

AMPLIFICATION DU GÈNE EGFR/CEP7 PAR FISH SUR COUPE DE PARAFFINE

1 INFORMATIONS GÉNÉRALES

1.1 Société, établissement ou organisme demandeur :

Centre universitaire de santé McGill

1.2 Date de demande d'examen : 29 juin 2012

1.3 Date de l'avis : 2 avril 2013

Mise en garde :

Le présent avis est fondé sur les informations scientifiques et commerciales [déposées par le(s) demandeur(s) ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire] selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

2 TECHNOLOGIE, SOCIÉTÉ ET LICENCE(S)

2.1 Nom de la technologie : analyse de l'amplification du gène du récepteur de croissance épidermique (*EGFR*) relativement au nombre de copies du chromosome 7 (CEP7) par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH).

2.2 Description brève de la technologie : la FISH permet d'analyser visuellement la balance des locus/chromosomes au moyen de la microscopie à fluorescence [Fontaine *et al.*, 2008]. Dans ce cas-ci, l'analyse du ratio *EGFR*/CEP7 repose sur l'appariement d'une sonde fluorescente spécifique au locus du gène *EGFR* et d'une sonde contrôle, spécifique au centromère du chromosome 7 (CEP7). L'objectif est de vérifier la présence d'un gain du nombre de copies d'*EGFR* (amplification) relativement au nombre de copies du chromosome 7 (voir la figure 1).

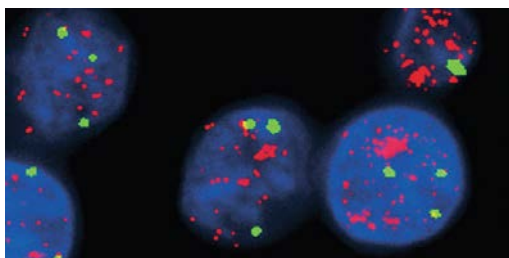


Figure adaptée de Horbinski *et al.*, 2011b.

Figure 1. Analyse de l'amplification d'*EGFR* et énumération du chromosome 7 par FISH



2.3 Société ou développeur : Dr Marie-Christine Guiot, pathologiste au CUSM, selon le protocole original publié par [Brat *et al.*, 2004]¹.

Prétraitement des lames : Vysis Paraffin Pretreatment kit I (Laboratoires Abbott, Limitée).

Sondes : Vysis EGFR/CEP7 FISH Probe Kit (Laboratoires Abbott, Limitée).

2.4 Licence(s) : licences d'établissement octroyées par Santé Canada à Laboratoires Abbott, Limitée (#210).

2.5 Brevet, le cas échéant :

2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA) :

Prétraitement des lames

Homologation Santé Canada : FISH SPECIMEN PRETREATMENT REAGENT KIT #79946 (Abbott Molecular Inc.)

Sondes

Homologation Santé Canada : VYSIS EGFR/CEP7 FISH PROBE KIT #81666 (Abbott Molecular Inc.)

2.7 Valeur pondérée : 250,44.

3 INDICATIONS CLINIQUES, MILIEUX DE PRATIQUE ET MODALITÉS D'ADMINISTRATION

3.1 Patients ciblés :

Personnes atteintes d'un oligodendrogliome (ODG) ou d'un glioblastome (GBM).

3.2 Description de la ou des maladies visée(s) :

Selon le Registre central américain des tumeurs cérébrales (CBTRUS), 90 828 cas de gliomes primaires ont été diagnostiqués aux États-Unis entre 2005 et 2009, représentant 80 % des tumeurs malignes primaires du cerveau et du système nerveux central [Dolecek *et al.*, 2012]. Le GBM compte pour 54 % des cas de gliomes alors que l'ODG représente 6,2 % des cas. L'incidence annuelle du GBM et l'ODG est de 3,2 cas et de 0,3 cas par 100 000 personnes, respectivement [Dolecek *et al.*, 2012]. Selon la classification de l'OMS, publiée en 2007, regroupant les gliomes en quatre grades (OMS I à IV), le GBM est de grade IV alors que les ODG purs et mixtes (oligoastrocytomes) sont de grade OMS II ou III, dépendamment s'il s'agit d'une forme anaplasique : oligodendrogliomes anaplasiques (OA) et oligoastrocytomes anaplasiques (OAA) [Louis *et al.*, 2007]. Concernant les GBM et les ODG, les taux de survie à cinq ans sont de 4,7 % et de 79,1 %, respectivement.

