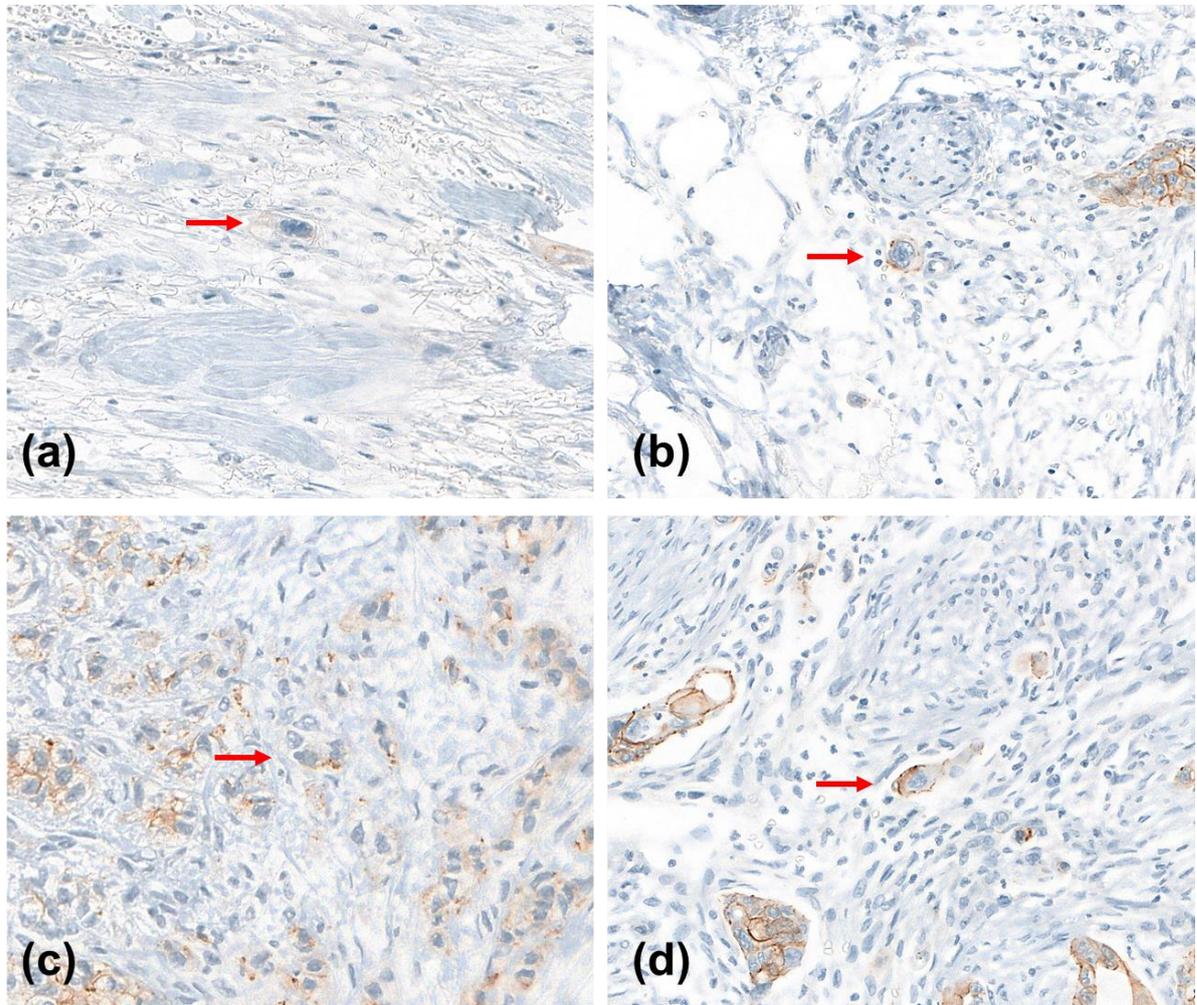


Figure 6 : expression immunohistochimique aberrante de la E-Cadhérine

(a) perte complète du marquage membranaire (x40) (b) perte partielle du marquage membranaire (x40) (c) marquage cytoplasmique sans marquage membranaire (x40) (d) marquage cytoplasmique et membranaire incomplet (x40) (flèches rouges)

4. Corrélation entre le budding tumoral et la TEM

4.1. Méthode 1 : selon Karamitopoulou et coll.

Il existait une association significative entre le grade de BT et la présence d'un phénotype mésenchymateux, en effet parmi les 33 PDAC avec haut grade de BT, 23 (70%) avaient un phénotype mésenchymateux ($p=0.0065$) (Fig. 7a).

Le grade de BT sur HES était associé de manière significative à un marquage aberrant avec l'anticorps anti-E-Cadhérine ($p=0,0136$), en effet parmi les 42 PDAC avec un bas grade de BT, 9 (21%) avaient une expression aberrante de la E-cadhérine et 33 (79%) une expression conservée (Fig. 7b). Il n'y avait pas d'association significative entre le grade de BT sur HES et l'expression de la vimentine d'une part, et celle de ZEB1 d'autre part. Avec le marquage par les cytokératines, la majorité des PDAC (68 cas, 91%) comportaient un BT de haut grade, seuls 7 patients comportait un BT de bas grade, l'étude de corrélation n'a pas été réalisée par manque de puissance.

La présence d'un phénotype mésenchymateux était associée de manière significative à la présence de BT de morphologie fusiforme, en effet parmi les 11 PDAC ayant un BT de morphologie fusiforme, 10 (91%) avaient un phénotype mésenchymateux ($p=0.0052$). Une association significative était observée entre le grade de BT sur HES et la morphologie du BT, en effet parmi les 11 PDAC ayant un BT de morphologie fusiforme, 9 (81%) étaient caractérisés par un haut grade de BT ($p=0.0085$) (tableau 2).

4.2. Méthode 2 : selon l'ITBCC

Il existait une association significative entre le grade de BT et le phénotype mésenchymateux, en effet parmi les 40 PDAC en grade intermédiaire et en haut grade de BT, 27 (68%) avait un phénotype mésenchymateux ($p=0.0041$) (Fig. 7a).

Le grade de BT sur HES était associé de manière significative à un marquage aberrant de l'anticorps anti-E-cadhérine ($p=0.0002$). En effet, parmi les 35 PDAC en bas grade de BT, 4 (11%) avait une expression aberrante de la E-cadhérine et 31 (89%) une expression conservée (Fig. 7b). Aucune association n'était mise en évidence entre le grade de BT et l'expression de la vimentine d'une part, et celle de ZEB1 d'autre part. Il n'y avait pas d'association significative entre le grade de BT et la présence d'un BT de morphologie fusiforme (tableau 2).

