

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Faculté de Pharmacie

ANNÉE 2015

THÈSE N°

**Intérêt de la classification histo-moléculaire
des gliomes diffus dans la prise en charge
thérapeutique des patients**

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

le 24 novembre 2015

par

Karine FAUCHER

née le 30 août 1974 à Limoges

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. le Professeur Philippe CARDOTPrésident

M. le Professeur François LABROUSSE Juge

M. le Professeur Bertrand LIAGRE Juge

Mme le Docteur Françoise ESCLAIRE Juge

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur Jean-Luc **DUROUX**, Professeur

1^{er} VICE-DOYEN : Madame Catherine **FAGNÈRE**, Maître de Conférences

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS :

BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GÉNÉRALE ET MINÉRALE
DESMOULIÈRE Alexis	PHYSIOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

MOESCH Christian	HYGIÈNE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
ROGEZ Sylvie	BACTÉRIOLOGIE ET VIROLOGIE
SAINT-MARCOUX Franck	TOXICOLOGIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS – ÉMÉRITES :

DREYFUSS Gilles	PARASITOLOGIE
LOUDART Nicole	PHARMACOLOGIE

MAÎTRE DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS – PRATICIEN HOSPITALIER DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

PICARD Nicolas	PHARMACOLOGIE
-----------------------	---------------

MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE
CLÉDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
DELEBASSÉE Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE- IMMUNOLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FAGNÈRE atherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
LÉGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
MERCIER Aurélien	PARASITOLOGIE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE- IMMUNOLOGIE
PASCAUD Patricia	PHARMACIE GALÉNIQUE – BIOMATERIAUX CÉRAMIQUES
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
SIMON Alain	CHIMIE GÉNÉRALE ET MINÉRALE
TROUILLAS Patrick	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

PROFESSEUR DE LYCÉE PROFESSIONNEL :

ROUMIEUX Gwenhaël	ANGLAIS
--------------------------	---------

ATTACHÉ TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

PARENT Marianne	PHARMACOTECHNIE, PHARMACIE GALÉNIQUE
VEDRENNE Nicolas	CHIMIE ANALYTIQUE
MBAKIDI Jean-Pierre	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
CHEMIN Guillaume	BIOCHIMIE ET TOXICOLOGIE

DÉTACHEMENT à compter du 1/09/2014 pour 2 ans :

MARION-THORE Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
------------------------------	-----------------------------------

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Philippe CARDOT

Professeur des Universités de Chimie Analytique, Chef de service de Chimie Analytique

C'est pour moi un honneur que vous soyez mon directeur de thèse et le président de mon jury. Je tiens à vous faire part de mon sincère respect et de ma reconnaissance pour l'aide, les conseils et le soutien dont vous avez fait preuve tout au long de mes études pharmaceutiques.

A Monsieur le Professeur François LABROUSSE

Professeur des Universités d'Anatomie Pathologique, Praticien Hospitalier, Chef de service d'Anatomie Pathologique

Je tiens à vous exprimer ma reconnaissance pour m'avoir guidée et soutenue de manière indéfectible tout au long de mon parcours et de mon travail de thèse, et pour avoir accepté d'en être le co-directeur. Merci pour votre disponibilité, vos conseils avisés et pour la relecture attentive de ce manuscrit.

A Monsieur le Professeur Bertrand LIAGRE

Professeur des Universités de Biochimie, chef de service de Biochimie

Depuis de nombreuses années, j'ai pu apprécier tes qualités personnelles et professionnelles, que tu sais mettre sans compter au service des autres. Je te remercie sincèrement de l'amitié et de l'honneur que tu me fais en acceptant de juger ce travail de thèse.

A Madame le Docteur Françoise ESCLAIRE

Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier, service de Cytologie, Histologie et cytogénétique

Je tiens à te remercier d'avoir accepté de juger ce travail. A plusieurs reprises, j'ai pu apprécier ta gentillesse, ta bonne humeur et tes qualités professionnelles au niveau universitaire mais aussi hospitalier. Tu es une personne de Qualité (au sens propre et au sens figuré bien sûr).

A toutes les personnes du Service d'Anatomie Pathologique

Cela fait plusieurs années que je fais partie de ce service et que vous me faites bénéficier de votre savoir-faire, de votre gentillesse, de votre bonne humeur sans cesse renouvelés même dans la difficulté. La pluridisciplinarité de notre travail en fait toute sa richesse et son intérêt. Je vous remercie sincèrement de tous les moments passés et à venir.

En particulier, je souhaite remercier l'équipe de la Plateforme de Génétique Moléculaire, Alain, Emilie, Marion, Jade, Maeva, et tout particulièrement Sandrine et Sylvain avec qui nous avons commencé l'aventure de la biologie moléculaire des cancers il y a 9 ans. Je n'oublie pas que vous m'avez sans cesse soutenue tout au long de mon parcours, du point de vue moral et aussi logistique. Ce sont des qualités comme les vôtres qui font de belles équipes.

Enfin, je vous voudrais dire merci à toutes les personnes avec qui j'ai collaboré, discuté, échangé et qui ont enrichi mon quotidien de chercheur et d'enseignante par leur expérience, leur gentillesse et leur disponibilité.

Je pense en premier lieu à Faraj Terro : tu m'as apporté une aide, un soutien et des conseils précieux. Tu as beaucoup de qualités personnelles et professionnelles et j'espère que nous continuerons notre collaboration longtemps.

Merci également à toutes les personnes de l'équipe EA3842, en particulier Fabrice, Barbara et Aurélie et aux autres personnes qui se reconnaîtront dans ces remerciements.

A Maman,
A Ludo,
A Mathis,
... MES 3 PILIERS

A ma famille, mes amis et tous ceux qui m'ont soutenue,
conseillée et supportée tout au long de ce parcours.

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION	8
II. GLIOMES: DEFINITION ET EPIDEMIOLOGIE	10
1. DEFINITION	10
2. EPIDEMIOLOGIE	10
III. DIAGNOSTIC ET CLASSIFICATION	11
1. ELEMENTS CLINIQUES ET RADIOLOGIQUES	11
a. <i>Eléments cliniques</i>	11
b. <i>Eléments radiologiques</i>	12
2. ANATOMO-PATHOLOGIE ET CLASSIFICATION OMS 2007	13
a. <i>Mise en évidence de la structure spatiale des gliomes</i>	13
b. <i>Critères histologiques et classification OMS 2007</i>	14
c. <i>Difficultés de la classification OMS 2007</i>	17
3. MARQUEURS MOLECULAIRES	17
i. Altération de la voie de p53	18
ii. Altération de la voie Rb (rétinoblastome)	19
iii. Pertes combinées des bras entiers 1p et 19q et du chromosome 10	19
iv. Mutation des gènes IDH1 et IDH2	21
v. Marqueurs de la maintenance des télomères	22
vi. Inactivation du gène MGMT	23
vii. Altération de l'EGFR	23
4. VERS UNE NOUVELLE CLASSIFICATION OMS 2015	27
IV. PRONOSTIC ET PRISE EN CHARGE	28
1. PRONOSTIC	28
2. PRISE EN CHARGE SELON LES RECOMMANDATIONS HAS	29
a. <i>Traitements spécifiques</i>	29
i. Prise en charge chirurgicale	30
ii. Radiothérapie	31
iii. Chimiothérapie ou thérapie ciblée	31
b. <i>Traitements d'accompagnement</i>	34
i. Corticothérapie	34
ii. Traitement antiépileptique	34
iii. Autres traitements symptomatiques	34
iv. Prise en charge globale	34
c. <i>Suivi et évaluation de la réponse aux traitements</i>	35
d. <i>Traitement des récurrences</i>	35
e. <i>Essais cliniques</i>	35
V. EXPOSE DES TRAVAUX: RECHERCHE DE BIOMARQUEURS POUR LA PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE	38
VI. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	76
VII. CONCLUSION	78
VIII. BIBLIOGRAPHIE	79

I. INTRODUCTION

Les gliomes sont des tumeurs du système nerveux central qui se développent à partir du tissu de soutien appelé glie. La prise en charge de ces tumeurs est difficile avec un pronostic sombre à cause de l'hétérogénéité intra-tumorale mais également inter-individuelle. En effet, ce sont des tumeurs qui présentent une importante hétérogénéité du point de vue clinique, histologique et moléculaire. De ce fait, elles sont difficiles à diagnostiquer et à classer de manière reproductible. Plusieurs classifications de ces tumeurs, émanant d'un consensus international, se sont succédées. La dernière en date est la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) 2007. Elle permet de distinguer des tumeurs (1) de grades II à IV, en fonction du degré de malignité observé histologiquement, et (2) de type cytologique différent en fonction de la morphologie d'apparement des cellules tumorales (morphologie d'oligodendrocyte ou d'astrocyte). La classification OMS 2007 propose donc principalement sept types de gliomes distincts, chacun avec un pronostic et une prise en charge thérapeutique qui lui est propre, d'où l'importance de classer correctement ces tumeurs. Un autre niveau de difficulté est le caractère souvent incomplet de l'exérèse chirurgicale. La localisation et la topographie de la tumeur sont en effet critiques pour la préservation des fonctions motrices ou cognitives du patient. De plus, une des caractéristiques notable et unique en oncologie est la capacité des tumeurs gliales à émettre à partir de leur périphérie des cellules tumorales isolées qui envahissent le parenchyme cérébral environnant et qui représentent une cause majeure de récurrence.

C'est dans ce contexte difficile, que les marqueurs moléculaires ont fait leur apparition, il y a une quinzaine d'années. Ce sont des anomalies génétiques, épigénétiques, génomiques ou protéiques qui ont été montrées comme spécifiques d'un sous-type ou d'un grade tumoral donné. Elles ont permis d'apporter un niveau de précision supplémentaire dans la classification des tumeurs gliales. L'exemple le plus représentatif de l'utilité des marqueurs moléculaires est la perte complète et combinée des bras chromosomiques 1p et 19q, caractéristique quasi exclusive du sous-type de tumeur gliale que sont les oligodendrogliomes. Cette altération génomique est utile au diagnostic mais a également une valeur pronostique et prédictive de la réponse à la chimiothérapie. L'intensification de la recherche fondamentale et clinique dans ce domaine a permis de consacrer d'autres marqueurs moléculaires pour la prise en charge des tumeurs gliales : méthylation du promoteur du gène *MGMT*, amplification et mutation du gène *EGFR*, mutations des gènes *IDH*, *BRAF*, *p53* ou encore *ATRX*. Le terme de classification histo-moléculaire a progressivement émergé, avec une utilisation concrète pour

le diagnostic puisque qu'une nouvelle classification OMS les intégrant va remplacer prochainement la classification 2007. De plus, la classification histo-moléculaire a une conséquence directe pour l'évaluation du pronostic, de la réponse à la chimiothérapie ou à la radiothérapie. Enfin, un nombre croissant d'essais cliniques peuvent inclure les patients présentant des marqueurs histo-moléculaires spécifiques et associés à la molécule thérapeutique proposée.

Ce travail de thèse a pour objectif de présenter les différents critères cliniques, radiologiques et histologiques de la classification OMS actuelle et d'expliquer pourquoi les marqueurs moléculaires, qu'ils soient génétiques, génomiques, épigénétiques ou protéiques sont utiles pour la prise en charge des gliomes. Enfin, nous présenterons les travaux de recherche grâce auxquels l'équipe du service d'Anatomie Pathologique a contribué par ses travaux à la consécration des marqueurs histo-moléculaire, en présentant trois articles publiés sur cette thématique.

II. Gliomes: définition et épidémiologie

1. Définition

Les gliomes sont des tumeurs primitives du système nerveux central (SNC). Ils constituent un ensemble hétérogène dans lequel chaque type tumoral correspond à l'une des cellules du tissu de soutien nerveux appelé glie (Figure 1). La glie se compose essentiellement d'astrocytes, cellules à multiples rôles (protection des neurones, soutien, apport de nutriment, défense immunitaire, etc...), d'oligodendrocytes, cellules essentielles pour la production de la myéline, et d'épendymocytes, qui séparent le tissu nerveux du liquide céphalo-rachidien.

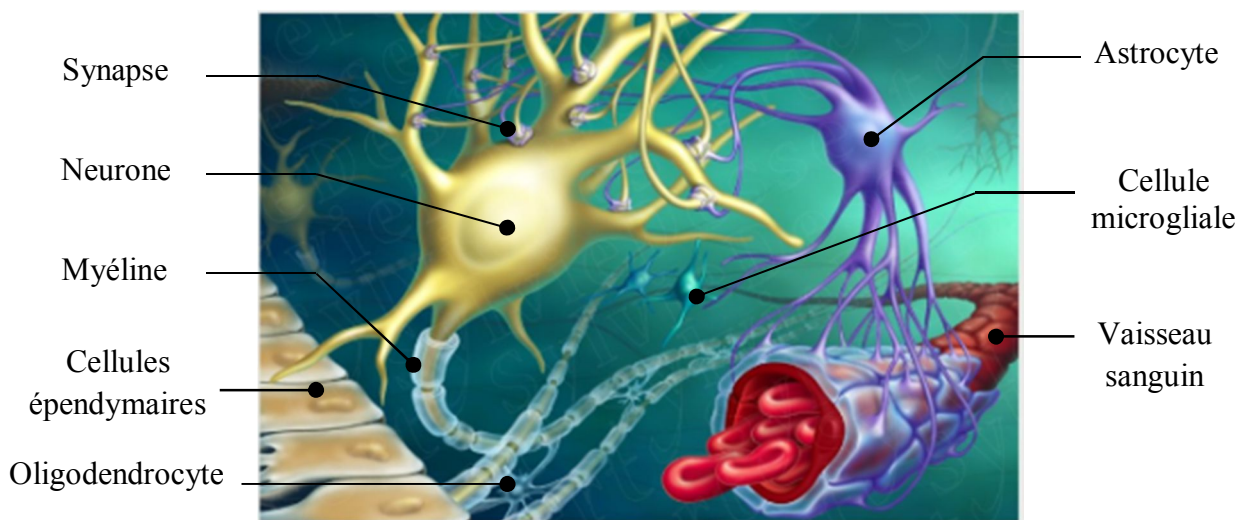


Figure 1. Représentation schématique des principales cellules du tissu de soutien du système nerveux central (SNC). D'après <http://sylvie-dessert.net/Biologie-médicale.fr>.

Les gliomes regroupent principalement les astrocytomes, dérivé des astrocytes et les oligodendrogliomes, dérivés des oligodendrocytes.

2. Epidémiologie

Les cancers du SNC représentent environ 2% des tumeurs malignes de l'adulte avec une incidence de 4999 cas en 2012 dont 56% chez l'homme (*Institut de Veille Sanitaire, 2015*). Ce sont des cancers de mauvais pronostic : la mortalité a légèrement augmenté jusqu'en 2000 et montre une petite tendance à la décroissance depuis le milieu des années 2000, de 1,1% par an chez les hommes et de 1,9% par an chez les femmes. En 2012, le nombre estimé de décès était de 3052 dont 58% d'hommes (*Institut de Veille Sanitaire, 2015*).

Les gliomes sont les tumeurs primitives les plus fréquentes du système nerveux central de l'adulte (*Louis et al. 2007(a) ; Louis et al. 2007(b)*) et les secondes après les leucémies chez l'enfant. L'incidence des gliomes dépend du grade au moment du diagnostic : ainsi le registre spécialisé de la Gironde fait état de 500 à 700 nouveaux cas pour les gliomes diffus de bas grade (grade II), de 800 à 1000 pour les gliomes anaplasiques (grade III) et de 3000 pour les glioblastomes (gliomes de grade IV). Les glioblastomes sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes, représentant 15% de toutes les tumeurs intracrâniennes, avec un âge médian de survenue de 53 ans et une incidence en augmentation chez les sujets âgés.

La cause des cancers primitifs du SNC est inconnue dans la grande majorité des cas. En ce qui concerne les gliomes, il existe cependant des facteurs de risques intrinsèques et extrinsèques. Les facteurs intrinsèques sont les syndromes de prédisposition familiale comme les syndromes de Li-Fraumeni ou de Turcot ou encore les neurofibromatoses de type 1 et 2. Ils rendent compte d'environ 1% des gliomes de l'adulte. Les facteurs de risque extrinsèques avérés sont constitués principalement par l'exposition aux dérivés nitrés inscrite au tableau des maladies professionnelles, et aux radiations ionisantes, alors que l'exposition aux champs électromagnétiques et aux pesticides est en cours d'étude (*Fédération Nationale des centres de lutte contre le cancer, 2002 ; Institut National du Cancer, 2015*).

III. Diagnostic et classification

1. Eléments cliniques et radiologiques

a. Eléments cliniques

Une tumeur cérébrale doit être suspectée devant des signes neurologiques d'apparition brutale ou d'aggravation progressive. Les signes apparaissent lorsque :

- l'expansion tumorale comprime ou déplace le cerveau,
- la tumeur empêche la circulation normale du LCR favorisant l'hydrocéphalie,
- la lésion infiltre une ou plusieurs aires fonctionnelles,
- des remaniements hémorragiques, nécrotiques ou kystiques se produisent au sein de

la tumeur.

La symptomatologie clinique varie, en fonction de la localisation et de la dynamique de la croissance tumorale (*Andon et al. 2005*). Ainsi, les crises focales ou les déficits neurologiques observés permettent de connaître dans quelle région se situe la lésion (Figure 2).

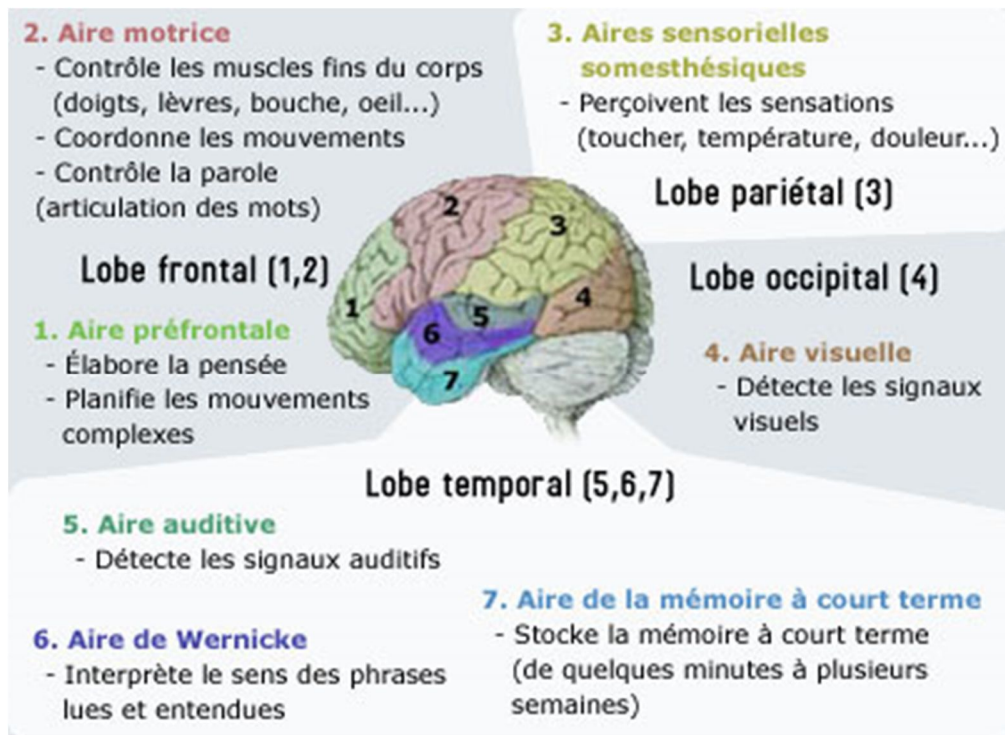


Figure 2. Correspondance entre les zones cérébrales et les fonctions motrices et cognitives. D'après <http://www.neuromedia.ca/les-aires-corticales-et-leurs-fonctions>.

Les symptômes révélateurs sont principalement :

- des céphalées (50%)
- une crise d'épilepsie (20%)
- une hypertension intracrânienne (HTIC) : céphalées inhabituelles et persistantes (typiquement réveillant en deuxième partie de nuit), nausées matinales, vomissements (classiquement au réveil et soulageant les céphalées), troubles de la vigilance, troubles visuels, troubles de l'équilibre, étourdissements, troubles du comportement,
- une augmentation du périmètre crânien chez le jeune enfant (HTIC),
- des troubles cognitifs : changement de personnalité, troubles de l'humeur ou du caractère, ralentissement idéo-moteur.

b. Éléments radiologiques

L'imagerie a plusieurs objectifs (Dietemann et al. 2012) :

- détection précoce du processus tumoral devant les premiers symptômes cliniques
- détermination de la topographie de la lésion et corrélation entre le tableau clinique et les données de l'imagerie
- définition de la nature tumorale de la lésion

- apport des informations topographiques, morphologiques, métaboliques et fonctionnelles utiles à la décision thérapeutique et à la surveillance du processus tumoral.

L'imagerie peut être réalisée par tomodensitométrie (scanner) et/ou par IRM (Imagerie par Résonance Magnétique). Le scanner reste souvent la première étape du diagnostic. Devant une première crise d'épilepsie, la sensibilité du scanner est de plus de 90% pour le dépistage d'une étiologie tumorale. L'IRM est l'examen de référence. Elle offre une plus grande sensibilité que le scanner (comparaison Figures 3A et 3B), proche de 100% pour le dépistage des tumeurs cérébrales symptomatique. Elle permet de confirmer le syndrome de masse et d'orienter vers un diagnostic. Radiologiquement, il est classique de distinguer les tumeurs gliales de grade II (Figure 3C) et celles de grade III ou IV (Figure 3D) en fonction des prises de contraste. L'IRM est l'outil de choix pour assurer la surveillance des gliomes de grade II. L'apparition d'une prise de contraste traduit un changement de grade, ce qui incite à modifier la prise en charge thérapeutique.

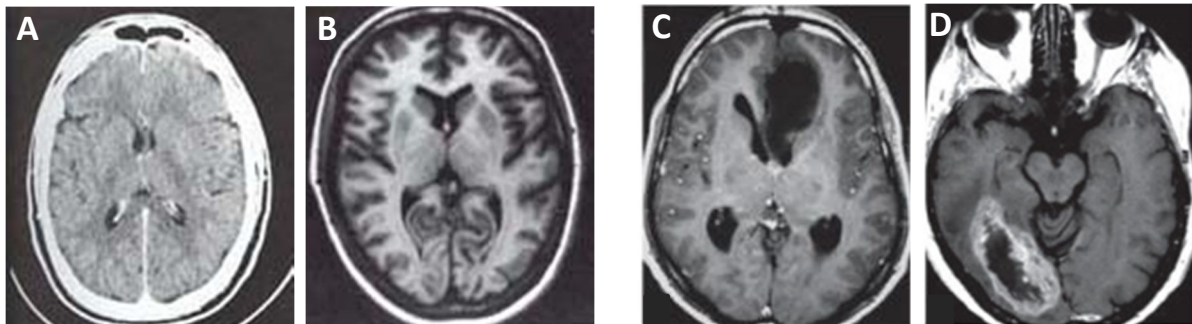


Figure 3. Imagerie cérébrale. Comparaison de coupes axiales de cerveau normal observées par scanner (A) et IRM T1 (B). IRM d'un astrocytome diffus (grade II) (C) et d'un glioblastome (grade IV) (D) en axial T1 après injection de produit de contraste (gadolinium).

En routine, la place du scanner, sans, puis avec injection de produit de contraste, est limitée :

- aux patients ayant une contre-indication à l'IRM ;
- au défaut d'accès à l'IRM en situation d'urgence (signes HTIC, état de mal épileptique,...). Le scanner sera ensuite systématiquement complété par une IRM.

2. Anatomopathologie et classification OMS 2007

a. Mise en évidence de la structure spatiale des gliomes

La croissance tumorale des gliomes se distingue de celle des autres tumeurs malignes, notamment parce que l'extension tumorale se fait par infiltration du tissu cérébral par des cellules tumorales isolées. Cette infiltration induit une réaction du parenchyme cérébral qui présente une hyperplasie astrocytaire, appelée gliose cérébrale. Les travaux de C Daumas-

Duport et al ont montré qu'il y avait deux types de tissu tumoral (*Daumas-Duport et al. 2000*) : le tissu tumoral solide (TT) composé uniquement de cellules tumorales et le tissu formé de cellules tumorales infiltrantes (CTI) (Figure 4A), aisément repérable par des techniques de colorations classiques en HPS (Hémalun-Phloxine-Safran, Figure 4B).

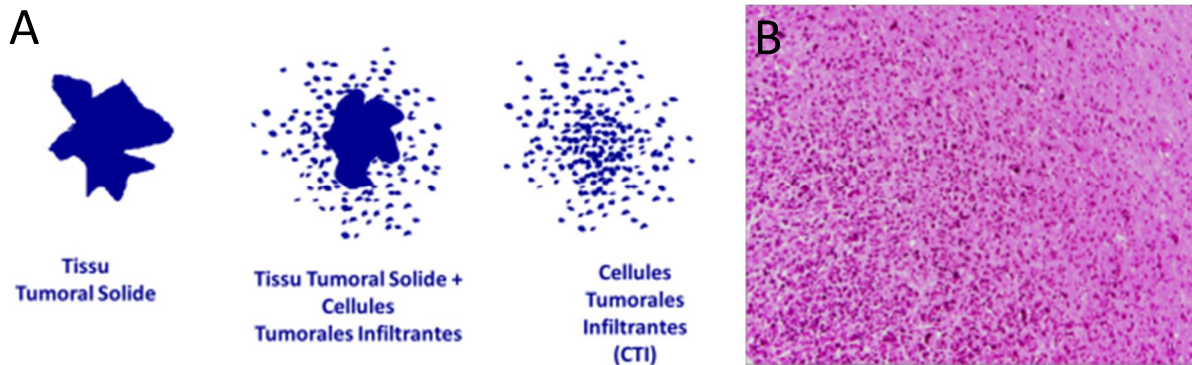


Figure 4. Structure spatiale des gliomes composés de tissu tumoral solide et de cellules tumorales infiltrantes (A), d'après Catherine Dauma-Duport, communication personnelle. Cette structure spatiale est aisément repérable par une coloration de coupe tumorale par HPS (Hémalun-Phloxine-Safran) (B).

Les gliomes infiltrants peuvent être composés uniquement de CTI, et la densité de cellules tumorales est alors variable dans la tumeur, ou bien être constitué de TT avec une composante associée de CTI. Les glioblastomes sont toujours formés de TT et d'une composante de CTI. Les oligodendrogliomes, les astrocytomes ou les oligoastrocytomes peuvent aussi présenter une structure mixte, mais au moment du diagnostic les deux tiers de ces tumeurs ne sont formées que de CTI.

Lorsqu'une tumeur présente une composante de TT, il s'y associe une néo-angiogenèse qui n'existe pas dans le contingent de CTI (*Daumas-Duport et al. 2000*). Ces données permettent de comprendre et d'intégrer les données de l'imagerie :

- après injection de produit de contraste (gadolinium), la prise de contraste étant étroitement liée au degré d'édification vasculaire, la composante de TT se traduit sur le scanner ou l'IRM par une prise de contraste,
- en revanche, la composante de CTI ne prend pas le contraste.

b. Critères histologiques et classification OMS 2007

Le diagnostic de certitude repose sur l'examen anatomopathologique du tissu tumoral obtenu par biopsie ou résection tumorale partielle ou totale.

La classification de l'organisation mondiale de la santé (OMS) 2007 permet de distinguer les gliomes essentiellement selon deux critères histologiques : le type cytologique majoritaire et le grade de la tumeur (*Louis et al. 2007(a) ; Louis et al., 2007(b)*).

- Trois groupes de gliomes peuvent être distingués en fonction de la différenciation des cellules tumorales qui constituent le type cytologique majoritaire : les astrocytomes présentant des caractéristiques morphologiques et immunohistochimiques d'astrocytes ; les oligodendrogliomes, celles des oligodendrocytes ; les tumeurs mixtes ou oligo-astrocytomes, ayant des caractéristiques de ces deux types cellulaires

- Le système de grading des gliomes repose sur la présence de critères d'anaplasie : faible différenciation, densité cellulaire élevée, atypies nucléaires, activité mitotique, mitoses atypiques, nécrose, prolifération vasculaire et endothéliale. L'OMS définit le grade en fonction de la présence ou de l'absence de ces critères d'anaplasie pour chaque type histologique. Entre types histologiques différents, pour un même grade, les critères d'anaplasie sont variables. Le grade définit le degré de malignité des gliomes :

* les gliomes de grade I (astrocytome pilocytique, 5% des gliomes) sont des tumeurs gliales, non infiltrantes, curables par la chirurgie.

* à partir du grade II, les gliomes sont infiltrants et toujours malins. On distingue les gliomes de « bas » grade (II, 20 à 25% des gliomes) et de « haut » grade (III et IV, 70 à 75% des gliomes) dont la prise en charge et l'évolution sont différentes. Les tumeurs de grade II peuvent être des oligodendrogliomes, astrocytomes ou oligo-astrocytomes, celles de grade III des oligodendrogliomes ou astrocytomes ou oligo-astrocytomes anaplasiques, les glioblastomes étant de toujours de grade IV.

La classification OMS 2007 des gliomes reconnaît ainsi plusieurs types histologiques de gliomes dont nous ne retiendrons que les sept principaux :

- Astrocytomes diffus ou de grade II (Figure 5 A, Tableau 1)
- Astrocytomes anaplasiques ou de grade III (Tableau 1)
- Glioblastomes, tumeurs astrocytaires de grade IV (Figure 5B) : ce sont des tumeurs très polymorphes (glioblastomes multiformes, Figure 5C)
- Oligodendrogliomes diffus ou de grade II (Tableau 1)
- Oligodendrogliomes anaplasiques ou de grade III (Figure 5D, Tableau 1)
- Tumeurs mixtes oligoastrocytaires ou oligoastrocytome diffus ou de grade II
- Oligoastrocytome anaplasique ou de grade III.

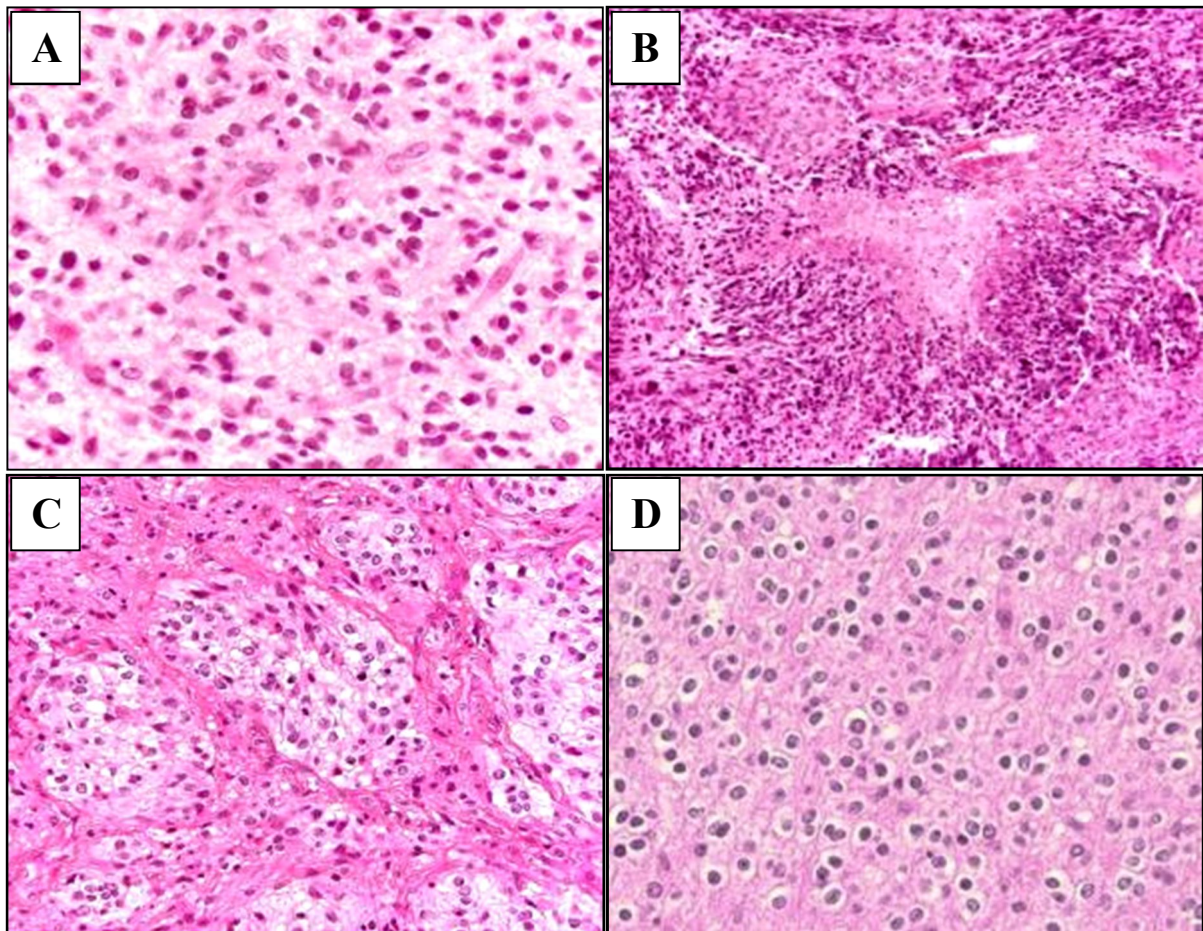


Figure 5. Coupes histologiques colorées par HPS (Hémalun-Phloxine-Safran) d'un astrocytome diffus (A), d'un glioblastome avec nécrose au centre et progression pseudo-paillassadique de la tumeur en périphérie (B), d'un glioblastome multiforme à composante oligodendrogliale (C) et d'un oligodendrogliome « pur » avec cellules typiques à cytoplasme clair (D).

	Grade	Différenciation	Densité cellulaire	Atypies nucléaires	Activité mitotique	Nécrose	Prolifération vasculaire
Astrocytomes	II	bien	modérée	occasionnelles	0 ou 1 mitose	non	non
	III	moyennement	augmentée	présentes	présente (<5)	non	non
	IV	peu	élevée	marquées	marquée	oui	oui
Oligo-dendrogliom	II	bien	modérée	+/- marquées	occasionnelle	non	non proéminente
	III	anaplasie focale ou diffuse	augmentée	présentes	+/- élevée	oui	proéminente

Tableau 1. Grading OMS 2007 des astrocytomes et des oligodendrogliomes.

c. Difficultés de la classification OMS 2007

L'une des principales critiques qui peut être formulée à l'égard de la classification de l'OMS est son manque de reproductibilité.

Du point de vue histologique, il est en effet difficile de distinguer :

- les gliomes « purs », c'est-à-dire présentant un type cytologique unique (astrocytomes, oligodendrogliomes), des gliomes mixtes (oligoastrocytomes, glioblastomes à composante oligodendrogliale)
- les glioblastomes à composante oligodendrogliale (glioblastomes multiformes) des oligo-astrocytomes anaplasiques
- les gliomes de grade II des gliomes de grade III.

L'identification de groupes de tumeurs a bénéficié de la découverte de critères moléculaires, génétiques, génomiques ou protéiques, qui sont venus compléter l'approche purement morphologique. La recherche, fondamentale et appliquée a permis de montrer que l'intégration de ces critères était indispensable pour déterminer le diagnostic, le pronostic et la stratégie thérapeutique. La combinaison des critères histologiques et des critères moléculaires a donné naissance au terme nouveau de « classification histo-moléculaire ». Cette approche histo-moléculaire a fait l'objet d'un consensus international en 2015, préfigurant la nouvelle classification OMS à paraître. Les deux paragraphes suivants seront consacrés à décrire les marqueurs moléculaires d'intérêt et leur place dans la future classification OMS.

3. Marqueurs moléculaires

De nombreux travaux ont permis de mettre en évidence les altérations génétiques présentes dans les gliomes et de proposer une première classification moléculaire qui les prend en compte (*Louis et al. 2001, Mischel et al. 2007 (a) (b) (c)*). L'ensemble de ces travaux vise à associer des anomalies moléculaires avec le diagnostic histopathologique.

Les premières altérations mises en évidence comme impliquées dans la tumorigenèse des tumeurs gliales sont l'amplification de l'oncogène *EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*) et les pertes du chromosome 10 et des bras chromosomiques 1p et 19q. De nombreux oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs sont localisés au niveau de ces chromosomes. Leur altération par perte, mutation ou amplification entraîne des perturbations du cycle cellulaire, de la transduction du signal, mais aussi des processus apoptotiques, angiogéniques, invasifs et métastatiques, qui favorisent et entretiennent la tumorigenèse.

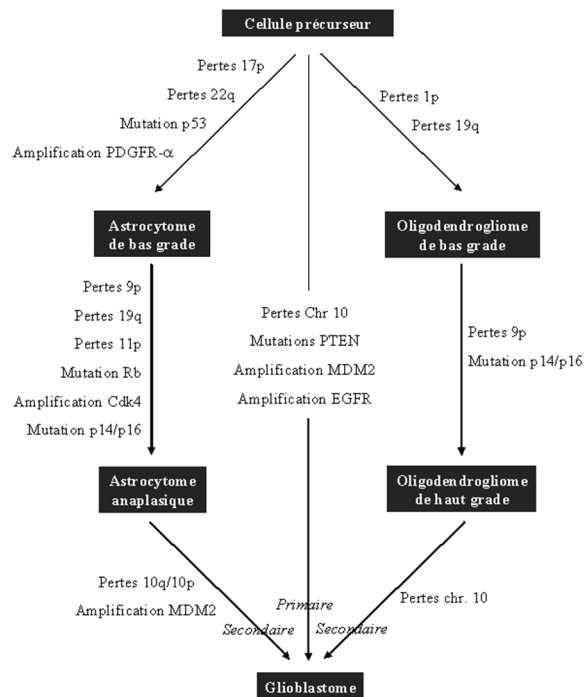


Figure 6. Principales altérations génétiques associées aux sous-types de tumeurs gliales. D'après Kleihues et al. 1999 et Ohgaki et al. 2005.