3.3 Nombre de patients visés :

Le CUSM, par le biais du demandeur, rapporte faire entre 150 et 200 diagnostics de gliomes par année. Le volume d'analyses attendu pour les trois prochaines années a été estimé entre 300 et 350 analyses, soit plus de 100 par année.

¹ Communication électronique personnelle avec Dr Marie-Christine Guiot (9 janvier 2013).

3.4 Spécialités médicales concernées (et autres professionnels, le cas échéant) :

Radio-oncologie, hémato-oncologie et neuropathologie.

3.5 Modalités d'administration du test :

Spécimens de résection chirurgicale ou biopsique dont les tissus sont fixés au formaldéhyde et enrobés en paraffine.

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique :

Complémentaire (diagnostic). Le répertoire actuel contient plusieurs analyses du même genre.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle :

L'amplification d'*EGFR* est observée dans 50 % des GBM et dans 15 % à 20 % des gliomes de grade OMS III (OA, OAA et AA) [Furnari *et al.*, 2007]. L'amplification du nombre de copies du gène *EGFR* varie de quelques-unes à plusieurs milliers dans chaque noyau. Plusieurs techniques permettent de mettre en évidence l'amplification, notamment la réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR), l'hybridation génomique comparative (CGH) et le FISH. Le niveau d'expression de la protéine EGFR peut être évalué par immunohistochimie.

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie :

L'amplification d'EGFR est une signature génétique presque exclusive au GBM et la présence de cette caractéristique augmente avec l'âge du patient [Ohgaki *et al.*, 2004]. Les statuts EGFR^{amp} et del(1p/19q), une signature de l'ODG, sont mutuellement exclusifs [Idbaih *et al.*, 2011]. Le GBM se présente en plusieurs sous-types histologiques : pléomorphe (26 %), gémistocytique (25 %), à composantes oligodendrogiales (15 %), à petites cellules (27 %), gliosarcomes (2 %), à cellules géantes (1 %) et mixtes [Hatanpaa *et al.*, 2010]. L'analyse du statut EGFR par FISH serait utile notamment pour : 1) conclure un diagnostic de GBM lorsque les critères histologiques sont insuffisants pour le faire, p. ex., différencier les tumeurs ODG de haut grade et les GBM à petites cellules, 2) différencier un GBM primaire d'un GBM récurrent et 3) mieux apprécier le pronostic des tumeurs OMS III. Les tissus de tumeurs cérébrales étant habituellement fixés au formaldéhyde et conservés en bloc de paraffine, le FISH peut être réalisé simplement et rapidement sur ce type d'échantillons, et ce, peu importe l'âge des tissus [Jha *et al.*, 2011; Woehrer *et al.*, 2011].

4.4 Le coût de la technologie et des options :

L'examen des lames requiert un microscope à fluorescence équipé avec les filtres adéquats (Carl Zeiss Canada). De plus, étant donné que le signal fluorescent disparaît avec le temps, un système de photo documentation adéquat est requis relativement à l'archivage des données. Le coût de l'équipement et des trousseaux n'est pas connu.

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 La pertinence clinique (validité et utilité cliniques) et la validité analytique

5.1.1 Remplacement d'un autre test

Ne s'applique pas.

5.1.2 Valeur diagnostique et pronostique du statut EGFR^{amp} évalué par FISH

Diagnostic différentiel ODG anaplasique et GBM à petites cellules

En 2004, Korshunov et ses collaborateurs ont publié une étude de cohorte de 114 patients atteints d'un gliome de haut grade (GHG) avec une morphologie uniforme à petites cellules. L'objectif principal était de vérifier les valeurs diagnostiques et pronostiques de différents marqueurs génétiques associés aux gliomes, dont l'EGFR. À l'intérieur du groupe de tumeurs à petites cellules, les auteurs ont constaté une très grande variété de profils génétiques et d'issues cliniques. Quatre sous-groupes distincts ont été identifiés : 1) 13 patients dont la tumeur ne comportait aucune altération génétique et dont le taux de survie globale à 5 ans (SG 5 ans) était de 83 %, 2) 20 patients de statut del(1p/19q) ou del 19q (SG 5 ans : 59 %), 3) 35 patients dont la tumeur comportait une délétion de *p16* et(ou) et *PTEN* sans amplification d'EGFR (SG 5 ans : 8 %) et 46 patients de statut EGFR^{amp} (SG 5 ans : 0 %). Des analyses multivariées ont démontré qu'en présence d'un GHG à petites cellules, le statut EGFR^{amp} est un facteur indépendant de mauvais pronostic alors que l'absence d'aberrations génétiques de même qu'un statut del(1p/19q) sont des facteurs de bon pronostic (voir le tableau 1). Perry et ses collaborateurs concluent également que le statut EGFR^{amp} est un marqueur distinctif des astrocytomes à petites cellules et prédit un comportement biologique agressif de type GBM.