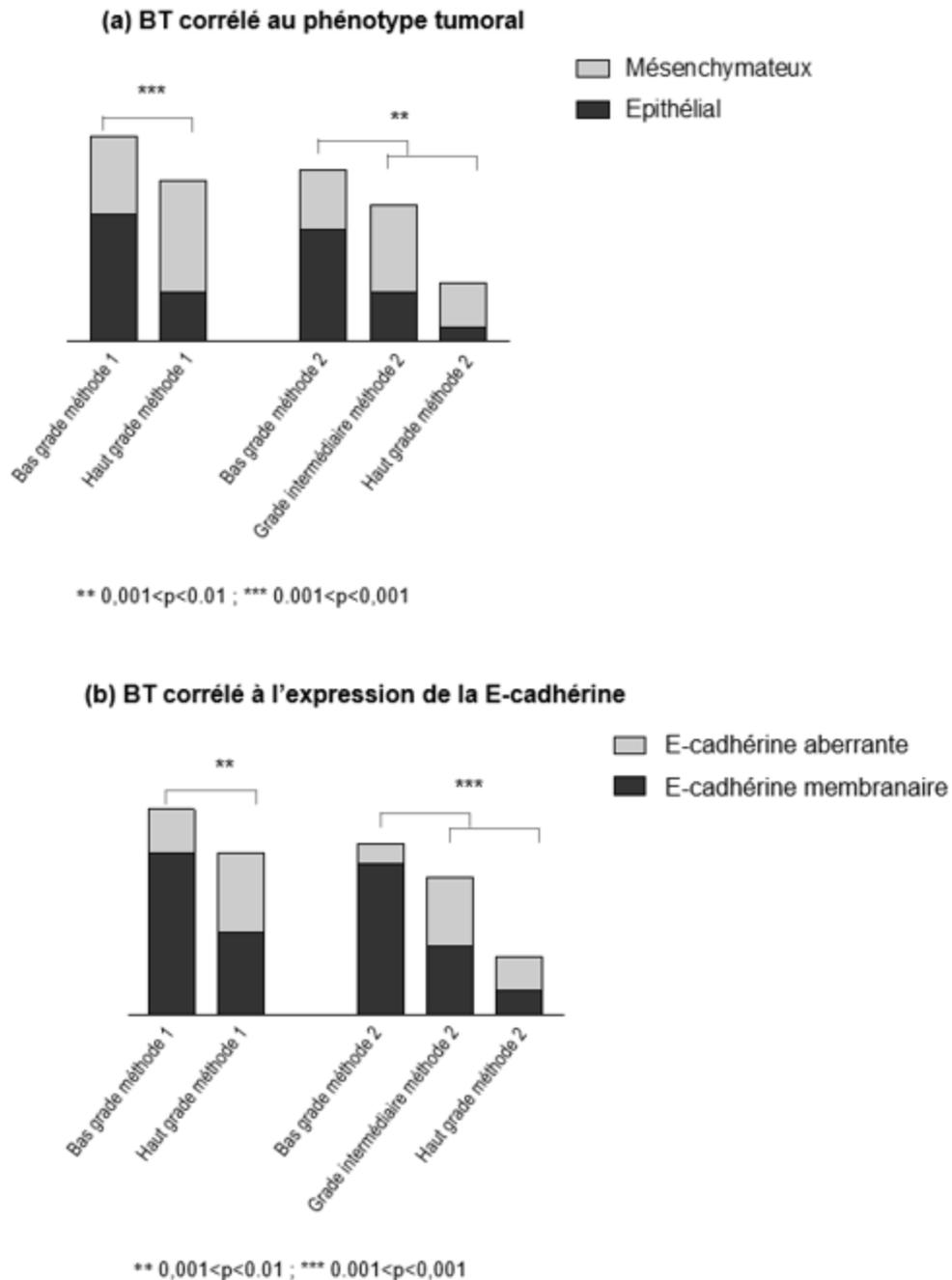


Figure 7 : associations entre les grades de budding tumoral (BT) sur Hémalun Eosine Safran (HES) selon chaque méthode avec le phénotype tumoral d'une part et l'expression aberrante de la E-Cadhérine d'autre part.

(a) phénotype mésenchymateux associé au BT : présence d'une association significative entre la présence d'un phénotype mésenchymateux et le grade de BT selon les 2 méthodes.
 (b) expression de la E-Cadhérine associé au BT sur HES : présence d'une association significative entre l'expression aberrante de l'E-Cadhérine et le grade de BT selon les 2 méthodes.

Tableau 2 : corrélation de la morphologie du BT avec le phénotype tumoral d'une part et avec le grade de BT d'autre part.

		BT de morphologie épithélioïde n=64 (85%)	BT de morphologie fusiforme n=11 (15%)	<i>p</i>
Phénotype	Epithélial	35 (58)	1 (9)	0.0052
	Mésenchymateux	29 (45)	10 (91)	**
Méthode 1	Bas grade	40 (63)	2 (18)	0.0085
	Haut grade	24 (37)	9 (82)	**
Méthode 2	BD1	31 (48)	4 (36)	0.5276
	BD2/BD3	33 (52)	7 (64)	NS

5. Corrélation du BT et de la TEM aux autres paramètres clinico-pathologiques et à la survie

Le grade de BT évalué selon chaque méthode n'était pas associé de manière significative aux facteurs pronostiques connus, tels que le stade pTNM selon la 7^e et la 8^e édition, le statut ganglionnaire métastatique, la présence d'embolies vasculaires tumorales, d'engainements périnerveux tumorales. Il n'existait pas d'association significative entre le BT et la survie globale, ni entre le BT et la survie sans récurrence quelle que soit la méthode d'évaluation du BT (fig. 8 et tableau 3).

Le phénotype mésenchymateux (de façon globale et pour chaque marqueur individuellement) n'était pas associé aux facteurs pronostiques connus, ni à la survie globale ni à la survie sans récurrence (tableau 4).

Le seul paramètre associé à la survie était la présence d'engainements périnerveux tumorales ($p=0.0098$).

Nous avons réalisé les mêmes analyses de survie avec et sans les patients décédés en « post opératoire » immédiat, défini par 90 jours ($n=7$). Les analyses présentées incluent ces malades mais leur omission ne change rien.

6. Evaluation de l'index de prolifération Ki67

L'expression aberrante de ZEB1 était significativement associée à une diminution de l'indice de prolifération Ki67 ($p=0.0376$). Parmi les 51 cas n'exprimant pas ZEB1, la valeur médiane du Ki67 était de 20%. Parmi les 24 cas présentant un marquage aberrant de ZEB1, la valeur médiane du Ki67 était de 10%. Il n'existait pas d'association significative entre la valeur de Ki67 avec le marquage aberrant de la E-Cadhérine, de la vimentine et avec la présence d'un statut phénotypique mésenchymateux.

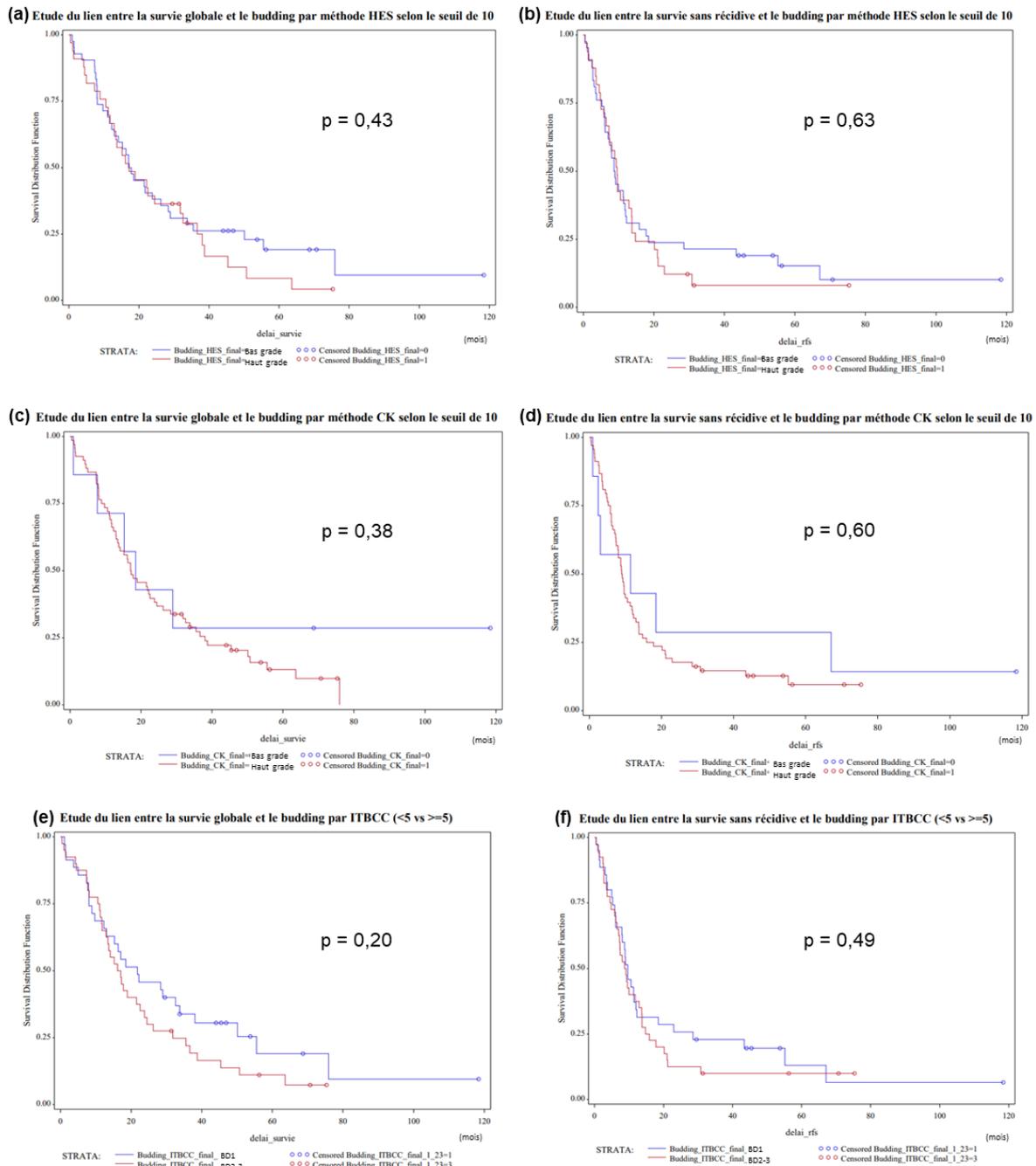


Figure 8 : courbes de survie globale et de survie sans récurrence en fonction du grade de budding tumoral.