La confrontation des différentes données moléculaires et des données histologiques a permis d'émettre des hypothèses sur l'existence de «voies moléculaires de progression tumorale» spécifiques à certains sous-groupes de gliomes et sur la chronologie de survenue de certaines altérations dans la progression tumorale (Kleihues et al. 1999; Ohgaki et al. 2005) (figure 6). Ainsi, les mutations du gène *p53* codant pour la protéine p53 qui surviennent à un stade précoce semblent préférentiellement associées aux tumeurs astrocytaires caractérisées par une évolution progressive vers la malignité pour finir en glioblastomes secondaires, alors que l'amplification de l'*EGFR* paraît associée aux glioblastomes *de novo*. D'autres altérations comme les délétions des bras chromosomiques 1p et 19q sont spécifiques des tumeurs d'origine oligodendrocytaire.

i. Altération de la voie de p53

Le gène *p53*, situé sur le chromosome 17, code pour la phosphoprotéine P53, gardien du génome. Lors d'une agression cellulaire, la concentration et la demi-vie de P53 augmentent. Afin d'offrir à la cellule l'opportunité de réparer les erreurs constatées avant de se diviser, p53 provoque l'arrêt du cycle cellulaire entre la phase G1 et la phase S puis l'apoptose de la cellule si l'erreur n'est pas réparée.

L'accumulation de quantités importantes et anormales de P53 est retrouvée dans de nombreux cancers. Dans les glioblastomes et les astrocytomes anaplasiques, il existe de nombreuses mutations au niveau du gène *p53* (Kleihues et al. 1999; Ohgaki et al. 2005; Gross et al. 2005) qui conduisent à l'inactivation de sa fonction de gardien du génome (Soussi et al. 2000). En cas de mutation, la dégradation de la protéine est diminuée entraînant une accumulation de protéine anormale. La voie de p53 peut également être altérée en raison de l'atteinte d'autres gènes qui codent des protéines impliquées dans le contrôle des niveaux cellulaires de p53, notamment p14ARF et MDM2 (« mouse double minute 2 »). La protéine p14ARF contrôle l'activité de MDM2 qui elle, régule l'expression de p53. La perte des deux copies du gène de p14ARF ou l'amplification/surexpression de MDM2 conduit à une rapide déplétion de la protéine p53 (Collins 2004).

La détection par immunohistochimie d'une accumulation de P53, qu'elle soit due à une mutation du gène ou à une altération d'un de ses régulateurs, est l'un des marqueurs histomoléculaires utilisé pour le diagnostic des gliomes. La majorité des glioblastomes présente une perte de p53, une absence de p14ARF ou une surexpression de MDM2 (Ichimura et al. 2000). Les mutations de p53 sont moins fréquentes dans les glioblastomes primaires (environ 30%) alors que les glioblastomes secondaires présentent une forte incidence pour ce type de mutations (plus de 65%) (Ohgaki et al. 2005).

ii. Altération de la voie Rb (rétinoblastome)

Dans plus de 90% des glioblastomes, se retrouve une anomalie de l'un des acteurs impliqués dans la voie du rétinoblastome (Rb) (Ueki et al. 1996). Il peut s'agir de la perte d'expression de p16, un inhibiteur des cdk, de la surexpression de CDK4 (Schmitt et al. 1994), ou de mutations du gène de la protéine Rb.

iii. Pertes combinées des bras entiers 1p et 19q et du chromosome 10

La perte combinée des bras chromosomiques 1p et 9q correspond à une translocation déséquilibrée t(1;19)(q10;p10), (Figure 7) (Brandner et al. 2015 ; Griffins et al. 2006 ; Jenkins et al. 2006). Cette altération est une caractéristique moléculaire des oligodendrogliomes. Elle est absente dans les astrocytomes et les glioblastomes dans lesquels les altérations concernant ces bras chromosomiques consistent pour la plupart en des pertes partielles ou télomériques (Arslantas et al. 2007 ; Ichimura et al. 2008). Les régions télomériques 1p36 and 19q13.3 ont été identifiées comme les plus petites régions perdues (Barbashina et al. 2005; Kitange et al. 2005 ; Reddy et al. 2008; Smith et al. 1999), mais

seules les pertes des bras entiers (Ichimura *et al.* 2008 ; Reddy *et al.* 2008; Smith *et al.* 1999 ; Bello *et al.* 1994 ; Boulay *et al.* 2007; Felsberg *et al.* 2004 ; Idbaih *et al.* 2005 ; Idbaih *et al.* 2008) sont associées à un pronostic plus favorable (Aldape *et al.* 2007 ; Giannini *et al.* 2008).

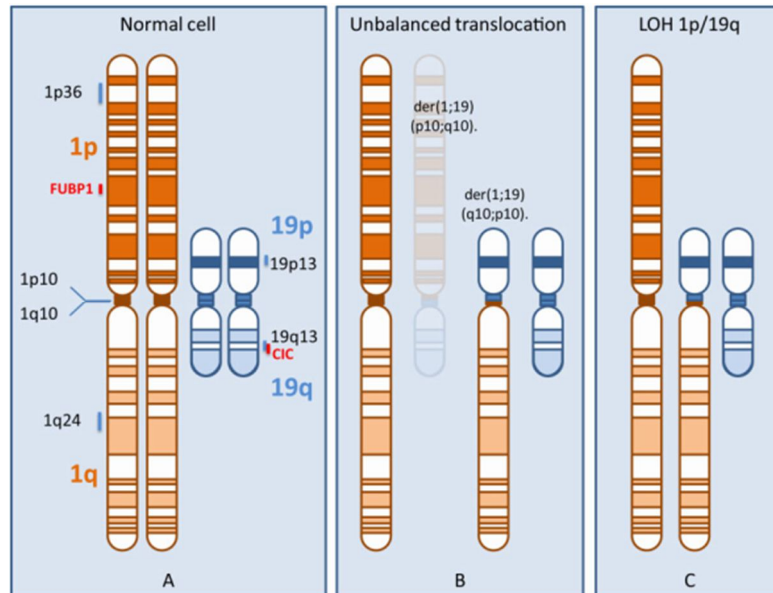


Figure 7. Translocation chromosomique conduisant à la perte entière des bras chromosomiques 1p et 19q. (A) Une cellule normale contient deux copies des chromosomes 1 et 19, chacun d'entre eux avec un bras court (p) et un bras long (q). La localisation de CIC (en 19q13.2) et de FUBP1 (en 1p31.10) sont indiquées, ainsi que les sondes commerciales 1p36, 19q13 et les contrôles 1q24 et 19q13 utilisés pour les techniques de FISH. (B) La translocation déséquilibrée conduit à une transposition au niveau du centromère de 19q vers 1p, à sa perte et à la formation d'un chromosome dérivé « der ». (C) La perte des bras chromosomiques 1p et 19q résulte en une copie de 1p et de 19q et deux copies de 1q et de 19p. D'après Brandner *et al.* 2015.

La perte combinée et complète des bras chromosomiques 10p and 10q est fréquente dans les astrocytomes et les glioblastomes (Durand *et al.* 2010 ; Hata *et al.* 2006 ; Ohgaki *et al.* 2004 Yakut *et al.* 2007; Louis *et al.* 2007; Arslantas *et al.* 2007) et associée le plus souvent à un mauvais pronostic (Yakut *et al.* 2007; Louis *et al.* 2007). Des études ont montré que la perte complète 1p19q et la perte 10q ou 10p10q tendent à être mutuellement exclusives (Arslantas *et al.* 2007; Hoang-Xuan *et al.* 2001; Hoang-Xuan *et al.* 2005 ; Lavon *et al.* 2007; Ueki *et al.* 2002). Cependant, lorsque les pertes 10q et 1p19q sont associées au sein d'une même tumeur, l'altération 10q annule l'effet bénéfique de la perte complète 1p19q en terme de valeur pronostique (Hoang-Xuan *et al.* 2005).

La perte des bras chromosomiques peut être recherchée par différentes méthodes. La technique d'hybridation in situ permet de rechercher ces altérations génomiques dans le tissu

tumoral, sur des coupes tissulaires. Cependant, les sondes commerciales disponibles ciblent uniquement les régions télomériques (Figure 7A). De même, il n'existe pas de sondes permettant de rechercher une délétion des bras 10p et 10q. Les techniques fondées sur l'analyse de l'ADN extrait du tissu tumoral donnent des résultats fiables et reproductibles. C'est le cas de la méthode dite LOH (Loss Of Heterozygosity) qui permet de mettre en évidence la perte d'un allèle, c'est à dire la perte d'une des deux copies d'un locus hétérozygote dans l'ADN tumoral par comparaison à l'ADN non tumoral qui conserve ces deux copies. Cette technique nécessite cependant un tissu contrôle non tumoral, le plus souvent représenté par du sang.

En cas d'impossibilité d'analyse génétique (absence de prélèvement sanguin par exemple), l'analyse immunohistochimique de l'expression de la protéine Alpha-interneurine (INA) peut être utile. Cette protéine, codée par un gène se trouvant en 10q24.33, est un filament intermédiaire de classe IV impliqué dans la synthèse des neurofilaments et la morphogenèse des neurones. Des études ont montré que l'expression de l'INA est associée à une perte complète 1p19q et une rétention du bras 10q, et que la technique immunohistochimique peut remplacer l'analyse moléculaire par LOH (*Ducray et al, 2009, Ducray et al. 2011, Mokhtari et al 2011, Durand et al 2011*). Cependant, nous avons montré qu'une discordance entre les données immunohistochimiques et génomiques était observée dans environ 10% des cas (*Durand et al. 2011*).

iv. Mutation des gènes IDH1 et IDH2

Les protéines IDH1 et IDH2 (Isocitrate DésHydrogénases 1 et 2) sont des enzymes du métabolisme énergétique qui oxydent l'isocitrate en α -cétoglutarate. Il existe plusieurs isoenzymes selon les compartiments cellulaires, dont une forme mitochondriale (IDH2) à NAD^+ qui participe au cycle de KREBS et une forme cytoplasmique (IDH1) à NADP^+ qui participe à la lipogenèse. La mutation du gène *IDH1*, initialement décrite dans les glioblastomes multiformes (GBM), (*Parsons et al. 2008*) est l'altération la plus fréquemment retrouvée dans les gliomes, indépendamment du sous-type histologique (*Balss et al. 2008*). L'incidence des mutations d'*IDH1* est de 6 % dans les GBM, la majorité concernant des GBM secondaires (*Ichimura et al. 2009*), et varie de 60 à 80 % dans les autres gliomes (*Kloosterhof et al. 2011 ; Watanabe et al. 2009*). Contrairement à d'autres altérations spécifiques telles que les pertes 1p19q or 10p10q, le statut mutationnel *IDH-1* n'a pas d'utilité diagnostique directe pour la détermination du sous-type histologique. La présence d'une mutation est en revanche associée à un meilleur pronostic (*Sanson et al. 2009*) et aux tumeurs

des patients jeunes. Dans les tumeurs gliales, les mutations d'IDH1 concernent principalement le codon de l'arginine 132, résultant en une altération de l'activité enzymatique et en l'accumulation de 2-hydroxyglutarate (Boisselier et al. 2012 ; Zhao et al. 2009). En plus de la mutation p.R132H qui représente environ 80% des mutations du codon 132, d'autres mutations comme p.R132C, p.R132S et p.R132G peuvent survenir dans les gliomes. La forme mitochondriale IDH2 peut également comporter des mutations au niveau du codon 172. Ces mutations, bien que rares, ont été identifiées comme spécifiques des gliomes (Hartmann et al. 2009; Rossetto et al. 2011; Sonoda et al. 2009 ; Yan et al. 2009) notamment dans les gliomes diffus et anaplasiques mais jamais dans les glioblastomes ni dans les astrocytomes pilocytiques (Balss et al. 2008; Ichimura et al. 2009; Watanabe et al. 2009; Sanson et al. 2009; Rossetto et al. 2011; Sonoda et al. 2009 ; Yan et al. 2009).

En pratique, la recherche de la mutation R132H du gène *IDH1* s'effectue par immunohistochimie à l'aide d'un anticorps qui la détecte spécifiquement (Preusser et al. 2011 ; Capper et al. 2009 ; Kato et al. 2009). En cas d'absence de marquage par l'anticorps dirigé contre la forme portant la mutation R132H, les mutations plus rares du codon 132 du gène IDH et du codon 172 du gène IDH sont recherchées par des techniques classiques de PCR-séquençage.

v. Marqueurs de la maintenance des télomères

- Mutation du gène *ATRX*: le gène *ATRX* ou « alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked », localisé en Xq21.1 code pour la protéine nucléaire ubiquitaire ATRX. Les mutations dans le gène *ATRX* entraînent une perte d'expression de la protéine nucléaire dans les cellules tumorales mais pas dans les cellules non tumorales. La perte de fonction d'ATRX conduit à une altération des télomères, au phénotype pathologique ATL (Alternative Lengthening of telomere) et à une déstabilisation importante du génome (Abedalthagafi et al. 2013; Clynes et al. 2014). Les mutations d'*ATRX* sont des altérations spécifiques des gliomes astrocytaires incluant les astrocytomes diffus et anaplasiques (Siegal 2015 ; Wiestler et al. 2014 ; Schwartzenruber et al. 2012 ; Wiestler et al. 2013 ; Jiao et al. 2012). Elles ne sont en revanche pas retrouvées dans les oligodendrogliomes et les glioblastomes, alors que les résultats sont contradictoires concernant les oligo-astrocytomes (Jiao et al. 2012 ; Kannan et al. 2012 ; Killela et al. 2013). Plusieurs études ont montré que les patients avec une mutation *ATRX* et une mutation IDH sont des patients plus jeunes et dont la survie est significativement allongée du fait de ces marqueurs (Wiestler et al. 2013 ; Jiao et al. 2012).

Les mutations du gène *ATRX* entraînent une perte d'expression protéique qui est révélée par immunohistochimie. Ce marqueur génomique/protéique fait partie de la nouvelle classification OMS qui sera décrite ultérieurement.

- Mutation du gène *TERT*: récemment des mutations du gène *TERT* ont été mises en évidence dans les tumeurs gliales (Killela et al. 2013). Les mutations du promoteur *TERT* sont retrouvées dans 83% des glioblastomes primaires et sont mutuellement exclusives des mutations *ATRX* et du phénotype ALT, caractéristiques des astrocytomes (Killela et al. 2013). Ces données montrent que le maintien des télomères est un phénomène physiopathologique important des gliomes et qu'il existe deux voies distinctes (*TERT* vs. *ATRX/ALT*), (Killela et al. 2013 ; Foote et al. 2015).

vi. Inactivation du gène *MGMT*

Le gène *MGMT* (*O⁶-Methyl-Guanyl-Methyl-Transferase*), situé en 10q26, code pour une enzyme de réparation de l'ADN qui reverse les effets génotoxiques des agents alkylants. La méthylation du promoteur de *MGMT* conduit à une inhibition de transcription du gène et une perte d'expression de la protéine. La méthylation de *MGMT* a été montrée comme facteur de bon pronostic et/ou de réponse à la chimiothérapie par témozolomide chez les patients atteints de glioblastome (Hegi et al. 2005). Cette donnée reste controversée pour les gliomes de bas grade (Ochsenbein et al. 2011 ; Weller et al. 2010).

Il existe plusieurs méthodes pour mettre en évidence de la méthylation de *MGMT*. L'une d'entre elle repose sur l'analyse immunohistochimique de l'expression de la protéine *MGMT* tandis que d'autres méthodes sont fondées sur l'amplification d'ADN qui a au préalable subi un traitement au bisulfite de sodium (Havik et al. 2012 ; Uno et al. 2011 ; Weller et al. 2010). Cependant, le promoteur du gène *MGMT* contient 98 sites CpG et aucune de ces méthodes ne permet d'analyser l'ensemble de ces îlots. Pour cette raison, il existe des discordances entre le taux d'expression de *MGMT* mesuré par immunohistochimie et les résultats d'hypo- ou d'hyperméthylation des îlots qui dépendent du nombre et de la position des îlots ciblés dans l'analyse par PCR (Mason et al. 2012 ; Uno et al. 2011).

vii. Altération de l'*EGFR*

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) appartient à la famille HER, un groupe de quatre récepteurs membranaires (Figure 8). De nombreux travaux ont montré qu'*EGFR* joue un rôle prépondérant dans l'oncogenèse des gliomes (Andersson et al. 2004 ; Bredel et al. 1999 ;

McLendon et al. 2007 ; Potti et al. 2004; Schlegel et al. 1994 ; Tabori et al. 2005). Dans ces tumeurs, les altérations les plus courantes sont l'amplification et les mutations du gène et la surexpression protéique (*Gil-Benso et al. 2007 ; Nakamura et al. 2007 ; Okada et al. 2007 ; Schober et al. 1995; Shinojima et al. 2003; Torp et al. 1991(a) ; Torp et al. 1991(b)*).

L'amplification d'EGFR est fréquemment observée dans les glioblastomes tandis qu'elle est plus rare dans les astrocytomes anaplasiques. Dans les GB, une amplification de l'EGFR est très souvent associée à la perte entière du chromosome 10 (*Durand et al. 2011*), qui comporte notamment le gène suppresseur de tumeur PTEN (« phosphate-tensine »). Comme le gène *PTEN* est muté dans 45% des glioblastomes, les deux copies du gène sont inactivées, altérant sa fonction de gène suppresseur de tumeur et d'inhibiteur de la voie de signalisation de l'EGFR (*Schmidt et al. 1999*). Les oligodendrogliomes et les oligo-astrocytomes anaplasiques ne présentent habituellement pas d'amplification de l'EGFR.

Dans les glioblastomes, une amplification de l'*EGFR* est souvent associée à la présence du mutant EGFRvIII. Ce variant muté ne possède pas les exons 2 à 8 et code pour une protéine tronquée au niveau de son domaine extracellulaire (Figure 9). Ce récepteur muté est constitutionnellement actif de manière (*Estrada-Bernal et al. 2011 ; Gan et al., 2009 ; Inda et al. 2010; Lla et al. 2002 ; Mukasa et al. 2012 ; Nagane et al. 2001*). La prévalence de ce mutant dans les glioblastomes et son potentiel oncogénique ont justifié le développement récent de molécules thérapeutiques anti-EGFR qui le ciblent spécifiquement (*Sampson et al. 2010; Heimberger et al. 2009*). L'amplification du gène EGFR peut être recherchée par hybridation fluorescente in situ, dont l'interprétation est aisée et rapide. D'autres méthodes peuvent être utilisées comme la quantification par qPCR sur l'ADN génomique ou encore par méthode MLPA (Multiplex Ligation-dependant Probe Amplification) en réalisant une PCR quantitative multiplexe (*Jeuken et al. 2009*).

Les tumeurs surexprimant le récepteur EGFR sont des tumeurs de mauvais pronostic comme les glioblastomes et les astrocytomes (*Okada et al. 2003 ; Varella-Garcia et al. 2006*) et présentent une chimiorésistance au traitement par PCV (procarbazine, CCNU, lomustine), vincristine) et/ou Témzolomide (*Cairncross et al. 1998 ; Ino et al. 2001 ; Korshunov et al. 2004 ; Cairncross et al. 2006; van den Bent et al. 2006*). Les valeurs pronostique et prédictive de réponse à la chimiothérapie sont cependant discutées.

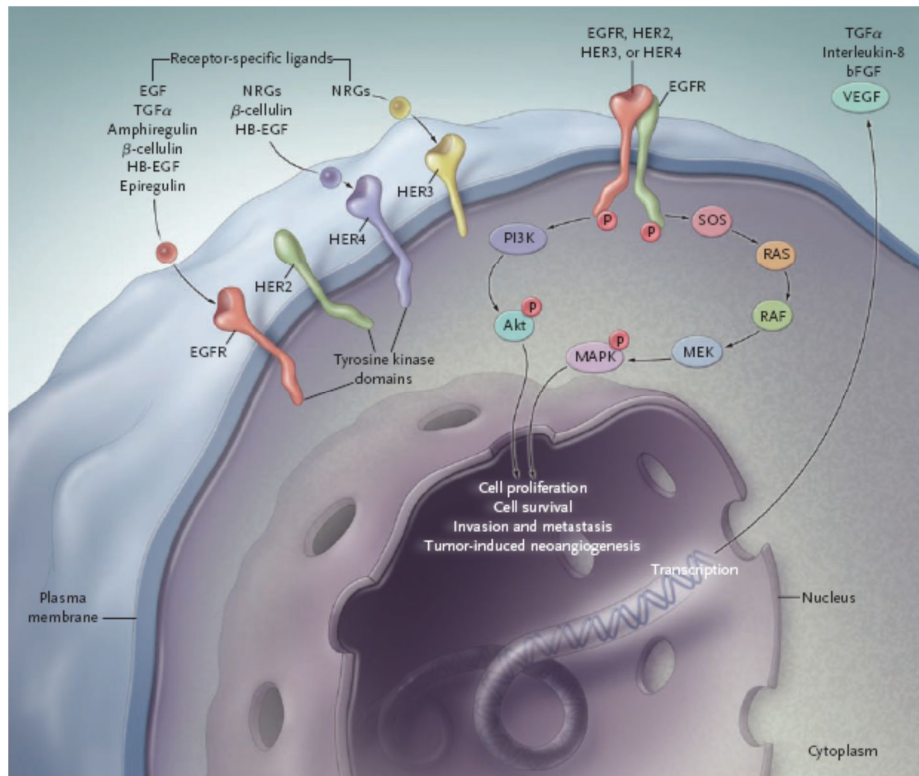


Figure 8. Voie de signalisation de l'EGFR selon Fortunato Ciardiello & al, 2008. Trois étapes peuvent être décrites dans la voie de signalisation dépendant de l'activation de l'EGFR. La première correspond à la fixation du ligand spécifique au niveau du domaine extracellulaire du récepteur. La seconde consiste en la formation d'un homodimère EGFR-EGFR ou d'un hétérodimère EGFR-HER2, EGFR-HER3 ou EGFR-HER4 correspondant aux formes actives et aboutissant à la phosphorylation ATP-dépendante de résidus tyrosine de la partie intracellulaire du récepteur. Finalement, cette phosphorylation induit l'activation de la voie de signalisation intracellulaire. Les deux voies majeures concernées par l'activation de l'EGFR sont la voie de RAS-RAF-MEK-MAPK qui contrôle la transcription de gènes, la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S et la prolifération cellulaire, et la voie de PI3K-Akt laquelle active une cascade de signaux anti-apoptotiques. (bFGF= basic fibroblast growth factor, HB-EGF= héparin-binding EGF, MAPK=mitogen-activated protein kinase, PI3K=phosphatidyl inositol kinase, TGFα=transforming growth factor α, VEGF=vascular endothelial growth factor).

De plus, il a été montré que des molécules anti-EGFR seraient susceptibles d'améliorer la survie des patients surexprimant ce récepteur dans leur tumeur mais aucune étude clinique n'a pu confirmer ces résultats préliminaires (Korshunov et al. 2004 ; Cairncross et al. 2006; Ionescu et al. 2005).

Certains travaux indiquent que l'expression de l'EGFR dans les tumeurs est bien plus complexe qu'attendue. Le gène de l'EGFR peut générer un premier type d'ARNm, l'EGFR variant 1 (EGFRv1), qui code pour le récepteur entier, connu sous le nom d'EGFR, ErbB ou HER1. Ce récepteur est le plus communément étudié parmi les membres de la famille de l'EGFR et c'est celui qui est ciblé par les molécules anti-EGFR. Cependant, parallèlement à la production de l'EGFR, les cellules cancéreuses synthétisent également des isoformes plus courtes du récepteur, appelées sEGFR, qui peuvent être de nature différente (Figure9) : les

isoformes tronquées b, c et d résultent d'ARNm uniques, générés par épissage alternatif à partir du gène de l'EGFR, alors que la cellule est également capable de générer une isoforme PI-sEGFR par clivage protéolytique du récepteur entier. Quoiqu'il en soit, aucune de ces isoformes tronquées (sEGFR b, c, d ou PI-sEGFR) n'a de domaine tyrosine kinase (Reiter et al. 2001 ; Reiter et al. 2003 ; Sanderson et al. 2008). Elles ne peuvent donc pas être directement responsables de l'activation de la voie de signalisation intracellulaire. L'expression de ces isoformes tronquées a été montrée dans plusieurs cancers et notamment dans les gliomes (Durand et al. 2012).

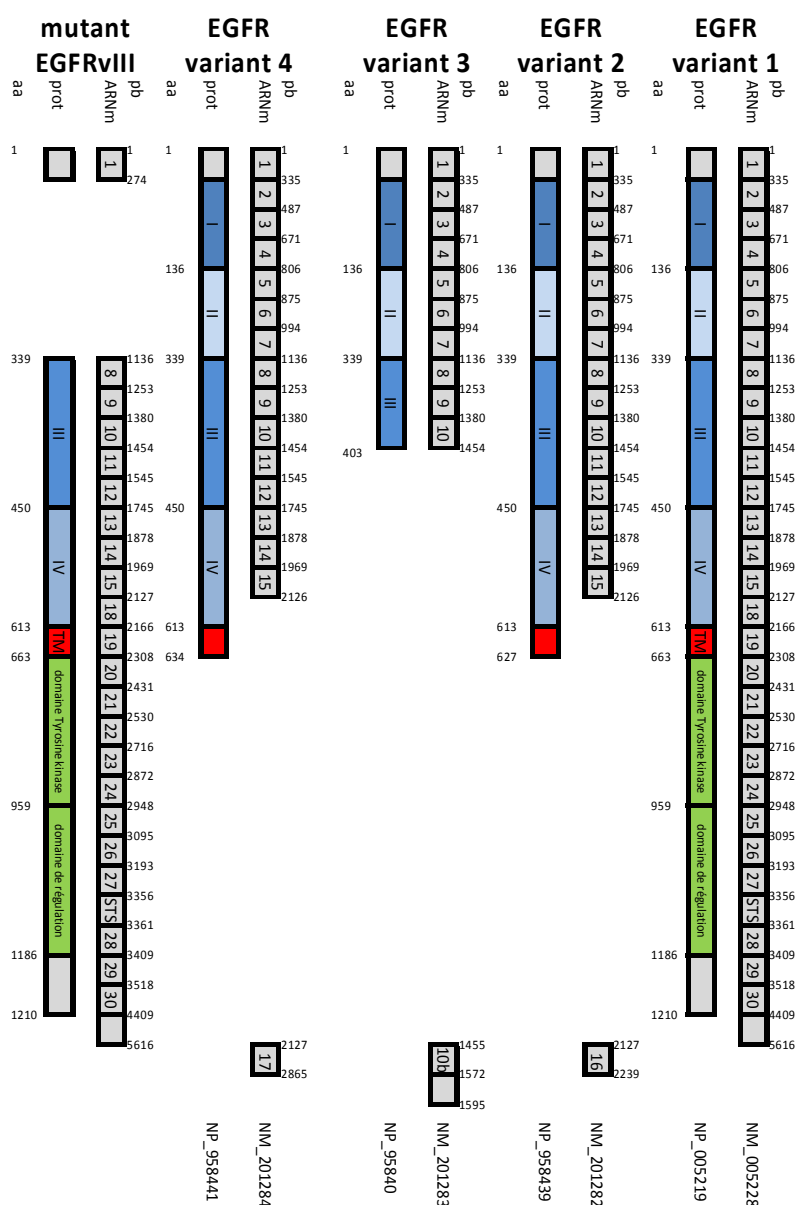


Figure 9. Cartographie des différents variants et isoformes de l'EGFR

L'existence de ces isoformes tronquées pourrait permettre d'expliquer l'absence de consensus concernant les valeurs pronostique ou prédictive de la surexpression d'EGFR. En effet les résultats obtenus par immunohistochimie dépendent de la nature de l'épitope reconnu par l'anticorps utilisé. Les anticorps disponibles dans le commerce peuvent détecter le domaine extracellulaire de l'EGFR (DEC) ou le domaine intracellulaire (DIC). Alors que les anticorps anti-DIC détectent le récepteur EGFR entier et le mutant EGFRvIII, les anticorps anti-DEC détectent en plus toutes les isoformes tronquées du récepteur pouvant être générées par épissage alternatif de l'ARNm (Figure 9), mais qui n'ont pas de domaine intracellulaire donc pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque. L'interprétation des résultats dépend donc du type de récepteur détecté.

4. Vers une nouvelle classification OMS 2015

L'ensemble des études sur les marqueurs moléculaires a permis d'envisager une nouvelle classification histo-moléculaire, intégrant les données histologiques et les données moléculaires. Le « Cancer Genome Atlas » (TCGA) a identifié trois sous-groupes de gliomes à partir de données « omics » de 293 patients atteints de gliomes de grade II et III. Deux des groupes présentent des mutations des gènes *IDH* mais peuvent être distingués entre eux par la présence ou non d'une perte combinée et complète des bras chromosomiques 1p et 19q ou une mutation du gène *P53*. Le troisième groupe ne présente pas de mutation *IDH* (Brat et al. 2015).

Le TCGA a montré que la prévalence de l'altération du gène *TERT* est de 64% dans les tumeurs *IDH* non mutées, de 90% dans les tumeurs avec altérations *IDH1/1p19q* et enfin de 4% dans gliomes avec mutations *IDH/P53*. Ces résultats ont conduit à une autre étude stratifiée sur 1087 gliomes de grade II à IV, qui a permis de distinguer cinq groupes avec des caractéristiques histo-moléculaires spécifiques : (1) tumeurs triple-positives *IDH/1p19q/TERT*, (2) tumeurs avec mutations *IDH/TERT*, (3) tumeurs avec mutation *IDH* seulement, (4) tumeurs avec mutation *TERT* uniquement, (5) les triples négatifs. Les tumeurs sans mutation *TERT* présentent en général des altérations du gène *ATRX*, qui a donc été intégré dans la future classification histo-moléculaire (Reuss et al. 2015 ; Louis et al. 2014).

Cette classification propose un logigramme qui aide au diagnostic de la tumeur, d'après la présence ou non des altérations moléculaires (Figure 10). Cette nouvelle classification ne comporte plus d'oligoastrocytomes qui ont été reclassés en astrocytomes ou en

oligodendrogliomes en fonction des marqueurs histo-moléculaires qu'ils présentent. Une valeur pronostique est proposée pour chacune des tumeurs (Figure 10, à droite).

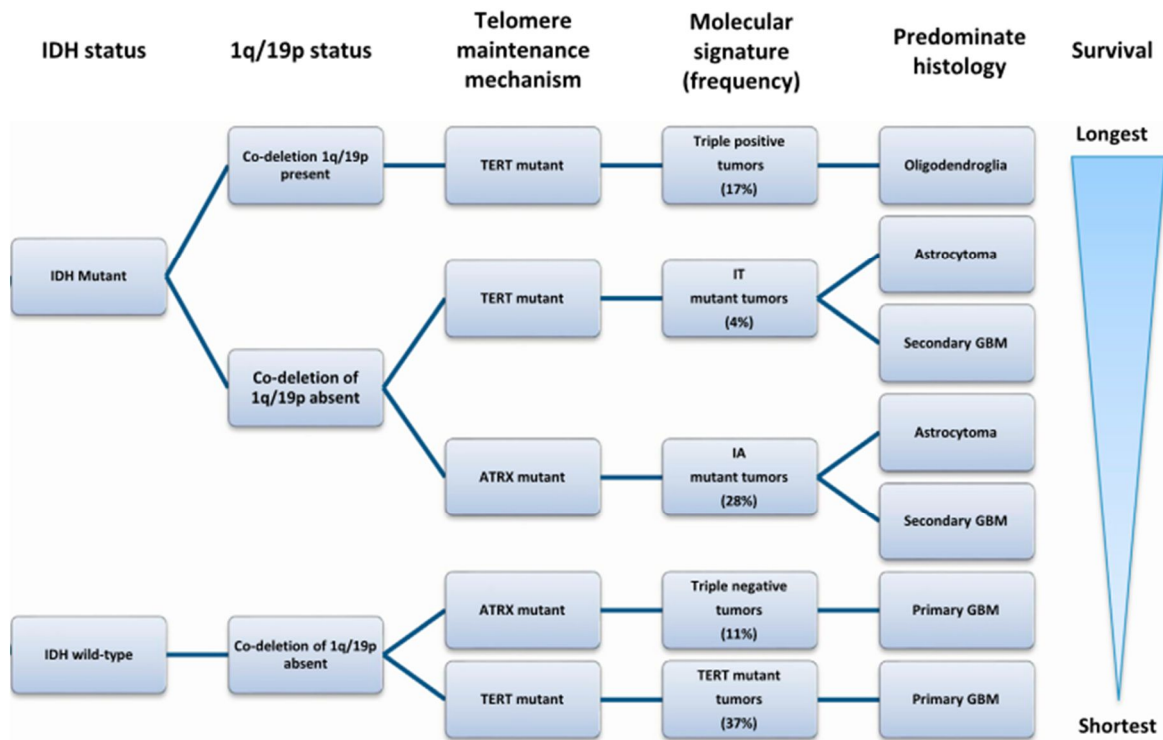


Figure 10. Logigramme d'analyses moléculaires à réaliser pour l'aide au diagnostic des tumeurs gliales. Une estimation de la valeur pronostique en fonction du diagnostic est présentée à droite de la figure, (Modifié d'après Foote et al. 2015).

IV. Pronostic et prise en charge

1. Pronostic

Le pronostic des gliomes diffus est déterminé par un ensemble de paramètres relatifs à la tumeur (type, taille, grade, opérabilité, anomalies moléculaires) et de paramètres démographiques et cliniques du patient (âge, état cognitif, indice de Karnofsky qui évalue l'état fonctionnel et général du patient).

La durée de survie des patients atteints de gliome infiltrant dépend de l'âge au diagnostic puisqu'elle est de 31,7 mois avant 40 ans alors qu'elle n'est que de 8,4 mois après 60 ans. La survie varie également en fonction des diagnostics histopathologiques et des grades (tableau 2), (Louis et al. 2007) : la médiane de survie pour les patients atteints de gliomes de grade II évolue de 2 à 9 ans. Pour les gliomes de grade III, le pronostic est favorablement influencé, indépendamment des facteurs cliniques et radiologiques, par la perte 1p19q (7 ans environ pour les patients avec perte 1p19q versus 3 ans pour les autres). Pour les glioblastomes : la

médiane de survie se situe de 10 à 17 mois. Le décès est le plus souvent secondaire à des récurrences : les astrocytomes diffus et anaplasiques se transforment fréquemment en tumeurs de grade IV.

L'intégration des marqueurs moléculaires dans la future classification va modifier la valeur pronostique de ces différentes tumeurs (Figure 10). Les patients présentant une mutation *IDH1* ont toujours un meilleur pronostic que les patients sans mutation *IDH1*. Les mutations triples (*IDH1/p19q/TERT*) sont les altérations pour lesquelles la survie est la meilleure. Les patients triples négatifs et ceux qui ont seulement la mutation du gène *TERT* ont la probabilité de survie la plus faible (Foote et al. 2015 ; Brandner et al. 2015). Certains facteurs moléculaires (comme la méthylation du promoteur du gène de la MGMT) ne sont pas encore de pratique courante même si leur impact pronostique est fortement suspecté (HAS, 2010).

2. Prise en charge selon les recommandations HAS

a. Traitements spécifiques

La prise en charge thérapeutique est définie en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP). Elle tient compte de tous les éléments concernant le patient (âge et état général du patient, localisation tumorale, histologie, imagerie, marqueurs moléculaires) et a pour objectif d'améliorer le pronostic et l'état fonctionnel du patient. Cette prise en charge se fait en accord avec le patient, ou la personne de confiance le cas échéant, sur la base de l'avis rendu en RCP. La prise en charge est présentée au patient au cours d'une consultation d'annonce et fait l'objet d'un accord mutuel. Le traitement peut faire appel à la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie ou la thérapie ciblée, qui peuvent être ou non associées.

Stratégies thérapeutiques :

- pour les glioblastomes, le traitement de référence est une exérèse chirurgicale la plus large possible, suivie d'une radiothérapie et d'une chimiothérapie par témozolomide concomitante puis adjuvante (protocole de Stupp, Stupp et al. 2005). Pour les patients présentant un état général altéré (IK < 70), il n'y a pas de traitement de référence, la stratégie thérapeutique est discutée en RCP.

		Âges de diagnostic	Survie avec traitement	Complications évolutives
Tumeurs astrocytaires	Astrocytome pilocytique (grade I)	Enfants, inférieur à 20 ans	Supérieur à 15 ans	Récidives
	Astrocytome diffus (grade II)	Adulte jeune, avec un pic de fréquence entre 30 et 40 ans	6 à 8 ans	Progression en glioblastome après 4 à 5 ans d'évolution
	Astrocytome anaplasique (grade III)	45 ans	2 à 3 ans	Progression en glioblastome après 2 ans d'évolution
	Gioblastome (grade IV)	Tout âge, avec un pic de fréquence entre 45 et 75 ans	Inférieur à 1 an (20% à un an)	Récidives
Tumeurs oligodendrogiales	Oligodendrogliome diffus (grade II)	Adulte, avec un pic de fréquence entre 40 et 45 ans	Supérieur à 10 ans (51% à 10 ans)	Récidives
	Oligodendrogliome anaplasique (grade III)	Adulte, avec un pic de fréquence entre 45 et 50 ans	2 à 3 ans	Récidives
	Oligoastrocytome diffus (grade II)	Adulte, avec un pic de fréquence entre 35 et 45 ans	6,3 ans (58% à 5 ans et 32% à 10 ans)	Récidives
	Oligoastrocytome anaplasique (grade III)	Adulte, avec un pic de fréquence entre 50 et 60 ans	2,8 ans (36% à 5 ans et 9% à 10 ans)	Récidives

Tableau 2. Âges de diagnostic, survie et complications en fonctions des diagnostics histopathologique selon la classification OMS actuelle (Louis et al. 2007).

- pour les autres gliomes : la stratégie thérapeutique est discutée en RCP. Il n'existe actuellement pas de consensus pour la prise en charge. Néanmoins, pour les oligodendrogliomes ayant une perte complète 1p19q, un traitement par chimiothérapie première par PCV est préconisée (recommandations de réseau POLA).

i. Prise en charge chirurgicale

La chirurgie a pour objectif de réduire le volume tumoral. Dans un certain nombre de cas, pour des raisons topographiques, fonctionnelles ou encore liées à l'état général du patient ou à son refus, une chirurgie d'exérèse n'est pas réalisable et seule une biopsie sera proposée afin de confirmer et/ou de typer la pathologie tumorale. L'exérèse chirurgicale doit contribuer à la qualité et à la durée de la survie, selon la localisation de la tumeur et les facteurs cliniques du patient. Une chirurgie maximaliste ne doit pas aggraver l'état fonctionnel du patient. Elle n'est donc proposée qu'à condition de préserver sa qualité de vie. La chirurgie éveillée a pour objectif de préserver la fonctionnalité. Schématiquement, une résection chirurgicale sera choisie en présence d'un foyer circonscrit dans un lobe cérébral. Si la lésion est profonde, la

tumeur ne sera pas résecable et une biopsie seule sera retenue. Pour un gliome de haut grade, l'exérèse sera préférée lorsqu'elle est possible.