5.1.3 Valeur diagnostique et pronostique du statut EGFR^{amp} (OMS III)

Le diagnostic histopathologique du GBM (OMS IV) requiert la présence de cellules gliales anaplasiques, d'une activité mitotique accrue et d'une prolifération vasculaire accompagnée ou non de nécrose [Louis *et al.*, 2007]. La variation interobservateur est rare concernant le diagnostic de GBM, mais a été bien décrite dans le cas de gliomes de grades inférieurs [van den Bent, 2010]. L'hypothèse voulant que le statut EGFR soit un outil de diagnostic complémentaire des tumeurs de grades OMS III et puisse mieux prédire le comportement biologique de celles-ci a été vérifiée.

Le tableau 1 présente quelques études ayant comme objectif de vérifier la valeur pronostique indépendante du statut EGFR^{amp} parmi des cohortes de patients atteints de tumeurs oligodendrogiales ou astrocytaires anaplasiques (OMS III). Hormis l'étude de Korshunov visant un groupe de tumeurs morphologiquement classées entre les grades OMS III et IV, aucune des études repérées n'a pu établir de façon statistiquement significative une valeur pronostique indépendante associée au statut EGFR^{amp} relativement aux tumeurs OMS III (voir le tableau 1).

5.1.4 Statut EGFR^{amp} distingue le GBM primaire du GBM secondaire

Le GBM primaire, sans manifestations cliniques antérieures ou preuves d'une évolution issue d'un astrocytome de grade inférieur (GBM secondaire), représente 90 % des cas et survient surtout chez les personnes âgées [Barker *et al.*, 2012]. Le fait que l'amplification d'EGFR soit observée uniquement dans les GBM suggère qu'il s'agirait d'un événement tardif de la progression tumorale des astrocytomes [Hoang-Xuan *et al.*, 2005]. Benito et ses collaborateurs [2010] ont analysé l'association entre l'amplification ou non d'EGFR et les caractéristiques cliniques et génétiques d'une série de 45 GBM primaires. Plus de la moitié des cas ont présenté une amplification d'EGFR (53 %). Aucun bénéfice de survie n'a été associé à cette caractéristique (données non montrées). Les GBM secondaires représentent environ 10 % des cas et se développent chez des patients plus jeunes (moins de 50 ans). Ils contiennent souvent des mutations des gènes *TP53* et *IDH1*. La fréquence de délétions de *PTEN* et d'amplifications

d'EGFR sont faibles. Plusieurs études ont confirmé ces données qui distinguent le GBM de novo du GBM secondaire [Appin *et al.*, 2013; Watanabe *et al.*, 1996].

En résumé, l'amplification d'EGFR demeure essentiellement un marqueur diagnostique étant donné que le statut EGFR^{amp} ne semble pas fournir d'informations pronostiques supplémentaires, probablement en raison de sa forte association avec le diagnostic de GBM [Horbinski *et al.*, 2011b]. Parmi les ODG anaplasiques, il semble que le mauvais pronostic associé au statut EGFR^{amp} soit en fait un mauvais diagnostic de GBM à petites cellules [Fallon *et al.*, 2004].