(a) méthode 1 HES : corrélation du grade de BT avec la survie globale (b) méthode 1 HES : corrélation du grade de BT avec la survie sans récurrence (c) méthode 1 Cytokératine AE1/AE3 : corrélation du grade de BT avec la survie globale (d) méthode 1 Cytokératine AE1/AE3 : corrélation du grade de BT avec la survie sans récurrence (e) méthode 2 ITBCC : corrélation du BT1/BT2-3 avec la survie globale (f) méthode 2 ITBCC : corrélation du BT1/BT2-3 avec la survie sans récurrence

Tableau 3 : répartition des facteurs clinico-pathologiques en fonction des grades de BT sur HES selon chaque méthode d'évaluation

	Bas grade n =42 (56%)	Haut grade n = 33 (44%)	BD1 n=35 (47%)	BD2 n=28 (37%)	BD3 n=12 (16%)
	Méthode 1		Méthode 2		
Stade pTNM 7^{ème} édition (n=73)					
Stade Ia	1 (2)	1 (3)	1 (3)	0 (0)	1 (8)
Stade Ib	1 (2)	0 (0)	1 (3)	0 (0)	0 (0)
Stade IIa	4(10)	5 (15)	4 (11)	3 (12)	2 (17)
Stade IIb	34 (83)	25 (76)	28 (80)	22 (85)	9 (75)
Stade III	1 (2)	1 (3)	1 (3)	1 (4)	0 (0)
Stade pTNM 8^{ème} édition (n=70)					
Stade Ia	1 (3)	2(6)	1(3)	0 (0)	2 (18)
Stade Ib	3 (8)	4 (13)	4 (12)	2 (8)	1 (9)
Stade IIa	2 (5)	0 (0)	1 (3)	1 (4)	0 (0)
Stade IIb	23 (59)	19 (61)	19 (56)	18 (72)	5 (45)
Stade III	10 (26)	6 (19)	9 (26)	4 (16)	3 (27)
Statut ganglionnaire (pN)					
N0 (n=12)	6 (14)	6 (18)	6 (17)	3 (11)	3 (25)
N1 (n=63)	36 (86)	27 (82)	29 (83)	25 (89)	9 (75)
Marges de résection					
R0 (n=64)	36 (86)	28 (85)	30 (86)	23 (82)	11 (92)
R1 (n=11)	6 (14)	5 (15)	5 (14)	5 (18)	1 (8)
Emboles vasculaires tumoraux					
Oui (n=44)	25 (60)	19 (58)	20 (27)	17 (61)	7 (58)
Non (n=31)	17 (40)	14 (42)	15 (73)	11 (39)	5 (42)
Engainements péri nerveux tumoraux					
Oui (n=67)	37 (88)	30 (90)	32 (91)	24 (86)	11 (92)
Non (n=8)	5 (12)	3 (10)	3 (9)	4 (10)	1 (8)
Différenciation tumorale					
Peu différencié (n=7)					
Moyennement différencié (n=50)	5 (12)	2 (6)	3 (9)	2 (7)	2 (17)
Bien différencié (n=18)	24 (57)	26 (79)	21 (60)	22 (79)	7 (58)
	13 (31)	5 (15)	11 (31)	4 (14)	3 (25)

Tableau 4 : répartition des facteurs clinico-pathologiques en fonction du phénotype tumoral

	Phénotype épithélial n=36 (48%)	Phénotype mésenchymateux n=39 (52%)
Stade pTNM 7^{ème} édition (n=73)		
Stade Ia	1 (3)	1 (3)
Stade Ib	1 (3)	0 (0)
Stade IIa	3 (8)	6 (15)
Stade IIb	29 (80)	30 (77)
Stade III	1 (3)	1 (3)
Stade pTNM 8^{ème} édition (n=70)		
Stade Ia	2 (6)	1 (3)
Stade Ib	3 (8)	4 (10)
Stade IIa	0 (0)	2 (5)
Stade IIb	19 (53)	23 (59)
Stade III	9 (25)	7 (18)
Statut ganglionnaire (pN)		
N0 (n=12)	5 (14)	7 (18)
N1 (n=63)	31 (86)	32 (82)
Marges de résection		
R0 (n=64)	31 (86)	33 (85)
R1 (n=11)	5 (14)	6 (15)
Emboles vasculaire tumoraux		
Oui (n=44)	22 (61)	22 (56)
Non (n=31)	14 (39)	17 (44)
Engainements péri nerveux tumoraux		
Oui (n=67)	33 (92)	34 (87)
Non (n=8)	3 (8)	5 (13)
Différenciation tumorale		
Peu différencié (n=7)	0 (0)	5 (13)
Moyennement différencié (n=50)	21 (58)	29 (74)
Bien différencié (n=18)	13 (36)	5 (13)

DISCUSSION

L'adénocarcinome du pancréas est caractérisé par une incidence croissante et un pronostic très sombre lié notamment à une forte chimiorésistance. Alors que la biologie de ce cancer est de mieux en mieux comprise, les marqueurs permettant une stratification pronostique des patients restent rares. Dans ce contexte, nous sommes intéressés au budding tumoral, qui constitue un critère histopronostique péjoratif dans plusieurs cancers digestifs, en particulier dans le CCR pour lequel il est associé au phénomène de TEM. Dans le PDAC, son impact pronostique et son lien avec la TEM ont fait l'objet de nombreuses études, mais restent controversés et sans intérêt clinique à ce jour, en lien notamment avec un manque de standardisation des méthodes d'évaluation (annexe 1). Les objectifs de ce travail de thèse étaient ainsi d'une part de comparer deux méthodes d'évaluation du budding tumoral dans le PDAC afin d'identifier la plus pertinente, et d'autre part de corrélérer les résultats obtenus au phénotype TEM, aux données cliniques et anatomo-pathologiques afin d'évaluer l'intérêt pronostique du budding tumoral. Nous avons réalisé une étude morphologique et immunohistochimique détaillée sur une série homogène de 75 patients opérés pour PDAC, inclus de façon consécutive, n'ayant pas reçu de traitement néoadjuvant, et pour lesquels les données cliniques étaient disponibles. Nous avons étudié le BT selon deux méthodes et le phénotype TEM avec la E-Cadhérine, la vimentine et ZEB1. Cette étude rétrospective monocentrique a permis d'obtenir une cohorte représentative des autres séries de PDAC, avec 82% de métastases ganglionnaires, 89% d'engainements péri nerveux tumoraux, 59% d'emboles vasculaires tumoraux et une médiane de survie de 15 mois (39,43).

Méthodes d'évaluation du budding tumoral

Les méthodes d'évaluation du BT rapportées dans le PDAC sont particulièrement hétérogènes et non standardisées à ce jour (annexe 1). Des variations existent à plusieurs niveaux : 1- la définition même du budding, 2- la méthodologie pour l'évaluer (coloration HES ou immunohistochimie), 3- les secteurs tumoraux à analyser : lame entière ou hot spot, front d'invasion et/ou centre, 4- surface de champ et grossissement, 5- seuils pour classer le BT.

Tout d'abord, le nombre de cellules constituant un budding tumoral n'est pas consensuel dans le PDAC. Plusieurs définitions coexistent, telle que celle de Ueno et coll. qui définit le BT comme un amas non glandulaire de 4 cellules tumorales ou moins (67), définition que nous avons utilisée comme de nombreux auteurs (41,43,48,68–76) et qui est celle recommandée par l'ITBCC (31). D'autres équipes considèrent le BT comme un amas de 5 cellules ou moins (33,77,78). De plus, les amas peu différenciés de plus de 5 cellules tumorales, situés au front d'invasion, nommés « poorly differentiated clusters » auraient dans le CCR un impact pronostique encore supérieur à celui du BT et un lien avec la TEM (79), ce qui suggère un continuum entre ces différents paramètres au front d'invasion.

Par ailleurs, l'utilisation de la CKAE1/AE3 améliore la détection du BT, en effet sur HES nous avons mis en évidence 44% de BT de haut grade contre 90% avec la CKAE1/AE3. Toutefois, cela ajoute du temps et du coût d'analyse, et est difficile à mettre en pratique en routine. De plus, même si cela est débattu, il a été suggéré que certains fibroblastes pourraient exprimer les cytokératines (80). Comme O'Connor et coll. (43) nous pensons que le BT peut être évalué de façon fiable sur HES. Dans notre étude la cytokératine n'améliorait pas la concordance inter-observateur et ne

permettait pas d'obtenir un impact pronostique. Néanmoins, cette technique pourrait présenter au minimum un intérêt pédagogique afin d'acquérir une expérience dans ce domaine.