La qualité de la résection est évaluée dans les 24 à 72 heures suivant la chirurgie par la réalisation d'une IRM post-opératoire, ou à défaut d'une TDM sans et avec injection. L'exérèse est considérée totale en l'absence de résidu tumoral visible. Elle est dite sub-totale si le résidu tumoral post-opératoire est inférieur à 1,5 cm³ et incomplète si le résidu tumoral est supérieur à 1,5 cm³.

L'intervention chirurgicale peut nécessiter un examen anatomo-pathologique. Les prélèvements examinés doivent être représentatifs de la tumeur et doivent intéresser, lorsqu'elles existent, les zones de prise de contraste. Ils doivent permettre de poser un diagnostic anatomopathologique : détermination du type de gliome et du grade. L'examen extemporané peut être réalisé si la réponse du pathologiste est déterminante pour guider l'acte chirurgical. Les étalements cellulaires ou smears permettent de préciser la cytologie en particulier lors de l'examen extemporané.

ii. Radiothérapie

La radiothérapie réalisée après une chirurgie d'exérèse, seule (après typage de la tumeur sur biopsie par exemple) ou associée à la chimiothérapie de manière concomitante ou séquentielle. La radiothérapie post-chirurgicale est débutée dans les 6 semaines suivant l'intervention chirurgicale (délai le plus court possible). Elle est focale (dirigée sur le volume tumoral avec une marge), conformationnelle (conforme à l'image), en 3 dimensions (utilise l'imagerie (IRM, TDM) pour délimiter les volumes). Une aggravation du tableau clinique peut s'observer au cours de la première semaine d'irradiation. Si l'indication de radiothérapie est retenue, le schéma de traitement varie selon le grade du gliome (Tableau 3).

Gliome	Dose totale délivrée	Nombre de fractions	Dose par fraction	Administration
Haut grade (III et IV)	Jusqu'à 60 Gy	30	2 Gy	5 jours / semaine
Bas grade (III)	45 à 54 Gy	25-30	1,8 à 2 Gy	5 jours / semaine

Tableau 3. Schéma de traitement par radiothérapie des gliomes en fonction du grade (recommandations HAS 2010)

iii. Chimiothérapie ou thérapie ciblée

La chimiothérapie est fréquemment utilisée. Elle est le plus souvent administrée par voie systémique (orale ou IV), et parfois par voie locale (implant intracavitaire dans le temps

opérateur). Les modalités d'administration en fonction des molécules sont indiquées dans le tableau 4.

Le témozolomide (Temodal[®]) est un agent alkylant, traitement standard des gliomes malins, astrocytomes, oligodendrogliomes et oligoastrocytomes, grades III et IV. Le témozolomide est converti spontanément en un métabolite actif, le 5-(3-méthyl)-1-triazén-1-yl-imidazole-4-carboxamide (MTIC). Cette molécule est administrée par voie orale et présente une excellente pénétration dans le tissu cérébral et le liquide cébrospinal (*Newlands et al. 1992*). La conversion spontanée du témozolomide en MTIC produit un composé capable de méthyliser l'ADN (*Denny et al. 1994*). La formation de O6-méthylguanine est responsable de mésappariements des bases au sein de l'ADN, et en cas de déficience du système cellulaire de réparation des mésappariements, entraîne l'apoptose de la cellule concernée. En théorie, le choix de la chimiothérapie peut être guidé par la détermination du statut *MGMT* : la méthylation du promoteur du gène *MGMT* inhibe la synthèse de la protéine qui ne peut alors plus réverser l'alkylation des guanines générée par le témozolomide. La connaissance du statut méthylé ou non du promoteur du gène *MGMT* dans l'ADN tumoral du patient permettrait donc de choisir entre la radiothérapie seule et la radiothérapie combinée au témozolomide. Cependant, comme nous l'avons expliqué précédemment, la limite des techniques de détection du statut *MGMT* et l'absence de consensus actuel sur le sujet font que ce marqueur n'est pas toujours utilisé en pratique clinique.

La lomustine (Belustine[®]) est un antinéoplasique cytostatique alkylant appartenant au groupe des nitroso-urées. Elle provoque une alkylation de l'ADN et de l'ARN. Son intérêt dans le traitement des tumeurs cérébrales est sa grande solubilité dans les graisses qui favorise son passage à travers la barrière hémato-encéphalique (*Taal et al. 2015*).

Comme la lomustine, la carmustine (BICNU[®] ou GLIADEL[®]) est un antinéoplasique cytostatique alkylant appartenant au groupe des nitroso-urées. Elle agit essentiellement par alkylation de l'ADN et de l'ARN, ainsi que par carbamylation des protéines. Sa grande solubilité dans les graisses favorise son passage à travers la barrière hémato-encéphalique.

La vincristine (Oncovin[®]) : La vincristine a pour effet d'empêcher la polymérisation des microtubules en se fixant sur les dimères de tubuline libre, comme la colchicine ou la vinblastine. Cela entraîne un arrêt des mitoses et l'apoptose.

Molécules(DCI)	Spécialité	Classe de la molécule	Voie d'administration	Modalités d'administration
Témozolomide	Temodal [®] Témodar [®]	Agent alkylant	Voie orale	En continu (7j/7) pendant la radiothérapie ou en discontinu (5j tous les 28j)
Lomustine	Belustine [®]	Agent alkylant cytostatique (groupe des nitroso-urée)		En discontinu
Carmustine	BICNU [®] GLIADEL [®]		Voie intraveineuse	En discontinu
			Implant intracavitaire	Unique, peropératoire
Fotémustine	Muphoran [®]			En discontinu
Protocole PCV (Procarbazine, Lomustine, vincristine)	Natulan [®] Belustine [®] Oncovin [®]	Association	Mixte selon les molécules	En discontinu
Bévacizumab ^(a)	Avastin [®]	Thérapie ciblée : anticorps monoclonal anti-angiogénique	Voie intraveineuse	En discontinu

Tableau 4. Voie et modalités d'administration des molécules de chimiothérapie et de thérapie ciblée utilisées dans le traitement des gliomes. ^(a) L'utilisation du bévacizumab dans cette indication est en cours d'évaluation (utilisation hors AMM à l'étude dans le cadre du référentiel de bon usage (RBU)). (Recommandations HAS 2010)

La fotémustine (Muphoran[®]) est également un antinéoplasique cytostatique alkylant et carbamylant appartenant au groupe des nitroso-urées, à spectre d'activité antitumorale expérimentale large. Sa formule chimique comporte un bio-isostère de l'alanine (acide amino-1-éthylphosphonique) qui facilite la pénétration cellulaire et le franchissement de la barrière hémato-encéphalique.

La procarbazine (Natulan[®]) est antinéoplasique cytostatique alkylant dérivé de la méthylhydrazine appartenant au groupe des hydrazines. Elle possède un faible pouvoir inhibiteur de la monoamine oxydase.

Le bévacizumab (Avastin[®]) est un anticorps monoclonal anti-VEGF, visant à inhiber l'angiogenèse. Il est indiqué dans le traitement des glioblastomes résistants au traitement de première ligne, combiné à la radiothérapie et au témozolomide. Deux études récentes montrent que son intérêt en première ligne est mitigé, car si le bévacizumab augmente bien la durée de vie sans progression de la maladie en association avec la radiothérapie et le témozolomide, la survie des patients n'est pas significativement augmentée pour autant (Chinot et al. 2014 ; Gilbert et al. 2014). Cependant, il n'est pas possible de conclure

concernant l'utilité du bévacizumab qui se trouve aujourd'hui dans une multitude d'essais cliniques dont les résultats seront disponibles dans les mois ou les années qui viennent. Notons qu'il n'existe pas, à l'heure actuelle, de test compagnon permettant de rechercher un marqueur moléculaire prédictif d'une réponse au bévacizumab.

b. Traitements d'accompagnement

i. Corticothérapie

Les corticoïdes oraux ou parentéraux sont fréquemment utilisés en neuro-oncologie. Ils agissent essentiellement sur l'œdème péritumoral. Ils permettent une réduction de l'HTIC et une amélioration fonctionnelle rapide (réduction des déficits et des crises comitiales). Mais il existe de nombreux effets indésirables (aspect cushingoïde, myopathie, complications psychiatriques,...). De plus, les corticoïdes, par un effet indirect anti-angiogénique, s'opposent à la pénétration de la chimiothérapie dans la tumeur. Ils peuvent en outre induire une hyperglycémie qui peut encourager la croissance de la tumeur.

ii. Traitement antiépileptique

Un traitement antiépileptique est nécessaire à titre prophylactique pendant la période péri-opératoire et chez les patients ayant présenté une crise inaugurale ou continuant à souffrir de crises itératives. Sauf exception, il n'est pas indiqué au long cours chez les patients dont l'histoire ne comporte aucune crise. Le choix du traitement ne présente pas de spécificité ; les médicaments les plus fréquemment utilisés en première intention sont le lévétiracétam (Keppra®), l'acide valproïque (Dépakine®), la lamotrigine (Lamictal®) et la carbamazépine (Tégréto®) en monothérapie. En cas de chimiothérapie envisagée, on privilégiera les agents non inducteurs enzymatiques. Ils nécessitent une surveillance des effets indésirables.

iii. Autres traitements symptomatiques

Divers traitements peuvent être nécessaires au cours de l'évolution d'une tumeur cérébrale : antidépresseurs, anxiolytiques, anticoagulants, antalgiques, antiémétiques, protecteurs gastriques, anti-œdémateux autres que les corticoïdes (Mannitol®, Diamox®).

iv. Prise en charge globale

La prise en charge globale des patients tient compte à la fois du patient et de son entourage. Elle intègre également, en raison du pronostic défavorable à court terme, une possible prise en charge palliative d'emblée.

c. Suivi et évaluation de la réponse aux traitements

Le suivi varie selon le grade tumoral : environ tous les 6 mois pour un gliome de grade II, de l'ordre de 2 à 3 mois pour les gliomes de grades III et IV. Le suivi repose sur l'examen clinique et l'IRM cérébrale, pour évaluer la réponse aux traitements et rechercher d'éventuelles complications. Le principal critère d'évaluation est la taille de la prise de contraste. Des aspects d'augmentation de taille de la tumeur à l'IRM dans les suites immédiates (généralement moins de 3 mois) de la radiothérapie avec chimiothérapie concomitante par témozolomide peuvent exister sans qu'il n'y ait de progression tumorale véritable. Ce phénomène est dénommé pseudo-progression. Le diagnostic différentiel avec une récurrence tumorale authentique est difficile, et un avis RCP est demandé. Le suivi est alors souvent plus rapproché. Devant un tableau de dégradation clinique, brutal ou progressif, la décision de changement ou d'interruption des traitements oncologiques doit être précédée d'une évaluation clinico-radiologique.

Le suivi à distance par IRM a pour but de dépister les récurrences, les transformations et éventuellement les radio-nécroses après radiothérapie.

d. Traitement des récurrences

Lors de rechute, la chimiothérapie peut être locale (comme du Gliadel® si ré-intervention chirurgicale) ou systémique. La chimiothérapie systémique dépendra du type tumoral. L'abstention thérapeutique et/ou les soins palliatifs pourront également être discutés.

e. Essais cliniques

Le traitement des gliomes diffus reste décevant malgré les progrès significatifs de la chirurgie, de la radiothérapie et des chimiothérapies cytotoxiques. L'échec de ces traitements s'explique par le caractère très infiltrant de ces tumeurs limitant l'efficacité des thérapies locales, et leur résistance intrinsèque à la radiothérapie et aux chimiothérapies cytotoxiques. Depuis quelques années, de nouvelles approches thérapeutiques se sont développées. L'institut national du cancer répertorie pas moins de 59 essais clos et 27 essais encore ouverts pour les tumeurs cérébrales que ce soit pour des molécules de chimiothérapie ou de thérapie ciblée (<http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Le-registre-des-essais-cliniques>).

Les voies de signalisation des récepteurs à tyrosine kinase comme par exemple celles des récepteurs EGFR et PDGFR sont très sollicitées durant l'initiation et la progression tumorale des gliomes. La fréquence de ces altérations a conduit à évaluer l'efficacité de plusieurs

agents inhibant l'activité tyrosine kinase de ces récepteurs membranaires. Ainsi, l'imatinib (Glivec®), un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de plusieurs récepteurs (c-Kit, DDR1, DDR2, CSF-1R, PDGFR- α et PDGFR- β), ou encore le gefitinib (Iressa®) et l'erlotinib (Tarceva®) deux inhibiteurs oraux des domaines tyrosines kinases de l'EGFR ont fait l'objet d'essais thérapeutiques en monothérapie ou en association dans les gliomes malins en récurrence. Les essais dont les résultats sont connus à ce jour sont assez décevants avec un taux de réponse globalement inférieur à 15 %. Cependant de nombreux essais sont encore en cours ou, s'ils sont clos aux inclusions, n'ont pas encore été analysés. Par exemple, IGR TARCEVA, un essai de phase 1 européen et multicentrique vise à évaluer l'erlotinib (Tarceva®) seul chez des enfants ayant une tumeur cérébrale maligne réfractaire ou récidivante, et évaluant l'erlotinib associé à une radiothérapie en traitement de première ligne, chez des enfants ayant un gliome du tronc cérébral. L'objectif de cet essai est de déterminer la dose la mieux tolérée d'erlotinib (un inhibiteur de l'EGFR) chez ces enfants.

L'échec des traitements anti-EGFR pourrait s'expliquer par une diffusion insuffisante de ces traitements au sein de la tumeur. Une activation concomitante de multiples récepteurs à tyrosine kinase distincts du ou des récepteurs ciblés peut se mettre en place. Enfin, il se peut également que l'altération de la voie de signalisation ne concerne pas le récepteur mais un facteur en aval comme PTEN par exemple. Certains essais cliniques ciblant les facteurs intracellulaires de la voie de signalisation sont également en cours : c'est le cas des inhibiteurs de PI3K et de mTOR comme des analogues de la rapamycine. Parallèlement à ces essais cliniques, les travaux de recherche sont poursuivis pour identifier les tumeurs les plus susceptibles de répondre à ces traitements, avec pour objectif de trouver un marqueur moléculaire prédictif de la réponse au traitement.

Depuis quelques années, de nombreuses essais cliniques ciblent l'angiogenèse et propose des molécules de thérapies ciblées ou de chimiothérapie anti-angiogéniques. Les gliomes malins sont en effet richement vascularisés, la tumeur produit de nouveaux vaisseaux sanguins, étroits, sinueux qui sont autant d'obstacles à la pénétration de la chimiothérapie au cœur de la tumeur. Huit-cent essais cliniques aujourd'hui dans le monde sont une combinaison de chimiothérapie et d'un médicament anti angiogénique qui contracte ces vaisseaux sanguins. Il y a deux cibles principales : bloquer le facteur de croissance VEGF ou bloquer le récepteur VEGFR à la surface des cellules. Le bévacizumab (Avastin®), un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) est utilisé dans de nombreux essais, généralement en association avec une chimiothérapie (Hoang-Xuan et al. 2011). Si les

résultats de certaines études s'avèrent décevants car ils n'améliorent que très peu la survie des patients (*Chinot et al. 2014 ; Gilbert et al. 2014*), plusieurs autres essais ciblant l'angiogenèse sont en cours et permettent d'espérer des améliorations de la survie:

- Citons par exemple TAVAREC, un essai de phase 2, randomisé, multicentrique européen, évaluant l'efficacité du témozolomide associé ou non à du bévacizumab, chez des patients ayant un gliome en rechute. L'objectif de cet essai est d'évaluer l'efficacité du témozolomide associé ou non à du bévacizumab, chez des patients présentant un gliome de grade II ou III, sans perte 1p/19q, en rechute après une ligne de traitement.

- Un autre exemple d'essai clinique ciblant l'angiogenèse est CILENT, un essai de phase 1, français, multicentrique, évaluant la tolérance d'un traitement associant du cilengitide à une radiothérapie, chez des patients jeunes (6 mois à 21 ans, 40 inclusions) ayant un gliome infiltrant du tronc cérébral. Le cilengitide est un pentapeptide cyclique de synthèse qui inhibe des intégrines, notamment les intégrines alpha V bêta 3, 5, 6 qui interviennent dans l'angiogenèse tumorale. L'objectif de cet essai est de déterminer la dose recommandée de cilengitide en tant qu'inhibiteur d'angiogenèse, lors d'un traitement administré en association avec une radiothérapie, chez des patients jeunes ayant un gliome infiltrant du tronc cérébral.

De nombreux mécanismes physiopathologiques et facteurs oncogéniques différents sont ciblés par des essais cliniques avec de nouvelles molécules ou de nouvelles associations ou par des projets de recherche plus transversale : par exemple, UF 9042 est une étude de faisabilité visant à caractériser une signature microARN spécifique des gliomes diffus de bas grade dans le sang circulant pour les utiliser comme outils de diagnostic et de suivi dans cette population de patients. Dans une toute autre approche thérapeutique, de type vaccinale en combinaison avec la radio-chimiothérapie, la forme tronquée EGFRvIII observée dans un tiers des GBM a été administrée par des injections sous cutanées, avec des résultats prometteurs qui demandent à être confirmés dans un essai contrôlé.

Un aperçu de l'ensemble des thérapies usuelles ou expérimentales utilisées est présenté dans l'annexe I.

V. Exposé des travaux: recherche de biomarqueurs pour la prise en charge thérapeutique

Article n°1 : Perte des chromosomes 1p19q par LOH et expression de P53 et Olig2 dans les gliomes: association avec les types histologiques et le pronostic

Karine Durand, Angélique Guillaudeau, Nicolas Weinbreck, Rafaël DeArmas, Sandrine Robert, Alain Chaunavel, Isabelle Pommepuy, Sylvie Bourtoutmieux, François Caire, Franck Sturtz, François Labrousse.

Modern Pathology (2010); 23 : 619-628

La perte d'hétérozygotie (« Loss of Heterozygosity » ou LOH) des bras chromosomiques 1p et 19q, est considérée comme un marqueur de bon pronostic des tumeurs oligodendrogiales. Cependant les pertes de matériel chromosomique peuvent intéresser différents *loci*: elles peuvent être télomériques, interstitielles, centromériques ou affecter un bras chromosomique entier. Les associations entre l'étendue des pertes 1p et 19q et le type tumoral, les autres marqueurs moléculaires (P53, Olig2, EGFR, etc...) ou le pronostic du patient ne sont pas encore complètement élucidées. Dans ce travail, nous avons analysé un certain nombre de marqueurs microsatellites situés sur des *loci* chromosomiques s'étendant du télomère au centromère, afin de caractériser le type de perte 1p et 19q dans une série de 39 gliomes infiltrants, incluant des astrocytomes, des glioblastomes, des oligo-astrocytomes et des oligodendrogliomes. Nous avons étudié l'association entre la perte d'hétérozygotie et l'expression de P53 et d'Olig2, et l'amplification du gène *EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*). Enfin, nous avons évalué l'influence des différents marqueurs moléculaires sur la survie globale des patients.

Méthodes

Pour chacun des 39 patients, nous disposions de tissu tumoral congelé, de tissu tumoral fixé au formol et inclus en paraffine et de tissu non tumoral (sang). L'étude des pertes chromosomiques 1p19q par LOH a consisté à analyser par PCR-analyse de fragment un minimum de 15 et 7 régions microsatellites sur les bras 1p et 19q respectivement, à partir d'ADNg non tumoral (sang) et tumoral. L'amplification du gène *EGFR* a été étudiée à partir d'étalement de tissu congelé, par technique d'hybridation fluorescente *in situ*. L'expression des protéines P53 et Oligo2 a été quantifiée par immunohistochimie à l'aide d'anticorps spécifiques.

Résultats principaux

Cinq types différents de LOH 1p19q ont été identifiés dans la cohorte de tumeurs étudiée : Absence de perte, perte télomérique, perte interstitielle (sans perte télomérique ni centromérique), perte focale et perte complète de tous les *loci* analysés entre le télomère et le centromère. Les pertes complètes des bras 1p et 19q sont associées dans 90% des cas. Cette altération est présente dans tous les oligodendrogliomes classiques alors que les autres types de LOH (télomérique, interstitiel, centromérique) prédominent dans le groupe des oligo-astrocytomes.

L'amplification du gène *EGFR* a été identifiée dans 12% des oligo-astrocytomes et 60% des glioblastomes, de manière cohérente avec les données de la littérature, mais n'est pas associée à la perte complète 1p19q.

La perte complète 1p19q est associée de manière significative à l'expression d'Olig2, en particulier dans les oligodendrogliomes mais n'est jamais observée dans les astrocytomes et les glioblastomes qui surexpriment P53.

Concernant les valeurs pronostiques des altérations étudiées, les patients présentant une perte complète 1p19q semblent bénéficier d'une survie plus longue. De plus, nous avons montré que parmi les patients avec des tumeurs prenant le contraste (tumeurs de haut grade), ceux qui présentent une perte complète 1p19q ont un meilleur pronostic.

Conclusion

Notre étude a montré que l'association du statut LOH 1p19q et des données histopathologiques et immunohistochimiques, procure des informations pertinentes et utiles pour (i) discriminer les différents types de gliomes, notamment oligodendrogliomes vs. astrocytomes et glioblastomes, et (ii) identifier un sous-groupe de tumeur associé à un meilleur pronostic.

1p19q LOH patterns and expression of p53 and Olig2 in gliomas: relation with histological types and prognosis

Karine S Durand^{1,*}, Angélique Guillaudeau^{1,*}, Nicolas Weinbreck¹, Rafaël DeArmas¹, Sandrine Robert¹, Alain Chaunavel¹, Isabelle Pommepuy¹, Sylvie Bourthoumieu², François Caire³, Franck G Sturtz⁴ and François J Labrousse¹

¹Department of Pathology, Dupuytren University Hospital, Limoges, France; ²Department of Cytology, Dupuytren University Hospital, Limoges, France; ³Department of Neurosurgery, Dupuytren University Hospital, Limoges, France and ⁴Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Dupuytren University Hospital, Limoges, France

In glial tumors, the loss of heterozygosity of the 1p and 19q chromosomal arms is thought to be a marker of good prognosis in oligodendroglial tumors. However, 1p and 19q loss of heterozygosity may be telomeric, interstitial, centromeric or affect the whole arm of the chromosome and the associations between these different patterns and tumor type, other molecular markers and patient prognosis remain unclear. We analyzed microsatellite markers in a region spanning the chromosome from the telomere to the centromere, to characterize the pattern of 1p and 19q loss of heterozygosity in 39 infiltrative gliomas, including astrocytomas, glioblastomas, oligoastrocytomas and oligodendrogliomas. We then studied the association between loss of heterozygosity and the expression of p53 protein and Olig2, as analyzed using immunohistochemistry, and epidermal growth factor receptor (EGFR) gene amplification, as investigated using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Finally, we assessed the influence of molecular markers on the overall survival of patients. We identified five different 1p19q loss of heterozygosity patterns among the tumors studied and found that loss of heterozygosity over the whole 1p arm was associated with loss of heterozygosity over the whole 19q arm in 90% of cases. 1p19q whole loss was present in all the classical oligodendrogliomas, whereas other 1p19q loss patterns predominated in oligoastrocytomas. 1p19q whole loss was also significantly associated with Olig2 overexpression, but was never observed in tumors overexpressing p53 protein. We also found that, among patients with contrast-enhancing tumors, those with 1p19q whole loss tended to survive for longer. In combination with classical histological and immunohistochemical data, 1p19q status determination provides pertinent information useful for (1) discriminating between histological types of gliomas and (2) identifying a subgroup of tumors that are associated with a better prognosis.

Modern Pathology (2010) 23, 619–628; doi:10.1038/modpathol.2009.185; published online 15 January 2010

Keywords: 1p19q loss of heterozygosity; glioma; p53; Olig2; prognosis

The malignant growth, transformation and progression of gliomas have been shown to involve changes in gene expression and several genetic abnormalities. Molecular markers may therefore be useful

tools for the accurate, pathological and molecular classification of these tumors.^{1–3} Changes in chromosomal copy number are common events in gliomas. These changes include deletions, partial or complete duplication of chromosomes, general polyploidy and high-copy number amplifications of specific regions.^{4,5}

It is now widely accepted that the combined loss of the 1p and 19q chromosomal arms, typically consisting of a whole 1p19q deletion corresponding to an unbalanced translocation t(1;19)(q10;p10),^{6,7} is the molecular hallmark of classical oligodendroglioma.

Correspondence: Professor FJ Labrousse, MD, Department of Pathology, Dupuytren University Hospital, 2 Avenue Martin Luther King, 87042 Limoges Cedex, France.
E-mail: labrousse@unilim.fr

*These authors contributed equally to this work.
Received 16 September 2009; revised 1 December 2009; accepted 7 December 2009; published online 15 January 2010

Genomic alterations to the 1p and 19q chromosomal arms are rare in astrocytomas and glioblastomas, mostly consisting of partial and/or telomeric deletions in these tumors.^{4,8} However, the frequency and type of 1p19q genomic alteration have been shown to be highly variable. 1p19q loss is reported in approximately 40–70% of classical forms of oligodendrogliomas^{9–12} and in approximately 50% of oligoastrocytomas.^{2,13} 1p36 (~7 Mb) and 19q13.3 (~0.9 Mb) have been identified as minimal regions of loss,^{11,12,14,15} but 1p and 19q deletions involving the entire 1p and 19q arms have been described.^{8,16–22}

As reported by some researchers,^{23,24} the morphological characteristics of gliomas may be a source of variability concerning 1p and 19q loss. There is now a consensus that tumors with a typical clear cell component should be classified as classical oligodendrogliomas. However, tumors with a mixed oligodendroglial and astrocytic morphology or those composed of hybrid cells remain difficult to be classified precisely.¹³ Glioblastomas are easy to recognize when characteristic necrosis with pseudopalisades is observed, but they are polymorphous and considerable variability is observed in the cellular composition of these tumors. In addition, as gliomas are infiltrative neoplasms, tumor cell density is variable. This criterion must be evaluated before the interpretation of molecular results.

We aimed to clarify the value of partial or whole 1p and 19q loss as a molecular marker in gliomas, by carrying out polymerase chain reaction (PCR) analysis of the loss of heterozygosity (LOH) of microsatellite markers located in a region extending from the telomere to the centromere of the 1p and 19q chromosome arms. Deletion patterns were compared with cytological tumor type and the status of other markers used for glioma characterization, such as the expression of p53 protein and Olig2 and *epidermal growth factor receptor (EGFR)* gene amplification. Finally, we evaluated the use of 1p19q loss pattern as a prognostic marker.

Materials and methods

Patients and Tumor Samples

We studied 39 adult patients diagnosed with infiltrating glioma and undergoing surgery at Limoges Dupuytren University Hospital. All samples were used in accordance with French bioethics laws regarding patient information and consent. At the time of resection, tumor samples were fixed in 4% formalin, embedded in paraffin and sections were cut and stained with hemalum phloxine safran.

The histopathological type of the tumor was determined, according to the World Health Organization² classification, by three different pathologists. Tumors consisting mostly of a typical oligodendroglial component, described as a 'fried egg' pattern, with or without minigemistocytes, were classified as

oligodendrogliomas (Figure 1a). Tumors with a mixed or hybrid morphotype were classified as oligoastrocytomas (Figure 1b). Tumors consisting solely of tumor cells with an astrocytic morphology were classified as astrocytomas (Figure 1c). In glioblastomas (Figure 1d), we determined whether there was an oligodendroglial component.

Tissue Controls

Genomic DNA (gDNA) was extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. In each case, control sections were also used to check that a representative tumor component had been selected for molecular analysis, for example, the clear cell component for oligodendrogliomas. Tumor cell density (TCD) was determined using a semi-quantitative method, with scoring as follows: TCD+ if <20% of cells were tumor cells, TCD++ if between 20 and 70% of the cells were tumor cells, or TCD+++ if ≥70% of the cells were tumor cells. Only samples with pure tumor tissue (TT) or with a TCD scored as ++ or +++ on control slides were used for analysis.

Extraction of Genomic DNA

For each patient, gDNA was extracted from tumor tissue and from non-tumor tissue or whole blood with the QiaAmp DNA mini or micro kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), depending on the amount of tissue, used according to the manufacturer's instructions. Samples were treated with RNase to prevent the RNA contamination of samples and the purified gDNA was eluted in distilled water, quantified using spectrophotometry and stored at -20 °C until use.

LOH Analysis

LOH analysis was performed on 50 ng of tumor and non-tumor gDNA. We analyzed 15 microsatellite markers located between the telomere and the centromere for the 1p chromosome (D1S243 (1p36.33), D1S2663 (1p36.23), D1S507 (1p36.21), D1S2864 (1p36.12), D1S247 (1p35.2), D1S2657 (1p34.3), D1S197 (1p33), D1S2700 (1p32.2), D1S2788 (1p31.3), D1S499 (p31.1), D1S208 (1p31.1), D1S2819 (1p21.3), D1S206 (1p21.2), D1S189 (1p13.1), D1S2696 (1p12)), and 7 markers for the 19q chromosome (D19S887 (19q13.43), D19S888 (19q13.42), D19S867 (19q13.32), D19S900 (19q13.31), D19S223 (19q13.2), D19S570 (19q13.12), D19S931 (19q12)).

In brief, normal and tumor gDNA were used as template for PCR amplification in the presence of 0.5 μM forward and reverse primers, 3 mM MgCl₂, 0.2 μM dNTP, 1.25 U HotStart DNA polymerase (SurePrime DNA polymerase, MP Biomedicals, Illkirch, France), 1–5% dimethylsulfoxide, depend-

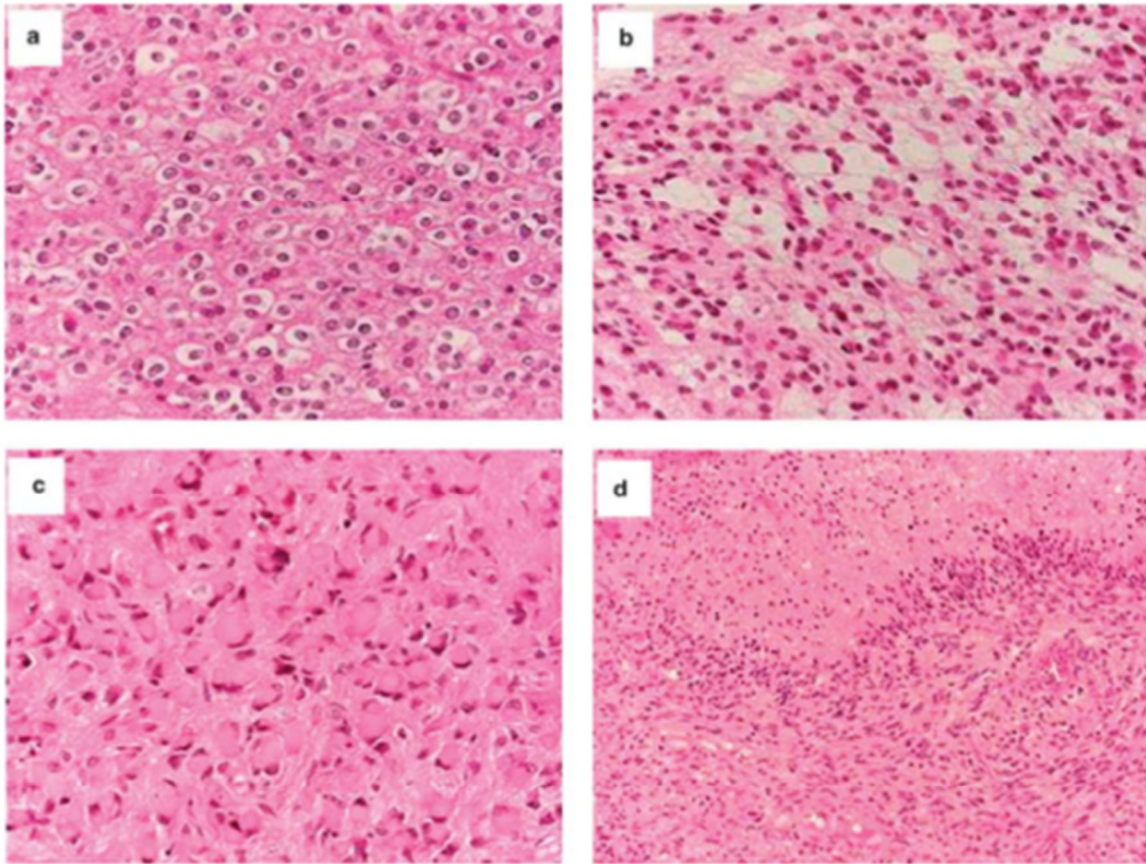


Figure 1 Tumor types. Oligodendroglioma with typical honeycomb pattern (a), mixed astrocytic and oligodendroglial components in an oligoastrocytoma (b), gemistocytic astrocytoma (c), glioblastoma with pseudopalisading necrosis (d).

ing of the marker studied and $1 \times$ DNA polymerase buffer, in a final volume of $20 \mu\text{l}$. The amplification conditions were as specified by the manufacturer of the DNA polymerase.

PCR products were separated by capillary electrophoresis in a 3130XL (Applied Biosystems) genetic analyzer and analyzed using GeneScan software (Applied Biosystems). In DNA samples showing heterozygosity for a particular marker, LOH was assessed by measuring the peak height for each of the alleles produced from both the tumor and the corresponding normal DNA. The formula $(T1/T2)/(N1/N2)$ was applied, in which $T1$ and $N1$ are the peak heights generated for the smaller allele from tumor and normal tissue, respectively, and $T2$ and $N2$ are the peak heights generated for the PCR products from the larger allele of tumor and normal tissue, respectively. Heterozygosity was considered to be maintained if $0.5 < \text{ratio} < 2$ and to have been lost if $0.5 \geq \text{ratio} \geq 2$. A patient was considered to be homozygous for a marker if only one allele was observed for normal and tumor tissue.

EGFR Gene Amplification

EGFR gene amplification was analyzed with smear preparations of frozen tissue, using double fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with the 'LSI *EGFR* SpectrumOrange/CEP 7 SpectrumGreen Probe' kit (Abbott Molecular, IL, USA), as previously described.²⁵ In each case, tumor cell density and type were checked on adjacent tissue sections, to ensure that the tissue analyzed was identical to that used for the LOH study.

EGFR gene amplification was considered to have occurred if $> 10\%$ of the cells analyzed yielded a red signal (corresponding to the *EGFR*-specific probe) to green signal (centromeric region of chromosome 7) ratio ≥ 2 , as suggested in several previous studies.^{26–28}

Immunohistochemistry

We cut $5 \mu\text{m}$ -thick sections from paraffin-embedded tumors and incubated them with the following primary antibodies: monoclonal mouse anti-p53

antibody (DakoCytomation, Glostrup, Denmark, 1/50) and rabbit anti-Olig2 antibody (Immuno-Biological Laboratories, Gunma, Japan, 1/200). Sample slides were processed automatically (BenchMark XT ICH/ISH, Ventana Medical Systems) according to protocols supplied by the antibody manufacturers.

The percentage of cells labeled with the antibodies against p53 and Olig2 was determined on 500 cells.

Statistical Analyses

StatView 5.0 software (SAS Institute, Cary, NC, USA) was used for statistical analyses. Means were compared in the nonparametric Mann-Whitney test for pairs of variables and with the Kruskal-Wallis tests for comparisons of more than two variables. Pearson's chi-square test or Fisher's exact test was used to assess differences between nominal vari-

ables. Overall survival was analyzed using Kaplan-Meier, and the log-rank test was used to compare subgroups relative to overall survival.

Results

Patient Characteristics

Relevant features of the patients are summarized in Table 1.

There were 14 women and 25 men, aged from 18 to 77 years (median age at surgery, 51.6 years). The series included 33 primary and 6 recurrent tumors. There were 4 astrocytomas, 11 glioblastomas, 17 oligoastrocytomas and 7 oligodendrogliomas. Of 11 glioblastomas, 6 had a minor (<10%) oligodendroglial component. In all, 12 tumors had a temporal location, whereas 27 were extratemporal. On magnetic resonance imaging, 31 of the 39 tumors showed contrast enhancement.

Table 1 Demographical, pathological and clinical features

Sample	Histological type and grade ^a	Sex	Age (years)	Status	Tumor location	Contrast enhancement	Radio therapy	Chemo therapy
1	A II	M	50	Primary	Extra-temporal	No	No	No
2	A III	M	72	Primary	Temporal	Yes	Yes	Yes
3	A III	F	42	Primary	Extra-temporal	Yes	Yes	Yes
4	A III	F	57	Primary	Temporal	Yes	Yes	Yes
5	GB IV	F	38	Primary	Extra-temporal	Yes	Yes	No
6	GB IV	F	70	Primary	Extra-temporal	Yes	Yes	No
7	GB IV	M	43	Primary	Temporal	Yes	Yes	Yes
8	GB IV	M	35	Primary	Temporal	Yes	Yes	Yes
9	GB IV	F	45	Primary	Extra-temporal	Yes	Yes	Yes
10	GB IV	M	61	Primary	Extra-temporal	Yes	Yes	Yes
11	GB IV	F	77	Primary	Temporal	Yes	No	Yes
12	GB IV	M	76	Primary	Temporal	Yes	No	Yes
13	GB IV	F	58	Primary	Extra-temporal	Yes	Yes	Yes
14	GB IV	M	68	Primary	Temporal	Yes	No	Yes
15	GB IV	M	48	Primary	Temporal	Yes	Yes	Yes
16	OA II	F	66	Primary	Extra-temporal	Yes	Yes	Yes
17	OA II	F	47	Recurrent	Extra-temporal	No	Yes	Yes
18	OA II	M	52	Recurrent	Temporal	No	No	No
19	OA II	M	49	Primary	Extra-temporal	No	No	No
20	OA II	M	58	Primary	Extra-temporal	Yes	No	Yes
21	OA II	M	52	Primary	Temporal	No	Yes	No
22	OA II	F	34	Recurrent	Extra-temporal	No	No	No
23	OA II	M	50	Primary	Extra-temporal	No	Yes	Yes
24	OA III	M	73	Primary	Extra-temporal	Yes	Yes	No
25	OA III	M	72	Primary	Extra-temporal	Yes	Yes	Yes
26	OA III	F	42	Primary	Temporal	Yes	Yes	Yes
27	OA III	M	54	Primary	Extra-temporal	Yes	Yes	Yes
28	OA III	M	68	Primary	Extra-temporal	Yes	Yes	Yes
29	OA III	F	18	Primary	Extra-temporal	Yes	No	Yes
30	OA III	F	57	Primary	Extra-temporal	Yes	Yes	Yes
31	OA III	M	41	Primary	Extra-temporal	Yes	Yes	Yes
32	OA III	M	35	Recurrent	Extra-temporal	Yes	No	No
33	O II	M	58	Recurrent	Extra-temporal	Yes	Yes	Yes
34	O II	M	29	Primary	Extra-temporal	Yes	Yes	No
35	O III	M	70	Primary	Extra-temporal	Yes	No	Yes
36	O III	M	53	Primary	Extra-temporal	Yes	Yes	Yes
37	O III	M	31	Primary	Extra-temporal	Yes	Yes	Yes
38	O III	M	68	Primary	Temporal	No	No	Yes
39	O III	F	45	Recurrent	Extra-temporal	Yes	No	No

A, astrocytoma; O, oligodendroglioma; OA, oligoastrocytoma; GB, glioblastoma.