Tableau 1. Valeurs pronostiques du statut EGFR^{amp} évaluées par FISH

Plan de l'étude	EGFR ^{amp} / Chr. 7 ^{poly}	Valeur pronostique		
[Fuller <i>et al.</i> , 2003] (Étude de cohorte, OA diffus de grades variables)				
RT+CT, N = 70, 37 ans (12-78), suivi de 3,3 ans.	10 %/Non évalué	Variables	SG (mois)	HR décès multivariée (N = 70)
		Grades : OMS II, III et IV	NA, 73 et 12; p < 0,0001	II vs III : 3,2; p = 0,03 (59) II vs IV : 5,6; p = 0,002 (45)
		< 40 ans, 40-59 ans, ≥ 60 ans	96, 73 et 4; p < 0,0001	1,06; p = 0,0001
		EGFR ^{amp} : oui vs non	16 vs 96; p = 0,0007	NS
[Korshunov <i>et al.</i> , 2004] (Étude de cohorte, gliomes de haut grade à petites cellules)				
RT+CT, N = 114, 47 ans (19-72), suivi de 117 mois.	40 %/59 %	Variables	SG 5 ans (%)	HR décès multivariée (N = 114)
		< 50 ans vs ≥ 50 ans	37 vs 9; p = 0,004	NS
		EGFR ^{amp} : oui vs non	0 vs 41; p < 0,0001	3,28; P = 0,001
		Chr. 7 ^{poly} : oui vs non	5 vs 55; p < 0,0001	NS
		del 1p/19q : oui vs non	54 vs 17; p < 0,0001	- 2,79; p = 0,01
		Sans altérations : oui vs non	83 vs 12; p < 0,0001	-3,47; p = 0,0006
[Dehais <i>et al.</i> , 2006] (Étude de cohorte, AA : 9 %, OA : 56 % et OAA : 35 %)				
RT+CT, N = 156, 46 ans (20-83), suivi médian de 57,3 mois.	17 % / Non évalué	Variables	SG médiane (mois)	RR décès multivariée (N)
		> 46 ans vs ≤ 46 ans	25 vs 41; p = 0,012	1,73; p = 0,018 (156)
		OA vs OAA et AA	67 vs 29; p = 0,0002	0,54; p = 0,01 (156)
		EGFR ^{amp} : oui vs non	17 vs 39; p = 0,0002	NS (150)
		del 1p/19q : oui vs non	99 vs 29; p = 0,0002	0,30; p = 0,0025 (143)

[Kouwenhoven <i>et al.</i> , 2009] (Étude de cohorte, précision du pronostic OA et OAA)				
		Variables	HR décès univariée (N = 368)	HR (décès) multivariée (N)
EORTC 26951 RT vs RT+PCV, N = 368, 48 ans (19-68), suivi de 117 mois.	14 %/ 19 %	< 50 ans vs ≥ 50 ans	Non évalué	HR : 1,85; p = 0,002 (84)
		EGFR ^{amp} : oui vs non	2,68; p < 0,0001	NS (29)
		Chr. 7 ^{poly} : oui vs non	1,94; p = 0,0002	HR : 1,65; p = 0,02 (59)
		del 1p/19q : oui vs non	0,12; p < 0,0001	HR : 0,12; p < 0,0001 (100)
		del 1p : oui vs non	0,57; p = 0,01	HR : 0,57; p = 0,01 (56)
		Nécrose : oui vs non	HR : 2,00; p = 0,0004	HR : 2,00; p = 0,0004 (92)

Abréviations : AA : astrocytome anaplasique; Chr. 7^{poly} : polysomie du chromosome 7; CT : chimiothérapie; HR : hazard ratio, analyse univariée ou multivariée; N : nombre de patients; NA : Non atteinte; NS : non statistiquement significatif; OA : oligoastrocytome; OAA : oligoastrocytome anaplasique; PCV : procarbazine, lomustine (CCNU) et vincristine; RT : radiothérapie; SG : survie globale; SSP : survie sans progression.

5.2 Validité clinique

Termes	Présence	Absence	Sans objet
Sensibilité	X		
Spécificité	X		
Valeur prédictive positive (VPP)	X		
Valeur prédictive négative (VPN)	X		
Rapport de vraisemblance (LR)		X	
Courbe ROC		X	
Exactitude		X	

Sensibilité, spécificité, VPP et VPN :

À partir d'une série de 750 gliomes suivis prospectivement, Horbinski *et al.* (2011a) ont démontré une forte corrélation entre le statut EGFR^{amp} et le niveau d'expression d'EGFR en IHC ($p < 0,0001$). En combinant les gliomes démontrant une immunoréactivité jugée de modérée à forte, l'IHC EGFR a pu identifier tous les cas présentant une amplification d'EGFR par FISH (sensibilité de 100 %), en plus de démontrer une VPN de 99 %. Comme plusieurs cas démontrant une immunoréactivité jugée modérée ou forte n'avaient pas d'amplification, la spécificité et la VPP étaient de 39 % et 59 %, respectivement.