Le BT était observé principalement au front d'invasion mais restait de répartition globalement homogène dans la tumeur, en effet dans 73% des cas, le BT était présent à la fois au centre et en périphérie de la tumeur. La répartition péri ou intra tumorale du BT est simple à concevoir dans le CCR de stade pT1 où le front d'invasion est clairement identifiable, mais elle est plus aléatoire sur une pièce de résection de PDAC où le front d'invasion et le centre de la tumeur sont parfois difficiles à repérer sur coupes histologiques.

Variabilité inter-observateur

Afin de pouvoir comparer nos résultats aux autres séries, nous avons utilisé les deux méthodes d'évaluation du BT les plus souvent rapportées dans la littérature, à savoir celle de Karamitopoulou et coll. (41) sur 10 champs en comptant le BT sur HES et sur CKAE1/AE3, puis celle de l'ITBCC sur HES (31) (annexe 1). Cette dernière n'a été évaluée qu'une seule fois dans le PDAC, sans étude de corrélation au phénotype TEM (42). Dans notre expérience, la méthode sur 10 HPF est peu reproductible (ICC : 0.49). De même, Karamitopoulou et coll. (41) ont décrit le BT sur une série de 117 PDAC avec une concordance inter-observateur moyenne (ICC : 0.72).

Il est à noter que l'environnement tumoral peut rendre difficile le compte du BT à la fois en intra-tumoral et plus particulièrement au front d'invasion, sous la forme d'une réaction inflammatoire importante, de la présence de fibroblastes activés au noyau irrégulier, de nécrose tumorale associée à des débris cellulaires ou de

secteurs mucosécrétants comportant des cellules tumorales isolées. Dans notre expérience la méthode sur 10 HPF à fort grossissement (x40), était particulièrement concernée par ces variations, ce qui pouvait impacter la reproductibilité inter-observateur.

De plus, l'habitude du pathologiste à reconnaître le BT peut influencer la concordance inter-observateur. Nous avons observé une réelle courbe d'apprentissage pour l'évaluation du BT. Dans notre étude, la méthode sur 10 HPF a été réalisée avant la méthode ITBCC, pour laquelle la concordance inter-observateur était excellente, ainsi il est possible que notre expérience ait été améliorée lors du compte selon l'ITBCC. Nous avons toutefois mené notre étude en conditions réelles, petit à petit, pour refléter autant que possible la pratique quotidienne. En effet, plusieurs études dans ce domaine ont été réalisées par des experts du BT (41,42), ce qui peut conduire à un biais de classement par rapport à une évaluation de routine par des pathologistes moins expérimentés sur le BT. De façon intéressante, ce biais a été récemment exploré par l'équipe de Martin et coll. (81) qui a comparé le compte du BT selon l'ITBCC sur 244 CCR par 6 pathologistes de niveaux d'expérience différents (4 internes, 1 praticien hospitalier, 1 expert). Dans leur étude, seuls la mise en communs des scores d'une part, et ceux obtenus par un interne de 4 ans d'expérience d'autre part, étaient associés au pronostic. Les résultats individuels des cinq autres pathologistes n'étaient pas associés au pronostic, excepté ceux de l'expert en BT qui étaient associés à la présence de métastases à distance. Ces données suggèrent qu'une discussion collégiale ainsi qu'une période d'apprentissage sont nécessaires à une évaluation reproductible et fiable du BT.

Budding tumoral et valeur pronostique

Notre étude a permis d'identifier des images de BT dans 100% des PDAC analysés, dont environ la moitié était classés en haut grade sur l'HES. Cette prévalence élevée est en accord avec les observations antérieures de O'Connor et coll. (89%) (43) et de Karamitopoulou et coll (97.5%) (41,42) et suggère que le BT serait plus fréquemment observé dans le PDAC que dans les autres cancers digestifs tels que le CCR, le carcinome épidermoïde de l'œsophage, l'adénocarcinome de l'estomac et de l'ampoule de Vater (27,33,67,82–86). La prévalence particulièrement élevée du BT dans le PDAC pourrait s'expliquer par sa découverte à un stade plus avancé et à sa capacité particulière à disséminer.

Dans notre étude, selon l'ITBCC, 47% des tumeurs étaient en bas grade de BT (BD1), 37% en grade intermédiaire (BD2) et 16% en haut grade de BT (BD3), avec une concordance inter-observateur excellente (ICC : 0.92). Cette méthode nous a semblée plus rapide, moins fastidieuse à réaliser que celle sur 10 HPF, mieux adaptée à une pratique « de routine » d'autant qu'elle est déjà utilisée pour le CCR. En effet, la méthode dite ITBCC validée pour le CCR, correspond à la méthode de Ueno modifiée (87), qui recommande d'évaluer au préalable 10 HPF au front d'invasion pour limiter la variabilité due à la sélection d'un seul hot spot. Dans notre étude, nous avons évalué en plus le budding intra-tumoral. De façon intéressante et contrairement à notre hypothèse de travail, dans le PDAC le BT n'avait pas de valeur pronostique en analyse univariée sur la survie sans récurrence et la survie globale et n'était pas associé aux facteurs histopronostiques connus. Il est à noter que la principale limite de notre étude est le relatif faible effectif. Toutefois les courbes de Kaplan-Meier (fig. 8) conjointes sur une période relativement longue, montrent clairement une absence d'impact pronostique du BT sur la survie, et laissent préjuger

qu'une augmentation de l'effectif ne changerait pas ces résultats. De plus, notre cohorte comporte uniquement des PDAC résécables, contrairement à l'étude récente de Karamitopoulou et coll. testant le score ITBCC dans sur série de 110 PDAC (42), dont 10 de stade IV non résécables. Dans leur étude, 16% des tumeurs étaient en bas grade de BT (BD1), 29% en grade intermédiaire (BD2) et 55 % en haut grade (BD3), avec une bonne concordance inter-observateur et un impact pronostique du BT de haut grade.

La revue de la littérature montre que l'impact pronostique du budding tumoral de haut grade est moins clair dans le PDAC que dans le CCR (annexe 1). En effet, nos résultats sont en accord avec ceux de Kohler et coll. (39), qui n'ont pas mis en évidence d'impact pronostique du grade de BT. De même, sur la plus grande série réalisée dans le PDAC, O'Connor et coll. (43) ont montré un impact pronostique de la présence de BT mais pas du grade de budding, la présence d'un traitement néoadjuvant n'était d'ailleurs pas précisée. L'équipe de Karamitopoulou et coll. ont publié des études sur la même série de patients à quatre reprises (41,42,45,48) pour laquelle l'information relative au traitement néoadjuvant est discordante. De plus, l'équipe de Chouat et coll. (46) a récemment montré un impact pronostique sur la survie sans récurrence du grade de BT, déterminé par une méthode non standardisée, dans laquelle un budding tumoral était constitué de 5 cellules tumorales ou moins et le compte du BT était réalisé dans un hot spot sur une surface de champ de 0.19 mm². Il est possible que des différences dans les caractéristiques des patients, et surtout la variabilité inter-observateur pour évaluer le BT expliquent ces résultats discordants. Un effort de standardisation de l'évaluation du BT dans le PDAC est nécessaire afin d'harmoniser les résultats. De plus les seuils pour classer le budding

restent à établir, sur le modèle de ce qui a été réalisé pour le CCR mais adapté au PDAC, avec des études qui corréleront précisément le nombre de BT à la survie.

De même, nous n'avons pas mis en évidence de relation entre le BT et les autres facteurs histopronostiques connus, en accord avec les résultats publiés récemment (42). Au contraire, des études antérieures ont décrit des associations variables du BT à la présence d'embolies lymphatiques tumorales (41,43), au stade pT (UICC, 7^{ème} édition) (41), à la présence d'engainements péri nerveux (43) ainsi qu'à la présence de métastases ganglionnaires (39).

Au total, la signification du BT « inné » dans le PDAC reste controversée et notre étude ne montre pas sa valeur pronostique. Dans le CCR, il est associé à un plus fort risque de métastase dans les stades pT1 et à une survie sans récurrence plus courte dans les stades II, sans métastase ganglionnaire. Dans le PDAC, le pronostic est beaucoup plus défavorable que celui du CCR et est découvert à un stade tardif, il paraît ainsi difficile d'envisager que la seule détection du BT puisse prédire la survie.