^aWHO grades II-IV.

Of 39 patients, 26 received radiotherapy, 28 received chemotherapy and 21 received a combination of chemotherapy and radiotherapy; 6 patients had no treatment.

Deletion Patterns for the 1p and 19q Chromosomes

Microsatellite analyses of the 1p and 19q chromosome arms showed five various genomic patterns (Figure 2): whole chromosome arm retention; telomeric loss encompassing at least the most telomeric marker but without interstitial and centromeric deletion; interstitial loss with the retention of both alleles for centromeric and telomeric markers; scattered loss concerning one marker located anywhere on the chromosome; and whole loss, with LOH for all markers located between the telomere and the centromere.

Whole 1p and 19q arm retention was observed in 20 tumors, whereas the 1p scattered loss pattern was found in 3 tumors (2 glioblastomas and 1 oligoastrocytoma) and 1p interstitial loss was found in only 1 oligoastrocytoma. A 1p telomeric loss pattern was observed in 3 tumors (1 astrocytoma and 2 oligoastrocytomas), and a 19q telomeric loss pattern

was observed in 2 tumors (1 glioblastoma and 1 oligoastrocytoma). In one case, the tumor showed a combined 1p19q telomeric loss pattern. Of 9 tumors with 1p whole loss, 8 also showed 19q whole loss ($P < 0.0001$), indicating a significant association between these two patterns.

The 1p whole loss and 1p19q whole loss patterns were not related to the age or sex of the patient or to recurrence, contrast enhancement (Table 2) or tumor location (result not shown). The 1p whole loss and 1p19q whole loss patterns were both strongly associated with the oligodendroglial tumor type (Table 2, $P < 0.0001$); all the oligodendroglomas presented the 1p19q whole loss pattern, whereas this pattern was found in only one oligoastrocytoma and none of the astrocytomas and glioblastomas.

EGFR Amplification

EGFR amplification was not linked with the age or sex of the patient, recurrence or radiological data (Table 3). In our series, 12% of the oligoastrocytomas and 60% of the glioblastomas showed amplification of the EGFR gene, whereas no such amplification was observed in any of the oligodendroglomas and

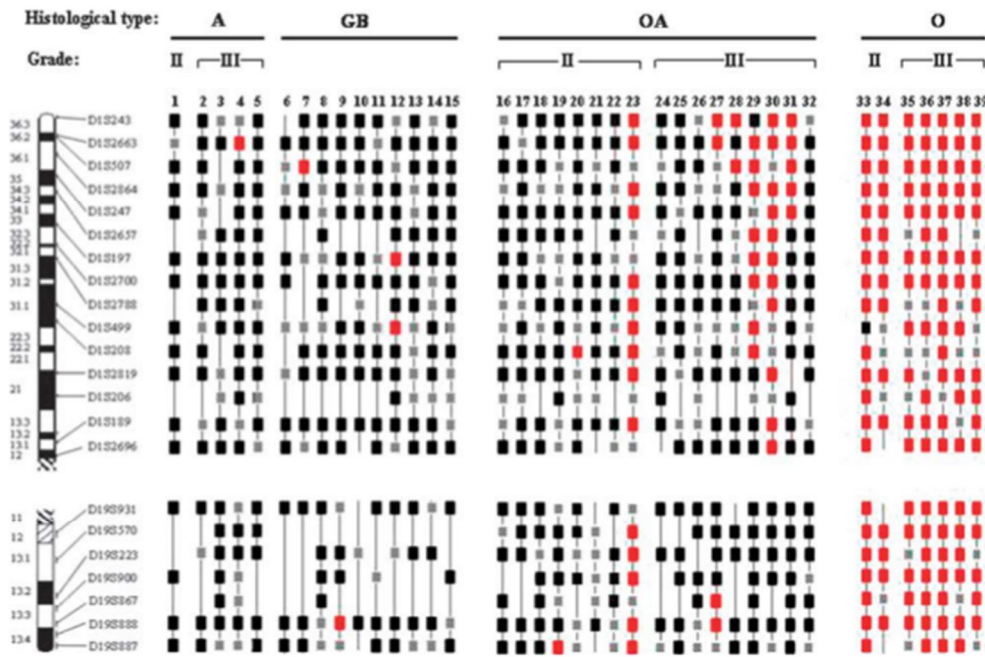


Figure 2 Genomic pathways of 1p and 19q chromosome arms. Loss of heterozygosity was analyzed for 15 and 7 microsatellite markers spanning from telomere to centromere of, respectively, 1p and 19q chromosome. Loss (red squares), retention (black squares) or homozygosity (hatched little squares) were indicated for each marker. A: astrocytoma; GB: glioblastoma; OA: oligoastrocytoma; O: oligodendrogloma.

Table 2 Relation between 1p and 19q whole loss and demographical and histopathological parameters

Parameters	No. of patients	1p whole loss		1p19q whole loss	
		n	P-value	n	P-value
All patients	39	9		8	
Sex					
Female	14	2		1	
Male	25	7	0.55	7	0.25
Age (years)					
≤51.6	19	5		4	
>51.6	20	4	NS	4	NS
Contrast enhancement					
Yes	31	7		6	
No	8	2	NS	2	NS
Histological type					
A	4	0		0	
GB	11	0	<0.0001	0	<0.0001
OA	17	2		1	
O	7	7		7	

A, astrocytoma; GB, glioblastoma; OA, oligoastrocytoma; O, oligodendroglioma; NS, not significant.

astrocytomas ($P=0.009$). *EGFR* amplification was not significantly associated with the presence or absence of 1p19q whole loss, but none of the seven tumors with 1p19q whole loss showed *EGFR* amplification.

p53 and Olig2 Expression

In our series, the expression of p53 and Olig2 was not correlated with demographic parameters, such as the age or sex of the patient (Table 4).

p53 protein was significantly more strongly expressed in astrocytomas and glioblastomas, in which 65.7 and 58.5%, respectively, of the cells were labeled, than in oligoastrocytomas (46.1%) and oligodendrogliomas (12%, $P=0.01$). p53 labeling was weaker in tumors with the 1p19q whole loss genomic pattern (11.4%) than in other tumors (54.5%, $P=0.001$).

Olig2 expression was significantly associated with histological type and the 1p19q genomic pattern. The Olig2 labeling index was higher in oligodendrogliomas (78.6%) than in the other histological types (astrocytomas: 52.5%, glioblastomas: 46.4%, oligoastrocytomas: 62.4%, $P=0.03$). Higher levels of Olig2 expression were also associated with the 1p19q whole loss genomic pattern, as the tumors expressing Olig2 most strongly had 1p19q whole loss ($P=0.02$).

Effect of Molecular Markers on Patient Overall Survival

At the time of the analysis, 16 of the 39 patients had died. Median overall survival for the whole group

Table 3 Relation between demographical and histological parameters and *EGFR* amplification in tumors

Parameters	No. of patients ^a	<i>EGFR</i> amplification ^b		
		Negative	Positive	P-value
All patients	35	21	11	
Sex				
Female	13	11	2	
Male	22	16	6	0.69
Age (years)				
≤51.6	18	16	2	
>51.6	17	11	6	0.19
Contrast enhancement				
Yes	28	20	8	
No	7	7	0	0.26
Histological type				
A	4	4	0	
GB	10	4	6	0.009
OA	14	12	2	
O	7	7	0	
1p19q whole loss				
Yes	7	7	0	
No	28	20	8	0.26

A, astrocytoma; GB, glioblastoma; OA, oligoastrocytoma; O, oligodendroglioma.

^aFour patients had not been included in *EGFR* amplification study for technical reasons.

^b*EGFR* amplification was considered as negative or positive when <10% or >10% of cells had a spot ratio ≥ 2 , respectively.

was 45 months. Overall survival did not depend significantly on the sex of the patient, but tended to be longer in younger patients (for whom there were too few events to determine a median value) than in older patients (22 months, $P=0.06$, Figure 3a). Overall survival did not depend on the histological type of the tumor ($P=0.16$).

Patients with the 1p19q whole loss genomic pattern seemed to have a better overall survival (45 months) than those without 1p19q whole loss (22 months, $P=0.11$, Figure 3b), although this difference was not statistically significant.

Contrast enhancement was associated with a worse prognosis (median overall survival 22 vs 45 months, $P=0.03$, Figure 3c). In total, 31 patients had contrast-enhancing tumors. Five of the six patients with contrast-enhancing tumors who also had a 1p19q whole loss genomic pattern were alive at the time of analysis, whereas almost 60% of patients who did not present this genomic profile died with an overall survival of 17 months ($P=0.08$, Figure 3d).

Discussion

In our series, an analysis of microsatellite markers spanning the chromosome arms studied from the

Table 4 Relation of demographical, histological and genomic parameters with p53 and Olig2 expression

Parameters	No. of patients	p53		Olig2	
		Mean% ± s.d.	P-value	Mean% ± s.d.	P-value
All patients	39	45.7 ± 33.6		59.2 ± 24.3	
Sex					
Female	14	48.1 ± 36.5		52.9 ± 23.1	
Male	25	44.4 ± 32.5	0.71	63.6 ± 23.4	0.19
Age (years)					
≤ 51.6	19	55.3 ± 36.6		54.5 ± 26.1	
> 51.6	20	36.5 ± 28.3	0.08	64.8 ± 20.4	0.24
Contrast enhancement					
Yes	31	42.1 ± 31.7		61.1 ± 24.1	
No	8	59.6 ± 33.3	0.22	54.4 ± 22.3	0.4
Histological type					
A	4	65.7 ± 26.3		52.5 ± 32	
GB	11	58.5 ± 31.1	0.01	46.4 ± 22.8	0.03
OA	17	46.1 ± 34		62.4 ± 20.5	
O	7	12 ± 12.5		78.6 ± 14.9	
1p19q whole loss					
Yes	8	11.4 ± 11.7		76.9 ± 14.6	
No	31	54.5 ± 31.6	0.001	55.3 ± 23.6	0.02

A, astrocytoma; GB, glioblastoma; OA, oligoastrocytoma; O, oligodendroglioma.

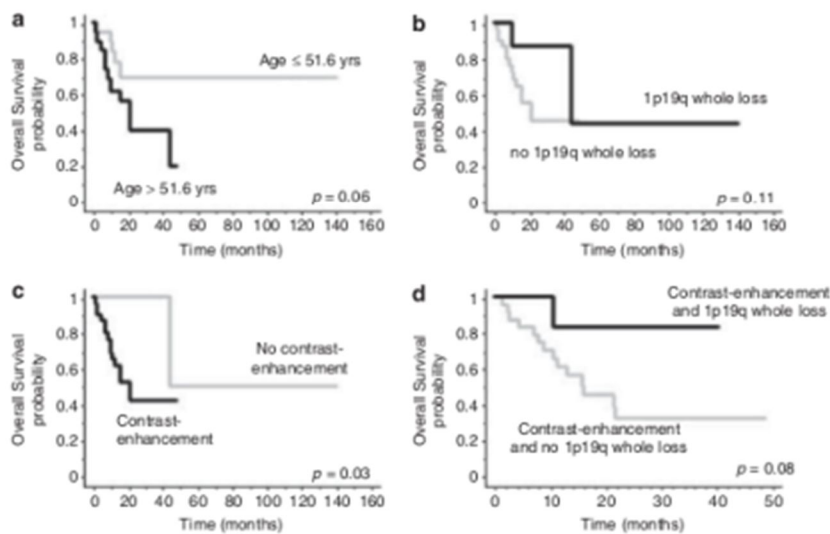


Figure 3 Overall survival of patients. Patient overall survival according to age at diagnosis (a), presence or absence of a 1p19q whole loss (b), presence or absence of a contrast enhancement in the tumor (c) and presence or absence of a 1p19q whole loss in tumors with a contrast enhancement (d). The log-rank test was used to compare subgroups relative to overall survival.

telomere to the centromere identified five 1p and 19q loss patterns, the nature of which depended on the histological tumor type considered: 1p whole loss was significantly associated with 19p whole loss, and the combined 1p19q whole loss pattern was associated with classical oligodendrogliomas,

whereas other loss patterns predominated in mixed oligoastrocytomas and, to a lesser extent in astrocytomas and glioblastomas. All our cases of classical oligodendrogliomas showed 1p19q whole loss. This association has been reported in only two other studies^{29,30} with most published series reporting

a percentage of combined 1p19q loss of 40–70% in oligodendrogliomas.^{9,11,12,15,22,31–33}

There may be several reasons for the discrepancies between different studies. The criteria used for the histological definition of oligodendrogliomas remain a matter of debate among neuropathologists.^{34–37} Knowledge of the quality of tumor tissue selected for the molecular analysis, in terms of its cellular composition and tumor cell density, is essential for interpretation of the results obtained. This information is not always supplied in published articles. The close relationship between morphological and molecular patterns in our series of oligodendrogliomas probably resulted from the careful selection of the clear cell tumor component for molecular analysis.

Divergent results may also be accounted for by the extent of chromosome loss. Consistent with our findings, Boulay *et al*¹⁷ found four different 1p patterns in oligodendrogliomas and glioblastoma multiforme: arm retention, telomeric loss, interstitial loss and centromeric loss including whole loss. In this study, oligodendrogliomas presented only two haplotypes, mainly whole loss and, in a minority of cases, arm retention, whereas the other patterns were found in glioblastoma multiforme. Other studies have reported that whole 1p loss is rare in astrocytomas and, conversely, that partial loss restricted to the 1p36 region is more frequent in anaplastic astrocytomas (22%), glioblastomas (34%)⁸ and oligoastrocytomas (60%).¹² We found 1p telomeric loss limited to the 1p36 region in 25% of the astrocytomas and 35% of the oligoastrocytomas.

Various patterns of 1p19q deletion associated with oligodendrogliomas (ie, 1p19q whole loss) or astrocytomas (ie, 1p19q telomeric loss or no loss) were found in the 17 oligoastrocytomas of our series. This reflects the mixed or hybrid nature of this tumor type.^{2,13} As for oligodendrogliomas, the reported frequency of deletions varies from 'very rare'³⁰ to 50–75%.^{22,32,33,38} In practice, despite the detection of 1p19q whole loss in only 1 of our 17 cases, we think that 1p19q testing should be carried out for oligoastrocytomas to improve their classification and also because their prognosis could be related to 1p19q status.^{39,40}

The molecular data were correlated with those obtained for the other markers tested. The presence of 1p19q whole loss was significantly associated with higher levels of Olig2 expression, indicating that these two markers tend to be associated with tumors of the oligodendroglial type. Mokhtari *et al*¹¹ reported such an association but, unlike us, identified discriminant cutoff values for Olig2 expression as a function of histological tumor type. p53 overexpression and 1p19q whole loss were mutually exclusive, consistent with published findings.^{2,41–43} Furthermore, the heterogeneity of oligoastrocytomas was well illustrated by the patterns of expression of Olig2 and p53, the levels of which were intermediate between those of oligodendrogliomas and

those of astrocytomas or glioblastomas. Consistent with other reports,^{19,25} *EGFR* amplification was restricted to oligoastrocytomas and glioblastomas, in which it was observed in 14 and 60% of cases, respectively. *EGFR* was never amplified in tumors with the 1p19q whole loss pattern.

Determining the extent of the chromosomal deletion is of paramount importance for tumor typing and evaluation of prognosis. Complete 1p19q loss is associated with the classical oligodendroglial phenotype and has been shown to be correlated with significantly longer overall and progression-free survival, whereas partial 1p telomeric loss is mostly found in astrocytic tumors and is associated with a poor prognosis.^{8,20} Thus, in practice, analyses of 1p and 19q loss analyses should distinguish between cases of whole loss and telomeric loss, based on the use of appropriate FISH probes, comparative genomic hybridization or microsatellite marker amplification by PCR, exploring the entire chromosomal arms.

Only one of the eight patients with a tumor showing 1p19q whole loss died after 45 months. The 31 patients without this pattern had a median overall survival of 22 months, with a mortality rate of 42%. Contrast enhancement is widely accepted to be a criterion for malignancy. In our series, patients with tumors showing no contrast enhancement had significant better overall survival than the other patients (45 vs 22 months). Interestingly, among the 31 patients with tumors showing contrast enhancement, 5 of the 6 patients with tumors showing 1p19q whole loss were alive (mean follow-up 23 months), whereas, in the absence of this pattern, the median overall survival was 13 months, with a 60% mortality rate.

The molecular basis of the better prognosis associated with tumors showing 1p19q whole loss remains unclear. Several candidate genes located on the 1p and 19q chromosomes^{14,44–46} have been identified as potentially favoring or suppressing tumor progression. Efforts have been made to identify the breakpoint of unbalanced t(1;19) and the resulting gene alterations, affecting *NOTCH2*,¹⁷ for example, but no such breakpoint has yet been clearly identified.

In conclusion, we found that 1p19q status determination was useful for (1) discriminating between different histological types of gliomas and (2) identifying a subgroup of contrast-enhancing tumors with a better prognosis. Thus, 1p19q status is a good diagnostic and prognostic factor, provided that care is taken when selecting tumor tissues for analysis and the chromosome region analyzed is large enough.

Acknowledgements

This work was supported by the committee of the 'Ligue contre le Cancer du Limousin'. We thank the

'Tumorothèque du Limousin' and the pathologists for providing and controlling tumor tissues.

Disclosure/conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Dai C, Holland EC. Astrocyte differentiation states and glioma formation. *Cancer J* 2003;9:72–81.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007;114:97–109.
- Sanson M, Thillet J, Hoang-Xuan K. Molecular changes in gliomas. *Curr Opin Oncol* 2004;16:607–613.
- Arslantas A, Artan S, Oner U, et al. Genomic alterations in low-grade, anaplastic astrocytomas and glioblastomas. *Pathol Oncol Res* 2007;13:39–46.
- Kramar F, Zemanova Z, Michalova K, et al. Cytogenetic analyses in 81 patients with brain gliomas: correlation with clinical outcome and morphological data. *J Neurooncol* 2007;84:201–211.
- Griffin CA, Burger P, Morsberger L, et al. Identification of der(1;19)(q10;p10) in five oligodendrogliomas suggests mechanism of concurrent 1p and 19q loss. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006;65:988–994.
- Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, et al. A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res* 2006;66:9852–9861.
- Ichimura K, Vogazianou AP, Liu L, et al. 1p36 is a preferential target of chromosome 1 deletions in astrocytic tumours and homozygously deleted in a subset of glioblastomas. *Oncogene* 2008;27:2097–2108.
- Bourdon V, Plessis G, Chapon F, et al. Chromosome imbalances in oligodendroglial tumors detected by comparative genomic hybridization. *Ann Genet* 2004;47:105–111.
- Jeuken JW, von Deimling A, Wesseling P. Molecular pathogenesis of oligodendroglial tumors. *J Neurooncol* 2004;70:161–181.
- Kitange G, Misra A, Law M, et al. Chromosomal imbalances detected by array comparative genomic hybridization in human oligodendrogliomas and mixed oligoastrocytomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2005;42:68–77.
- Reddy KS. Assessment of 1p/19q deletions by fluorescence *in situ* hybridization in gliomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2008;184:77–86.
- Burger PC, Scheithauer BW. Tumors of the Central Nervous System. American Registry of Pathology: Washington, DC, 2007, pp 596.
- Barbashina V, Salazar P, Holland EC, et al. Allelic losses at 1p36 and 19q13 in gliomas: correlation with histologic classification, definition of a 150-kb minimal deleted region on 1p36, and evaluation of CAMTA1 as a candidate tumor suppressor gene. *Clin Cancer Res* 2005;11:1119–1128.
- Smith JS, Alderete B, Minn Y, et al. Localization of common deletion regions on 1p and 19q in human gliomas and their association with histological subtype. *Oncogene* 1999;18:4144–4152.
- Bello MJ, de Campos JM, Kusak ME, et al. Molecular analysis of genomic abnormalities in human gliomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1994;73:122–129.
- Boulay JL, Miserez AR, Zweifel C, et al. Loss of NOTCH2 positively predicts survival in subgroups of human glial brain tumors. *PLoS One* 2007;2:e576.
- Felsberg J, Erkwow A, Sabel MC, et al. Oligodendroglial tumors: refinement of candidate regions on chromosome arm 1p and correlation of 1p/19q status with survival. *Brain Pathol* 2004;14:121–130.
- Idbaih A, Marie Y, Lucchesi C, et al. BAC array CGH distinguishes mutually exclusive alterations that define clinicogenetic subtypes of gliomas. *Int J Cancer* 2008;122:1778–1786.
- Idbaih A, Marie Y, Pierron G, et al. Two types of chromosome 1p losses with opposite significance in gliomas. *Ann Neurol* 2005;58:483–487.
- Ransom DT, Ritland SR, Moertel CA, et al. Correlation of cytogenetic analysis and loss of heterozygosity studies in human diffuse astrocytomas and mixed oligo-astrocytomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1992;5:357–374.
- Smith JS, Tachibana I, Lee HK, et al. Mapping of the chromosome 19 q-arm glioma tumor suppressor gene using fluorescence *in situ* hybridization and novel microsatellite markers. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;29:16–25.
- Kros JM, van der Weiden M, Zheng PP, et al. Intratumoral distribution of 1p loss in oligodendroglial tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007;66:1118–1123.
- Pinto LW, Araujo MB, Vettore AL, et al. Glioblastomas: correlation between oligodendroglial components, genetic abnormalities, and prognosis. *Virchows Arch* 2008;452:481–490.
- Guillaudeau A, Durand K, Pommepuy I, et al. Determination of EGFR status in gliomas: usefulness of immunohistochemistry and fluorescent *in situ* hybridization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2009;17:220–226.
- 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;10:7820–7826.
- Marks RA, Zhang S, Montironi R, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in prostatic adenocarcinoma after hormonal therapy: a fluorescence *in situ* hybridization and immunohistochemical analysis. *Prostate* 2008;68:919–923.
- Okuda K, Sasaki H, Kawano O, et al. Epidermal growth factor receptor gene mutation, amplification and protein expression in malignant pleural mesothelioma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008.
- Burger PC, Minn AY, Smith JS, et al. Losses of chromosomal arms 1p and 19q in the diagnosis of oligodendroglioma. A study of paraffin-embedded sections. *Mod Pathol* 2001;14:842–853.
- Godfraind C, Rousseau E, Ruchoux MM, et al. Tumour necrosis and microvascular proliferation are associated with 9p deletion and CDKN2A alterations in 1p/19q-deleted oligodendrogliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2003;29:462–471.
- Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, et al. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1473–1479.

- 32 Johnson MD, Vnencak-Jones CL, Toms SA, *et al*. Allelic losses in oligodendroglial and oligodendroglioma-like neoplasms: analysis using microsatellite repeats and polymerase chain reaction. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:1573–1579.
- 33 Kraus JA, Koopmann J, Kaskel P, *et al*. Shared allelic losses on chromosomes 1p and 19q suggest a common origin of oligodendroglioma and oligoastrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995;54:91–95.
- 34 Aldape K, Burger PC, Perry A. Clinicopathologic aspects of 1p/19q loss and the diagnosis of oligodendroglioma. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:242–251.
- 35 Burger PC. What is an oligodendroglioma? *Brain Pathol* 2002;12:257–259.
- 36 Dumas-Duport C, Varlet P, Tucker ML, *et al*. Oligodendrogliomas. Part I: patterns of growth, histological diagnosis, clinical and imaging correlations: a study of 153 cases. *J Neurooncol* 1997;34:37–59.
- 37 McCarthy BJ, Propp JM, Davis FG, *et al*. Time trends in oligodendroglial and astrocytic tumor incidence. *Neuroepidemiology* 2008;30:34–44.
- 38 Maintz D, Fiedler K, Koopmann J, *et al*. Molecular genetic evidence for subtypes of oligoastrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997;56:1098–1104.
- 39 Eoli M, Bissola L, Bruzzone MG, *et al*. Reclassification of oligoastrocytomas by loss of heterozygosity studies. *Int J Cancer* 2006;119:84–90.
- 40 Yip S, Iafrate AJ, Louis DN. Molecular diagnostic testing in malignant gliomas: a practical update on predictive markers. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008;67:1–15.
- 41 Mokhtari K, Paris S, Aguirre-Cruz L, *et al*. Olig2 expression, GFAP, p53 and 1p loss analysis contribute to glioma subclassification. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2005;31:62–69.
- 42 Figarella-Branger D, Colin C, Coulibaly B, *et al*. [Histological and molecular classification of gliomas]. *Rev Neurol (Paris)* 2008;164:505–515.
- 43 Kraus A, Neff F, Behn M, *et al*. Expression of alternatively spliced mdm2 transcripts correlates with stabilized wild-type p53 protein in human glioblastoma cells. *Int J Cancer* 1999;80:930–934.
- 44 Bagchi A, Mills AA. The quest for the 1p36 tumor suppressor. *Cancer Res* 2008;68:2551–2556.
- 45 Ermoian RP, Kaprelian T, Lamborn KR, *et al*. Signal transduction molecules in gliomas of all grades. *J Neurooncol* 2009;91:19–26.
- 46 Gregory SG, Barlow KF, McLay KE, *et al*. The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1. *Nature* 2006;441:315–321.

Article n°2 : Expression de l'alpha-internexine dans les gliomes : relation avec le type histologique, et le statut 1p, 19q, 10p, et 10q

Karine Durand, Angélique Guillaudeau, Isabelle Pommepuy, Alain Chaunavel, Emilie Gadeaud, Marion Porcheron, Jean-Jacques Moreau.

Journal of Clinical Pathology (2011), 64: 793-801

D'une manière analogue aux altérations des bras chromosomiques 1p et 19q, les gliomes sont l'objet d'altérations fréquentes d'une partie ou de la totalité du chromosome 10. Ces altérations sont associées à la progression tumorale dans les tumeurs astrocytaires et à un mauvais pronostic. Le gène de l'alpha-internexine (INA), localisé en 10q24.33 code pour un filament intermédiaire intervenant dans la neurogenèse. L'expression de la protéine INA a été reportée dans les gliomes et un taux d'expression élevé de cette protéine est associé avec la perte complète des bras chromosomiques 1p et 19q. Afin de clarifier la relation entre ces altérations génomiques et l'expression d'INA, et d'évaluer l'utilité de l'immunohistochimie d'INA dans la détermination du diagnostic histo-moléculaire des gliomes, nous avons étudié ces marqueurs histo-moléculaires dans une série de 40 gliomes, incluant des astrocytomes, des oligodendrogliomes, des oligoastrocytomes et des glioblastomes.

Méthodes

Pour chacun des 40 patients, l'étude des pertes chromosomiques 10p et 10q par LOH a consisté à analyser par PCR-analyse de fragment les régions microsatellites allant du centromère au télomère, pour chacun des bras chromosomiques 10p et 10q. Afin de comparer l'association des altérations 1p19q et 10p10q, la LOH des chromosomes 1p19q a également été étudiée. L'amplification du gène *EGFR* a été analysée à partir de tissus en paraffine, par technique d'hybridation fluorescente *in situ*. L'expression des protéines INA, Ki67, P53, Oligo2 a été quantifiée par immunohistochimie à l'aide d'anticorps spécifiques.

Résultats principaux

Dans notre série, cinq types différents de LOH 10p10q ont été observés: Absence de perte, perte télomérique, perte interstitielle (sans perte télomérique ni centromérique), perte focale et perte complète de tous les loci analysés entre le télomère et le centromère. Dans les tumeurs étudiées, la perte complète du bras chromosomique 10p est associée de manière significative à celle du bras chromosomique 10q ($p < 0,0001$). De plus la perte complète 1p19q est systématiquement exclusive des pertes 10p, 10q ou 10p10q ($p < 0,005$).

Nous avons montré que la prévalence des altérations chromosomiques varie en fonction du type histologique : 75% des glioblastomes, 20% des astrocytomes et 36% des oligo-astrocytomes présentent une perte complète 10p10q alors qu'elle n'est retrouvée pour aucun oligodendrogliome ($p=0,002$). A l'inverse et comme nous l'avions montré dans une étude précédente, la perte complète 1p19q est observée seulement dans les oligodendrogliomes mais jamais dans les autres types de tumeurs ($p<0,0001$).

L'expression d'INA diffère significativement en fonction du type histologique : alors que l'INA est surexprimée dans 73% des oligodendrogliomes, elle est absente ou faible dans les astrocytomes et les glioblastomes et dans 91% des oligo-astrocytomes ($p=0,0005$). La surexpression d'INA est inversement corrélée à la perte complète 10p10q mais associée, dans 89% des cas, à la perte complète 1p19q ($p<0,0001$). Il existe cependant une discordance entre le taux d'INA et le statut 1p19q dans 10% des cas.

Conclusion

L'analyse de l'expression d'INA par immunohistochimie peut se révéler utile pour le diagnostic histopathologique des tumeurs : alors que les oligodendrogliomes font l'objet d'une perte complète 1p19q et d'une surexpression d'INA, les astrocytomes et les glioblastomes sont caractérisés par une perte complète 10p10q, une rétention 1p19q, une amplification d'*EGFR* et une faible, voire une absence d'expression d'INA. La plupart des oligo-astrocytomes, bien qu'hétérogènes, possèdent les caractéristiques des tumeurs astrocytaires. Nos résultats montrent que l'immunohistochimie d'INA peut être utile au diagnostic en cas d'impossibilité de détermination du statut 1p19q, par exemple en absence de prélèvement sanguin. Si les deux techniques sont possibles, la recherche d'altération 1p19q doit cependant être préférée puisqu'il existe une discordance entre les deux marqueurs histomoléculaires dans 10% des cas.

Alpha-internexin expression in gliomas: relationship with histological type and 1p, 19q, 10p and 10q status

Karine Durand,¹ Angélique Guillaudeau,¹ Isabelle Pommepuy,¹ Laura Mesturoux,¹ Alain Chaunavel,¹ Emilie Gadeaud,¹ Marion Porcheron,¹ Jean-Jacques Moreau,² François Labrousse¹

¹Department of Pathology, Dupuytren University Hospital, Limoges, France
²Department of Neurosurgery, Dupuytren University Hospital, Limoges, France

Correspondence to
Dr François Labrousse, Department of Pathology, Dupuytren University Hospital, 2 Avenue Martin Luther King, 87042 Limoges, France; labrousse@unilim.fr

Accepted 9 May 2011
Published Online First
8 June 2011

ABSTRACT

Background The *alpha-internexin* (*INA*) gene encodes an intermediate filament involved in neurogenesis and maps in 10q24.33. A strong INA protein expression has been reported in oligodendroglial tumours and was associated with 1p19q deletion. To assess the relevance of INA immunohistochemistry in glioma typing, this paper studied the relationship between INA expression, histological type, genomic status and patient outcome. **Methods** The study analysed INA, nestin, Olig2 and p53 expression, loss of heterozygosity of microsatellite markers from telomere to centromere of 10p, 10q, 1p and 19q chromosomes and *epidermal growth factor receptor* gene (*EGFR*) amplification in 40 gliomas (five astrocytomas, 12 oligodendrogliomas, 11 oligoastrocytomas, 12 glioblastomas). INA expression was scored as absent, weak (<10% of labelled tumour cells) or strong (>10%).

Results Oligodendrogliomas showed strong INA and Olig2 expression, and 1p19q whole loss of heterozygosity (wLOH). Astrocytomas and glioblastomas were characterised by no or weak INA expression, high p53 and nestin expression, 10p10q wLOH, and *epidermal growth factor receptor* amplification. Most oligoastrocytomas had characteristics of astrocytic tumours. All tumours with strong INA expression retained the 10q chromosome arm and, except for one, had a 1p19q wLOH status. However, despite a strong link between INA expression, 1p19q wLOH and 10q retention, discrepancies were observed in 10% of cases. The presence of INA expression, whether weak or strong, was related to a better prognosis.

Conclusion INA expression study can be helpful for glioma typing and prognosis determination in combination with other markers. Nevertheless, INA immunohistochemistry cannot replace the genomic analysis to determine 1p19q and 10p10q status.

Molecular markers are helpful for infiltrative glioma classification.^{1–3} The combined whole loss of the 1p and 19q chromosomal arms, consisting of a whole 1p19q deletion corresponding to an unbalanced translocation $t(1;19)(q10;p10)$ ^{4–5} is a genomic alteration characteristically found in oligodendroglioma,⁶ and is associated with a good prognosis.^{7–9} The deletions of the 10p and 10q chromosome arms are most often reported in astrocytomas and glioblastomas, and are associated with a poor prognosis.^{2–9} However, the frequency and the type of 10p10q genomic alterations differ

according to the histological subtype,¹⁰ and are associated with tumour progression in astrocytomas.^{11–12} Low-grade astrocytomas present no or few chromosome 10 alterations, whereas 10q or 10p loss of heterozygosity (LOH) has been reported in 35–60% of anaplastic astrocytomas.^{11–13} Furthermore, entire chromosome 10 loss is observed in 60–80% of glioblastomas.^{2–12, 14–16} Some studies have reported that the 1p19q loss and the 10q or 10p10q loss tend to be mutually exclusive.^{11–17–20} Loss of 10q seems to cancel out the good prognosis for tumours with 1p19q loss.¹²

Alpha-internexin (INA), whose gene maps in 10q24.33, is a class IV intermediate filament involved in neurofilament synthesis and in morphogenesis of neurons.²¹ INA physiologically interacts with other intermediate filaments, such as nestin, and its expression has been demonstrated in tumours of neuronal origin, including neuroblastomas and medulloblastomas.^{22–23} Although it is unknown whether INA plays a role in glioma oncogenesis, its expression is stronger in oligodendrogliomas than in other gliomas.^{24–25} Tumours with a 1p19q deletion have a proneural gene expression profile²⁶ and INA is one of the most overexpressed neuronal genes in these tumours.²⁷ Indeed, a recent study showed that INA expression as assessed by immunohistochemistry could be a reliable prognostic marker and a surrogate marker for the 1p19q codeletion.²⁸

To assess the relevance of INA immunohistochemistry in glioma typing, we analysed INA expression in a series of 40 gliomas. We studied its association with LOH patterns on 1p, 19q, 10p and 10q chromosomes studied by PCR with microsatellite markers covering a region extending from the telomere to the centromere of the chromosome arms. The relation between INA expression and the status of other markers used for glioma characterisation, such as the expression of p53, Olig2 and nestin, and amplification of the *epidermal growth factor receptor* gene (*EGFR*) was also examined. In addition, patient outcome was analysed according to INA expression levels and genomic patterns.

MATERIALS AND METHODS

Patients and tumour samples

We retrospectively studied 40 adult patients diagnosed with infiltrative glioma and undergoing surgery at Limoges Dupuytren University Hospital from February 2006 to May 2010. Cases were

randomly selected to constitute homogeneous sizing groups of the different histological tumour types. All samples were used in accordance with French bioethics laws regarding patient information and consent.

Tumour samples were collected at the time of resection, fixed in 4% formalin and embedded in paraffin. Sections were cut and stained with haemalum phloxine saffran. The histological type and the grade of the tumours were determined, according to the WHO classification,² by three different pathologists.

Tissue controls

Genomic DNA was extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. In each case, control sections were also used to check that a representative tumour component had been selected for molecular analysis: for example, the clear cell component for oligodendrogliomas. Tumour cell density (TCD) was determined by a semiquantitative method, with scoring as follows: TCD+ if less than 20% of cells were tumour cells, TCD++ if between 20% and 70% of the cells were tumour cells or TCD+++ if 70% or more of the cells were tumour cells. Only samples purely consisting of tumour tissue or with a TCD scored as ++ or +++ on control slides were used for analysis.

Extraction of genomic DNA

For each patient, genomic DNA was extracted from tumour tissue and from whole blood with the QiaAmp DNA mini or micro kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), depending on the amount of tissue, used according to the manufacturer's instructions. Samples were treated with RNase to prevent RNA contamination of samples and the purified genomic DNA was eluted in distilled water, quantified by spectrophotometry and stored at -20°C until use.

LOH analysis

Aliquots of 25 ng of tumour or non-tumour genomic DNA were used for LOH analysis. We studied 19, eight, nine and 15 microsatellite markers located between the telomere and the centromere of the 1p, 19q, 10p and 10q chromosomal arms, respectively (figure 1).

Briefly, genomic DNA was used as the template for PCR amplification in the presence of 0.5 µM forward and reverse primers, 3 mM MgCl₂, 0.2 µM dNTP, 1.25 U HotStart DNA polymerase (SurePrime DNA polymerase; MP Biomedicals, Illkirch, France), 1–5% bovine serum albumin/glycerol mix, depending of the marker studied, and 1×DNA polymerase buffer, in a final volume of 20 µl. The amplification conditions were as specified by the manufacturer of the DNA polymerase.

PCR products were separated by capillary electrophoresis in a 3130XL (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) genetic analyser and analysed with GeneScan software (Applied Biosystems). In DNA samples displaying heterozygosity for any particular marker, LOH was assessed by measuring the peak height for each of the alleles produced from both the tumour and the corresponding normal DNA. The formula $(T1/T2)/(N1/N2)$ was applied, in which T1 and N1 are the peak heights generated for the smaller allele from tumour and normal tissue, respectively, and T2 and N2 are the peak heights generated for the PCR products from the larger allele in tumour and normal tissue, respectively. Heterozygosity was considered to be maintained if $0.6 < \text{ratio} < 1.9$ and to have been lost if $\text{ratio} < 0.4$ or > 2.1 . Ambiguous loss or retention was considered for $0.4 \leq \text{ratio} \leq 0.6$ or $1.9 \leq \text{ratio} \leq 2.1$. A patient was considered to be homozygous for a marker if only one allele was observed in both normal and tumour tissue.