Tel que démontré précédemment, l'amplification d'EGFR est considérée comme un facteur diagnostique pour les patients atteints d'un gliome de haut grade et dont la morphologie cellulaire est insuffisante pour poser le diagnostic de GBM. L'évaluation du statut EGFR^{amp} à partir de coupes en paraffine par FISH est une technique classique [Hyytinen *et al.*, 1994] et largement utilisée en clinique [Horbinski *et al.*, 2011a]. Le statut EGFR^{amp} évalué par FISH est également utilisé comme facteur de stratification dans plusieurs études cliniques récemment complétées ou présentement en cours; notamment l'étude NCT00337883² dont le but est de comparer l'efficacité de l'erlotinib, un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase(TKI), chez des patients atteints d'un GBM. Parmi les autres, on compte les ECR de phase II NCT01520870³ et NCT00301418⁴ dont les objectifs sont également d'évaluer l'efficacité de TKI chez des patients atteints de GBM ou d'AA récidivant.

Aucune étude ayant comparé la valeur pronostique du statut EGFR^{amp} évalué par FISH à d'autres méthodes n'a été repérée.

5.3 Validité analytique (ou technique)

Termes	Présence	Absence	Sans objet
Répétabilité		X	
Reproductibilité	X		
Sensibilité analytique		X	
Spécificité analytique		X	
Effet de matrice		X	
Concordance	X		
Corrélation	X		

² <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00337883> (consulté le 15 janvier 2013).

³ <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01520870> (consulté le 15 janvier 2013).

⁴ <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00301418> (consulté le 15 janvier 2013).

Le terme « amplification d'*EGFR* » fait référence à l'augmentation du nombre de copies du gène *EGFR*. Dans le cas du gliome malin, c'est la polysomie 7 qui est responsable de l'amplification de l'ADN et non juste du gène *EGFR*. Bien que l'amplification d'un gène précède souvent la surexpression de son transcrit [Coulibaly *et al.*, 2010], l'amplification du gène ne doit pas être confondue avec la surexpression de sa protéine [Schwab, 1999]. En oncologie, l'immunohistochimie (IHC) permet d'évaluer efficacement le niveau de production d'une oncoprotéine comme l'EGFR.

Reproductibilité interobservateurs

À partir d'une série de 170 spécimens histologiques et de 153 spécimens cytologiques provenant de tumeurs pulmonaires et non pulmonaires, 2 observateurs différents ont évalué le nombre moyen de copies (NMC) d'*EGFR* au moyen du FISH [Zlobec *et al.*, 2010]. Agrément interobservateur ($r = 0,99$, spécimens cytologiques et $r = 0,89$, spécimens histologiques). La différence moyenne NMC entre les observateurs était de $-0,003$ (IC95 % : $-0,05$ à $0,05$) et de $0,008$ (IC95 % : $-0,09$ à $0,11$) pour la cytologie et l'histologie, respectivement (Bland-Altman).

Concordance et corrélation entre les tests :

IHC vs FISH : Spearman test, $p < 0,0001$ [Horbinski *et al.*, 2011a] et $p = 0,0004$ [Guillaudeau *et al.*, 2009].

PCR vs FISH : Concordance de 89 % et un coefficient de corrélation kappa de 0,73 [Smith *et al.*, 2001].

5.4 Les recommandations favorables d'introduction dans les autres juridictions

L'European Society for Medical Oncology (ESMO) a publié des lignes directrices quant à la prise en charge de patients atteints de gliomes malins [Stupp *et al.*, 2010]. Le statut EGFR n'a pas été considéré.

Le National Comprehensive Cancer Network (NCCN) a publié un rapport concernant la pertinence clinique de plusieurs marqueurs tumoraux associés aux gliomes. Le statut EGFR n'a pas été considéré [Febbo *et al.*, 2011].

6 RÉPERCUSSIONS À ANTICIPER DE L'INTRODUCTION ÉVENTUELLE DE L'ANALYSE

6.1 Impact sur les ressources matérielles et humaines : Aucune étude n'a été repérée.

6.2 Conséquences économiques d'une introduction dans le système de santé et de services sociaux québécois : Aucune étude d'impact économique ou de coût-bénéfice n'a été repérée.