Budding tumoral et transition épithélio-mésenchymateuse

Dans notre étude, 52% des PDAC avaient un phénotype mésenchymateux et 48% un phénotype épithélial. Le phénotype mésenchymateux était dans la majorité des cas incomplet (93%). En effet, la TEM est un processus dynamique, transitoire et réversible, et un phénotype mésenchymateux complet associant de façon concomitante la perte de toutes les caractéristiques épithéliales et l'acquisition de toutes les caractéristiques mésenchymateuses est rarement observé dans les carcinomes humains (57).

Quelle que soit la méthode d'évaluation du BT, son lien avec la TEM est constant, en effet nous avons montré une association significative entre le BT de haut grade selon chaque méthode, avec d'une part l'expression aberrante de la E-cadhérine et d'autre part avec la présence d'un phénotype tumoral mésenchymateux. Il existe également une association significative entre la morphologie fusiforme du BT avec d'une part le phénotype mésenchymateux et avec d'autre part la présence d'un BT de haut grade (selon la méthode sur 10 HPF). Ces résultats suggèrent que le grade et la morphologie fusiforme du BT sont des traductions morphologiques de la TEM dans le PDAC. Cette association encore controversée pour certains (88), a été observée dans de nombreuses études menées sur le PDAC (39,40,46,48,89,90).

Dans notre étude, il n'a pas été observé d'association significative entre la présence d'un statut mésenchymateux et les facteurs histopronostiques connus, la survie sans récurrence et la survie globale. Ces résultats sont différents de ceux obtenus par l'équipe de Yamada et coll. (64) qui ont observé que la TEM était un facteur pronostique indépendant pour le PDAC. Cependant, leur score pour évaluer le statut TEM est peu reproductible et l'administration ou non d'un traitement néoadjuvant n'est pas mentionnée. De même l'équipe de Kohler et coll. (39) a observé une association significative entre la présence d'une expression aberrante de la E-cadhérine sur le BT et la survie à long terme. Entre ces études et plus généralement dans la littérature, il existe une importante hétérogénéité de méthodologie pour évaluer la TEM, les anticorps utilisés sont nombreux, pour certains non commerciaux, parfois utilisés en double marquage (40) et difficiles à mettre au point pour une utilisation en routine.

La TEM est complexe à appréhender par nos techniques morphologiques et immunohistochimiques semi-quantitatives. En effet, elle correspond à un processus dynamique, le plus souvent focal au sein de la tumeur, or nous avons étudié ces marqueurs sur une seule lame tumorale. De plus, ce phénotype est présent dans les cellules du stroma du microenvironnement tumoral, ce qui complique sa détection au sein des cellules cancéreuses.

Dans notre expérience, le marqueur le plus facile à interpréter était la E-Cadhérine. En effet, son expression aberrante au sein de la tumeur était facile à mettre en évidence, à la différence de la vimentine et de ZEB1, pour lesquels le marquage des fibroblastes adjacents pouvait rendre difficile la visualisation d'un marquage aberrant. La perte d'expression de la E-cadhérine plus spécifiquement sur le BT par rapport à la tumeur principale est en accord avec les résultats des études précédentes (39,48,89).

Sur le plan physiopathologique, le processus de TEM impliquerait de nombreux acteurs, tels que les voies Wnt / β caténine et TGF β , des acteurs épigénétiques (famille des miR-200), des facteurs de transcriptions des familles *ZEB*, *SNAIL*, *SLUG* et *TWIST* (91,92). La place de la E-cadhérine dans le processus de TEM est encore débattue, plusieurs études suggèrent que ces facteurs de transcription viendraient inhiber *CDH1* (codant pour la E-cadhérine) en se fixant sur son promoteur (48,91). Au contraire, d'autres équipes suggèrent que l'expression aberrante de la E-cadhérine serait l'étape la plus précoce dans le processus de TEM à l'origine de la formation du budding (89,93). Dans notre étude, le marqueur le plus présent est la perte d'expression de la E-cadhérine au sein du BT, et plus souvent au front d'invasion tumoral, gradient également observé par l'équipe de Kohler et coll. (39).

Cellules souches cancéreuses pancréatiques et chimiorésistance

De plus, les cellules tumorales en TEM auraient des propriétés de cellules souches (CSC) (57,59,94). De façon intéressante nous avons observé qu'une baisse de l'index de prolifération Ki67 était associé à une expression aberrante de ZEB1. Il existerait en effet une diminution du Ki67, en raison notamment d'un arrêt du cycle cellulaire nécessaire aux propriétés invasives de la cellule tumorale mésenchymateuse (29,47,58,59,94,95). Ainsi, la présence d'un index de prolifération Ki67 bas pourrait être un marqueur indirect de résistance aux traitements, lié à la présence de cellules souches cancéreuses au sein de la tumeur, et pourrait ainsi être intéressant à évaluer avant traitement néoadjuvant dans le cadre des essais thérapeutiques actuels. Les CSC seraient en phase quiescente, non prolifératives et ainsi plus résistantes aux chimiothérapies et radiothérapies (57,59). De plus, il a été observé de façon expérimentale que l'administration d'une chimiothérapie (gemcitabine) entraînerait la sélection de population de CSC (96). Des auteurs ont montré qu'il existait une boucle de rétrocontrôle négatif entre *ZEB1* et la famille des miR-200 (micro ARN), permettant le maintien de la TEM et les propriétés de cellule souche tumorale, et pourrait devenir une potentielle cible thérapeutique (97).

BT, TEM et migration cellulaire

De plus la question reste posée de savoir si les amas de quelques cellules ont la même valeur que des cellules infiltrantes isolées. De façon intéressante, des études tridimensionnelles suggèrent que la plupart des cellules isolées seraient en réalité des artéfacts de section tissulaire qui exprimeraient de façon variable les marqueurs de TEM (89,98). Ces équipes s'appuient sur deux résultats majeurs : 1-la plupart des

BT étaient connectés entre eux ou à la masse tumorale principale avec uniquement 9-22% de vrai BT. 2- il n'y avait aucune cellule tumorale isolée infiltrante. Le BT ne serait ainsi pas statique mais le reflet de projections de la tumeur principale donnant de fausses images de bourgeonnement. Ces données témoignent d'une probable migration cellulaire collective avec TEM partielle telle qu'observée sur nos coupes histologiques et permettent de relier deux concepts apparemment opposés : migration sous forme de cellules isolées et migration collective.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le budding tumoral « inné » peut être évalué de façon simple et fiable par le score ITBCC sur HES dans l'adénocarcinome du pancréas pour lequel il représente un marqueur indirect de TEM et comporte des cellules tumorales moins proliférantes probablement impliquées dans la chimiorésistance. Ainsi, bien que notre étude ne confirme pas la valeur pronostique du BT de haut grade, nous pensons que le BT pourrait, par son lien avec la TEM, avoir d'autres intérêts dans le PDAC, notamment permettre de mieux comprendre les interactions avec le microenvironnement, ou devenir une cible thérapeutique ou un marqueur prédictif de réponse aux traitements anti-cancéreux. A l'ère des essais évaluant l'intérêt des traitements néoadjuvants, des études sur les biopsies pancréatiques préopératoires pourraient permettre d'évaluer l'impact du BT sur la réponse aux traitements.

Quoi qu'il en soit, la recherche d'un consensus pour évaluer le BT dans le PDAC apparaît comme un pré-requis indispensable à toute utilisation en clinique. Notre étude s'inscrit dans cette démarche de recherche d'un gold-standard qui repose sur une collaboration multidisciplinaire associant description anatomo-pathologique détaillée et suivi clinique rigoureux, ainsi que sur la mise en commun de différentes expériences et d'études multicentriques. La compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents reste néanmoins nécessaire pour empêcher l'émergence de résistances aux médicaments anti-cancéreux et élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin d'améliorer la prise en charge des patients.