EGFR gene amplification

EGFR gene amplification was investigated in 38 cases (in two cases there was not enough remaining tumour tissue in paraffin blocks) on consecutive paraffin sections from the same blocks used in LOH and immunohistochemical analyses, by double fluorescent in situ hybridisation with the 'LSI EGFR SpectrumOrange/CEP 7 SpectrumGreen Probe' kit (Abbott Molecular Inc, Illinois, USA). This technique was a modification of the method previously described:²⁹ briefly, 4 µm paraffin sections were incubated for 16 h at 56°C, submitted to deparaffinising, digested with pepsin (Abbott Molecular Inc) at 37°C for 45 min and dehydrated in successive ethanol baths. Slides were incubated with 10 µl of each probe for 5 min at 73°C to denature DNA and 16 h at 37°C to ensure hybridisation. Sections were washed in 2× SSC/0.3% NP40 solution, once for 1 min at room temperature, once for 2 min at 73°C, and dehydrated in successive ethanol baths. Counterstaining and microscopic observation of EGFR amplification were performed as previously described.²⁹

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed with 5-µm-thick sections of paraffin-embedded tissue. The following primary antibodies were tested: alpha-internexin (INA, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France; 1/2000^o), nestin (Chemicon International, Molsheim, France; 1/10000^o), glial fibrillar acidic protein (GFAP; DakoCytomation, Glostrup, Denmark; 1/1600^o), p53 (DakoCytomation; 1/50^o), Ki67 (clone MIB-1; DakoCytomation; 1/200^o) and Olig2 (Immuno-Biological Laboratories, Gunma, Japan; 1/200^o). Sample slides were processed automatically (BenchMark XT ICH/ISH, Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA) according to the manufacturer's protocols. Endogenous biotin was blocked. The percentages of cells labelled with the antibodies against INA, nestin, p53, Olig2 and Ki67 were determined by studying at least 500 cells for each antibody in tumour areas of highest positivity.

INA expression was scored as absent, weak (<10% of tumour cells labelled) or strong (>10% of tumour cells labelled).²⁸ In three cases, immunohistochemical study of INA expression could not be achieved due to the small amount of remaining tumour tissue in paraffin blocks. In accordance with the literature³⁰ and classic immunohistochemical methods, the expression of p53 was scored as weak ($\leq 10\%$ of cells positive) or strong (>10% of cells positive). Other markers were analysed by comparing means \pm SD.

Statistical analyses

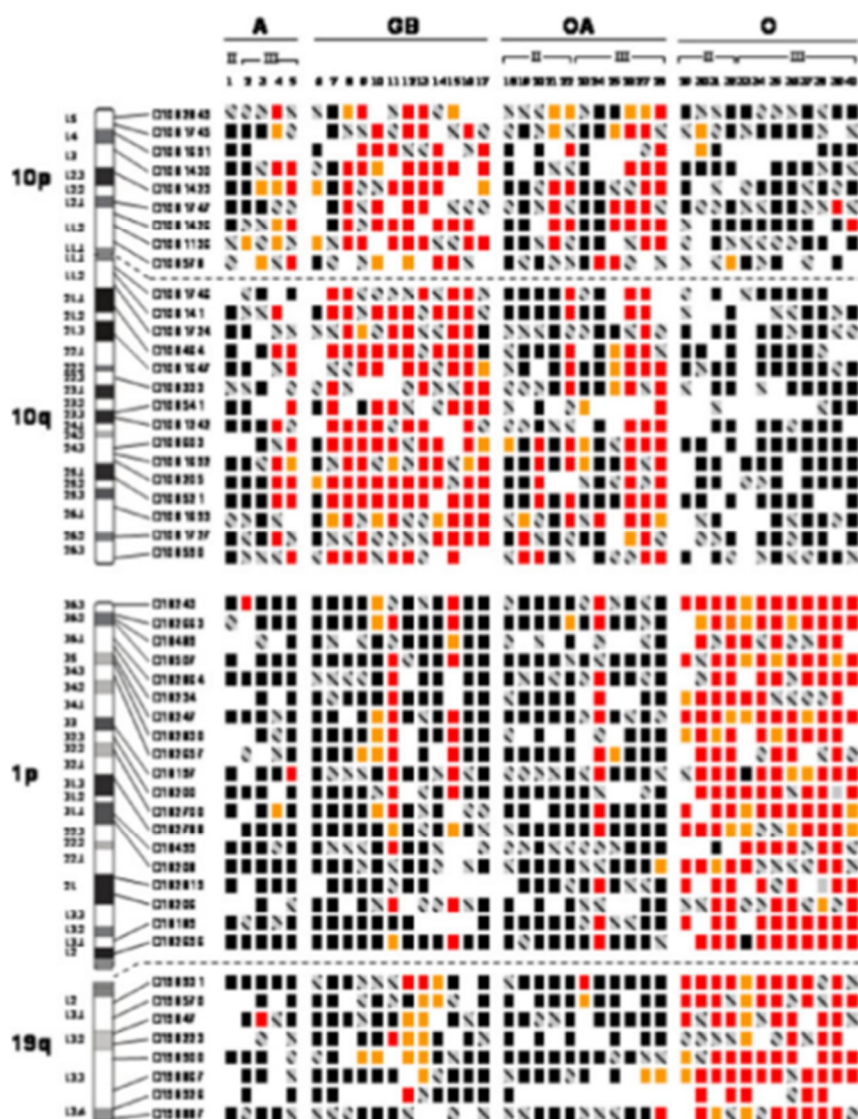
StatView 5.0 software was used for statistical analyses. Fisher's exact test was used to assess differences between nominal variables. Means were compared with the non-parametric Mann-Whitney test for pairs of variables and with the Kruskal-Wallis tests for comparisons of more than two variables; $p < 0.05$ was considered to be statistically significant. Overall survival (OS) was analysed by Kaplan-Meier and the log rank test was used to compare subgroups relative to OS.

RESULTS

Patient characteristics

Relevant features of the patients are summarised in table 1. There were 20 women and 20 men, aged from 31 to 74 years (median age at surgery 56.5 years). The series included 31 primary and nine recurrent tumours. There were five astrocytomas, 12 glioblastomas, 11 oligoastrocytomas and 12 oligodendrogliomas. Median follow-up was 13 months and the end of

Figure 1 Genomic patterns of 10p, 10q, 1p and 19q chromosome arms. Loss of heterozygosity was analysed for nine, 15, 19 and eight microsatellite markers from telomere to centromere of 10p, 10q, 1p and 19q chromosomes, respectively. Significant loss (ratio <0.4 or >2.1 , red squares), significant retention ($0.6 < \text{ratio} < 1.9$, black squares), ambiguous loss or retention ($0.4 \leq \text{ratio} \leq 0.6$ or $1.9 \leq \text{ratio} \leq 2.1$, orange squares) or homozygosity (hatched squares) are indicated for each marker. Markers that flank the INA gene in 10q24.33 are indicated by a grey box. A, astrocytoma; GB, glioblastoma; O, oligodendroglioma; OA, oligoastrocytoma.



the study was December 2010. Of the 40 patients, 31 received radiotherapy, 31 chemotherapy and 27 a combination of chemotherapy and radiotherapy; five patients had no treatment.

Genomic patterns for the 1p, 19q, 10p and 19q chromosome arms

Microsatellite analyses of the 1p, 19q, 10p and 10q chromosomal arms showed different genomic patterns (figure 1): whole chromosomal arm retention (noLOH) or loss (wLOH), and telomeric, interstitial or scattered losses, limited to one or a few markers.

The 10p wLOH and 10q wLOH patterns were significantly associated ($p < 0.0001$). Of the 18 tumours with 10p wLOH, 15 also displayed 10q wLOH, two an interstitial loss and only one case had 10q noLOH. Only one tumour had a 10q wLOH without 10p LOH. The 1p wLOH was significantly associated with 19q wLOH in 12/15 cases, and the three remaining

tumours showed only 1p wLOH ($p < 0.0001$). 1p19q wLOH was in no case associated with 10p wLOH ($p = 0.0007$), 10q wLOH ($p = 0.0025$), or 10q10q wLOH ($p = 0.004$).

Relation between genomic alterations and histological types

The frequency of the 10p10q wLOH pattern differed between tumours of different histological type (table 2). 10p10q wLOH was present in 75% (nine/12 cases) of the glioblastomas, 20% (one/five cases) of the astrocytomas and 36% (four/11) of the oligoastrocytomas but none of the oligodendrogliomas ($p = 0.002$, table 2). With regard to histological types, the distributions of whole deletion of either 10p or 10q were similar to 10p10q codeletion ($p = 0.0006$ for each one of them).

Conversely, a 1p19q whole loss was present in all the oligodendrogliomas but not in any of the other tumours ($p < 0.0001$). Two glioblastomas and one oligoastrocytoma had an isolated 1p whole loss, without 19q wLOH.

Table 1 Demographic, pathological and clinical features

Sample	Histological type and grade*	Sex	Age (years)	Status	Location	Radiotherapy	Chemotherapy
1	A II	M	51	Primary	Frontal	No	No
2	A III	F	74	Primary	Frontal	Yes	No
3	A III	F	58	Primary	Frontal	Yes	Yes
4	A III	M	72	Primary	Temporal	Yes	Yes
5	A III	F	64	Primary	Parietal	Yes	Yes
6	GB	M	64	Primary	Parietal occipital corpus callosum	No	No
7	GB	F	50	Primary	Temporal parietal	Yes	Yes
8	GB	F	55	Primary	Frontal corpus callosum	Yes	Yes
9	GB	M	35	Primary	Frontal temporal	Yes	Yes
10	GB	M	43	Primary	Parietal temporal	Yes	Yes
11	GB	F	62	Recurrent	Parietal occipital	Yes	Yes
12	GB	F	59	Primary	Frontal	Yes	Yes
13	GB	F	50	Primary	Temporal parietal	Yes	Yes
14	GB	F	59	Primary	Frontal corpus callosum	Yes	Yes
15	GB	F	72	Primary	Frontal	Yes	Yes
16	GB	F	62	Primary	Corpus callosum	Yes	Yes
17	GB	F	69	Primary	Frontal	Yes	Yes
18	OA II	M	48	Primary	Temporal insular	No	No
19	OA II	F	35	Recurrent	Frontal	No	No
20	OA II	F	58	Primary	Diencephalic	Yes	No
21	OA II	M	51	Recurrent	Temporal	No	No
22	OA II	M	58	Primary	Parietal occipital	No	Yes
23	OA III	F	42	Primary	Temporal	Yes	Yes
24	OA III	F	57	Recurrent	Parietal occipital	Yes	Yes
25	OA III	M	35	Recurrent	Parietal	Yes	No
26	OA III	M	72	Primary	Parietal	Yes	Yes
27	OA III	F	56	Primary	Frontal parietal	Yes	Yes
28	OA III	M	68	Primary	Temporal	No	Yes
29	O II	M	52	Primary	Frontal parietal	Yes	Yes
30	O II	M	58	Recurrent	Insular	Yes	Yes
31	O II	M	33	Primary	Frontal	Yes	No
32	O II	M	50	Primary	Frontal parietal	No	Yes
33	O III	F	57	Primary	Frontal temporal	Yes	Yes
34	O III	M	61	Recurrent	Frontal corpus callosum	Yes	Yes
35	O III	M	70	Primary	Frontal corpus callosum	No	Yes
36	O III	M	53	Primary	Frontal	Yes	Yes
37	O III	F	43	Primary	Parietal	Yes	Yes
38	O III	M	32	Recurrent	Frontal	Yes	No
39	O III	M	31	Primary	Parietal	Yes	Yes
40	O III	F	44	Recurrent	Frontal corpus callosum	Yes	Yes

*WHO grades II, III, IV.

A, astrocytoma; F, female; GB, glioblastoma; M, male; O, oligodendroglioma; OA, oligoastrocytoma.

There was no significant difference between 10p, 10q or 10p10q wLOH status and the other parameters, including patient sex, age or tumour status.

Relationship between INA expression, histological type and genomic alterations

INA expression appeared as a cytoplasmic and perinuclear labelling in tumour cells. Residual neurons and neuronal processes also showed immunopositivity but could be morphologically distinguished from tumour cells (figure 2). In the same tumour, protein expression was heterogeneous with negative areas adjacent to positive zones.

Different patterns of INA expression were analysed: absent versus weak/strong; no/weak versus strong; no, weak and strong. Results are given in table 3. There was no correlation between INA expression and the age or sex of the patient, or tumour status. INA expression differed significantly according to histological type: all astrocytomas and glioblastomas and 91% of oligoastrocytomas showed no or weak INA expression, whereas

73% of oligodendrogliomas strongly expressed INA ($p=0.0005$). Eighty-nine per cent (eight/nine cases) of the tumours with strong INA expression had a whole 1p19q deletion ($p<0.0001$). However, in three of the 11 (27.3%) oligodendrogliomas, all with 1p19q codeletions, less than 10% of tumour cells were INA positive (cases 30, 31 and 39). These three tumours did not differ from other oligodendrogliomas according to other biological parameters studied, ie, p53, Olig2, Nestin or Ki67 expression (results not shown). In addition, one oligoastrocytoma displaying a strong INA expression had no 1p19q LOH (case 21) (figure 2D).

The INA expression level was inversely related to 10p10q wLOH ($p=0.008$). In particular, none of the tumours with a 10q wLOH, the chromosomal arm which maps the INA gene, overexpressed INA ($p=0.003$, results not shown).

Nestin, p53, Olig2 and Ki67 expression

Nestin, Olig2 and Ki67 protein expression did not differ according to patient sex, age, or tumour status (table 4).

Table 2 10p and 10q wLOH according demographic and histopathological features

Features	No of patients	10pwLOH		10qwLOH		10p10qwLOH	
		n	p Value	n	p Value	n	p Value
All patients	40	18		16		15	
Sex							
Female	20	10	0.75	10	0.33	9	0.51
Male	20	8		6		6	
Age (years)							
≤56.5	20	7	0.34	5	0.11	4	0.05
>56.5	20	11		11		11	
Tumour status							
Primary	31	15	0.68	15	0.10	14	0.14
Recurrent	9	3		1		1	
Histological type							
A	5	2	0.0006	2	0.0006	1	0.002
GB	12	10		10		9	
OA	11	6		4		4	
O	12	0		0		0	

A, astrocytoma; GB, glioblastoma; O, oligodendroglioma; OA, oligoastrocytoma; wLOH, whole loss of heterozygosity.

However, p53 levels differed according to tumour status ($p=0.002$). The abundance of each protein significantly differed according to the histological tumour type. Oligodendrogliomas underexpressed p53 ($p=0.01$) and nestin ($p=0.0003$) compared with astrocytomas, glioblastomas or oligoastrocytomas. Oligodendrogliomas and oligoastrocytomas overexpressed Olig2 ($p=0.009$), but had a lower Ki67 labelling index ($p=0.007$) compared with astrocytomas and glioblastomas.

Ki67 and nestin were more strongly expressed in tumours with 10p10q wLOH ($p=0.007$ and $p=0.001$, respectively), than in tumours with other 10p10q LOH patterns. In contrast, tumours

with retention of heterozygosity for 1p19q underexpressed Olig2 ($p=0.004$), but overexpressed p53 ($p=0.003$) and nestin ($p<0.0001$) compared with tumours with 1p19q wLOH.

In our series, there was no significant association between Ki67 and INA expression or between Olig2 and INA expression. In contrast, INA expression was inversely associated with that of p53 ($p=0.03$) and nestin ($p=0.03$) (results not shown).

EGFR amplification

Among the 38 tumours analysed, six presented an amplification of the *EGFR* gene (table 5). The amplification of *EGFR* did not depend on patient sex, age, tumour status, or histological type. *EGFR* was not amplified in any tumour with 1p19q whole deletion ($p=0.0001$). *EGFR* amplification was closely associated with 10p10q LOH status: 83% (five/six cases) of tumours with *EGFR* amplification also had a 10p10q wLOH ($p=0.03$). INA expression was not significantly associated with *EGFR* amplification ($p=0.3$).

Influence of molecular markers on patient OS

At the time of analysis, 10 of the 40 patients had died. OS did not depend significantly on patient sex, age or treatment. OS tended to be better for patients who had an oligodendroglioma than for those who had a glioblastoma, whereas OS tended to be intermediate in patients harbouring an oligoastrocytoma or an astrocytoma ($p=0.08$, results not shown). OS probability was significantly higher for patients having a tumour with a 1p19qwLOH and no loss on chromosome 10 (figure 3A–C). In tumours with 1p19q retention, 10qwLOH was more closely related to a worse prognosis ($p=0.05$, figure 3A) than 10pwLOH and 10p10qwLOH ($p=0.2$, figure 3B and $p=0.1$, figure 3C, respectively).

Regarding INA expression, it was the presence or the absence of an expression rather than the expression levels that was the determinant for OS evaluation: tumours with INA expression,

Figure 2 INA immunohistochemistry. (A) Strong INA expression in an oligodendroglioma (case 35); original magnification $\times 400$. (B) Oligodendroglioma (case 36): pattern of tumour cell labelling in dense tumour tissue; original magnification $\times 400$. (C) Infiltrative cortical component in the same case (36): labelling of scattered tumour cells surrounding residual neurons; original magnification $\times 400$. (D) INA expression in an oligoastrocytoma without 1p19q loss and with 10q retention (case 21); original magnification $\times 400$.

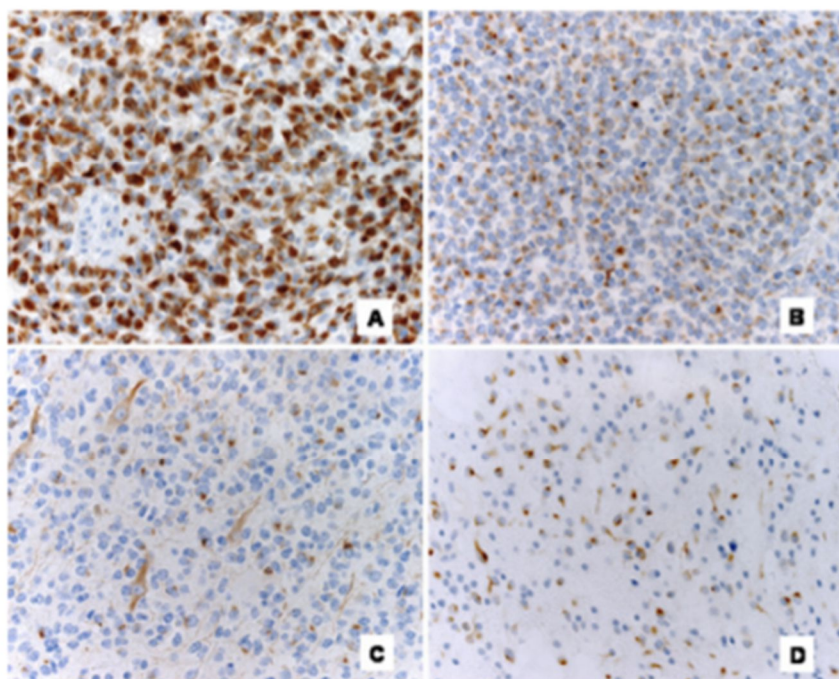


Table 3 INA expression according to demographic, histological and genomic features

Features	INA expression levels			Absent/weak	Strong	p Value	Absent	Weak	Strong	p Value
	Absent	Weak/strong	p Value							
All patients	14	23		28	9		14	14	9	
Sex										
Female	8	10	0.42	15	3	0.29	8	7	3	0.53
Male	6	13		13	6		6	7	6	
Age (years)										
≤56.5	5	14	0.14	13	6	0.29	5	8	6	0.30
>56.5	9	9		15	3		9	6	3	
Tumour status										
Primary	12	16	0.27	23	5	0.11	12	11	5	0.26
Recurrent	2	7		5	4		2	3	4	
Histological type										
A	1	3	0.01	4	0	0.0002	1	3	0	0.0005
GB	7	4		11	0		7	4	0	
OA	6	5		10	1		6	4	1	
O	0	11		3	8		0	3	8	
10p10q wLOH										
No	5	18	0.02	14	9	0.02	5	9	9	0.008
Yes	9	5		14	0		9	5	0	
1p19q wLOH										
No	14	12	0.006	25	1	<0.0001	14	11	1	<0.0001
Yes	0	11		3	8		0	3	8	

A, astrocytoma; GB, glioblastoma; O, oligodendroglioma; OA, oligoastrocytoma; wLOH, whole loss of heterozygosity.

whether weak or strong, had better OS probability than those without ($p=0.05$, figure 3D compared with figure 3E,F). However, when the analysis focused only on tumours without 1p19qwLOH, there was no significant relation between OS and the presence or the absence of INA expression ($p=0.13$, data not shown).

DISCUSSION

In the present work, we analysed INA expression, association with the genomic LOH pattern of 1p, 19q, 10p and 10q chromosomes and the relation with histological glioma types and

patient outcome. We found that INA expression was dependent on histological type, with astrocytic and mixed tumours expressing little or no INA compared with oligodendrogliomas. This is consistent with other studies that report a significantly higher expression of INA in oligodendrogliomas than in glioblastomas and, in particular, in gliomas with 1p19q loss than in those with 1p19q retention.^{24 25 28 31 32} In our series, 1p19q wLOH was found in all typical oligodendrogliomas but never in other histological types, as we reported in a previous study⁶ and strong INA expression was directly related to 1p19q wLOH

Table 4 P53, Olig2, Ki67 and Nestin expression according to demographic, histological and genomic features

Features	P53		p Value	Olig2		p Value	Ki67		p	Nestin	
	Weak	Strong		Mean (%) ± SD	p Value		Mean (%) ± SD	p		Mean (%) ± SD	p Value
All patients	12	28		51.2 ± 30		18.9 ± 13.5		38.7 ± 39			
Sex											
Female	5	15	0.52	44.6 ± 28.8	0.13	19.7 ± 12.1	0.5	60.4 ± 40	0.005		
Male	7	13		58.2 ± 30.4		18.1 ± 15		18.2 ± 24.7			
Age (years)											
≤56.5	6	14	>0.9	55.8 ± 28.8	0.28	16 ± 12.5	0.21	35.4 ± 40.7	0.56		
>56.5	6	14		46.3 ± 31.2		21.7 ± 14.2		41.8 ± 38.2			
Tumour status											
Primary	6	25	0.02	49.7 ± 30.9	0.65	20.2 ± 14.1	0.33	46.6 ± 41.1	0.56		
Recurrent	6	3		56.9 ± 27.4		14.1 ± 13.3		14.1 ± 15.6			
Histological type											
A	1	4	0.01	29 ± 30.5	0.009	30.6 ± 8.1	0.007	68.6 ± 38.3	0.0003		
GB	1	11		34.3 ± 30.3		30.2 ± 10.5		67.7 ± 36.5			
OA	2	9		60.5 ± 15.2		14.1 ± 14.5		27.9 ± 28.5			
O	8	4		70.5 ± 26.7		14.1 ± 11		3.7 ± 3.5			
10p10qwLOH											
No	9	16	0.48	45.3 ± 29.8	0.28	26.1 ± 13	0.007	63.6 ± 36.3	0.001		
Yes	3	12		54.8 ± 30.2		14.5 ± 12.1		23.6 ± 32.8			
1p19qwLOH											
No	4	24	0.003	70.54 ± 26.7	0.004	14.1 ± 11	0.15	3.7 ± 3.5	<0.0001		
Yes	8	4		43.6 ± 28.1		20.9 ± 14.1		51.7 ± 38.1			

A, astrocytoma; GB, glioblastoma; O, oligodendroglioma; OA, oligoastrocytoma; wLOH, whole loss of heterozygosity.

Table 5 EGFR amplification according to demographic, histological and genomic features

Features	EGFR amplification		p Value
	Yes	No	
All patients	6	32	
Sex			
Female	5	15	0.23
Male	1	17	
Age (years)			
≤56.5	2	17	0.65
>56.5	4	15	
Tumour status			
Primary	6	23	0.34
Recurrent	0	9	
Histological type			
A	1	4	0.39
GB	3	9	
OA	2	8	
O	0	11	
10p/10q wLOH			
No	1	23	0.03
Yes	5	9	
1p19q wLOH			
No	6	21	0.0001
Yes	0	11	
INA expression			
Absent	3	10	0.30
Weak	3	11	
Strong	0	9	

A, astrocytoma; EGFR, epidermal growth factor receptor; GB, glioblastoma; O, oligodendroglioma; OA, oligoastrocytoma; wLOH, whole loss of heterozygosity.

status. Inversely, all the tumours with a 10q wLOH status expressed little or no INA, whereas tumours with 10q retention showed either no, low or strong INA expression. Different 10p and 10q LOH patterns were observed in our series but 50% and 75% of anaplastic astrocytomas and glioblastomas, respectively, presented whole and combined 10p/10q LOH; this is consistent with previous reports.^{2–12} The 1p19q wLOH was mutually exclusive with 10p wLOH, 10q wLOH or 10q/10q wLOH, suggestive of different oncogenic pathways for the histological types. There is disagreement between previous studies concerning the relation between 1p19q loss and 10q or 10p/10q loss.^{11–20, 33–34} The discrepancies between studies could result from the techniques^{19, 34–37} or from the criteria used for the histological definition of gliomas, which is still a matter of debate among neuropathologists.^{7, 38–40}

In our series, all the tumours with strong INA expression retained the 10q chromosomal arm. In contrast, the tumours with 10q retention did not constantly express INA, indicating that 10q retention was a necessary but not sufficient condition for INA expression. The strong link we observed between 1p19q molecular status and INA expression levels, as eight of the nine tumours with INA high expression also presented a 1p19q whole loss, was in agreement with the findings of Ducray and coworkers.²⁸ However, we found discrepancies in 10% of our 40 gliomas: three oligodendrogliomas with 1p19q wLOH weakly expressed INA, whereas one oligoastrocytoma, without 1p19q LOH, strongly expressed INA. In addition, INA labelling was heterogeneous in the same tumour, with positive areas adjacent to negative areas that may be a cause of false negativity on biopsy samples. In our opinion, INA can be integrated in the panel of antibodies used to type gliomas, in association with other routinely used markers. However, because of the discrepancies we observed with the immunohistochemical

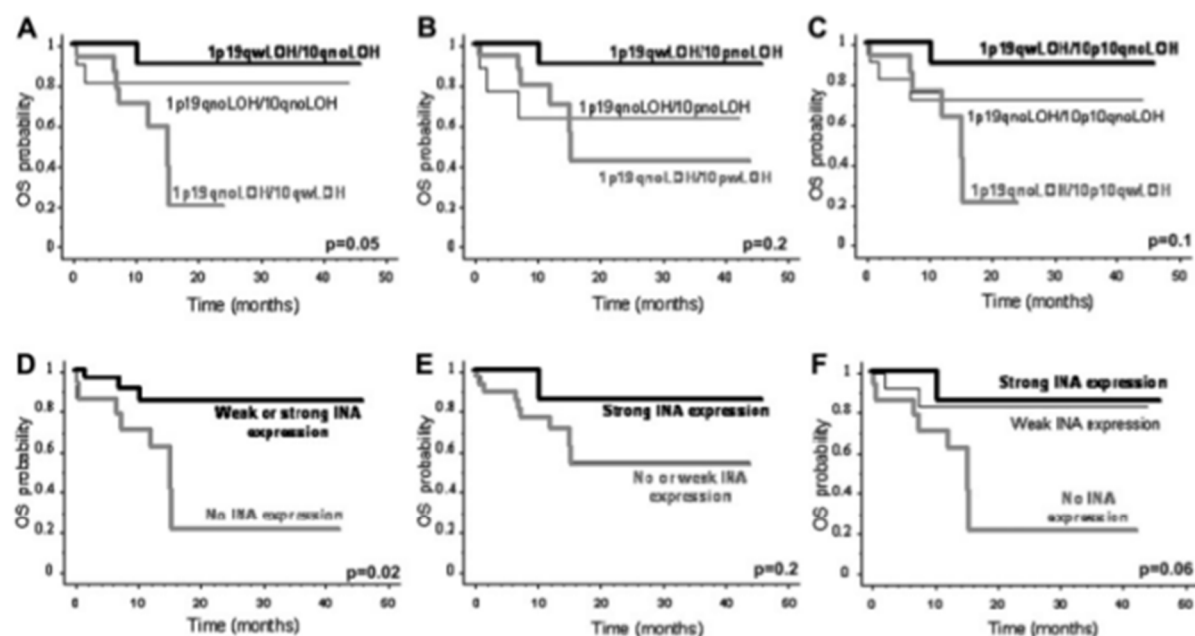


Figure 3 Overall survival (OS) of patients. Patient OS was examined according to genomic status (A–C), and INA expression levels (D–F). The log-rank test was used to compare patient outcome in subgroups: patients with 1p19q wLOH status versus those with 1p19q retention and 10q wLOH (A), 10p wLOH (B), or entire chromosome loss (C), and patients who presented no versus weak/strong INA expression (D), no or weak versus strong INA expression (E), and no versus weak and strong INA expression (F).

investigation, we think that the genomic analysis remains the gold standard method to determine the 1p19q and 10p10q status.

Although no function for INA in oncogenesis has been described, its expression profile in gliomas may suggest that the cell origin of oligodendrogliomas with 1p19q loss is progenitor to both neurons and oligodendrocytes.⁴¹ This hypothesis is confirmed by the absence of INA expression in astrocytomas, glioblastomas and, except for one case, in oligoastrocytomas. Other genes involved in neurogenesis are expressed in tumours with 1p19q wLOH.²⁶ Our results are consistent with this possibility as we found that INA expression was inversely associated with that of nestin, and to a lesser extent directly related to that of Olig2, implicated in oligodendroglial specification and also involved in neurogenesis.⁴² However, it remains unclear whether the 'neuronal genes' expression observed is partly due to the presence of entrapped neurons within the tumours,⁴³ or is genuinely specific to tumour cells in 1p19q codeleted tumours.²⁷

Immunohistochemistry revealed that the presence of standard protein markers used for pathological diagnosis, ie, Olig2, Ki67, nestin and p53, was directly related to histological type, but also to the 1p19q and 10p10q genomic pattern. Furthermore, EGFR amplification was significantly associated with 10p10q wLOH and mutually exclusive of 1p19q wLOH. Other authors have observed the same association,^{10,44,45} and monosomy of chromosome 10 has been shown to be associated with dysregulation of epidermal growth factor signalling in glioblastomas.⁴⁵

In accordance with the data from the literature,^{2,7-9} tumours with a 1p19q deletion had in our series a better prognosis, whereas in patients with 1p19q retention the presence of 10q deletion indicated a worse prognosis. Regarding INA immunohistochemistry, OS was better in patients with a weak or strong expression in their tumours, indicating that INA expression is a criterion of better prognosis. These findings are in agreement with previous studies.^{27,28} They are also consistent with the genomic data because 1p19q and 10q (and also 10p10q) deletions are mutually exclusive and INA expression is related to the presence of a 10q retention and a 1p19q deletion. However, in tumours without 1p19q wLOH the presence or the absence of INA expression did not significantly influence survival in our series. This would indicate that the prognostic value of INA could be due to the relation of its expression with molecular characteristics, ie, 10q retention and 1p19q loss.

In conclusion, INA expression was associated with oligodendroglial type, 1p19q wLOH, 10q chromosome retention and a better prognosis. INA expression study can thus be helpful for glioma typing and prognosis determination, in combination with other markers such as Olig2, Ki67, nestin or p53. Nevertheless, because of a discrepancy in 10% of cases, INA

immunohistochemistry cannot replace, in our opinion, genomic analysis to determine 1p19q and 10p10q status.

Acknowledgements The committee of the 'Ligue contre Le Cancer du Limousin' supported this work. The authors would like to thank the 'Tumorothèque du Limousin' for providing tumour tissues and M Benoit Marin (Unit of Clinical Research and Biostatistics, Dupuytren University Hospital) who kindly verified the statistical analysis.

Funding This study was funded by the Ligue contre Le Cancer du Limousin, Limoges 87000, France.

Competing interests None.

Patient consent Obtained.

Ethics approval All the samples were used in accordance with French bioethics laws regarding patient information and consent.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

- Dai C, Holland EC. Astrocyte differentiation states and glioma formation. *Cancer J* 2003;9:72–81.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007;114:97–109.
- Sanson M, Thillet J, Hoang-Xuan K. Molecular changes in gliomas. *Curr Opin Oncol* 2001;16:507–13.
- Griffin CA, Burger P, Morsberger L, et al. Identification of del(1;19)(q10;p10) in five oligodendrogliomas suggests mechanism of concurrent 1p and 19q loss. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006;65:988–94.
- Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, et al. A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res* 2006;66:9852–61.
- Durand KS, Gillaudeau A, Weirbeck N, et al. 1p19q LOH patterns and expression of p53 and Olig2 in gliomas: relation with histological types and prognosis. *Mod Pathol* 2010;23:619–28.
- Aldape K, Burger PC, Perry A. Clinicopathologic aspects of 1p/19q loss and the diagnosis of oligodendroglioma. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:242–51.
- Giannini C, Burger PC, Berkay BA, et al. Anaplastic oligodendroglial tumors: refining the correlation among histopathology, 1p 19q deletion and clinical outcome in Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *Brain Pathol* 2008;18:360–9.
- Eoli M, Bissola L, Bruzzone MG, et al. Reclassification of oligoastrocytomas by loss of heterozygosity studies. *Int J Cancer* 2006;119:84–90.
- Yakut T, Gutentag A, Bekar A, et al. Correlation of chromosomal imbalances by comparative genomic hybridization and expression of EGFR, PTEN, p53, and MIB-1 in diffuse gliomas. *Oncol Rep* 2007;17:1037–43.
- Arslantas A, Artan S, Oner U, et al. Genomic alterations in low-grade, anaplastic astrocytomas and glioblastomas. *Pathol Oncol Res* 2007;13:39–46.
- Hata N, Yoshimoto K, Yokoyama N, et al. Allelic losses of chromosome 10 in glioma tissues detected by quantitative single-strand conformation polymorphism analysis. *Clin Chem* 2006;52:370–8.
- Ichimura K, Schmidt EE, Miyakawa A, et al. Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;22:9–15.
- Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, et al. Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab Invest* 2000;80:65–72.
- Maier D, Compagno D, Taylor E, et al. New deletion in low-grade oligodendroglioma at the glioblastoma suppressor locus on chromosome 10q25-26. *Oncogene* 1997;15:997–1000.
- Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 2004;64:6892–9.
- Hoang-Xuan K, He J, Huguet S, et al. Molecular heterogeneity of oligodendrogliomas suggests alternative pathways in tumor progression. *Neurology* 2001;57:1278–81.
- Hoang-Xuan K, Idbah A, Mokhtari K, et al. [Towards a molecular classification of gliomas]. *Bull Cancer* 2005;92:310–16.
- Lavon I, Zrihan D, Zelikovitch B, et al. Longitudinal assessment of genetic and epigenetic markers in oligodendrogliomas. *Clin Cancer Res* 2007;13:1429–37.
- Ueki K, Nishikawa R, Nakazato Y, et al. Correlation of histology and molecular genetic analysis of 1p, 19q, 10q, TP53, EGFR, CDK4, and CDKN2A in 91 astrocytic and oligodendroglial tumors. *Clin Cancer Res* 2002;8:196–201.
- Chan SO, Chiu FC. Cloning and developmental expression of human 66 kd neurofilament protein. *Brain Res Mol Brain Res* 1995;29:177–84.
- Foley J, Witte D, Chiu FC, et al. Expression of the neural intermediate filament proteins peripherin and neurofilament-66/alpha-internexin in neuroblastoma. *Lab Invest* 1994;71:193–9.
- Kaya B, Mena H, Miettinen M, et al. Alpha-internexin expression in medulloblastomas and atypical teratoid-rhabdoid tumors. *Clin Neuropathol* 2003;22:215–21.

Take-home messages

- ▶ INA expression is associated with oligodendroglial type, 1p19q whole loss, 10q retention and a better prognosis.
- ▶ Because of a discrepancy in 10% of cases, INA immunohistochemistry cannot replace genomic analysis to determine 1p19q and 10p10q status.
- ▶ The better prognosis value of INA expression could be due to the relation of its expression with molecular characteristics, ie, 1p19q loss and 10q retention.

24. **Ikota H**, Kirjo S, Yokoo H, et al. Systematic immunohistochemical profiling of 378 brain tumors with 37 antibodies using tissue microarray technology. *Acta Neuropathol* 2006;**111**:475–82.
25. **Shirahata M**, Iwao-Kozumi K, Saito S, et al. Gene expression-based molecular diagnostic system for malignant gliomas is superior to histological diagnosis. *Clin Cancer Res* 2007;**13**:7341–56.
26. **Ferrer-Luna R**, Mata M, Nunez L, et al. Loss of heterozygosity at 1p-19q induces a global change in oligodendroglial tumor gene expression. *J Neurooncol* 2009;**95**:343–54.
27. **Ducray F**, Idbaih A, de Reynies A, et al. Anaplastic oligodendrogliomas with 1p19q codeletion have a proneural gene expression profile. *Mol Cancer* 2008;**7**:41.
28. **Ducray F**, Criniere E, Idbaih A, et al. Alpha-internexin expression identifies 1p19q codeleted gliomas. *Neurology* 2009;**72**:156–61.
29. **Guillaudeau A**, Durand K, Pommepuy I, et al. Determination of EGFR status in gliomas: usefulness of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2009;**17**:220–6.
30. **Kraus JA**, Lamszus K, Giesmann N, et al. Molecular genetic alterations in glioblastomas with oligodendroglial component. *Acta Neuropathol* 2001;**101**:311–20.
31. **Mukasa A**, Ueki K, Ge X, et al. Selective expression of a subset of neuronal genes in oligodendrogloma with chromosome 1p loss. *Brain Pathol* 2004;**14**:34–42.
32. **Mukasa A**, Ueki K, Matsumoto S, et al. Distinction in gene expression profiles of oligodendrogliomas with and without allelic loss of 1p. *Oncogene* 2002;**21**:3961–8.
33. **Gresner SM**, Rieske P, Wozniak K, et al. Gliomas: association of histology and molecular genetic analysis of chromosomes 1p, 10q, and 19q. *Acta Neurol Exp (Warsz)* 2007;**67**:103–12.
34. **Kramar F**, Zamanova Z, Michalova K, et al. Cytogenetic analyses in 81 patients with brain gliomas: correlation with clinical outcome and morphological data. *J Neurooncol* 2007;**84**:201–11.
35. **Boulay JL**, Miserez AR, Zwaifel C, et al. Loss of NOTCH2 positively predicts survival in subgroups of human glial brain tumors. *PLoS One* 2007;**2**:e576.
36. **Ichimura K**, Vogazianou AP, Liu L, et al. 1p36 is a preferential target of chromosome 1 deletions in astrocytic tumours and homogeneously deleted in a subset of glioblastomas. *Oncogene* 2008;**27**:2097–108.
37. **Reddy KS**. Assessment of 1p/19q deletions by fluorescence in situ hybridization in gliomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2008;**184**:77–86.
38. **Burger PC**. What is an oligodendroglioma? *Brain Pathol* 2002;**12**:257–9.
39. **Dumas-Duport C**, Varlet P, Tucker ML, et al. Oligodendrogliomas. Part I: Patterns of growth, histological diagnosis, clinical and imaging correlations: a study of 153 cases. *J Neurooncol* 1997;**34**:37–59.
40. **McCarthy BJ**, Propp JM, Davis FG, et al. Time trends in oligodendroglial and astrocytic tumor incidence. *Neuroepidemiology* 2008;**30**:34–44.
41. **Nunes MC**, Roy NS, Keyoung HM, et al. Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain. *Nat Med* 2003;**9**:439–47.
42. **Lu QR**, Sun T, Zhu Z, et al. Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection. *Cell* 2002;**109**:75–86.
43. **Liang Y**, Diehn M, Watson N, et al. Gene expression profiling reveals molecularly and clinically distinct subtypes of glioblastoma multiforme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;**102**:5814–19.
44. **Idbaih A**, Marie Y, Lucchesi C, et al. BAC array CGH distinguishes mutually exclusive alterations that define clinicogenetic subtypes of gliomas. *Int J Cancer* 2008;**122**:1778–86.
45. **Yadav AK**, Ranfow JJ, Scholtens DM, et al. Monosomy of chromosome 10 associated with dysregulation of epidermal growth factor signaling in glioblastomas. *JAMA* 2009;**302**:276–89.