6.3 Principaux enjeux organisationnels, éthiques ou autres (social, juridique, politique) : L'assurance qualité est un enjeu important. Relativement à l'interprétation des résultats, des critères standards doivent être définis. Le développement des inhibiteurs de l'activité tyrosine-kinase de même que d'anticorps dirigés contre EGFR est une avenue de recherche en plein essor. Plusieurs molécules ont démontré leur efficacité dans d'autres cancers. De ce fait, l'utilité clinique d'évaluer le statut EGFR devrait être mise en perspective de la disponibilité ou non d'une thérapie efficace pour contrer l'action biologique de l'amplification d'*EGFR* [Martin *et al.*, 2009].

7 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Amplification du gène EGFR/CEP7 par FISH sur coupe de paraffine

Le statut de la technologie diagnostique :

☐ *Établie*

☐ *Innovatrice*

☒ *Expérimentale (pour la recherche uniquement)*

☐ *Remplacement de la technologie : _____ qui devient obsolète*

La recommandation de l'INESSS :

☐ *Avis de recommandation d'introduction*

☒ *Avis de refus d'introduction :*

Avec les données disponibles actuellement, l'analyse manque de maturité pour être utilisée en clinique.

Aucun traitement ciblé en fonction des résultats de l'analyse.

Très intéressant pour catégoriser les patients pour les essais cliniques.

☐ *Avis de réévaluation*

La décision de l'INESSS quant aux travaux indiqués, le cas échéant :

☐ *Lien à faire avec l'inscription de médicaments, si test compagnon*

☐ *Décision de production d'un guide d'usage optimal*

☐ *Production d'indicateurs, dans le cas d'un besoin de vigilance*

☐ *Aucun*

RÉFÉRENCES

- Appin CL, Gao J, Chisolm C, Torian M, Alexis D, Vincentelli C, et al. Glioblastoma with Oligodendroglioma Component (GBM-O): Molecular Genetic and Clinical Characteristics. *Brain Pathol* 2013;Janv 4:0.
- Barker CA, Chang M, Chou JF, Zhang Z, Beal K, Gutin PH, Iwamoto FM. Radiotherapy and concomitant temozolomide may improve survival of elderly patients with glioblastoma. *J Neurooncol* 2012;109(2):391-7.
- Benito R, Gil-Benso R, Quilis V, Perez M, Gregori-Romero M, Roldan P, et al. Primary glioblastomas with and without EGFR amplification: relationship to genetic alterations and clinicopathological features. *Neuropathology* 2010;30(4):392-400.
- Brat DJ, Seiferheld WF, Perry A, Hammond EH, Murray KJ, Schulsinger AR, et al. Analysis of 1p, 19q, 9p, and 10q as prognostic markers for high-grade astrocytomas using fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays from Radiation Therapy Oncology Group trials. *Neuro Oncol* 2004;6(2):96-103.
- Coulibaly B, Nanni I, Quilichini B, Gaudart J, Metellus P, Fina F, et al. Epidermal growth factor receptor in glioblastomas: correlation between gene copy number and protein expression. *Hum Pathol* 2010;41(6):815-23.
- Dehais C, Laigle-Donadey F, Marie Y, Kujas M, Lejeune J, Benouaich-Amiel A, et al. Prognostic stratification of patients with anaplastic gliomas according to genetic profile. *Cancer* 2006;107(8):1891-7.
- Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol* 2012;14(Suppl 5):v1-49.
- Fallon KB, Palmer CA, Roth KA, Nabors LB, Wang W, Carpenter M, et al. Prognostic value of 1p, 19q, 9p, 10q, and EGFR-FISH analyses in recurrent oligodendrogliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63(4):314-22.
- Febbo PG, Ladanyi M, Aldape KD, De Marzo AM, Hammond ME, Hayes DF, et al. NCCN Task Force report: Evaluating the clinical utility of tumor markers in oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2011;9(Suppl 5):S1-32.
- Fontaine D, Vandebos F, Lebrun C, Paquis V, Frenay M. [Diagnostic and prognostic values of 1p and 19q deletions in adult gliomas: critical review of the literature and implications in daily clinical practice]. *Rev Neurol (Paris)* 2008;164(6-7):595-604.
- Fuller CE, Schmidt RE, Roth KA, Burger PC, Scheithauer BW, Banerjee R, et al. Clinical utility of fluorescence in situ hybridization (FISH) in morphologically ambiguous gliomas with hybrid oligodendroglial/astrocytic features. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62(11):1118-28.
- Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 2007;21(21):2683-710.
- Guillaudeau A, Durand K, Pommepuy I, Robert S, Chaunavel A, Lacorre S, et al. Determination of EGFR status in gliomas: usefulness of immunohistochemistry