RÉFÉRENCES

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018 Jan 1;68(1):7–30.
2. Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. Pancreatic cancer. *The Lancet*. 2004 Mar 27;363(9414):1049–57.
3. Binenbaum Y, Na'ara S, Gil Z. Gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Drug Resist Updat*. 2015 Nov;23:55–68.
4. Tajima H, Makino I, Ohbatake Y, Nakanuma S, Hayashi H, Nakagawara H, et al. Neoadjuvant chemotherapy for pancreatic cancer: Effects on cancer tissue and novel perspectives. *Oncol Lett*. 2017 Jun;13(6):3975–81.
5. Smigiel JM, Parameswaran N, Jackson MW. Targeting Pancreatic Cancer Cell Plasticity: The Latest in Therapeutics. *Cancers*. 2018 Jan 10;10(1):14.
6. La caractérisation moléculaire définit plusieurs sous-types d'adénocarcinome canalaire du pancréas. *Bull Cancer (Paris)* [Internet]. 2017 Dec 19 [cited 2018 Jan 26]; Available from: <https://www-sciencedirect-com.gate2.inist.fr/science/article/pii/S0007455117303788>
7. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Res*. 2014 Jun 1;74(11):2913–21.
8. Torres C, Grippo PJ. Pancreatic Cancer Subtypes: A Roadmap for Precision Medicine. *Ann Med*. 2018 Mar 14;1–18.
9. Oettle H, Neuhaus P, Hochhaus A, Hartmann JT, Gellert K, Ridwelski K, et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. *JAMA*. 2013 Oct 9;310(14):1473–81.
10. Zhang Y, Yang C, Cheng H, Fan Z, Huang Q, Lu Y, et al. Novel agents for pancreatic ductal adenocarcinoma: emerging therapeutics and future directions. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol*. 2018 Jan 31;11(1):14.
11. Neoptolemos JP, Kleeff J, Michl P, Costello E, Greenhalf W, Palmer DH. Therapeutic developments in pancreatic cancer: current and future perspectives. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018 May 1;

12. Cloyd JM, Katz MHG, Prakash L, Varadhachary GR, Wolff RA, Shroff RT, et al. Preoperative Therapy and Pancreatoduodenectomy for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: a 25-Year Single-Institution Experience. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract.* 2017;21(1):164–74.
13. Rahman SH, Urquhart R, Molinari M. Neoadjuvant therapy for resectable pancreatic cancer. *World J Gastrointest Oncol.* 2017 Dec 15;9(12):457–65.
14. Roland CL, Yang AD, Katz MHG, Chatterjee D, Wang H, Lin H, et al. Neoadjuvant Therapy is Associated with a Reduced Lymph Node Ratio in Patients with Potentially Resectable Pancreatic Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2015 Apr;22(4):1168–75.
15. Neo-adjuvant FOLF(IRIN)OX for Resectable Pancreatic Adenocarcinoma - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2018 Apr 22]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02959879>
16. Neoadjuvant mFolfirinox With or Without Preoperative Concomitant Chemoradiotherapy in Patients With Borderline Resectable Pancreatic Carcinoma (PANDAS-PRODIGE 44) - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2018 Apr 22]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02676349>
17. Elshaer M, Gravante G, Kosmin M, Riaz A, Al-Bahrani A. A systematic review of the prognostic value of lymph node ratio, number of positive nodes and total nodes examined in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann R Coll Surg Engl.* 2017 Feb;99(2):101–6.
18. Ferrone CR, Pieretti-Vanmarcke R, Bloom JP, Zheng H, Szymonifka J, Wargo JA, et al. Pancreatic ductal adenocarcinoma: long-term survival does not equal cure. *Surgery.* 2012 Sep;152(3 Suppl 1):S43-49.
19. Paniccia A, Hosokawa P, Henderson W, Schulick RD, Edil BH, McCarter MD, et al. Characteristics of 10-Year Survivors of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *JAMA Surg.* 2015 Aug;150(8):701–10.
20. Schlitter AM, Jesinghaus M, Jäger C, Konukiewitz B, Muckenhuber A, Demir IE, et al. pT but not pN stage of the 8th TNM classification significantly improves prognostication in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2017;84:121–9.
21. Collisson EA, Sadanandam A, Olson P, Gibb WJ, Truitt M, Gu S, et al. Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat Med.* 2011 Apr;17(4):500.
22. Birnbaum DJ, Finetti P, Birnbaum D, Mamessier E, Bertucci F. Validation and comparison of the molecular classifications of pancreatic carcinomas. *Mol Cancer*

[Internet]. 2017 Nov 6 [cited 2018 Apr 13];16. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5674743/>

23. Bailey P, Chang DK, Nones K, Johns AL, Patch A-M, Gingras M-C, et al. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature*. 2016 Mar 3;531(7592):47–52.
24. Moffitt RA, Marayati R, Flate EL, Volmar KE, Loeza SGH, Hoadley KA, et al. Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Genet*. 2015 Oct;47(10):1168–78.
25. Cros J, Raffenne J, Couvelard A, Poté N. Tumor Heterogeneity in Pancreatic Adenocarcinoma. *Pathobiology* [Internet]. 2017 Aug 5 [cited 2018 Jan 28];(0). Available from: <http://www.karger.com/gate2.inist.fr/Article/FullText/477773>
26. Berg KB, Schaeffer DF. Tumor budding as a standardized parameter in gastrointestinal carcinomas: more than just the colon. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2018 Feb 6;
27. Mitrovic B, Schaeffer DF, Riddell RH, Kirsch R. Tumor budding in colorectal carcinoma: time to take notice. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2012 Oct;25(10):1315–25.
28. van Wyk HC, Park J, Roxburgh C, Horgan P, Foulis A, McMillan DC. The role of tumour budding in predicting survival in patients with primary operable colorectal cancer: a systematic review. *Cancer Treat Rev*. 2015 Feb;41(2):151–9.
29. Smedt LD, Palmans S, Sagaert X. Tumour budding in colorectal cancer: what do we know and what can we do? *Virchows Arch*. 2015 Nov 27;1–12.
30. Rogers AC, Winter DC, Heeney A, Gibbons D, Lugli A, Puppa G, et al. Systematic review and meta-analysis of the impact of tumour budding in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2016 27;115(7):831–40.
31. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, Dawson H, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2017 Sep;30(9):1299–311.
32. Koelzer VH, Zlobec I, Lugli A. Tumor budding in colorectal cancer--ready for diagnostic practice? *Hum Pathol*. 2016 Jan;47(1):4–19.
33. Zlobec I, Hädrich M, Dawson H, Koelzer VH, Borner M, Mallaev M, et al. Intratumoural budding (ITB) in preoperative biopsies predicts the presence of lymph node and distant metastases in colon and rectal cancer patients. *Br J Cancer*. 2014 Feb 18;110(4):1008–13.

34. Rogers AC, Gibbons D, Hanly AM, Hyland JMP, O'Connell PR, Winter DC, et al. Prognostic significance of tumor budding in rectal cancer biopsies before neoadjuvant therapy. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2014 Jan;27(1):156–62.
35. Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP. American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference: Colorectal Working Group. *Cancer.* 2000 Apr 1;88(7):1739–57.
36. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000 Jul;124(7):979–94.
37. Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A, Valentini V, Glimelius B, Haustermans K, et al. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2012 Oct;23(10):2479–516.
38. Société Française de Pathologie - Recommandations [Internet]. [cited 2018 Apr 13]. Available from: <http://www.sfpathol.org/documents-publics-recommandations.html>
39. Kohler I, Bronsert P, Timme S, Werner M, Brabletz T, Hopt UT, et al. Detailed analysis of epithelial-mesenchymal transition and tumor budding identifies predictors of long-term survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 2015 Mar;30 Suppl 1:78–84.
40. Masugi Y, Yamazaki K, Hibi T, Aiura K, Kitagawa Y, Sakamoto M. Solitary cell infiltration is a novel indicator of poor prognosis and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer. *Hum Pathol.* 2010 Aug;41(8):1061–8.
41. Karamitopoulou E, Zlobec I, Born D, Kondi-Pafiti A, Lykoudis P, Mellou A, et al. Tumour budding is a strong and independent prognostic factor in pancreatic cancer. *Eur J Cancer.* 2013 Mar;49(5):1032–9.
42. Karamitopoulou E, Wartenberg M, Zlobec I, Cibin S, Worni M, Gloor B, et al. Tumour Budding in Pancreatic Cancer revisited: Validation of the ITBCC Scoring System. *Histopathology.* 2018 Mar 1;
43. O'Connor K, Li-Chang HH, Kalloger SE, Peixoto RD, Webber DL, Owen DA, et al. Tumor Budding Is an Independent Adverse Prognostic Factor in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: *Am J Surg Pathol.* 2015 Apr;39(4):472–8.
44. Takahashi K, Hisaka T, Horiuchi H, Ishikawa H, Nakayama M, Nakashima O, et al. Neoplastic spindle cells are an independent prognostic factor in pancreatic cancer. *Pancreas.* 2015 Jul;44(5):742–9.