BMJ Group, supporting you throughout your career...

At BMJ Group we have resources available to you at every stage of your career.

Whether you are a medical student or doctor in training looking to keep up with the latest news and prepare for exams, or a qualified doctor who wants the latest medical information, to attend conferences, or looking for your next job, BMJ Group has something to offer. For the latest information on all of our products and services register to receive email updates at

group.bmj.com/registration

BMJ  BMJ Journals BMJ Careers BMJ Evidence Centre BMJ Learning 

Article n°3: les gliomes diffus de l'adulte produisent des ARNm codant pour des isoformes de l'EGFR dépourvues de domaine tyrosine kinase

Angélique Guillaudeau, Karine Durand, Hélène Rabinovitch-Chable, Isabelle Pommepuy, Laura Mesturoux, Sandrine Robert, Alain Chaunavel, Jean-Jacques Moreau, François Labrousse.

International Journal of Oncology (2012) 40 : 1142-1152.

Le gène *EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*) code pour quatre ARNm différents générés par épissage alternatif. Respectivement, les ARNm variants 1, 2, 3 et 4 codent pour l'isoforme entière a, classiquement appelée EGFR ou ERBB1 ou HER1, et les isoformes tronquées b, c et d auxquelles il manque le domaine intracellulaire tyrosine kinase. De plus, une perte des exons 2 à 8 sur le gène est responsable de la synthèse d'un mutant appelé EGFRvIII qui ne possède pas de domaine extracellulaire de liaison au ligand et qui est activé de manière constitutive. L'expression des isoformes tronquées b, c et d de l'EGFR n'a jamais été étudiée dans les gliomes diffus de l'adulte. C'est dans ce but que nous avons analysé, dans une série de 47 gliomes les taux d'expression des différentes isoformes et leur association avec le type histopathologique tumoral et la survie des patients.

Méthodes

L'expression protéique d'EGFR entier et des isoformes tronquées a été analysée par immunohistochimie en utilisant d'une part un anticorps dirigé contre le domaine extracellulaire (Ext-Ab), capable de détecter toutes les isoformes tronquées ou entière du récepteur ainsi que le mutant EGFRvIII, et un anticorps dirigé contre le domaine intracellulaire du récepteur (Int-Ab) qui détecte seulement l'EGFR entier et le mutant EGFRvIII. L'expression des ARNm EGFRv1, EGFRv2, EGFRv3 et EGFRv4 a été analysée par RT-PCR quantitative et celle d'EGFRvIII par PCR qualitative (présence ou absence). L'amplification du gène *EGFR* a été analysée par hybridation fluorescente *in situ*.

Résultats principaux

Dans la série étudiée, l'immunomarquage est très différent selon l'anticorps utilisé (Ext-Ab vs. Int-Ab). 98% des tumeurs ont un marquage positif avec l'anticorps Ext-Ab, contre seulement 78% avec l'anticorps Int-Ab. De plus, l'immunomarquage du récepteur EGFR est toujours plus fort avec l'anticorps Ext-Ab qu'avec l'anticorps Int-Ab ($p < 0,0001$).

Contrairement à l'immunomarquage avec l'anticorps Ext-Ab qui ne diffère pas selon le type histopathologique, l'immunomarquage avec l'anticorps Int-Ab est significativement plus élevé dans les astrocytomes, les glioblastomes et les oligodendrogliomes comparé aux oligo-astrocytomes.

Les taux d'ARNm d'EGFRv1, EGFRv2, EGFRv3 et EGFRv4 sont corrélés entre eux de manière significative. Ils sont exprimés dans tous les types histopathologiques mais les taux d'expression les plus élevés sont retrouvés pour les glioblastomes. Le taux d'ARNm EGFRv1 et la présence de l'ARNm du mutant EGFRvIII sont associés de manière positive à l'immunomarquage par l'anticorps Int-Ab.

En terme de survie, un pronostic péjoratif est associé avec le diagnostic histologique de glioblastome, l'amplification du gène *EGFR*, un fort immunomarquage par l'anticorps Int-Ab et une surexpression de l'ensemble des ARNm codant pour les isoformes entières et tronquées.

Conclusion

Nos résultats indiquent qu'en plus de l'EGFR et du mutant EGFRvIII, les gliomes diffus de l'adulte expriment des isoformes de l'EGFR dépourvues de domaine tyrosine kinase dont le mécanisme d'expression et le rôle physiopathologique restent à étudier. Nos observations soulignent le fait que des résultats obtenus par immunohistochimie peuvent dramatiquement varier en fonction de l'anticorps utilisé puisque les anticorps dirigés contre le domaine intracellulaire d'EGFR ne détectent pas les isoformes tronquées. Nous pensons que ces résultats pourraient en partie expliquer les divergences observées dans la littérature quant à la valeur pronostique de l'expression d'EGFR ou l'inefficacité des thérapies ciblées anti-EGFR.

Adult diffuse gliomas produce mRNA transcripts encoding EGFR isoforms lacking a tyrosine kinase domain

ANGÉLIQUE GUILLAUME¹, KARINE DURAND¹, HÉLÈNE RABINOVITCH-CHABLE²,
ISABELLE POMMEPUY¹, LAURA MESTUROUX¹, SANDRINE ROBERT¹, ALAIN CHAUNAVEL¹,
JEAN-JACQUES MOREAU³ and FRANÇOIS LABROUSSE¹

Departments of ¹Pathology, ²Biochemistry and Molecular Genetics, ³Neurosurgery,
Dupuytren University Hospital, 2 Avenue Martin Luther King, F-87042 Limoges, France

Received August 24, 2011; Accepted September 27, 2011

DOI: 10.3892/ijo.2011.1287

Abstract. The epidermal growth factor receptor (*EGFR*) gene encodes four alternatively spliced mRNA, variants 1, 2, 3 and 4, respectively, encoding the whole isoform a (EGFR) and truncated isoforms b, c and d, all of which lack the receptor's intracellular domain. In addition, a mutant EGFRvIII differs from isoform a in a truncated extracellular domain. The expression pattern of these isoforms is unknown in adult diffuse gliomas. Thus, we investigated in 47 cases: i) EGFR protein expression by immunohistochemistry using an extracellular domain-recognizing antibody (Ext-Ab) and an intracellular domain specific one (Int-Ab), ii) mRNA expression of EGFRv1, -v2, -v3, -v4 and -vIII by RT-PCR and iii) *EGFR* amplification by fluorescent *in situ* hybridization. The relation of these data with histological criteria and patient outcome was studied. The immunostaining was stronger with the Ext-Ab than with the Int-Ab. EGFRv1, -v2, -v3 and -v4 mRNA expression were highly correlated. They were expressed in all tumors, with highest levels in glioblastomas. EGFRv1 strong levels and the presence of vIII mRNAs were more closely associated with Int-Ab staining. *EGFR* gene amplification concerned only glioblastomas and was associated with the presence of EGFRvIII and high levels of EGFRv2, -v3 and -v4 transcripts. A pejorative outcome was associated with: histology (glioblastomas), *EGFR* amplification, strong Int-Ab labeling and high levels of variant mRNAs. Our results indicated that the full-length EGFR and mutant EGFRvIII are not the sole EGFR isoform expressed in diffuse gliomas. This could explain discordant immunohistochemical results reported in the literature and may have therapeutic implications.

Introduction

According to the World Health Organization classification (WHO), adult diffuse gliomas include astrocytomas, glioblastomas, oligodendrogliomas and oligoastrocytomas (1). Despite therapeutic advances, these tumors remain incurable and the prognosis for patients afflicted with anaplastic tumors and glioblastomas is still very poor (2).

The epidermal growth factor receptor (EGFR) belongs to HER family, a group of four receptors. Many reports have shown that EGFR contribute to diffuse glioma oncogenesis (3-8). The most prevalent EGFR pathway modifications involved are *EGFR* gene amplification and receptor overexpression, the latter of which remains controversial (9-15).

The *EGFR* gene is located in 7p12 and generates a first type of mRNA transcript, referred to as EGFR variant 1 (EGFRv1), which encodes the full-length receptor, known as isoform a, EGFR or HER1. Isoform a is a transmembrane protein with an intracellular tyrosine kinase domain. Ligand binding on the extracellular domain leads to stimulation of cellular proliferation and cell survival pathways. Glioblastomas harboring *EGFR* gene amplification frequently contain a genetic variant, EGFRvIII, which encodes a mutant receptor with an altered extracellular domain that renders it constitutively active (16-18).

In addition to variant v1, the *EGFR* gene generates three other alternatively spliced transcripts, referred to as variants 2-4 (EGFRv2-v4). The corresponding mRNAs are shorter than the EGFRv1 transcript and, respectively, encode truncated forms of the receptor (isoforms b, c and d), which lack the cytoplasmic tyrosine kinase domain. Soluble isoforms have been reported (19-21). The role of these truncated EGFR isoforms remains poorly known. *In vitro*, they have been shown to decrease cellular proliferation (22,23). The hypotheses for this cellular growth inhibition include the competitive binding of EGFR ligands by the truncated isoforms (24,25) and formation of catalytically inactive heterodimers of different isoforms, which interfere with the formation of functional holoreceptor dimers. This consequently prevents intracellular kinase activity (26). To our knowledge, expressions of truncated EGFR isoforms and their transcripts have never been studied in gliomas.

To assess whether EGFR protein isoforms and their corresponding transcripts are expressed in diffuse gliomas, we

Correspondence to: Dr François Labrousse, Department of Pathology, Dupuytren University Hospital, 2 Avenue Martin Luther King, F-87042 Limoges, France
E-mail: labrousse@unilim.fr

Key words: gliomas, glioblastoma, epidermal growth factor receptor, EGFR isoforms, *EGFR* mRNA variants

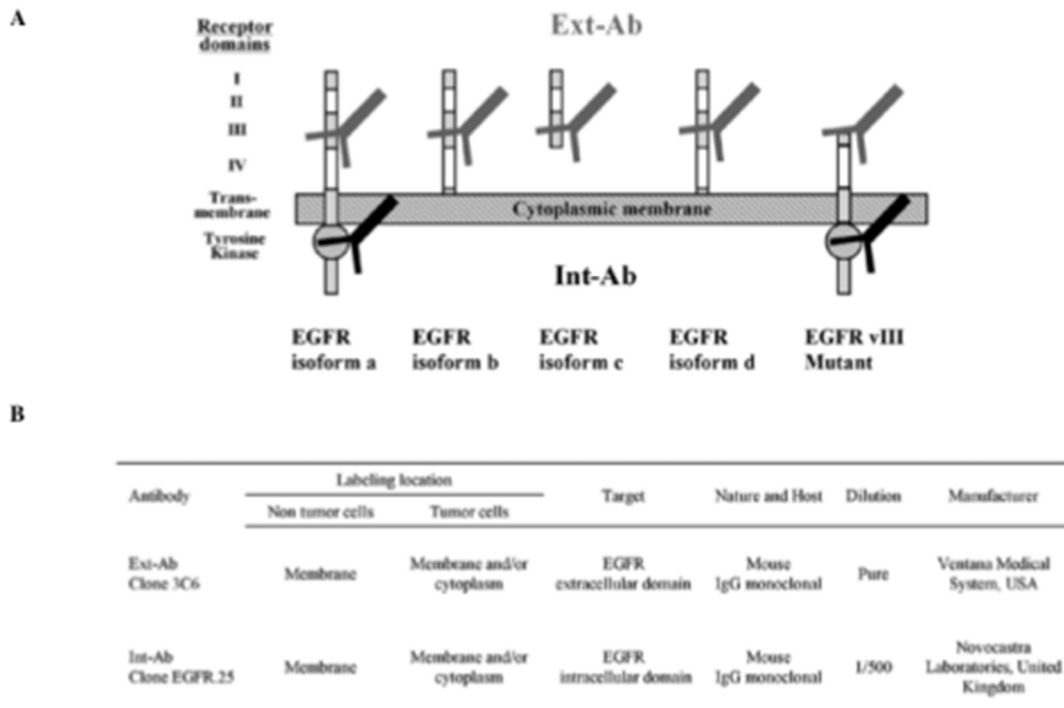


Figure 1. Characteristics of antibodies used in immunohistochemistry. (A), Ext-Ab (grey) and Int-Ab (black) targeting different domains of EGFR isoforms a, b, c, d and the EGFRvIII mutant; (B), Ext-Ab and Int-Ab characteristics.

performed an immunohistochemical analysis and determined the expression patterns of EGFRv1, -v2, -v3, -v4 and mutant EGFRvIII mRNAs. Results were analyzed with respect to the clinical data, patient outcome, histological tumor type and presence or absence of *EGFR* gene amplification.

Patients and methods

Patients and tissue samples. Tumors were obtained from 47 adult patients diagnosed with infiltrating glioma who were undergoing surgery at Limoges Dupuytren University Hospital between 1995 and 2011. Clinical and survival data were obtained by a retrospective query and all samples were used in accordance with French bioethics laws regarding patient information and consent. No patients received EGFR-targeted therapeutics. Tumor samples were fixed in 4% formalin at the time of resection. They were then embedded in paraffin and tumor sections were stained with hemalum phloxine saffron. Part of the surgical specimen was snap-frozen and conserved at -80°C . The histological type and grade of gliomas were determined according to the WHO classification (1). Non-tumor tissue was used as a control.

Immunohistochemistry. Sections ($5\ \mu\text{m}$) were cut from paraffin-embedded tumors and stained with two different anti-EGFR antibodies (Fig. 1). One antibody targeted the extracellular domain (Ext-Ab) and the other intracellular domain (Int-Ab). Sample slides were processed automatically (BenchMark XT ICH/ISH, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) according to protocols supplied by the manufacturers. EGFR staining was quantified according to a semiquantitative method

proposed by Hirsch *et al.* (27), as previously described (28). Staining was scored for labeling intensity (1, negative or trace; 2, weak; 3, moderate; 4, intense), percentage of positive cells per slide (0%-100%) and for the Hirsch score resulting from multiplication of these two parameters (absolute values ranging from 0 to 400). For certain analyses, the level of expression in samples was scored as: negative or low, intermediate, and high, which corresponded to Hirsch values of 0-200, 201-300, and 301-400, respectively.

We also tested the following antibodies: Ki67 (clone MiB-1, DakoCytomation, Glostrup, Denmark; 1/200 $^{\circ}$), p53 (Dako Cytomation; 1/50 $^{\circ}$), Olig2 (Immuno-Biological Laboratories, Gunma, Japan; 1/200 $^{\circ}$), and glial fibrillar acidic protein (Dako Cytomation; 1/1600 $^{\circ}$). The percentages of cells labeled with these antibodies were determined by studying at least five hundred cells for each antibody in tumor areas of highest positivity.

Total RNA extraction. Tumor tissue (30 mg) was incubated with 1 ml Qiazol $^{\circ}$ solution (Qiagen, Courtaboeuf, France) and CK14 ceramic beads (Ozyme) and then pulverized two times for 40 sec each at 6500 rpm in a Precellys 24 homogenizer (Bertin Technologies). Homogenized tissues were then lysed and RNA purification was performed according to the manufacturer's protocol (RNeasy Lipid Tissue Mini kit, Qiagen). RNA concentration and purity was estimated by spectrophotometry (NanoDrop ND1000, Labtech, France). RNA quality was assessed by capillary electrophoresis (Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies) and only RNA with an Integrity Number (R.I.N) >6 was used for analysis.

Table I. Characteristics of the primer used for quantitative and qualitative RT-PCR.

Target	Primer	Location	Sequence 5'-3'	Amplicon size (bp)	Primer temperature (°C)
EGFR variant 1	Forward	Exon 29-30	CTCCCAGTGCCTGAATACATA	83	58
	Reverse	Exon 30	GGCTGATTGTGATAGACAGGA		
EGFR variant 2	Forward	Exon 15	TGCACCTACGGGTCCTAAT	97	58
	Reverse	Exon 16	TGAAGCAAAGGGAGAAATTG		
EGFR variant 3	Forward	Exon 10	AAGGAAATCACAGGTTTGAGC	99	58
	Reverse	Exon 10bis	TCCAAGGGAAACAGGAAATATG		
EGFR variant 4	Forward	Exon 15	CTACGGGCCAGGAAATGAG	86	62
	Reverse	Exon 17	CGCTGCCATCATTACTTTGA		
HPRT	Forward	Exon 6	CTTTCCTTGGTCAGGCAGTA	90	58
	Reverse	Exon 7	TGGCTTATATCCAACACTTCG		
EGFRvIII	Forward	Exon 1	GCTCTGGAGAAAAGAAAGGTAAT	90	62
	Reverse	Exon 8	TCTCCATCTCATAAGCTGTCG		

Quantitative and qualitative RT-PCR. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 2 µg of total RNA using the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis[®] kit (Roche) and hexamer primers, according to the manufacturer's protocol. For PCR, primers were designed using Amplify 1.2 or Primer 3 (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.html/>) software and their specificity was determined by BLASTn in the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Primer characteristics are listed in Table I. Amplicon size and specificity were initially determined by 4% NuSieve agarose gel electrophoresis. Quantitative PCR [EGFRv1, -v2, -v3, -v4 and hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT)] and qualitative PCR (EGFRvIII) were performed on a Rotor Gene thermocycler (Corbett Research) using the Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I kit (Roche). All targets were amplified twice in duplicate in the presence of 3 mM MgCl₂ and 0.5 µM primers. Relative quantification of mRNA content was performed using the $\Delta\Delta C_t$ method [$(C_{t_{sample}} - C_{t_{calibrator}})_{target\ gene} - (C_{t_{sample}} - C_{t_{calibrator}})_{reference\ gene}$], modified according to Pfaffl (29), with efficiency correction by Rotor Gene software. mRNA content was expressed in relative arbitrary units (R.A.U.).

Fluorescent in situ hybridization. EGFR gene amplification and 1p36 and 19q13 losses were analyzed by double fluorescent *in situ* hybridization with the 'LSI EGFR SpectrumOrange/CEP 7 SpectrumGreen Probe', or with the 'LSI 1p36 spectrum orange/LSI 1q25 spectrum green probe' and the 'LSI 19q13 spectrum orange/LSI 19p13 spectrum green probe' (Abbott Molecular Inc., IL, USA) kits, respectively. They were investigated on consecutive paraffin sections from the same blocks used in immunohistochemical analyses. This technique was a modification of the method previously described (28); briefly, 4 µm paraffin sections were incubated 16 h at 56°C, submitted to deparaffinising, digested with pepsin (Abbott Molecular Inc.) at 37°C during 45 min and dehydrated in successive ethanol baths. Slides were incubated with 10 µl of each probe for 5 min at 73°C to denature DNA and 16 h at 37°C to ensure hybridiza-

tion. Sections were washed in 2X SSC/0.3% NP40 solution, once for 1 min at room temperature, once for 2 min at 73°C, and dehydrated in successive ethanol baths. Counterstaining and microscopic observation of EGFR amplification were performed as previously described (28). EGFR gene amplification was considered to have occurred if more than 10% of the cells analyzed produced a red (corresponding to the EGFR-specific probe) to green (centromeric region of chromosome 7) signal ratio ≥ 2 , as recommended previously (30,31). Eight sequential focus stacks with 0.3 µm were acquired and then integrated into a single image in order to reduce thickness related artifacts. Preparations were considered as valid when more of 80% of the cells showed bright signals.

Statistical analyses. StatView[®] 5.0 software (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) was used for statistical analyses. Fisher's exact test was used to assess differences between nominal variables. Means were compared with the non-parametric Mann-Whitney test for pairs of variables and with the Kruskal-Wallis tests for comparisons of more than two variables. Correlation Spearman test was used to compare quantitative variables. Overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) were analyzed by Kaplan-Meier and median OS or PFS medians were compared with the non-parametric log-rank or Breslow tests. Results for which $p < 0.05$ were considered to be statistically significant.

Results

Patient and tumor characteristics. Patient characteristics are summarized in Table II. For the series, median follow-up was 23.3 (0.5-240) months. Ki67 labeling index, Olig2 and p53 protein expression, and presence or absence of a 1p36-19q13 loss were consistent with histological typing. Thus, oligodendrogliomas were characterized by a 1p36/19q13 deletion, stronger olig2 and weaker p53 expressions compared to other tumor types (Table III).

Table II. Demographic, pathological and clinical features.

	No.	Grade	Sex (male/female)	Age (median)	Tumor status (primary/recurrent)	Radiotherapy (yes/no)	Chemotherapy (yes/no)
All	47		18/19	50.6	36/11	42/5	37/10
A	3	1 II, 2 III	1/2	51.3	2/1	2/1	2/1
GBM	21	21 IV	10/11	59.7	19/2	20/1	18/3
O	14	5 II, 9 III	3/11	48.1	10/4	13/1	13/1
OA	9	6 II, 3 III	4/5	43.2	5/4	7/2	4/5

A, astrocytoma; GBM, glioblastoma; O, oligodendroglioma; OA, oligoastrocytoma.

Table III. Molecular characterization of glioma histological types.

	Ki67 (n=45)		p53 (n=45)		Olig2 (n=45)		1p36-19q13 loss (n=46)									
	%	Mean \pm SD	p-value	%	Mean \pm SD	p-value	%	Mean \pm SD	p-value	Yes	No	p-value				
All patients		19 \pm 14			46.3 \pm 31.1					58.6 \pm 23.9				17	29	
Histological type																
A		13.7 \pm 10	0.06		80 \pm 10	0.0004				51.7 \pm 27.5	0.04			0	3	<0.0001
GBM		26.9 \pm 13.5			49.7 \pm 28.3					48.7 \pm 25.8				2	18	
O		14.8 \pm 19			20.6 \pm 18.4					71.8 \pm 18.3				14	0	
OA		10.8 \pm 11.2			67.8 \pm 28.5					61.1 \pm 19				1	8	

A, astrocytoma; GBM, glioblastoma; O, oligodendroglioma; OA, oligoastrocytoma.

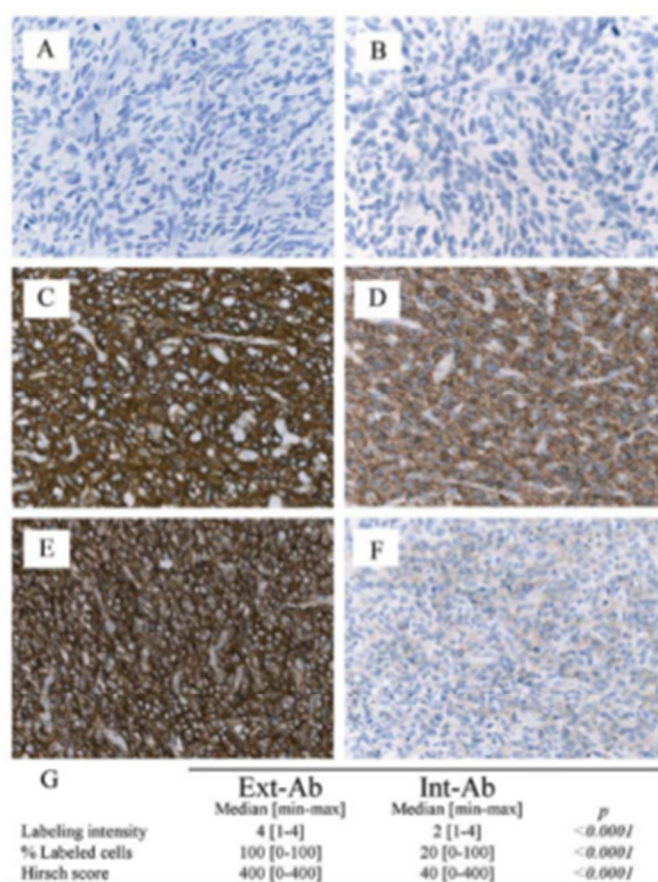


Figure 2. Immunohistochemical staining. Absence of labeling with both Ext-Ab (A) and Int-Ab (B) in a glioblastoma. Strong EGFR expression with both Ext-Ab (C) and Int-Ab (D) in a glioblastoma. Discordant staining: strong with the Ext-Ab (E) and very weak with the Int-Ab (F) in a grade III oligodendroglioma. (G), table of statistical analysis.

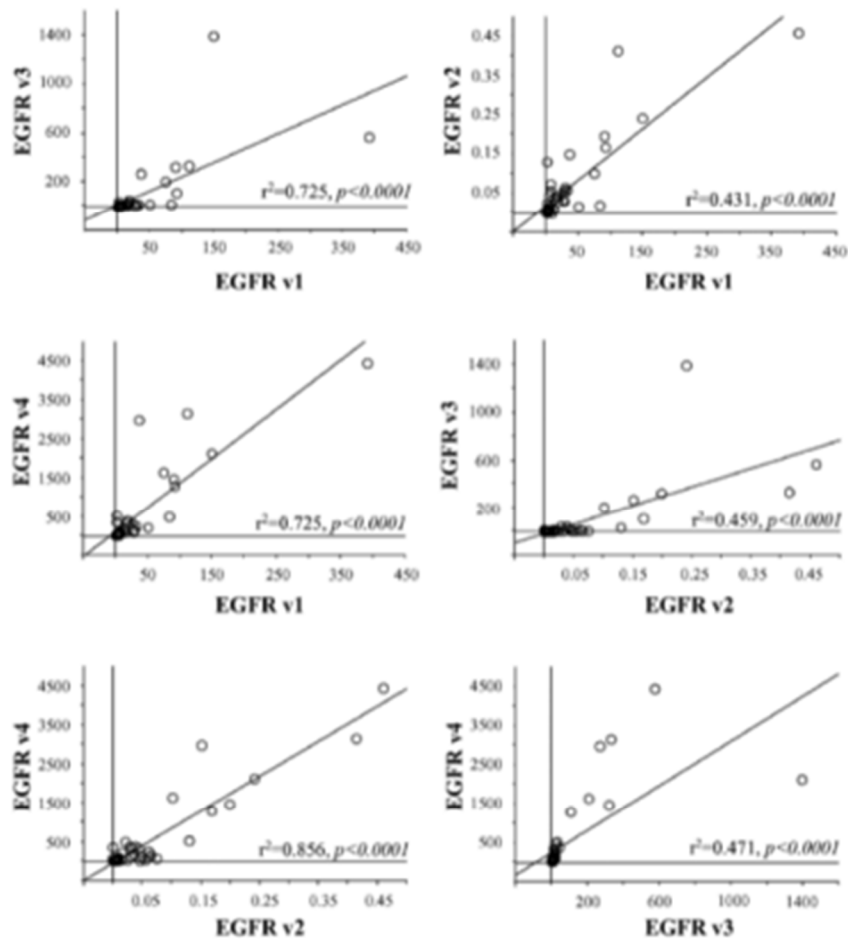


Figure 3. Correlation for EGFRv1+vIII, -v2, -v3 and -v4 mRNA levels.

for both) (Table VI, Fig. 7A). OS and PFS were better for patients with tumors showing a 1p36-19q13 loss and an absence of *EGFR* amplification (Table VI).

No/intermediate or strong tumor labeling with EGFR Ext-Ab did not influence OS and PFS times whereas no/intermediate labeling with EGFR Int-Ab was associated with longer OS and PFS (Table VI). In addition, PFS and OS were longer when gliomas expressed weak EGFRv1+vIII, -v2, v3, or -v4 mRNA levels and showed no mutant EGFRvIII mRNA expression (Table VI, Fig. 7B-F).

In glioblastomas (data not shown), PFS was significantly better for patients with no *EGFR* amplification (5.4 vs. 8.4 months, $p=0.01$), no expression of EGFRvIII mutant mRNA (3.7 vs. 8.4 months, $p=0.04$), or weak EGFRv2 (3.3 vs. 5.6 months, $p=0.04$) or -v4 mRNA levels (8.4 vs. 4.7 months, $p=0.05$). OS did not change according to these parameters.

Discussion

Based on the present results, we report that diffuse gliomas expressed truncated EGFR protein isoforms, based on: i) immunohistochemical data and ii) EGFRv1, -v2, -v3, -v4 variants and EGFRvIII mutant mRNA detection.

Immunohistochemical results varied according to the antibody used and favored the hypothesis of an expression of the truncated isoforms. The stronger EGFR staining obtained with Ext-Ab reflected their expression since, in addition to functional EGFR and the EGFRvIII mutant targeted by both antibodies, Ext-Ab also recognized the truncated EGFR isoforms b, c, and d whereas Int-Ab did not. The detection of truncated isoforms, depending on the antibody used, could explain some of the discrepancies found in literature regarding EGFR expression in gliomas (9-15). In our series, glioblastomas and oligodendrogliomas were strongly labeled by both Ext-Ab and Int-Ab, whereas oligoastrocytomas were moderately or strongly labeled by Ext-Ab but weakly by Int-Ab. Thus, in combination with other markers such as Olig2, p53 or 1p19q deletion, the study of EGFR expression might be useful to further characterize the diffuse gliomas (32-36).

The transcriptomic analysis showed that alternatively spliced EGFRv2, -v3 and -v4 transcript variants, encoding EGFR isoforms b, c and d, respectively, were expressed in addition to the EGFRv1 and EGFRvIII mutant mRNAs. In accordance with immunohistochemistry, detection of EGFRv1+vIII mRNA associated more closely with Int-Ab staining than with Ext-Ab staining. However, we also found an association between

Immunohistochemical detection of EGFR isoforms and EGFRvIII mutant. The percentage of gliomas stained by Ext-Ab was 98% (44/45), whereas only 78% (35/45) of the gliomas were stained by Int-Ab. The Ext-Ab and Int-Ab antibodies generated very different staining patterns in the gliomas (Fig. 2A-F). Glioma staining by Int-Ab was significantly lower than that of Ext-Ab in terms of intensity, percentage of positive cells and Hirsch score ($p < 0.0001$; Fig. 2G).

Neither antibody detected any significant differences in EGFR staining with respect to patient sex or age (data not shown). Staining intensities, percentages of labeled cells and Hirsch scores obtained with Ext-Ab did not significantly differ according to histological types. In contrast, Int-Ab scores were significantly higher in glioblastomas, astrocytomas or oligodendrogliomas compared to oligoastrocytomas (Table IV). In non-tumor tissue, we found no or very weak EGFR expression whatever the antibody used.

Quantitation of EGFR variants 1, 2, 3, 4 and EGFRvIII mRNAs. EGFR mRNA levels varied widely among the tumor samples. Median R.A.U. values were 7.3 (0.4-390.2) for EGFRv1+vIII mRNA, 0.02 (0-0.5) for EGFRv2 mRNA, 6.2 (0.1-1396.8) for EGFRv3 mRNA and 94.6 (2.1-4445.2) for EGFRv4 mRNA. Straight correlations were found for all comparisons between EGFRv1+vIII, -v2, -v3 and -v4 mRNA levels ($p < 0.0001$ for all, Fig. 3). EGFRvIII mutant expression was qualitatively detected in 26% (12/47) of the gliomas. In non-tumor tissue mRNA variant were very weakly expressed with 0.7 R.A.U. for EGFRv1+vIII and EGFRv3, 6.6 R.A.U. for EGFRv4 and no EGFRvIII and EGFRv2 expression.

Association of EGFR variant and EGFRvIII mRNA expression with other parameters. EGFRv1+vIII, -v2, -v3, and -v4 mRNA levels were not influenced by patient sex and age (data not shown). EGFRv1+vIII, -v3 and -v4 mRNA levels were higher in glioblastomas than in other tumor types when mean values were taken as a cut-off ($p = 0.04$, 0.01 and 0.002 , respectively) (Fig. 4). EGFRvIII mRNA was significantly associated with histological type, it was found in one astrocytoma, ten glioblastomas and one oligoastrocytoma, but in none oligodendroglioma ($p = 0.01$, data not shown). We also observed that EGFRv1+vIII mRNA levels more straightly correlated with Int-Ab staining than with Ext-Ab staining (Fig. 5).

EGFR gene amplification in gliomas. We detected EGFR gene amplification in 8 out of the 20 glioblastomas, but not in the other glioma types ($p = 0.007$, Table V). Glioblastomas with EGFR gene amplification expressed significantly stronger EGFRv1, -v2, -v3 and -v4 mRNA levels than gliomas with no EGFR amplification (Table V). The presence of mutant EGFRvIII mRNA was significantly associated with EGFR amplification ($p < 0.0001$).

Weak Ext-Ab staining was more closely associated with the absence of EGFR gene amplification than with its presence ($p = 0.09$), whereas strong Int-Ab staining was significantly associated with gene amplification ($p = 0.01$; Fig. 6).

Prognostic values. PFS and OS were significantly shorter for patients diagnosed with glioblastoma and astrocytoma than for those with oligodendroglioma and oligoastrocytoma ($p < 0.0001$

Table IV. Association between Ext-Ab and Int-Ab labeling and pathological parameters.

Histological type	Ext-Ab				Int-Ab				
	No.	Labeling intensity	p-value	Percentage of labeled cells	Hirsch score	p-value	Labeling intensity	Percentage of labeled cells	p-value
All	45	4 [1-4]		100 [0-100]	400 [0-400]		2 [1-4]	20 [0-100]	
A	3	4 [3-4]	0.73	70 [20-90]	360 [60-400]	0.69	2 [2-3]	30 [5-40]	0.01
GBM	19	4 [2-4]		100 [10-100]	400 [20-400]		3 [1-4]	30 [0-100]	
O	14	4 [1-4]		100 [0-100]	380 [0-400]		2 [1-3]	45 [0-70]	
OA	9	4 [2-4]		100 [20-100]	300 [80-400]		1 [1-2]	0 [0-10]	

Ext-Ab, antibody targeting the extracellular domain; Int-Ab, antibody targeting the intracellular domain; A, astrocytoma; GBM, glioblastoma; O, oligodendroglioma; OA, oligoastrocytoma.

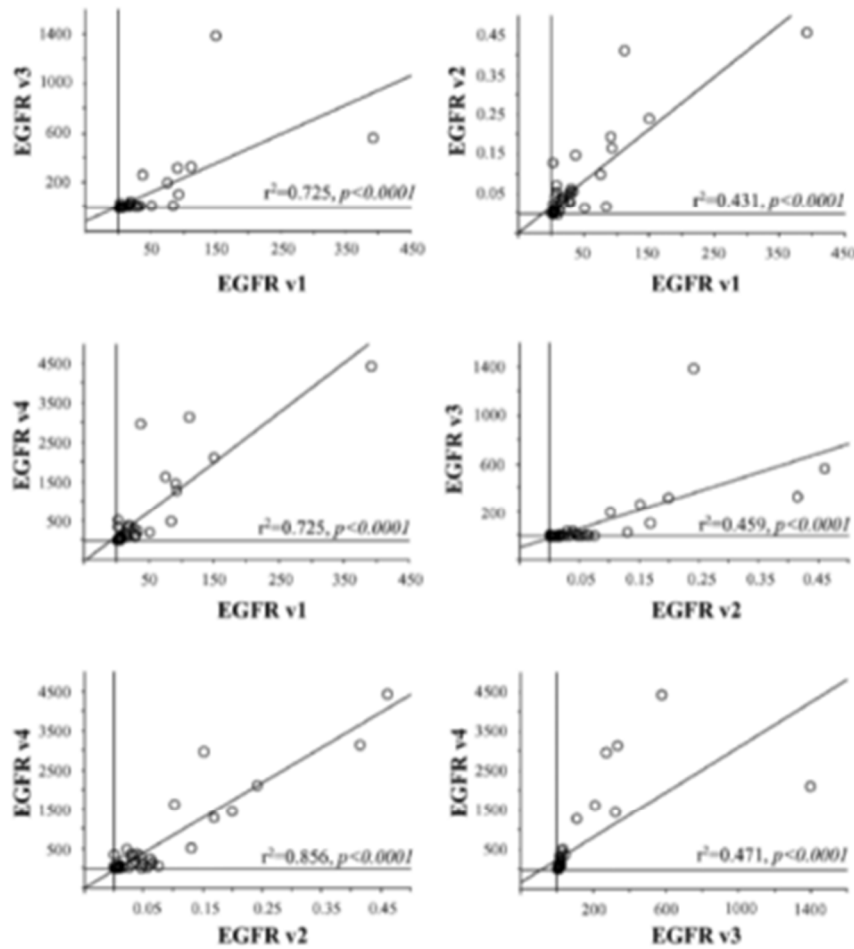


Figure 3. Correlation for EGFRv1+vIII, -v2, -v3 and -v4 mRNA levels.

for both) (Table VI, Fig. 7A). OS and PFS were better for patients with tumors showing a 1p36-19q13 loss and an absence of *EGFR* amplification (Table VI).

No/intermediate or strong tumor labeling with EGFR Ext-Ab did not influence OS and PFS times whereas no/intermediate labeling with EGFR Int-Ab was associated with longer OS and PFS (Table VI). In addition, PFS and OS were longer when gliomas expressed weak EGFRv1+vIII, -v2, v3, or -v4 mRNA levels and showed no mutant EGFRvIII mRNA expression (Table VI, Fig. 7B-F).

In glioblastomas (data not shown), PFS was significantly better for patients with no *EGFR* amplification (5.4 vs. 8.4 months, $p=0.01$), no expression of EGFRvIII mutant mRNA (3.7 vs. 8.4 months, $p=0.04$), or weak EGFRv2 (3.3 vs. 5.6 months, $p=0.04$) or -v4 mRNA levels (8.4 vs. 4.7 months, $p=0.05$). OS did not change according to these parameters.

Discussion

Based on the present results, we report that diffuse gliomas expressed truncated EGFR protein isoforms, based on: i) immunohistochemical data and ii) EGFRv1, -v2, -v3, -v4 variants and EGFRvIII mutant mRNA detection.