- and fluorescent in situ hybridization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2009;17(3):220-6.
- Hatanpaa KJ, Burma S, Zhao D, Habib AA. Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. *Neoplasia* 2010;12(9):675-84.
- Hoang-Xuan K, Idbaih A, Mokhtari K, Sanson M. [Towards a molecular classification of gliomas]. *Bull Cancer* 2005;92(4):310-6.
- Horbinski C, Hobbs J, Cieply K, Dacic S, Hamilton RL. EGFR expression stratifies oligodendroglioma behavior. *Am J Pathol* 2011a;179(4):1638-44.
- Horbinski C, Miller CR, Perry A. Gone FISHing: clinical lessons learned in brain tumor molecular diagnostics over the last decade. *Brain Pathol* 2011b;21(1):57-73.
- Hyytinen E, Visakorpi T, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Isola JJ. Improved technique for analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tumors by fluorescence in situ hybridization. *Cytometry* 1994;16(2):93-9.
- Idbaih A, Dalmasso C, Kouwenhoven M, Jeuken J, Carpentier C, Gorlia T, et al. Genomic aberrations associated with outcome in anaplastic oligodendroglial tumors treated within the EORTC phase III trial 26951. *J Neurooncol* 2011;103(2):221-30.
- Jha P, Sarkar C, Pathak P, Sharma MC, Kale SS, Gupta D, et al. Detection of allelic status of 1p and 19q by microsatellite-based PCR versus FISH: limitations and advantages in application to patient management. *Diagn Mol Pathol* 2011;20(1):40-7.
- Korshunov A, Sycheva R, Golanov A. Molecular stratification of diagnostically challenging high-grade gliomas composed of small cells: the utility of fluorescence in situ hybridization. *Clin Cancer Res* 2004;10(23):7820-6.
- Kouwenhoven MC, Gorlia T, Kros JM, Idbaih A, Brandes AA, Bromberg JE, et al. Molecular analysis of anaplastic oligodendroglial tumors in a prospective randomized study: A report from EORTC study 26951. *Neuro Oncol* 2009;11(6):737-46.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007;114(2):97-109.
- Martin V, Mazzucchelli L, Frattini M. An overview of the epidermal growth factor receptor fluorescence in situ hybridisation challenge in tumour pathology. *J Clin Pathol* 2009;62(4):314-24.
- Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 2004;64(19):6892-9.
- Perry A, Aldape KD, George DH, Burger PC. Small cell astrocytoma: an aggressive variant that is clinicopathologically and genetically distinct from anaplastic oligodendroglioma. *Cancer* 2004;101(10):2318-26.
- Schwab M. Oncogene amplification in solid tumors. *Semin Cancer Biol* 1999;9(4):319-25.
- Smith JS, Tachibana I, Passe SM, Huntley BK, Borell TJ, Iturria N, et al. PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Nat Cancer Instit* 2001;93(16):1246-56.

- Stupp R, Tonn JC, Brada M, Pentheroudakis G. High-grade malignant glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2010;21(Suppl 5):v190-3.
- van den Bent MJ. Interobserver variation of the histopathological diagnosis in clinical trials on glioma: a clinician's perspective. *Acta Neuropathol* 2010;120(3):297-304.
- Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 1996;6(3):217-23; discussion 23-4.
- Woehrler A, Sander P, Haberler C, Kern S, Maier H, Preusser M, et al. FISH-based detection of 1p 19q codeletion in oligodendroglial tumors: procedures and protocols for neuropathological practice - a publication under the auspices of the Research Committee of the European Confederation of Neuropathological Societies (Euro-CNS). *Clin Neuropathol* 2011;30(2):47-55.
- Zlobec I, Raineri I, Schneider S, Schoenegg R, Grilli B, Herzog M, et al. Assessment of mean EGFR gene copy number is a highly reproducible method for evaluating FISH in histological and cytological cancer specimens. *Lung Cancer* 2010;68(2):192-7.