45. Karamitopoulou E, Haemmig S, Baumgartner U, Schlup C, Wartenberg M, Vassella E. MicroRNA dysregulation in the tumor microenvironment influences the phenotype of pancreatic cancer. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2017 Aug;30(8):1116–25.
46. Chouat E, Zehani A, Chelly I, Njima M, Maghrebi H, Bani MA, et al. Tumor budding is a prognostic factor linked to epithelial mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma. Study report and literature review. *Pancreatology.* 2018 Jan 1;18(1):79–84.
47. Zhou P, Li B, Liu F, Zhang M, Wang Q, Liu Y, et al. The epithelial to mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cells: implication for treatment resistance in pancreatic cancer. *Mol Cancer.* 2017 Feb 28;16(1):52.
48. Galván JA, Zlobec I, Wartenberg M, Lugli A, Gloor B, Perren A, et al. Expression of E-cadherin repressors SNAIL, ZEB1 and ZEB2 by tumour and stromal cells influences tumour-budding phenotype and suggests heterogeneity of stromal cells in pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 2015 Jun 9;112(12):1944–50.
49. Svrcek M, Fléjou J-F. Tumor budding in colorectal cancers [Internet]. 2012. Available from: <https://doi.org/10.4267/2042/47605>
50. Karamitopoulou E. Tumor budding cells, cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition-type cells in pancreatic cancer. *Front Oncol [Internet].* 2013 Jan 4 [cited 2017 Mar 2];2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3539658/>
51. Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA. Cancer stem cells: mirage or reality? *Nat Med.* 2009 Sep;15(9):1010–2.
52. Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer.* 2009 Apr;9(4):265–73.
53. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009 Jun 1;119(6):1420–8.
54. Karamitopoulou E, Zlobec I, Panayiotides I, Patsouris ES, Peros G, Rallis G, et al. Systematic analysis of proteins from different signaling pathways in the tumor center and the invasive front of colorectal cancer. *Hum Pathol.* 2011 Dec;42(12):1888–96.
55. Du Z, Qin R, Wei C, Wang M, Shi C, Tian R, et al. Pancreatic Cancer Cells Resistant to Chemoradiotherapy Rich in “Stem-Cell-Like” Tumor Cells. *Dig Dis Sci.* 2011 Mar 1;56(3):741–50.
56. Izumiya M, Kabashima A, Higuchi H, Igarashi T, Sakai G, Iizuka H, et al. Chemoresistance Is Associated with Cancer Stem Cell-like Properties and Epithelial-

to-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer Cells. *Anticancer Res.* 2012 Jan 9;32(9):3847–53.

57. Shibue T, Weinberg RA. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017 Oct;14(10):611–29.

58. Friedl P, Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Jul;10(7):445.

59. Floor S, van Staveren WCG, Larsimont D, Dumont JE, Maenhaut C. Cancer cells in epithelial-to-mesenchymal transition and tumor-propagating-cancer stem cells: distinct, overlapping or same populations. *Oncogene.* 2011 Nov 17;30(46):4609–21.

60. Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M, Kaye J, Sugimoto H, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature.* 2015 Nov 26;527(7579):525–30.

61. Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, et al. Variable β -catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Aug 28;98(18):10356–61.

62. Arumugam T, Ramachandran V, Fournier KF, Wang H, Marquis L, Abbruzzese JL, et al. Epithelial to Mesenchymal Transition Contributes to Drug Resistance in Pancreatic Cancer. *Cancer Res.* 2009 Jul 15;69(14):5820–8.

63. Whittle MC, Hingorani SR. Disconnect between EMT and metastasis in pancreas cancer. *Oncotarget.* 2015 Sep 18;6(31):30445–6.

64. Yamada S, Fuchs BC, Fujii T, Shimoyama Y, Sugimoto H, Nomoto S, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition predicts prognosis of pancreatic cancer. *Surgery.* 2013 Nov;154(5):946–54.

65. Feig C, Gopinathan A, Neesse A, Chan DS, Cook N, Tuveson DA. The pancreas cancer microenvironment. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2012 Aug 15;18(16):4266–76.

66. Karamitopoulou E, Zlobec I, Kölzer V, Kondi-Pafiti A, Patsouris ES, Gennatas K, et al. Proposal for a 10-high-power-fields scoring method for the assessment of tumor budding in colorectal cancer. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2013 Feb;26(2):295–301.

67. Ueno H, Murphy J, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. Tumour “budding” as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology.* 2002 Feb;40(2):127–32.

68. Zlobec I, Molinari F, Martin V, Mazzucchelli L, Saletti P, Trezzi R, et al. Tumor budding predicts response to anti-EGFR therapies in metastatic colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol*. 2010 Oct 14;16(38):4823–31.
69. Giger OT, Comtesse SCM, Lugli A, Zlobec I, Kurrer MO. Intra-tumoral budding in preoperative biopsy specimens predicts lymph node and distant metastasis in patients with colorectal cancer. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2012 Jul;25(7):1048–53.
70. Puppa G, Senore C, Sheahan K, Vieth M, Lugli A, Zlobec I, et al. Diagnostic reproducibility of tumour budding in colorectal cancer: a multicentre, multinational study using virtual microscopy. *Histopathology*. 2012 Oct;61(4):562–75.
71. Park K-J, Choi H-J, Roh M-S, Kwon H-C, Kim C. Intensity of tumor budding and its prognostic implications in invasive colon carcinoma. *Dis Colon Rectum*. 2005 Aug;48(8):1597–602.
72. Shinto E, Jass JR, Tsuda H, Sato T, Ueno H, Hase K, et al. Differential prognostic significance of morphologic invasive markers in colorectal cancer: tumor budding and cytoplasmic podia. *Dis Colon Rectum*. 2006 Sep;49(9):1422–30.
73. Choi H-J, Park K-J, Shin J-S, Roh M-S, Kwon H-C, Lee H-S. Tumor budding as a prognostic marker in stage-III rectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis*. 2007 Aug;22(8):863–8.
74. Wang LM, Kevans D, Mulcahy H, O’Sullivan J, Fennelly D, Hyland J, et al. Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. *Am J Surg Pathol*. 2009 Jan;33(1):134–41.
75. Betge J, Kornprat P, Pollheimer MJ, Lindtner RA, Schlemmer A, Rehak P, et al. Tumor budding is an independent predictor of outcome in AJCC/UICC stage II colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2012 Nov;19(12):3706–12.
76. Graham RP, Vierkant RA, Tillmans LS, Wang AH, Laird PW, Weisenberger DJ, et al. Tumor Budding in Colorectal Carcinoma: Confirmation of Prognostic Significance and Histologic Cutoff in a Population-based Cohort. *Am J Surg Pathol*. 2015 Oct;39(10):1340–6.
77. Prall F, Nizze H, Barten M. Tumour budding as prognostic factor in stage I/II colorectal carcinoma. *Histopathology*. 2005 Jul;47(1):17–24.
78. Koelzer VH, Zlobec I, Berger MD, Cathomas G, Dawson H, Dirschmid K, et al. Tumor budding in colorectal cancer revisited: results of a multicenter interobserver study. *Virchows Arch Int J Pathol*. 2015 May;466(5):485–93.
79. Konishi T, Shimada Y, Lee LH, Cavalcanti MS, Hsu M, Smith JJ, et al. Poorly Differentiated Clusters Predict Colon Cancer Recurrence: An In-Depth Comparative

Analysis of Invasive-Front Prognostic Markers. *Am J Surg Pathol*. 2018 Jun;42(6):705.