Immunohistochemical results varied according to the antibody used and favored the hypothesis of an expression of the truncated isoforms. The stronger EGFR staining obtained with Ext-Ab reflected their expression since, in addition to functional EGFR and the EGFRvIII mutant targeted by both antibodies, Ext-Ab also recognized the truncated EGFR isoforms b, c, and d whereas Int-Ab did not. The detection of truncated isoforms, depending on the antibody used, could explain some of the discrepancies found in literature regarding EGFR expression in gliomas (9-15). In our series, glioblastomas and oligodendrogliomas were strongly labeled by both Ext-Ab and Int-Ab, whereas oligoastrocytomas were moderately or strongly labeled by Ext-Ab but weakly by Int-Ab. Thus, in combination with other markers such as Olig2, p53 or 1p19q deletion, the study of EGFR expression might be useful to further characterize the diffuse gliomas (32-36).

The transcriptomic analysis showed that alternatively spliced EGFRv2, -v3 and -v4 transcript variants, encoding EGFR isoforms b, c and d, respectively, were expressed in addition to the EGFRv1 and EGFRvIII mutant mRNAs. In accordance with immunohistochemistry, detection of EGFRv1+vIII mRNA associated more closely with Int-Ab staining than with Ext-Ab staining. However, we also found an association between

Table V. EGFR amplification.

	EGFR amplification		
	No.	Yes	p-value
Histological type			
A	3	0	0.007
GBM	12	8	
O	13	0	
OA	9	0	
EGFRv1+vIII mRNA			
< mean	34	2	0.0001
> mean	3	6	
EGFRv2 mRNA			
< mean	32	2	0.001
> mean	5	6	
EGFRv3 mRNA			
< mean	36	1	<0.0001
> mean	3	5	
EGFRv4 mRNA			
< mean	36	1	<0.0001
> mean	1	7	
EGFRvIII mRNA			
Present	4	7	<0.0001
Absent	33	1	

A, astrocytoma; GBM, glioblastoma; O, oligodendroglioma; OA, oligoastrocytoma.

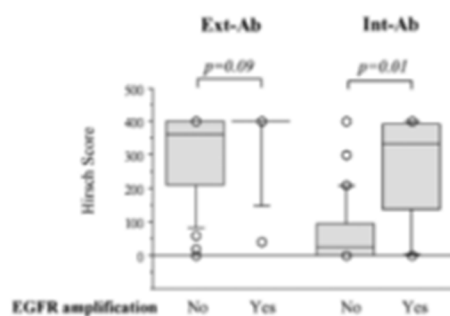


Figure 6. Association between EGFR gene amplification and immunohistochemical staining. Ext-Ab (A) and Int-Ab (B) staining expressed as Hirsch scores was compared in tumors exhibiting or lacking EGFR gene amplification.

Int-Ab staining and EGFRv2, -v3 and -v4 transcript expressions, although Int-Ab did not detect the isoform they encode. This association is probably the consequence of the strong link existing between the expressions of each EGFR transcript (Fig. 3). Nevertheless, alternatively spliced EGFR transcript variants and EGFRvIII mRNA were produced at different levels according to the histological type of glioma. The glioblastomas

Table VI. PFS and OS according to histological and molecular parameters.

	PFS		OS	
	Median (months)	p-value	Median (months)	p-value
Histological types				
A	16.4	<0.0001	34.9	<0.0001
GBM	5.4		10.9	
O	45.1		93.3	
OA	41		nr	
EGFR amplification				
Yes	4.7	<0.0001	8.8	0.0003
No	21.6		93.3	
1p36-19q13 loss				
Yes	21.9	0.04	93.3	0.09
No	16.4		24	
Ext-Ab				
No/intermediate	22.7	0.25	52.8	0.7
Strong	16.4		93.3	
Int-Ab				
No/intermediate	21.4	0.006	93.3	0.07
Strong	4.7		21.6	
EGFRv1 mRNA				
Weak	21	0.02*	93.3	0.1
Strong	5.4		21.6	
EGFRv2 mRNA				
Weak	21.4	0.01*	52.8	0.007
Strong	9		15.1	
EGFRv3 mRNA				
Weak	21	0.0007	93.3	0.004
Strong	4.7		10.9	
EGFRv4 mRNA				
Weak	21.4	<0.0001	93.3	0.0006
Strong	4.7		10.9	
EGFRvIII mRNA				
No	21.4	0.0007	52.8	0.03
Yes	4.7		10.9	

*The difference was not significant using log-rank test but was significant with Breslow-Gehan-Wilcoxon test. OS, overall survival; PFS, progression-free survival; Nr, not reached; A, astrocytoma; GBM, glioblastoma; O, oligodendroglioma; OA, oligoastrocytoma.

had a peculiar profile. They expressed the highest levels of EGFRv3 and -v4 mRNA transcripts and, in addition, EGFRvIII mRNA expression was related to this tumor type.

EGFR gene amplification was detected in eight glioblastomas. As previously reported (28), weak Ext-Ab staining was

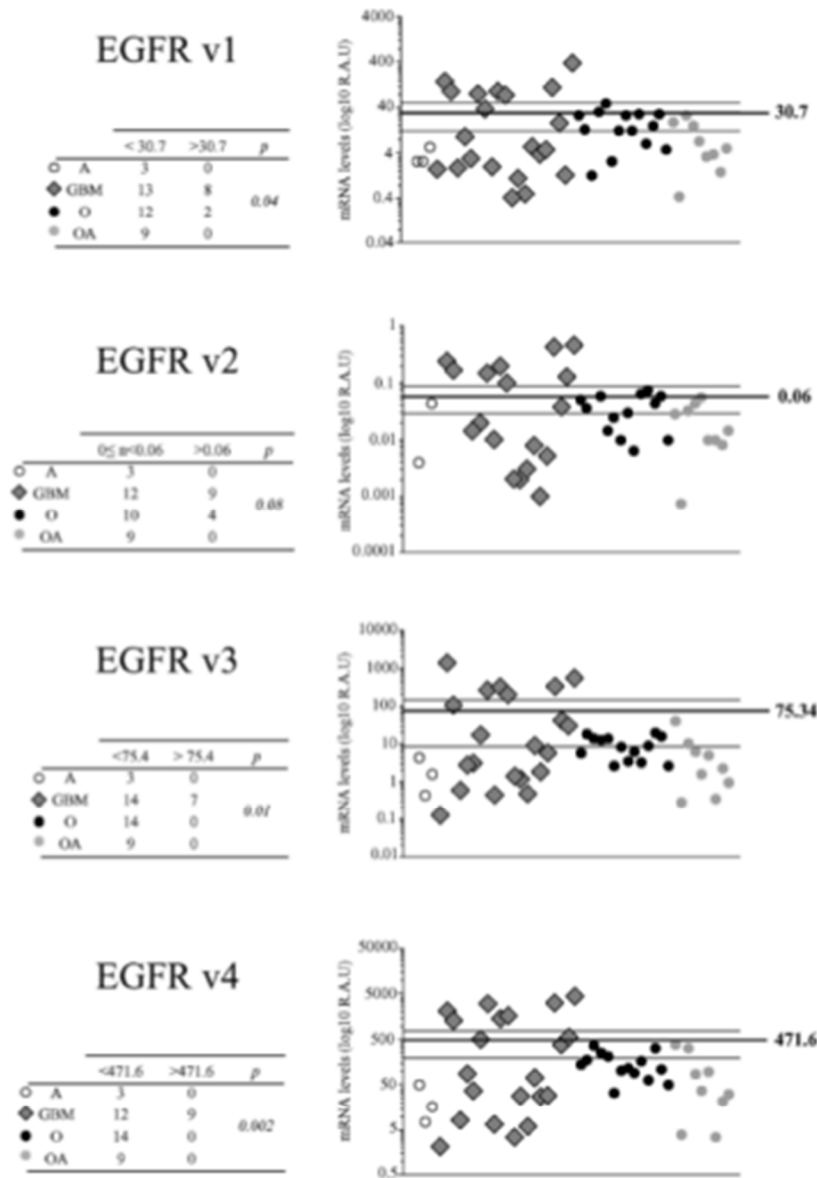


Figure 4. Relation between EGFR variant mRNA levels and histological types. EGFRv1+vIII, -v2, -v3 and -v4 mRNA levels were expressed in Log10 relative arbitrary unit (Log10 R.A.U.). Mean value was taken as a cut-off to determine the number of tumors under (< mean) and above (> mean) it.

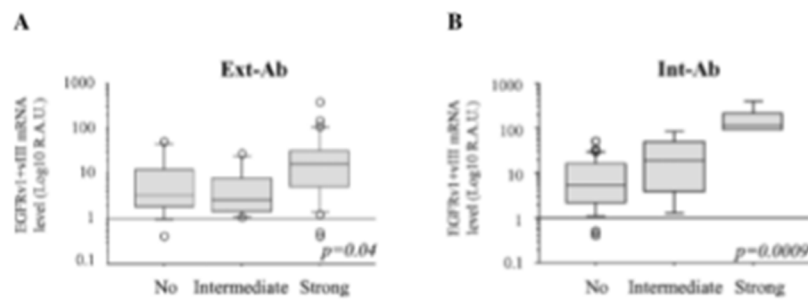


Figure 5. Relation between EGFRv1+vIII mRNA levels and immunohistochemical data. Ext-Ab (A) and Int-Ab (B) labeling were expressed as no vs. intermediate vs. strong Hirsch score.

Table V. EGFR amplification.

	EGFR amplification		p-value
	No.	Yes	
Histological type			
A	3	0	0.007
GBM	12	8	
O	13	0	
OA	9	0	
EGFRv1+vIII mRNA			
< mean	34	2	0.0001
> mean	3	6	
EGFRv2 mRNA			
< mean	32	2	0.001
> mean	5	6	
EGFRv3 mRNA			
< mean	36	1	<0.0001
> mean	3	5	
EGFRv4 mRNA			
< mean	36	1	<0.0001
> mean	1	7	
EGFRvIII mRNA			
Present	4	7	<0.0001
Absent	33	1	

A, astrocytoma; GBM, glioblastoma; O, oligodendroglioma; OA, oligoastrocytoma.

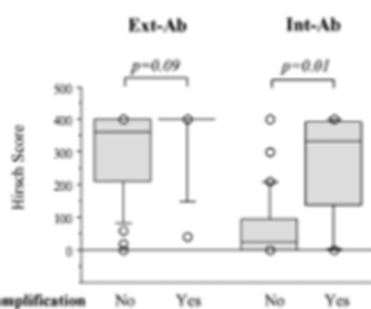


Figure 6. Association between EGFR gene amplification and immunohistochemical staining. Ext-Ab (A) and Int-Ab (B) staining expressed as Hirsch scores was compared in tumors exhibiting or lacking EGFR gene amplification.

Int-Ab staining and EGFRv2, -v3 and -v4 transcript expressions, although Int-Ab did not detect the isoform they encode. This association is probably the consequence of the strong link existing between the expressions of each EGFR transcript (Fig. 3). Nevertheless, alternatively spliced EGFR transcript variants and EGFRvIII mRNA were produced at different levels according to the histological type of glioma. The glioblastomas

Table VI. PFS and OS according to histological and molecular parameters.

	PFS		OS	
	Median (months)	p-value	Median (months)	p-value
Histological types				
A	16.4	<0.0001	34.9	<0.0001
GBM	5.4		10.9	
O	45.1		93.3	
OA	41		nr	
EGFR amplification				
Yes	4.7	<0.0001	8.8	0.0003
No	21.6		93.3	
1p36-19q13 loss				
Yes	21.9	0.04	93.3	0.09
No	16.4		24	
Ext-Ab				
No/intermediate	22.7	0.25	52.8	0.7
Strong	16.4		93.3	
Int-Ab				
No/intermediate	21.4	0.006	93.3	0.07
Strong	4.7		21.6	
EGFRv1 mRNA				
Weak	21	0.02*	93.3	0.1
Strong	5.4		21.6	
EGFRv2 mRNA				
Weak	21.4	0.01*	52.8	0.007
Strong	9		15.1	
EGFRv3 mRNA				
Weak	21	0.0007	93.3	0.004
Strong	4.7		10.9	
EGFRv4 mRNA				
Weak	21.4	<0.0001	93.3	0.0006
Strong	4.7		10.9	
EGFRvIII mRNA				
No	21.4	0.0007	52.8	0.03
Yes	4.7		10.9	

*The difference was not significant using log-rank test but was significant with Breslow-Gehan-Wilcoxon test. OS, overall survival; PFS, progression-free survival; Nr, not reached; A, astrocytoma; GBM, glioblastoma; O, oligodendroglioma; OA, oligoastrocytoma.

had a peculiar profile. They expressed the highest levels of EGFRv3 and -v4 mRNA transcripts and, in addition, EGFRvIII mRNA expression was related to this tumor type.

EGFR gene amplification was detected in eight glioblastomas. As previously reported (28), weak Ext-Ab staining was

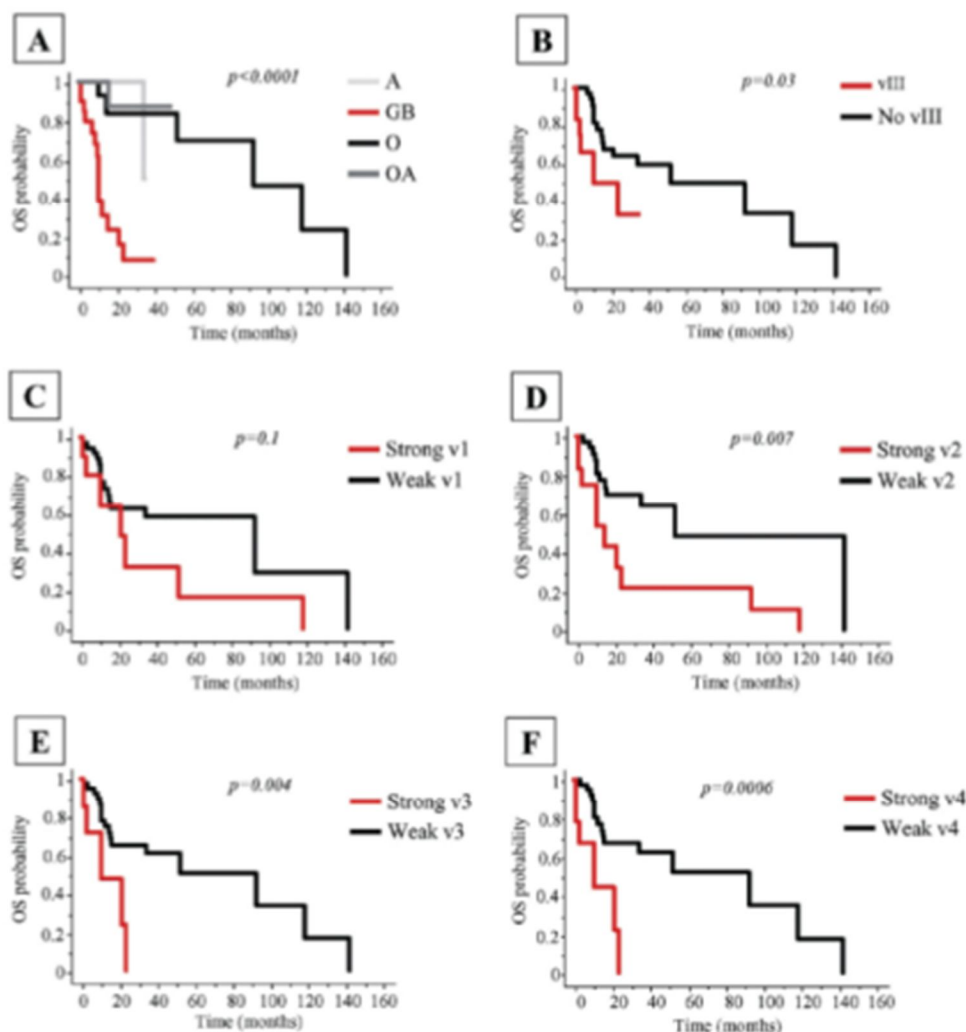


Figure 7. Patient overall survival (OS). Differences in OS according to histological types (A), mutant EGFRvIII expression (B), EGFRv1+vIII (C), -v2 (D), -v3 (E) and -v4 (F) mRNA levels were assessed by log-rank test.

associated with the lack of *EGFR* amplification. In contrast, Int-Ab staining intensity directly correlated with *EGFR* gene amplification, as already shown (37). This suggests that *EGFR* gene amplification is tightly associated with high expression of EGFR receptor isoforms that contain the intracellular tyrosine kinase domain, i.e., EGFR isoform a and the EGFRvIII mutant. Regarding the relationships with the prognosis in our series, the histological type (astrocytoma and glioblastoma), a strong staining with Int-Ab and the presence of *EGFR* amplification and of mutant vIII were associated with shorter PFS and OS times. High levels of EGFRv2, -v3 and -v4 transcript expression were also related to a shortened OS and PFS.

Our data tend to indicate that the role of EGFR pathway in glioblastoma oncogenesis is more complex than expected. In our series, in addition to the known molecular alterations i.e., *EGFR* gene amplification and expression of vIII mutant, we observed a strong staining with Int-Ab and high levels of EGFR

mRNA variants. Actually, the functional roles of the truncated EGFR isoforms are poorly known, particularly *in vivo*. *In vitro*, it has been described that soluble isoforms may regulate EGFR signaling in normal and tumor cells (26,38). Paradoxically, these isoforms have been shown to decrease cellular proliferation (22,23). The known mechanisms responsible for growth inhibition include competitive binding of ligands to soluble isoforms and formation of inactive heterodimers which inhibit the formation of holoreceptor dimers and/or intracellular kinase activity (24-26).

The presence of truncated EGFR isoforms in adult infiltrating gliomas must be considered in therapeutic management. The interactions between truncated EGFR isoforms and EGFR-targeted therapeutics are not well understood. The presence of non-functional receptors could contribute to the failure of therapeutics which target the EGFR extracellular domain (39). Conversely, it has been reported that the presence of truncated

EGFR isoforms may be predictive of the therapeutic response to gefitinib in endometrial adenocarcinomas (40). Lafky and coworkers speculated that the soluble vascular endothelial growth factor receptor (sVEGFR) represents a paradigm for understanding the function and potential application of EGFR isoforms as novel therapeutic molecules (41). Soluble VEGFR isoforms have been presented as effective therapeutic molecules (42) and a similar application for certain EGFR truncated isoforms may be possible.

To our knowledge, this is the first report that gliomas express EGFR transcripts other than EGFRv1 mRNA, which encodes the full-length and functional EGFR isoform α . The role of EGFR isoforms in glioma pathogenesis remains to be clarified, but their expression makes them potential targets of future diagnostic and therapeutic strategies.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the 'Comité Départemental de la Ligue contre le Cancer de la Corrèze'. We thank Mrs. Marion Porcheron for technical assistance, the 'Tumorthèque du Limousin' for providing all tissue samples and the 'Plateforme d'Oncologie Moléculaire' of the Limoges Dupuytren University Hospital.

References

- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW and Kleihues P: The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114: 97-109, 2007.
- Krex D, Link B, Hartmann C, von Deimling A, Pietsch T, Simon M, Sabel M, Steinbach JP, Heese O, Reifenberger G, Weller M and Schackert G: Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain* 130: 2596-2606, 2007.
- Andersson U, Guo D, Malmer B, Bergenheim AT, Brannstrom T, Hedman H and Henriksson R: Epidermal growth factor receptor family (EGFR, ErbB2-4) in gliomas and meningiomas. *Acta Neuropathol* 108: 135-142, 2004.
- Bredel M, Pollack IF, Hamilton RL and James CD: Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in high-grade non-brainstem gliomas of childhood. *Clin Cancer Res* 5: 1786-1792, 1999.
- McLendon RE, Turner K, Perkinson K and Rich J: Second messenger systems in human gliomas. *Arch Pathol Lab Med* 131: 1585-1590, 2007.
- Potti A, Forseen SE, Koka VK, Pervez H, Koch M, Fraiman G, Mehdi SA and Levitt R: Determination of HER-2/neu overexpression and clinical predictors of survival in a cohort of 347 patients with primary malignant brain tumors. *Cancer Invest* 22: 537-544, 2004.
- Schlegel J, Stumm G, Brandt K, Merdes A, Mechttersheimer G, Hynes NE and Kiessling M: Amplification and differential expression of members of the erbB-gene family in human glioblastoma. *J Neurooncol* 22: 201-207, 1994.
- Tabori U, Rienstein S, Dromi Y, Leider-Trejo L, Constantini S, Burstein Y, Dvir R, Amariglio N, Toren A, Rechavi G, Israeli S and Aviram A: Epidermal growth factor receptor gene amplification and expression in disseminated pediatric low-grade gliomas. *J Neurosurg* 103: 357-361, 2005.
- Gil-Benso R, Lopez-Gines C, Benito R, Lopez-Guerrero JA, Callaghan RC, Pellin A, Roldan P and Cerda-Nicolas M: Concurrent EGFR amplification and TP-53 mutation in glioblastomas. *Clin Neuropathol* 26: 224-231, 2007.
- Nakamura JL: The epidermal growth factor receptor in malignant gliomas: pathogenesis and therapeutic implications. *Expert Opin Ther Targets* 11: 463-472, 2007.
- Okada Y, Ohno C, Ueki K, Ogino M, Kawamoto S and Kim P: Comparison of numerical change of epidermal growth factor receptor gene among pre- and postirradiation glioma, and gliosis, and its clinical use. *Brain Tumor Pathol* 24: 15-18, 2007.
- Schober R, Bilzer T, Waha A, *et al.*: The epidermal growth factor receptor in glioblastoma: genomic amplification, protein expression, and patient survival data in a therapeutic trial. *Clin Neuropathol* 14: 169-174, 1995.
- Shinojima N, Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, Kochi M, Nakamura H, Makino K, Saya H, Hirano H, Kuratsu J, Oka K, Ishimaru Y and Ushio Y: Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 63: 6962-6970, 2003.
- Torp SH, Helseth E, Dalen A and Unsgaard G: Epidermal growth factor receptor expression in human gliomas. *Cancer Immunol Immunother* 33: 61-64, 1991.
- Torp SH, Helseth E, Ryan L, Stolan S, Dalen A and Unsgaard G: Amplification of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Anticancer Res* 11: 2095-2098, 1991.
- Gan HK, Kaye AH and Luwor RB: The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *J Clin Neurosci* 16: 748-754, 2009.
- Lal A, Glazer CA, Martinson HM, Friedman HS, Archer GE, Sampson JH and Riggins GJ: Mutant epidermal growth factor receptor up-regulates molecular effectors of tumor invasion. *Cancer Res* 62: 3335-3339, 2002.
- Sampson JH, Heimberger AB, Archer GE, Aldape KD, Friedman AH, Friedman HS, Gilbert MR, Herndon JE II, McLendon RE, Mitchell DA, Reardon DA, Sawaya R, Schmittling RJ, Shi W, Vredenburgh JJ and Bigner DD: Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol* 28: 4722-4729, 2010.
- Maihle NJ, Baron AT, Barrette BA, Boardman CH, Christensen TA, Cora EM, Faupel-Badger JM, Greenwood T, Juneja SC, Lafky JM, Lee H, Reiter JL and Podratz KC: EGF/ ErbB receptor family in ovarian cancer. *Cancer Treat Res* 107: 247-258, 2002.
- Reiter JL and Maihle NJ: Characterization and expression of novel 60-kDa and 110-kDa EGFR isoforms in human placenta. *Ann NY Acad Sci* 995: 39-47, 2003.
- Reiter JL, Threadgill DW, Eley GD, Strunk KE, Danielsen AJ, Sinclair CS, Pearsall RS, Green PJ, Yee D, Lampland AL, Balasubramanian S, Crossley TD, Magnuson TR, James CD and Maihle NJ: Comparative genomic sequence analysis and isolation of human and mouse alternative EGFR transcripts encoding truncated receptor isoforms. *Genomics* 71: 1-20, 2001.
- Flickinger TW, Maihle NJ and Kung HJ: An alternatively processed mRNA from the avian c-erbB gene encodes a soluble, truncated form of the receptor that can block ligand-dependent transformation. *Mol Cell Biol* 12: 883-893, 1992.
- Weber W, Gill GN and Spiess J: Production of an epidermal growth factor receptor-related protein. *Science* 224: 294-297, 1984.
- Cadena DL and Gill GN: Expression and purification of the epidermal growth factor receptor extracellular domain utilizing a polycistronic expression system. *Protein Expr Purif* 4: 177-186, 1993.
- Greenfield C, Hiles I, Waterfield MD, Federwisch M, Wollmer A, Blundell TL and McDonald N: Epidermal growth factor binding induces a conformational change in the external domain of its receptor. *EMBO J* 8: 4115-4123, 1989.
- Basu A, Raghunath M, Bishayee S and Das M: Inhibition of tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor (EGF) receptor by a truncated receptor form that binds to EGF: role for interreceptor interaction in kinase regulation. *Mol Cell Biol* 9: 671-677, 1989.
- Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr, Di Maria MV, Veve R, Bremmes RM, Baron AE, Zeng C and Franklin WA: Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol* 21: 3798-3807, 2003.
- Guillaumeau A, Durand K, Pommepuy I, Robert S, Chaunavel A, Lacorre S, De Armas R, Bourtoomieux S, El Demery M, Moreau JJ and Labrousse F: Determination of EGFR status in gliomas: usefulness of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 17: 220-226, 2009.
- Pfaffl MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45, 2001.
- Korshunov A, Sycheva R and Golanov A: Molecular stratification of diagnostically challenging high-grade gliomas composed of small cells: the utility of fluorescence in situ hybridization. *Clin Cancer Res* 10: 7820-7826, 2004.

EGFR isoforms may be predictive of the therapeutic response to gefitinib in endometrial adenocarcinomas (40). Lafky and coworkers speculated that the soluble vascular endothelial growth factor receptor (sVEGFR) represents a paradigm for understanding the function and potential application of EGFR isoforms as novel therapeutic molecules (41). Soluble VEGFR isoforms have been presented as effective therapeutic molecules (42) and a similar application for certain EGFR truncated isoforms may be possible.

To our knowledge, this is the first report that gliomas express EGFR transcripts other than EGFRv1 mRNA, which encodes the full-length and functional EGFR isoform α . The role of EGFR isoforms in glioma pathogenesis remains to be clarified, but their expression makes them potential targets of future diagnostic and therapeutic strategies.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the 'Comité Départemental de la Ligue contre le Cancer de la Corrèze'. We thank Mrs. Marion Porcheron for technical assistance, the 'Tumoro-thèque du Limousin' for providing all tissue samples and the 'Plateforme d'Oncologie Moléculaire' of the Limoges Dupuytren University Hospital.

References

- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW and Kleihues P: The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114: 97-109, 2007.
- Krex D, Klink B, Hartmann C, von Deimling A, Pietsch T, Simon M, Sabel M, Steinbach JP, Heese O, Reifenberger G, Weller M and Schackert G: Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain* 130: 2596-2606, 2007.
- Andersson U, Guo D, Malmer B, Bergenheim AT, Brannstrom T, Hedman H and Henriksson R: Epidermal growth factor receptor family (EGFR, ErbB2-4) in gliomas and meningiomas. *Acta Neuropathol* 108: 135-142, 2004.
- Bredel M, Pollack IF, Hamilton RL and James CD: Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in high-grade non-brainstem gliomas of childhood. *Clin Cancer Res* 5: 1786-1792, 1999.
- McLendon RE, Turner K, Perkinson K and Rich J: Second messenger systems in human gliomas. *Arch Pathol Lab Med* 131: 1585-1590, 2007.
- Potti A, Forseen SE, Koka VK, Pervez H, Koch M, Fraiman G, Mehdi SA and Levitt R: Determination of HER-2/neu overexpression and clinical predictors of survival in a cohort of 347 patients with primary malignant brain tumors. *Cancer Invest* 22: 537-544, 2004.
- Schlegel J, Stumm G, Brandt K, Merdes A, Mechttersheimer G, Hynes NE and Kiessling M: Amplification and differential expression of members of the erbB-gene family in human glioblastoma. *J Neurooncol* 22: 201-207, 1994.
- Tabari U, Riesenstein S, Dromi Y, Leider-Trejo L, Constantini S, Burstein Y, Dvir R, Amariglio N, Toren A, Rechavi G, Izraeli S and Aviram A: Epidermal growth factor receptor gene amplification and expression in disseminated pediatric low-grade gliomas. *J Neurosurg* 103: 357-361, 2005.
- Gil-Benso R, Lopez-Gines C, Benito R, Lopez-Guerrero JA, Callaghan RC, Pellin A, Roldan P and Cerda-Nicolas M: Concurrent EGFR amplification and TP-53 mutation in glioblastomas. *Clin Neuropathol* 26: 224-231, 2007.
- Nakamura JL: The epidermal growth factor receptor in malignant gliomas: pathogenesis and therapeutic implications. *Expert Opin Ther Targets* 11: 463-472, 2007.
- Okada Y, Ohno C, Ueki K, Ogino M, Kawamoto S and Kim P: Comparison of numerical change of epidermal growth factor receptor gene among pre- and postirradiation glioma, and gliosis, and its clinical use. *Brain Tumor Pathol* 24: 15-18, 2007.
- Schober R, Bilzer T, Waha A, *et al.*: The epidermal growth factor receptor in glioblastoma: genomic amplification, protein expression, and patient survival data in a therapeutic trial. *Clin Neuropathol* 14: 169-174, 1995.
- Shinojima N, Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, Kochi M, Nakamura H, Makino K, Saya H, Hirano H, Kuratsu J, Oka K, Ishimaru Y and Ushio Y: Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 63: 6962-6970, 2003.
- Torp SH, Helseth E, Dalen A and Unsgaard G: Epidermal growth factor receptor expression in human gliomas. *Cancer Immunol Immunother* 33: 61-64, 1991.
- Torp SH, Helseth E, Ryan L, Stolan S, Dalen A and Unsgaard G: Amplification of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Anticancer Res* 11: 2095-2098, 1991.
- Gan HK, Kaye AH and Luwor RB: The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *J Clin Neurosci* 16: 748-754, 2009.
- Lal A, Glazer CA, Martinson HM, Friedman HS, Archer GE, Sampson JH and Riggins GJ: Mutant epidermal growth factor receptor up-regulates molecular effectors of tumor invasion. *Cancer Res* 62: 3335-3339, 2002.
- Sampson JH, Heimberger AB, Archer GE, Aldape KD, Friedman AH, Friedman HS, Gilbert MR, Herndon JE II, McLendon RE, Mitchell DA, Reardon DA, Sawaya R, Schmittling RJ, Shi W, Vredenburgh JJ and Bigner DD: Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol* 28: 4722-4729, 2010.
- Maihle NJ, Baron AT, Barrette BA, Boardman CH, Christensen TA, Cora EM, Faupel-Badger JM, Greenwood T, Juneja SC, Lafky JM, Lee H, Reiter JL and Podratz KC: EGF/ ErbB receptor family in ovarian cancer. *Cancer Treat Res* 107: 247-258, 2002.
- Reiter JL and Maihle NJ: Characterization and expression of novel 60-kDa and 110-kDa EGFR isoforms in human placenta. *Ann NY Acad Sci* 995: 39-47, 2003.
- Reiter JL, Threadgill DW, Eley GD, Strunk KE, Danielsen AJ, Sinclair CS, Pearsall RS, Green PJ, Yee D, Lampland AL, Balasubramanian S, Crossley TD, Magnuson TR, James CD and Maihle NJ: Comparative genomic sequence analysis and isolation of human and mouse alternative EGFR transcripts encoding truncated receptor isoforms. *Genomics* 71: 1-20, 2001.
- Flickinger TW, Maihle NJ and Kung HJ: An alternatively processed mRNA from the avian c-erbB gene encodes a soluble, truncated form of the receptor that can block ligand-dependent transformation. *Mol Cell Biol* 12: 883-893, 1992.
- Weber W, Gill GN and Spiess J: Production of an epidermal growth factor receptor-related protein. *Science* 224: 294-297, 1984.
- Cadena DL and Gill GN: Expression and purification of the epidermal growth factor receptor extracellular domain utilizing a polycistronic expression system. *Protein Expr Purif* 4: 177-186, 1993.
- Greenfield C, Hiles I, Waterfield MD, Federwisch M, Wollmer A, Blundell TL and McDonald N: Epidermal growth factor binding induces a conformational change in the external domain of its receptor. *EMBO J* 8: 4115-4123, 1989.
- Basu A, Raghunath M, Bishayee S and Das M: Inhibition of tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor (EGF) receptor by a truncated receptor form that binds to EGF: role for interreceptor interaction in kinase regulation. *Mol Cell Biol* 9: 671-677, 1989.
- Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr, Di Maria MV, Veve R, Bremmes RM, Baron AE, Zeng C and Franklin WA: Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol* 21: 3798-3807, 2003.
- Guillaudeau A, Durand K, Pommepuy I, Robert S, Chaunavel A, Lacorre S, De Armas R, Bourtoimieux S, El Demery M, Moreau JJ and Labrousse F: Determination of EGFR status in gliomas: usefulness of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 17: 220-226, 2009.
- Pfaffl MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45, 2001.
- Korshunov A, Sycheva R and Golanov A: Molecular stratification of diagnostically challenging high-grade gliomas composed of small cells: the utility of fluorescence in situ hybridization. *Clin Cancer Res* 10: 7820-7826, 2004.

VI. Discussion et perspectives

Les tumeurs gliales font l'objet d'investigations intensives en recherche fondamentale et appliquée. Depuis plusieurs années, nos travaux s'orientent vers l'étude de marqueurs moléculaires dans les gliomes infiltrants. A l'instar d'autres équipes, nos résultats ont contribué à établir une classification histo-moléculaire des gliomes qui regroupe à la fois des critères histologiques et des critères moléculaires qu'ils soient génétiques, épigénétiques, génomiques ou protéiques. L'objectif de cette classification est d'aider à un diagnostic plus précis et plus reproductible des tumeurs gliales, puisque c'est en grande partie de ce diagnostic que dépendent le pronostic et la prise en charge thérapeutique des patients.

Nos travaux ont montré que la perte complète des bras chromosomiques 1p et 19q, ainsi qu'une forte expression d'Olig2 et de l'alpha-internexine (INA) sont des anomalies fortement évocatrices d'une tumeur oligodendrogliale et des facteurs de bon pronostic (*Durand et al. 2010*). En revanche, la perte complète du chromosome 10, l'amplification du gène *EGFR* et la surexpression de P53 sont spécifiques des tumeurs astrocytaires tels que les astrocytomes anaplasiques et les glioblastomes, et sont des facteurs de mauvais pronostic (*Durand et al. 2011*). Le caractère exclusif de ces deux types d'altérations en fait des marqueurs fiables pour le diagnostic et la détermination du pronostic des patients. Même si la future classification histo-moléculaire des gliomes retient surtout le statut 1p19q comme élément décisionnel accompagné des recherches séquentielles des altérations des gènes *IDH*, *ATRX* et *TERT*, les autres marqueurs sont couramment utilisés en pratique de routine dans les laboratoires. En effet, comme nous l'avons expliqué précédemment, l'analyse INA peut par exemple orienter ou confirmer un diagnostic si le prélèvement sanguin nécessaire à la recherche 1p19q n'a pas pu être obtenu. La perte complète du chromosome 10 et l'amplification du gène *EGFR* sont recherchées en routine car ils confirment non seulement un diagnostic d'astrocytome anaplasique et de glioblastome, mais ils permettent également au clinicien d'appréhender le pronostic du patient et de décider d'une prise en charge appropriée.

La valeur prédictive de réponse à la chimiothérapie reste incertaine pour la plupart des marqueurs, à l'exception de la perte 1p19q qui permet de prédire d'une sensibilité des patients au PCV (Procarbazine, Lomustine, Vincristine). Le lien entre la perte des chromosomes 1p19q et la sensibilité à la chimiothérapie n'a pas encore été élucidé car les régions chromosomiques perdues comportent des centaines voire des milliers de gènes, oncogènes, onco-supresseurs ou autres pouvant être impliqués dans le mécanisme de sensibilité. La valeur prédictive de la méthylation de *MGMT* reste à ce jour très controversée du fait de

l'étendu du nombre de sites CpG concernés par la méthylation et de l'absence de consensus des techniques employées pour cette analyse.

Nous poursuivons actuellement la recherche de marqueurs histo-moléculaires utiles à la classification des tumeurs gliales, notamment de marqueurs spécifiques de la composante infiltrante des glioblastomes qui reste problématique pour l'exérèse chirurgicale et la récurrence des tumeurs. Cette étude est réalisée par séquençage haut débit qui permet d'analyser les altérations de plus de 400 gènes précurseurs dans l'oncogenèse.

Récemment, nous avons montré que des isoformes tronquées de l'EGFR au niveau du domaine tyrosine kinase sont fortement exprimées dans les gliomes et en particulier dans les glioblastomes (*Guillaudeau et al. 2012*). Ces isoformes n'ont pas été étudiées auparavant dans la pathologie gliale. Pourtant leur forte expression dans les tissus et leur présence dans le sérum des patients atteints de plusieurs pathologies cancéreuses, comme les cancers bronchopulmonaires, cancers du col de l'utérus (*Oh et al. 2000*), de l'ovaire, du sein (*Baron et al. 2009 ; Baron et al. 2001 ; Muller et al. 2006*), colorectaux (*Zampino et al. 2008*) ou encore les méningiomes (*Durand et al. 2012*) suggèrent qu'elles pourraient jouer un rôle important dans la tumorigenèse. Ces isoformes tronquées/solubles possédant uniquement le domaine extracellulaire de l'EGFR, représentent des cibles potentielles compétitives des thérapies ciblées anti-EGFR dirigées contre le domaine extracellulaire du récepteur. Une étude du rôle physiopathologique des isoformes tronquées de l'EGFR est en cours : une lignée cellulaire de glioblastome modifiée génétiquement pour surexprimer l'une ou l'autre des isoformes tronquées sera étudiée pour élucider le mécanisme d'interaction entre ces isoformes et le récepteur entier, et la signalisation intracellulaire en résultant. La réponse des cellules surexprimant les récepteurs tronqués à une thérapie ciblée anti-EGFR est également en cours pour connaître leur part de responsabilité dans l'échec de ces thérapeutiques dans les tumeurs gliales.

VII. Conclusion

Comme dans d'autres pathologies cancéreuses, l'apport de la génétique et de la génomique dans la prise en charge de tumeurs gliales est considérable. La future classification de l'Organisation Mondiale de la Santé est une classification histo-moléculaire qui regroupe de manière consensuelle, des marqueurs histologiques à présent bien connus dans la pathologie gliale et des marqueurs moléculaires plus récents. Un logigramme décisionnel qui conduira à classer différemment les tumeurs permettra ainsi d'homogénéiser les pratiques diagnostiques et d'influer de ce fait sur la prise en charge thérapeutique du patient.