80. Guo L, Kuroda N, Nakayama H, Miyazaki E, Hayashi Y, Toi M, et al. Cytokeratin-positive subserosal myofibroblasts in gastroduodenal ulcer; another type of myofibroblasts. *Histol Histopathol*. 2006;21(7):697–704.
81. Martin B, Schäfer E, Jakubowicz E, Mayr P, Ihringer R, Anthuber M, et al. Interobserver variability in the H&E-based assessment of tumor budding in pT3/4 colon cancer: does it affect the prognostic relevance? *Virchows Arch Int J Pathol*. 2018 Apr 6;
82. Gabbert HE, Meier S, Gerharz CD, Hommel G. Tumor-cell dissociation at the invasion front: a new prognostic parameter in gastric cancer patients. *Int J Cancer*. 1992 Jan 21;50(2):202–7.
83. Prall F. Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology*. 2007 Jan;50(1):151–62.
84. Koike M, Kodera Y, Itoh Y, Nakayama G, Fujiwara M, Hamajima N, et al. Multivariate analysis of the pathologic features of esophageal squamous cell cancer: tumor budding is a significant independent prognostic factor. *Ann Surg Oncol*. 2008 Jul;15(7):1977–82.
85. Ohike N, Coban I, Kim GE, Basturk O, Tajiri T, Krasinskas A, et al. Tumor budding as a strong prognostic indicator in invasive ampullary adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2010 Oct;34(10):1417–24.
86. Lugli A, Karamitopoulou E, Zlobec I. Tumour budding: a promising parameter in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2012 May 22;106(11):1713–7.
87. Ueno H, Kajiwara Y, Shimazaki H, Shinto E, Hashiguchi Y, Nakanishi K, et al. New criteria for histologic grading of colorectal cancer. *Am J Surg Pathol*. 2012 Feb;36(2):193–201.
88. Yamada N, Sugai T, Eizuka M, Tsuchida K, Sugimoto R, Mue Y, et al. Tumor budding at the invasive front of colorectal cancer may not be associated with the epithelial-mesenchymal transition. *Hum Pathol*. 2017 Feb;60:151–9.
89. Enderle-Ammour K, Bader M, Ahrens TD, Franke K, Timme S, Csanadi A, et al. Form follows function: Morphological and immunohistological insights into epithelial-mesenchymal transition characteristics of tumor buds. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. 2017 May;39(5):1010428317705501.
90. Bronsert P, Kohler I, Timme S, Kiefer S, Werner M, Schilling O, et al. Prognostic significance of Zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1) expression in cancer cells and cancer-associated fibroblasts in pancreatic head cancer. *Surgery*. 2014 Jul;156(1):97–108.

91. Nieto MA. Context-specific roles of EMT programmes in cancer cell dissemination. *Nat Cell Biol.* 2017 May;19(5):416–8.
92. Vu T, Datta PK. Regulation of EMT in Colorectal Cancer: A Culprit in Metastasis. *Cancers.* 2017 Dec 16;9(12).
93. Liu X, Huang H, Remmers N, Hollingsworth MA. Loss of E-cadherin and epithelial to mesenchymal transition is not required for cell motility in tissues or for metastasis. *Tissue Barriers.* 2014;2(4):e969112.
94. Grigore AD, Jolly MK, Jia D, Farach-Carson MC, Levine H. Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT. *J Clin Med [Internet].* 2016 May [cited 2017 Mar 14];5(5). Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov.doc-distant.univ-lille2.fr/pmc/articles/PMC4882480/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/doc-distant.univ-lille2.fr/pmc/articles/PMC4882480/)
95. Dawson H, Lugli A. Molecular and Pathogenetic Aspects of Tumor Budding in Colorectal Cancer. *Front Med [Internet].* 2015 [cited 2018 May 8];2. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2015.00011/full>
96. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell.* 2007 Sep 13;1(3):313–23.
97. Wellner U, Schubert J, Burk UC, Schmalhofer O, Zhu F, Sonntag A, et al. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol.* 2009 Dec;11(12):1487–95.
98. Bronsert P, Enderle-Ammour K, Bader M, Timme S, Kuehs M, Csanadi A, et al. Cancer cell invasion and EMT marker expression: a three-dimensional study of the human cancer-host interface. *J Pathol.* 2014 Nov;234(3):410–22.

Référence / Année	n	Traitement néoadjuvant	Compte du budding tumoral			Analyse multivariée			Association BT / marqueurs de TEM	
			Technique / HPF	Surface de champ (mm ²)	Seuil	CIO (ICC ou k)	Analyse univariée	Survie globale		Survie sans récurrence
Masugi et coll. 2010 (40)	107	non	HES / 10 hot spots	0,237	≥ 7	/	p=0,0050	p = 0,0300	NR	E-Cadh, Vim
Karamitopoulou et coll. 2013 (41)	117	?	HES / 10 HPF	0,49	> 10	ICC : 0,72	p<0,0001	p < 0,0001	p = 0,0005	/
Galvan et coll. 2015 (48)	120	?	HES et PCK / 10 hotspots	0,55	>10	/	/	/	/	β-cat et ZEB1
O'Connor et al. 2015 (43)	192	?	HES et PCK / 10 HPF	0,49	≥ 1	k : 0,43 (HES) et 0,69 (PCK)	p=0,0003	NR	p = 0,0393	/
Kohler et coll. 2015 (39)	108	non	PCK / 24 HPF	NR	> 10	/	NS p=0,0700	NR	NR	β-cat, E-cadh, vim
Chouat et coll. 2018 (46)	50	non	HES et PCK / 1 hot spot	0,19	≥ 10	k : 0,6 (HES) et 0,73 (PCK)	p=0,0080	NR	p = 0,0200	Vim
Karamitopoulou et coll. 2018 (42)	110	non	ITBCC / 1 hot spot	0,785	≥ 10	k : 0,62	NR	p = 0,0031	p = 0,0460	/

Annexe 1 : tableau bibliographique, impact pronostique du budding tumoral dans le PDAC et association aux marqueurs de TEM.

Abréviations: HES : hémalum éosine safran, PCK : pan-cytokératine, HPF : high power field, CIO : concordance inter-observateur, ICC : coefficient de corrélation intra-classe, k : kappa, TEM : transition épithélio-mésenchymateuse, NR : non renseigné, NS : non significatif, β-cat : β-caténine, E-cadh : E-cadhérine, vim : vimentine.

AUTEUR : Nom : JEANNEAU

Prénom : Marie

Date de Soutenance : 08 juin 2018

Titre de la Thèse : Etude du budding tumoral et de la transition épithélio-mésenchymateuse dans l'adénocarcinome canalaire infiltrant du pancréas

Thèse - Médecine - Lille 2018

Cadre de classement : Anatomie et Cytologie Pathologique

Mots-clés : adénocarcinome canalaire infiltrant du pancréas, budding tumoral, transition épithélio-mésenchymateuse, marqueur pronostique, chimiorésistance

Résumé : Alors que l'évaluation du budding tumoral (BT) est standardisée et recommandée en routine dans l'adénocarcinome colorectal pour lequel il a une valeur pronostique péjorative, sa valeur pronostique dans l'adénocarcinome canalaire infiltrant du pancréas (PDAC) est controversée. Les résultats des études antérieures montrent une association variable au phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), et sont difficiles à extrapoler en raison 1- de populations hétérogènes quant aux traitements reçus 2- de méthodes d'évaluation hétérogènes pour le BT et la TEM. Les objectifs de notre étude étaient de comparer deux méthodes d'évaluation du BT dans le PDAC puis de corrélérer les résultats au phénotype TEM et au pronostic sur une population homogène de patients opérés sans traitement néoadjuvant.

L'analyse a porté sur une série rétrospective monocentrique de 75 patients. Le BT était évalué sur lames entières de pièces opératoires par coloration HES selon deux méthodes, de façon indépendante par 2 pathologistes. La méthode 1 était réalisée sur 10 HPF au x40 (Karamitopoulou et coll. 2013), la méthode 2 selon la conférence internationale de consensus sur 1 HPF au x20 (ITBCC, Lugli et coll. 2017). Le phénotype épithélial ou mésenchymateux était déterminé par étude immunohistochimique, en péri et intra-tumoral, par E-Cadhérine, Vimentine et ZEB1. Les résultats ont été corrélés aux paramètres clinico-pathologiques, à la survie globale et sans récurrence.

Le BT se répartissait de la façon suivante : selon la méthode 1 : bas grade 56% et haut grade 44%, selon la méthode 2 : bas grade 47%, grade intermédiaire 37% et haut grade 16%. La méthode 1, était fastidieuse et associée à une mauvaise concordance inter-observateur. Au contraire, la méthode 2 était simple à réaliser et caractérisée par une excellente concordance inter-observateur. Un phénotype mésenchymateux était observé dans 52% des PDAC. En analyse univariée le BT de haut grade, selon les 2 méthodes, était significativement associé au phénotype mésenchymateux ($p=0,006$ et $p=0,004$, respectivement), mais pas aux autres paramètres clinico-pathologiques ni à la survie.

Notre étude montre que le budding tumoral peut être évalué de façon simple et reproductible selon la méthode de l'ITBCC dans l'adénocarcinome du pancréas. Dans notre expérience, le haut grade de budding est un reflet du phénotype mésenchymateux mais n'a pas d'impact pronostique pour les patients opérés sans traitement néoadjuvant.

Composition du Jury :

Présidente :

Madame le Professeur Emmanuelle LETEURTRE

Assesseurs :

Madame le Professeur Stéphanie TRUANT

Monsieur le Docteur Jérôme CROS

Directrice :

Madame le Docteur Florence RENAUD