De nombreux champs d'investigations sont encore ouverts car, malgré le nombre considérable d'essais cliniques concernant les tumeurs cérébrales, il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement qui améliore de façon optimale la survie des patients.

VIII. Bibliographie

- Abedalthagafi M, Phillips JJ, Kim GE, et al. The alternative lengthening of telomere phenotype is significantly associated with loss of ATRX expression in high-grade pediatric and adult astrocytomas: a multi-institutional study of 214 astrocytomas. *Mod Pathol*. 2013, 26:1425–1432.
- Aldape K, Burger PC, Perry A. Clinicopathologic aspects of 1p/19q loss and the diagnosis of oligodendroglioma. *Arch Pathol Lab Med*. 2007 Feb;131(2):242-51.
- Andersson U, Guo D, Malmer B et al. Epidermal growth factor receptor family (EGFR, ErbB2-4) in gliomas and meningiomas. *Acta Neuropathol*. 2004 Aug;108(2):135-42.
- Andon A, Grill J, Vassal G, *et al*. *Les tumeurs du système nerveux central*. Paris: Institut Gustave Roussy 2005.
- Arslantas A, Artan S, Oner U et al. Genomic alterations in low-grade, anaplastic astrocytomas and glioblastomas. *Pathol Oncol Res*. 2007;13(1):39-46.
- Bals J, Meyer J, Mueller W et al. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol*. 2008 Dec;116(6):597-602.
- Barbashina V, Salazar P, Holland EC et al. Allelic losses at 1p36 and 19q13 in gliomas: correlation with histologic classification, definition of a 150-kb minimal deleted region on 1p36, and evaluation of CAMTA1 as a candidate tumor suppressor gene. *Clin Cancer Res*. 2005 Feb 1;11(3):1119-28.
- Baron AT, Lafky JM, Suman VJ et al. A preliminary study of serum concentrations of soluble epidermal growth factor receptor (sErbB1), gonadotropins, and steroid hormones in healthy men and women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001 Nov;10(11):1175-85.
- Baron AT, Wilken JA, Haggstrom DE et al. Clinical implementation of soluble EGFR (sEGFR) as a theragnostic serum biomarker of breast, lung and ovarian cancer. *IDrugs*. 2009 May;12(5):302-8.
- Bello MJ, de Campos JM, Kusak ME et al. Molecular analysis of genomic abnormalities in human gliomas. *Cancer Genet Cytogenet*. 1994 Apr;73(2):122-9.
- Boisselier B, Gallego Perez-Larraya J, Rossetto M et al. Detection of IDH1 mutation in the plasma of patients with glioma. *Neurology*. 2012 Oct 3.
- Boulay JL, Miserez AR, Zweifel C et al. Loss of NOTCH2 positively predicts survival in subgroups of human glial brain tumors. *PLoS One*. 2007;2(6):e576.
- Brandner S, von Deimling A. Diagnostic, prognostic and predictive relevance of molecular markers in gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2015 Oct;41(6):694-720.
- Brat D, Verhaak R, Dape K et al. Comprehensive, integrative genomic analysis of diffuse lower-grade gliomas. 2015;372:2481-2498.

Bredel M, Pollack IF, Hamilton RL et al. Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in high-grade non-brainstem gliomas of childhood. *Clin Cancer Res*. 1999 Jul;5(7):1786-92.

Capper D, Zentgraf H, Balsl J et al. Monoclonal antibody specific for IDH1 R132H mutation. *Acta Neuropathol*. 2009 Nov;118(5):599-601.

Cairncross JG. Cognition in survivors of high-grade glioma. *J Clin Oncol*. 1998 Sep;16(9):3210-1.

Cairncross G, Berkey B, Shaw E et al. Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *J Clin Oncol*. 2006 Jun 20;24(18):2707-14.

Chinot OL, Wick W, Mason W et al. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med*. 2014 Feb 20;370(8):709-22.

Clynes D, Jelinska C, Xella B, et al. ATRX dysfunction induces replication defects in primary mouse cells. *PLoS One*. 2014; 9: e92915.

Collins VP. Brain tumours: classification and genes. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2004 Jun;75 Suppl 2:ii2-11.

Daumas-Duport C, Beuvon F, Varlet P et al. Gliomes : classifications de l'OMS et de l'Hôpital Sainte-Anne. *Ann Pathol*. 2000 Oct;20(5):413-28.

Dietemann J-L. *Neuro-Imagerie diagnostique : 2^{ème} édition*. Ed Elsevier Masson 2012, 844p.

Ducray F, Idhah A, de Reynies A, et al. Anaplastic oligodendrogliomas with 1p19q codeletion have a proneural gene expression profile. *Mol Cancer* 2008; 7:41.

Ducray F, Criniere E, Idhah A, et al. Alpha-Internexin expression identifies 1p19q codeleted gliomas. *Neurology* 2009; 72:156-61.

Ducray F, Mokhtari K, Crinière E et al. Diagnostic and prognostic value of alpha internexin expression in a series of 409 gliomas. *Eur J Cancer*. 2011 Mar;47(5):802-8.

Durand KS, Guillaudeau A, Weinbreck N et al. 1p19q LOH patterns and expression of p53 and Olig2 in gliomas: relation with histological types and prognosis. *Mod Pathol*. 2010; Apr;23(4):619-28.

Durand K, Guillaudeau A, Pommepuy I, et al. Alpha-internexin expression in gliomas: relationship with histological type and 1p, 19q, 10p and 10q status. *J Clin Pathol*. 2011; Sep;64(9):793-801.

Estrada-Bernal A, Lawler SE, Nowicki MO et al. The role of sphingosine kinase-1 in EGFRvIII-regulated growth and survival of glioblastoma cells. *J Neurooncol*. 2011; May102(3):353-66.

Fédération Nationale des centres de lutte contre le cancer. Standards, Options et Recommandations pour la prise en charge des adultes atteints de gliomes intracrâniens. 2002 1-297.

Felsberg J, Erkwow A, Sabel MC et al. Oligodendroglial tumors: refinement of candidate regions on chromosome arm 1p and correlation of 1p/19q status with survival. *Brain Pathol.* 2004 Apr;14(2):121-30.

Foote M, Papadopoulos M, Diaz L. Genetic classification of gliomas: refining histopathology. *Cancer cell.* 2015;13:9-11.

Gan HK, Kaye AH, Luwor RB. The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *J Clin Neurosci.* 2009 Jun;16(6):748-54.

Giannini C, Burger PC, Berkey BA et al. Anaplastic oligodendroglial tumors: refining the correlation among histopathology, 1p 19q deletion and clinical outcome in Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *Brain Pathol.* 2008 Jul;18(3):360-9.

Gil-Benso R, Lopez-Gines C, Benito R et al. Concurrent EGFR amplification and TP-53 mutation in glioblastomas. *Clin Neuropathol.* 2007 Sep-Oct;26(5):224-31.

Gilbert MR. Renewing interest in targeting angiogenesis in glioblastoma. *Lancet Oncol.* 2014 Aug;15(9):907-8.

Griffin CA, Burger P, Morsberger L, et al. Identification of der(1;19)(q10;p10) in five oligodendrogliomas suggests mechanism of concurrent 1p and 19q loss. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006 Oct;65(10):988-94.

Gross MW, Kraus A, Nashwan K et al, Engenhardt-Cabillic R, Schlegel J. Expression of p53 and p21 in primary glioblastomas. *Strahlenther Onkol.* 2005 Mar;181(3):164-71.

Guillaudeau A, Durand K, Rabinovitch-Chable H et al. Adult diffuse gliomas produce mRNA transcripts encoding EGFR isoforms lacking a tyrosine kinase domain. *Int J Oncol.* 2012 Apr;40(4):1142-52.

Guillaudeau A, Durand K, Bessette B et al. EGFR soluble isoforms and their transcripts are expressed in meningiomas. *PLoS One.* 2012;7(5):e37204.

Hartmann C, Meyer J, Balss J et al. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol.* 2009 Oct;118(4):469-74.

Hata N, Yoshimoto K, Yokoyama N et al. Allelic losses of chromosome 10 in glioma tissues detected by quantitative single-strand conformation polymorphism analysis. *Clinical chemistry.* 2006 Mar;52(3):370-8.

Havik AB, Brandal P, Honne H et al. MGMT promoter methylation in gliomas-assessment by pyrosequencing and quantitative methylation-specific PCR. *J Transl Med.* 2012;10:36.

Heimberger AB, Sampson JH. The PEPvIII-KLH (CDX-110) vaccine in glioblastoma multiforme patients. *Expert Opin Biol Ther*. 2009 Aug;9(8):1087-98

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T et al. *MGMT* gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005 Mar 10;352(10):997-1003.

Hoang-Xuan K, He J, Huguet S et al. Molecular heterogeneity of oligodendrogliomas suggests alternative pathways in tumor progression. *Neurology*. 2001 Oct 9;57(7):1278-81.

Hoang-Xuan K, Idbaih A, Mokhtari K, et al. Towards a molecular classification of gliomas. *Bull Cancer*. 2005 Apr;92(4):310-6

Hoang-Xuan K1, Idbaih A. Advances in molecular genetics and treatment of gliomas. *Bull Acad Natl Med*. 2011;195(1):11-20.

Ichimura K, Bolin MB, Goike HM et al. Deregulation of the p14ARF/MDM2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities. *Cancer Res*. 2000 Jan 15;60(2):417-24.

Ichimura K, Vogazianou AP, Liu L et al. 1p36 is a preferential target of chromosome 1 deletions in astrocytic tumours and homozygously deleted in a subset of glioblastomas. *Oncogene*. 2008 Mar 27;27(14):2097-108.

Ichimura K, Pearson DM, Kocialkowski S et al. IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro Oncol*. 2009 Aug;11(4):341-7.

Idbaih A, Marie Y, Lucchesi C et al. BAC array CGH distinguishes mutually exclusive alterations that define clinicogenetic subtypes of gliomas. *Int J Cancer*. 2008 Apr 15;122(8):1778-86.

Idbaih A, Marie Y, Pierron G, Brennetot C et al. Two types of chromosome 1p losses with opposite significance in gliomas. *Ann Neurol*. 2005 Sep;58(3):483-7.

Inda MM, Bonavia R, Mukasa A et al. Tumor heterogeneity is an active process maintained by a mutant EGFR-induced cytokine circuit in glioblastoma. *Genes Dev*. 2010; Aug 15;24(16):1731-45.

Ino Y, Betensky RA, Zlatescu MC et al. Molecular subtypes of anaplastic oligodendroglioma: implications for patient management at diagnosis. *Clin Cancer Res*. 2001 Apr;7(4):839-45.

Institut de Veille Sanitaire. Estimation de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012 - Tumeurs solides : IN « surveillance épidémiologique des cancers ». Disponible sur <http://www.invs.sante.fr> (23/10/2015).

Institut National du Cancer. Les pesticides. Disponible sur <http://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Reduire-les-risques-de-cancer/Environnement/Les-pesticides> (18/10/2015).

Institut National du Cancer. Environnement. Disponible sur <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Tumeurs-du-cerveau/Facteurs-de-risque/Environnement> (18/10/2015).

Ionescu DN, Sasatomi E, Ciepły K et al. Protein expression and gene amplification of epidermal growth factor receptor in thymomas. *Cancer*. 2005 Feb 1;103(3):630-6.

Jiao Y, Killela PJ, Reitman ZJ, et al. Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget*. 2012;3:709–722.

Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, et al. A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res*. 2006 Oct 15;66(20):9852-61.

Jeuken J, Sijben A, Alenda C et al. Robust detection of EGFR copy number changes and EGFR variant III: technical aspects and relevance for glioma diagnostics. *Brain Pathol*. 2009 Oct;19(4):661-71.

Kannan K, Inagaki A, Silber J et al. Whole-exome sequencing identifies ATRX mutations as a key molecular determinant in lower-grade glioma. *Oncotarget*. 2012;3:1194-1203.

Kato Y, Jin G, Kuan CT et al. A monoclonal antibody IMab-1 specifically recognizes IDH1R132H, the most common glioma-derived mutation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Dec 18;390(3):547-51.

Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2013;110:6021-6026.

Kitange G, Misra A, Law M et al. Chromosomal imbalances detected by array comparative genomic hybridization in human oligodendrogliomas and mixed oligoastrocytomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005 Jan;42(1):68-77.

Kleihues P, Ohgaki H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol*. 1999 Jan;1(1):44-51.

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 Dec 1;10(23):7820-6.

Lal A, Glazer CA, Martinson HM, Friedman HS, Archer GE, Sampson JH, et al. Mutant epidermal growth factor receptor up-regulates molecular effectors of tumor invasion. *Cancer Res*. 2002 Jun 15;62(12):3335-9.

Lavon I, Zrihan D, Zelikovitch B et al. Longitudinal assessment of genetic and epigenetic markers in oligodendrogliomas. *Clin Cancer Res*. 2007 Mar 1;13(5):1429-37.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007 Aug;114(2): 97-109.

Louis DN, Wiestler OD, Cavenee WK. WHO Classification of tumours of the central nervous system. Lyon: IARC Press 2007.

Louis DN, Holland EC, Cairncross JG. Glioma classification: a molecular reappraisal. *Am J Pathol.* 2001 Sep;159(3):779-86.

Mason S, McDonald K. MGMT testing for glioma in clinical laboratories: discordance with methylation analyses prevents the implementation of routine immunohistochemistry. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012 Nov;138(11):1789-97.

McLendon RE, Turner K, Perkinson K et al. Second messenger systems in human gliomas. *Arch Pathol Lab Med.* 2007 Oct;131(10):1585-90.

Mischel PS, Cloughesy TF. Targeted molecular therapy of GBM. *Brain Pathol.* 2003 Jan;13(1):52-61. (a)

Mischel PS, Nelson SF, Cloughesy TF. Molecular analysis of glioblastoma: pathway profiling and its implications for patient therapy. *Cancer Biol Ther.* 2003 May-Jun;2(3):242-7. (b)

Mischel PS, Shai R, Shi T, et al. Identification of molecular subtypes of glioblastoma by gene expression profiling. *Oncogene.* 2003 Apr 17;22(15):2361-73. (c)

Mollenhauer J, Wiemann S, Scheurlen W et al. DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumours. *Nature genetics.* 1997 Sep;17(1):32-9.

Mokhtari K, Ducray F, Kros JM et al. Alpha-internexin expression predicts outcome in anaplastic oligodendroglial tumors and may positively impact the efficacy of chemotherapy: European organization for research and treatment of cancer trial 26951. *Cancer.* 2011 Jul 1;117(13):3014-26.

Mukasa A, Wykosky J, Ligon KL, et al. Mutant EGFR is required for maintenance of glioma growth in vivo, and its ablation leads to escape from receptor dependence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 9;107(6):2616-21.

Muller V, Witzel I, Pantel K et al. Prognostic and predictive impact of soluble epidermal growth factor receptor (sEGFR) protein in the serum of patients treated with chemotherapy for metastatic breast cancer. *Anticancer Res.* 2006 Mar-Apr;26(2B):1479-87.

Nagane M, Lin H, Cavenee WK et al. Aberrant receptor signaling in human malignant gliomas: mechanisms and therapeutic implications. *Cancer Lett.* 2001 Jan;162 Suppl:S17-S21.

Nakamura JL. The epidermal growth factor receptor in malignant gliomas: pathogenesis and therapeutic implications. *Expert Opin Ther Targets.* 2007 Apr;11(4):463-72.

Ochsenbein AF, Schubert AD, Vassella et al. Quantitative analysis of O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation in patients with low-grade gliomas. *J Neurooncol.* 2011 Jun;103(2):343-51.

Oh MJ, Choi JH, Kim IH et al. Detection of epidermal growth factor receptor in the serum of patients with cervical carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2000 Dec;6(12):4760-3.

Ohgaki H, Dessen P, Jourde B et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res*. 2004 Oct 1;64(19):6892-9.

Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005 Jun;64(6):479-89.

Okada Y, Hurwitz EE, Esposito JM et al. Selection pressures of TP53 mutation and microenvironmental location influence epidermal growth factor receptor gene amplification in human glioblastomas. *Cancer Res*. 2003 Jan 15;63(2):413-6.

Okada Y, Ohno C, Ueki K et al. Comparison of numerical change of epidermal growth factor receptor gene among pre- and postradiation glioma, and gliosis, and its clinical use. *Brain Tumor Pathol*. 2007;24(1):15-8.

Parsons DW, Jones S, Zhang X et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science (New York, NY)*. 2008 Sep 26;321(5897):1807-12.

Preusser M, Wohrer A, Stary S et al. Value and limitations of immunohistochemistry and gene sequencing for detection of the IDH1-R132H mutation in diffuse glioma biopsy specimens. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2011 Aug;70(8):715-23.

Potti A, Forseen SE, Koka VK et al. Determination of HER-2/neu overexpression and clinical predictors of survival in a cohort of 347 patients with primary malignant brain tumors. *Cancer Invest*. 2004;22(4):537-44.

Reddy KS. Assessment of 1p/19q deletions by fluorescence in situ hybridization in gliomas. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008 Jul 15;184(2):77-86.

Reiter JL, Maihle NJ. Characterization and expression of novel 60-kDa and 110-kDa EGFR isoforms in human placenta. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003 May;995:39-47.

Reiter JL, Threadgill DW, Eley GD et al. Comparative genomic sequence analysis and isolation of human and mouse alternative EGFR transcripts encoding truncated receptor isoforms. *Genomics*. 2001 Jan 1;71(1):1-20.

Reuss DE, Sahm F, Schrimpf D et al. ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry with subsequent copy number analysis and IDH sequencing as a basis for an "integrated" diagnostic approach for adult astrocytoma, oligodendroglioma and glioblastoma. *Acta Neuropathol*. 2015 Jan;129(1):133-46.

Rossetto M, Ciccarino P, Boisselier B et al. Metabolism of glioma and IDH1/IDH2 mutations. *Rev Neurol (Paris)*. 2011 Oct;167(10):699-703.

Sampson JH, Heimberger AB, Archer GE et al. Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide

vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol.* 2010; Nov 1;28(31):4722-9.

Sanderson MP, Keller S, Alonso A et al. Generation of novel, secreted epidermal growth factor receptor (EGFR/ErbB1) isoforms via metalloprotease-dependent ectodomain shedding and exosome secretion. *J Cell Biochem.* 2008 Apr 15;103(6):1783-97.

Sanson M, Marie Y, Paris S et al. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol.* 2009 Sep 1;27(25):4150-4.

Schlegel J, Stumm G, Brandle K et al. Amplification and differential expression of members of the erbB-gene family in human glioblastoma. *J Neurooncol.* 1994;22(3):201-7.

Schmidt EE, Ichimura K, Goike HM et al. Mutational profile of the PTEN gene in primary human astrocytic tumors and cultivated xenografts. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1999 Nov;58(11):1170-83.

Schmidt EE, Ichimura K, Reifenberger G, Collins VP. CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res.* 1994 Dec 15;54(24):6321-4.

Schober R, Bilzer T, Waha A et al. The epidermal growth factor receptor in glioblastoma: genomic amplification, protein expression, and patient survival data in a therapeutic trial. *Clin Neuropathol.* 1995 May-Jun;14(3):169-74.

Schwartzentruber J, Korshunov A, Liu XY et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature.* 2012;482:226–231.

Shinojima N, Tada K, Shiraishi S et al. Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res.* 2003 Oct 15;63(20):6962-70.

Siegel T. Clinical impact of molecular biomarkers in gliomas. *J. Clin. Neurosci.* 2015; 22:437-444.

Smith JS, Alderete B, Minn Y et al. Localization of common deletion regions on 1p and 19q in human gliomas and their association with histological subtype. *Oncogene.* 1999 Jul 15;18(28):4144-52.

Sonoda Y, Kumabe T, Nakamura T et al. Analysis of IDH1 and IDH2 mutations in Japanese glioma patients. *Cancer Sci.* 2009 Oct;100(10):1996-8.

Soussi T. The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2000 Jun;910:121-37; discussion 37-9.

Stupp R, Mason WP, Van den Bent MJ et al. European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352:987-96.

Tabori U, Rienstein S, Dromi Y et al. Epidermal growth factor receptor gene amplification and expression in disseminated pediatric low-grade gliomas. *J Neurosurg.* 2005 Oct;103(4 Suppl):357-61.

Taal W, Bromberg JE, van den Bent MJ. Chemotherapy in glioma. *CNS Oncol.* 2015;4(3):179-92.

Torp SH, Helseth E, Dalen A et al. Epidermal growth factor receptor expression in human gliomas. *Cancer Immunol Immunother.* 1991;33(1):61-4.

Torp SH, Helseth E, Ryan L et al. Amplification of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Anticancer Res.* 1991 Nov-Dec;11(6):2095-8.

Ueki K, Ono Y, Henson JW et al. CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res.* 1996 Jan 1;56(1):150-3.

Ueki K, Nishikawa R, Nakazato Y et al. Correlation of histology and molecular genetic analysis of 1p, 19q, 10q, TP53, EGFR, CDK4, and CDKN2A in 91 astrocytic and oligodendroglial tumors. *Clin Cancer Res.* 2002 Jan;8(1):196-201.

Uno M, Oba-Shinjo SM, Camargo AA et al. Correlation of MGMT promoter methylation status with gene and protein expression levels in glioblastoma. *Clinics (Sao Paulo).* 2011;66(10):1747-55.

van den Bent MJ, Hegi ME, Stupp R. Recent developments in the use of chemotherapy in brain tumours. *Eur J Cancer.* 2006 Mar;42(5):582-8.

Varella-Garcia M. Stratification of non-small cell lung cancer patients for therapy with epidermal growth factor receptor inhibitors: the EGFR fluorescence in situ hybridization assay. *Diagnostic pathology.* 2006;1:19.

Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P et al. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol.* 2009 Apr;174(4):1149-53.

Weller M, Stupp R, Reifenberger G et al. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol.* 2010 Jan;6(1):39-51.

Weller M, Wick W, Hegi ME, et al. Should biomarkers be used to design personalized medicine for the treatment of glioblastoma? *Future Oncol.* 2010 Sep;6(9):1407-14.

Wiestler B, Capper D, Holland-Letz T, et al. ATRX loss refines the classification of anaplastic gliomas and identifies a subgroup of IDH mutant astrocytic tumors with better prognosis. *Acta Neuropathol.* 2013;126:443-451.

Wiestler B, Capper D, Sill M, et al. Integrated DNA methylation and copy-number profiling identify three clinically and biologically relevant groups of anaplastic glioma. *Acta Neuropathol.* 2014 ; 128 : 561-571.

Yakut T, Gutenberg A, Bekar A et al. Correlation of chromosomal imbalances by comparative genomic hybridization and expression of EGFR, PTEN, p53, and MIB-1 in diffuse gliomas. *Oncol Rep.* 2007 May;17(5):1037-43.

Yan H, Parsons DW, Jin G et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 2009 Feb 19;360(8):765-73.

Zampino MG, Magni E, Santoro L et al. Epidermal growth factor receptor serum (sEGFR) level may predict response in patients with EGFR-positive advanced colorectal cancer treated with gefitinib? *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008 Dec;63(1):139-48.

Zhao S, Lin Y, Xu W et al. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 α . *Science (New York, NY).* 2009 Apr 10;324(5924):261-5.

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Table des annexes

ANNEXE 1. RECAPITULATIF DES TRAITEMENTS USUELS ET EXPERIMENTAUX DES TUMEURS GLIALES	91
--	-----------

Annexe 1. Récapitulatif des traitements usuels et expérimentaux des tumeurs gliales

Nom Générique	Nom de produit	Compagnie	Statut	Mode d'action	Commentaires
Thérapies usuels					
Témozolomide	Temodal	Schering-plough	Approuvé pour gliomes malins	Méthylation, ajout de CH3 sur les sites O6 et N7 de la guanine. Alkylant	Chimiothérapie orale. Le Temodal n'est pas actif directement mais est converti en une substance active à PH physiologique.
Carmustine	BICNU	Bristol-Myers-Sqibb	Approuvé pour gliomes malins	Action identique au Temodal, Méthylation, ajout de CH3 sur les sites O6 et N7 de la guanine. Alkylant	Chimiothérapie par intra-veineuse toutes les 6 semaines
Tamoxifen	Nolvadex	AstraZeneca	Approuvé ailleurs	Inhibiteur de la PKC (Protéine Kinase C) à hautes doses.	
Poliféprosan 20 avec implant de Carmustine	Gliadel	Pharmaceutiques De Guilford	Approuvé pour gliomes malins	L'implant décharge lentement la chimiothérapie dans le lit de tumeur.	
Célécoxib	Célébrex	Pfizer	Approuvé ailleurs	Inhibiteur Cox-2	Célécoxib est anti-inflammatoire non-steroidien qui empêche la synthèse de la prostaglandine en empêchant spécifiquement l'enzyme cyclooxygénase-2 (Cox-2). L'inhibition de l'activité Cox-2 enzymatique a réduit la prolifération et la migration des glioblastomes.
Etoposide	Vp-16	Nobex	Approuvé ailleurs	Chimiothérapie antitopoïsomérase II	Etoposide ne peut pas croiser la barrière hémato-méningée. Le laboratoire a développé un Etoposide plus soluble qui croise la barrière hématoencéphalique.
Irinotécan	Camptosar (Cpt-11)	Pfizer	Approuvé ailleurs	Chimiothérapie antitopoïsomérase I	Synergie avec Avastin
Carboplatine					IV de 300 à 400 mg/m2 toutes les 3 à 4 semaines
Fotemustine	Muphoran	Servier		Chimiothérapie alkylante	Nitroso-urée, alkylation, IV toutes les semaines 3 fois puis toutes les 3 semaines à 100mg/m2.
Lomustine (CCNU)	Belustine	Stakan		Chimiothérapie alkylante	Nitrosourée, alkylation. Chimiothérapie, orale, 75mg/m2 toutes les 3 semaines
Doxorubicine	Doxo ou	Schering-Plough		Chimio antitopoïsomérase II	Dans la forme liposomiale, la doxorubicine est

liposomiale	Adriamycine				encapsulée dans un enduit gras, un liposome qui lui permet de mieux pénétrer dans la tumeur à travers les vaisseaux tortueux et étroits de la tumeur.
	Caelyx				
	Myocet				
Thérapies pour contrer la résistance aux chimiothérapies					
06-benzylguanine	Alkylade	Pharmaceutiques Pacifiques	I	MGMT inhibiteur	
ABT-888		Laboratoires Abbott	Ib	PARP-1 inhibiteur	Synergie avec Témodal Asco 2008
BSI-201		BiPar Sciences	Ib	PARP-1 inhibiteur	Bénéfice avec Campto, Carboplatine et Temodal Asco 2008
RTA744		Realta Pharmaceuticals	I		Bénéfice avec Doxorubicine
ANG1005		Angiochem	I(10/07-12/08)		1 IV toutes les 3 semaines, vecteur de Paclitaxel. Bénéfice avec Paclitaxel qui traverse la barrière sang-tumeur.

Délivrance sur le site de la tumeur convection rehaussée (CED)					
AP12009		Antisense Pharma GmbH	Iib	Inhibiteur de TGF-β2	
PRX 321	IL 4-PE	Protox Therapeutics	Iib	Se lie aux récepteurs de l'Interleukine 4.	IL-4-PE ou PRX 321 se lie aux récepteur IL4 à la surface des cellules tumorales. PE ou exotoxine Pseudomonas est un agent cytotoxique. Infusion par CED de 60 ml de 2 à 7 jours. PRX321 est en développement clinique pour le traitement du cancer primitif du cerveau, l'astrocytome malin et plus particulièrement le glioblastome multiforme (GBM). Une phase II terminée chez les patients atteints d'un GBM récurrent ou évolutif n'a révélé aucune toxicité systémique .
Cintredekin besudotox	IL 13-PE38QQR	Neopharm	III	Se lie aux récepteurs de l'Interleukine 13.	IL13-PE38QQR (cintredexin besudotox) se lie aux récepteurs d'IL13 à la surface des cellules tumorales. Cintredekin besudotox est aujourd'hui en essais cliniques de Phase III dans plus de 100 hôpitaux en Allemagne, Angleterre, Pays-Bas, Etats-Unis, Israël et pas en France.

Thérapies antiangiogéniques (inhibiteurs d'intégrine, de HGF, de VEGF, de VEGFR)					
EMD 121974	Cilengitide	EMD Pharmaceuticals	I	Inhibiteur d'intégrine $\alpha v\beta 5$	A supprimé la croissance du glioblastome (U87MG) et du médulloblastome (DAOY) implantés chez la souris nude. L'inhibition empêche leur interaction avec la vitronectine et la ténascine des protéines de la matrice.
AMG-102		Amgen		Inhibiteur de HGF (Facteur de croissance hépatocytaire) et du récepteur c-Met	Les gliomes malins sont les tumeurs les plus vascularisées de l'homme. Taux de réponse de 57 à 63% pour Campto-Avastin. Activité antitumorale certaine au niveau des cellules souches responsables de l'angiogenèse. Les inhibiteurs de VEGF et VEGFR inhibent le fonctionnement des cellules souches. L'effet antiangiogénique est parfois inconsistant en raison d'une résistance de la tumeur qui cancérisse les cellules endothéliales des vaisseaux.
Becacizumab	Avastin	Roche	II	Inhibiteur de VEGF	
Aflibercept	VEGF-Trap	Sanofi-Aventis	III	Inhibiteur de VEGF	
Cediranib	Recentin	Astrazeneca	II	Inhibiteur de VEGFR	
Pazopanib		GlaxoSmithKline	II	Inhibiteur de VEGFR	
Sorafenib	Nexamar	Bayer Schering Pharma	II	Inhibiteur de VEGFR R1, R2, R3, et RAF	
Sunitinib	Sutent	Pfizer	II	Inhibiteur de VEGFR-2, PDGFR-beta, inhibiteur de RTK	
Vandetinib		Astra Zeneca	II	Inhibiteur de VEGFR	
Vatalanib		Novartis	II	Inhibiteur de VEGFR	
XL184		Exelisis	II	Inhibiteur de VEGFR et de Met	
CT-322 (Angiocept)		Adnexus Therapeutics	I	Inhibiteur de VEGFR-2	
Semaxanib		Sugen	II	Inhibiteur de VEGFR-2 et de PDGF.	
Thalidomide	Thalomid®	Celgene	II	Anti-angiogenese	
Thérapies ciblées contre le facteur de croissance épidermique (inhibiteurs d'EGFR)					
Erlotinib	Tarceva	Roche	II		Les inhibiteurs d'EGFR ne sont pas aussi efficaces qu'on le souhaiterait en rason de la forme mutée EGFRvIII des gliomes malins, mais un nouveau traitement visant EGFRvIII doit arriver
Gefitinib (ZD1839)	Iressa	Astrazeneca	II		
Lapatanib	Tyverb/Tykerb	GlaxoSmithKnife	II		validé en Europe pour le sein, médicament oral

BIBW2992		Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals	II		
Nimotuzumab	Theraloc	YM Biosciences	II		
Cetuximab	Erbix	Merck	II		Utilisé avec Campto
Tipifarnib (R115777, FTI)	Zarnestra	Johnson & Johnson	II	Inhibiteur de la farnésyle transférase	L'inhibition de la farnésyle transférase et par conséquent de la farnésylation de la protéine p21Ras bloque la capacité de la protéine p21Ras mutée à induire une prolifération cellulaire et à transformer les cellules normales en cellules cancéreuses.
Lonafarnib		Schering-plough	II		
Thérapies ciblées contre la désacétylation des histones (inhibiteurs de histone désacétylase HDAC)					
Vorinostat	Zolinza	Merck	II		Les groupements acétyles, CH ₃ CO des histones sont la cible des enzymes HDAC. Les histones forment le squelette de l'ADN. La modification de ces protéines par acétylation, ajout de CH ₃ CO détermine le degré d'enroulement de l'ADN et agit sur les gènes. Dans les tumeurs il y a désacétylation, retrait de CH ₃ CO qui provoque un resserrement de l'ADN et inhibe les gènes comme les gènes suppresseurs de tumeurs.
Depsipeptide		Gloucester Pharmaceuticals	II		
LBH589		Novartis	II		
Thérapies ciblées contre le récepteur de facteur de croissance plaquettaire PDGFR					
Dasatinib	Sprycel	Bristol Myers Squibb	I	Inhibiteur de PDGFR	
Imatinib	Glivec	Novartis	Approuvé ailleurs		Glivec bloque la prolifération cellulaire et induit l'apoptose des cellules en hébergeant la kinase Bcr-Abl.
Tandutinib		Millenium Pharmaceuticals	I		
Thérapies par immunosuppresseurs					
Everolimus		Biogen	I		
Sirolimus	Rapamune	Wyeth	Approuvé ailleurs		Approuvée dans les greffes d'organe pour empêcher le rejet.

Temsirolimus		Wyeth	II	Inhibiteur de la kinase mTOR (cible de rapamycin), une enzyme activée par PI3K/Akt. Ce blocus mène à l'arrestation de la division cellulaire en G1. .	
Deforolimus					
Thérapies ciblées diverses					
Azixa		Epicept Corp	II	Inhibe la formation des microtubules	Phase I en 2007
TLN 4601		Thallion Pharmaceutiques	II	Inhibiteur de Ras-MAPK et cellules cancéreuses Ras mutées	Injectin en intra-veineuse de 14 jours de TLN-4601 à 480 mg/m ² /day suivi de 7 jours sans.
Bortezomib	VELCADE	Millénium		Inhibiteur de proteasome	Ubiquitin/proteasome est le mécanisme de dégradation de la posttranscription des protéines impliquées dans le cycle cellulaire, transcription, réparation d'Adn, apoptose, angiogenese, et croissance. La cible inclue p53, mdm2, p21, p27, Rb, cyclins A, B, et E, I IKB, Nf-KB, Bcl-2, Bax, et caspase-3.
Perifosine		Kerix Biopharmaceuticals		Inhibiteur d' Akt	Perifosine induit un effet cytotoxique supérieur par apoptose lorsqu'il est combiné à la radiothérapie.
IPI504	Retaspimycin	Infinity Pharmaceuticals		Inhibiteur de HSP90	HSP signifie <i>heat shock protein</i> , choc thermique de protéine, 90 étant son poids moléculaire. Sa déficience en situation de stress provoquerait des mutations génétiques.
XL184		Exelisis	I/II	Inhibiteur de Met et VEGFR	
BEZ235		Novartis		Inhibiteur de P13K	
XL765		Exelisis	I	Inhibiteur de P13K et mTOR	Médicament oral en essai avec Temodal
Enzastaurin		Lilly	III	Inhibiteur de PKC β	Antiangiogénique oral
Sorafenib	Nexavar	Bayer Schering Pharma	II	Inhibiteur de Raf et VE	Comprimés 400 mg 2 fois par jour, révélation sur le cancer du foie.
Dasatinib	Spycel			Inhibiteur de Src et de PDGFR	Comprimés, un peu la même action que Glivec

Thérapies diverses

Dalteparine sodique	Fragmine	Pfizer	Approuvé ailleurs	Dalteparin arrête l'écoulement de sang vers la tumeur et bloque les enzymes nécessaires à la croissance tumorale.	Est utilisé en complément de la radiochimiothérapie de Temodal. Avant tout c'est un anticoagulant.
Edotecarine		Pfizer	I		
Réovirus humain	Reolysin	Oncolytics Biotech Inc..	II	Le virus infecte et tue seulement les cellules de tumeur par Ras.	Toujours en essai
Edotecarin (J-107088)		Pharmacia Corporation	III	Nouvelle chimiothérapie antitopoisomérase de type I	Essais en cours
Poly ICLC	Hiltonol	Oncovir, Inc.	II	Thérapie biologique	
Efaproxiral sodium (RSR-13)		Thérapeutique D'Allos	II/III	Augmente l'oxygène aux tissus hypoxiques de tumeur et potentialise la radiothérapie.	En phase 2 sur les glioblastomes et en phase 3 sur d'autres tumeurs.
131-I-chTNT-1/B MAB	Cotara	Peregrine Pharmaceuticals	I	anticorps monoclonal porteur d'un isotope radioactif Iodine 131	
DCVax cerveau		Nordwest Biothérapeutics	II	Cellules dendritiques et EGFRvIII vaccin	
CDX-110		Celldex Thérapeutics	II	Cible EGFRvIII	
Novo TTF-100A		Novocure	III	Champs magnétiques alternatifs	Appareil portable disposant d'électrodes et diffusant un champ magnétique qui perturbe comme les antitopoisomérases l'alignement en métaphase des chromosomes sur la plaque équatoriale indispensable à la poursuite de la division cellulaire. Mais il y a des exceptions.
Sagopilone		Bayer	II	Inhibiteur des microtubulures intracellulaires	Chimiothérapie semblable aux taxanes, a besoin d'une forme liposomiale.
HLA-A2 antigène leucocytaire humain à la surface des gliomes retirés			I		En combinaison avec Poly-ICLC en vaccin pour adultes avec astrocytome et oligo-astrocytome de bas grade. Injection intramusculaire toutes les 3 semaines de HLA-A2 à Pittsburg

D'après le site « Glioblastome Association Michèle Esnault (GFME) » 09/04/2013

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	: Acide Désoxyribonucléique
ARN	: Acide Ribonucléique
ATRX	: Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked
BRAF	: V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CTI	: Cellules tumorales isolées
CSF-1R	: Colony stimulating factor 1-receptor
DDR1 et 2	: Discoidin domain receptor tyrosine kinase 1 et 2
EGFR	: Epithelial Growth Factor Receptor
Ext-Ab	: Anticorps dirigé contre le domaine extracellulaire de l'EGFR
FDA	: Food and Drug Administration
FISH	: Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization
GBM	: Glioblastome multiforme
GFAP	: Protéine gliofibrillaire des astrocytes
HER	: Human Epithelial Receptor).
HAS	: Haute autorité de santé
HPRT	: Hypoxanthine phosphoribosyl transferase
HPS	: hémalun phloxine safran
IDH	: Isocitrate Deshydrogenase
INA	: Alpha-Internexine
Int-Ab	: Anticorps dirigé contre le domaine intracellulaire de l'EGFR
IRM	: Imagerie par Résonance Magnétique
kDa	: kiloDalton
LCR	: Liquide céphalorachidien
MAPK	: Mitogen-activated protein kinase
MDM2	: Mouse Double Minute 2
MGMT	: MethylGuanine MethylTransferase
MTIC	: 5-(3-méthyl)-1-triazen-1-yl-imidazole-4-carboxamide
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PCV	: procarbazine, CCNU [®] (lomustine), vincristine
PDGFR	: platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide
PI3K	: Phosphatidyl inositol kinase
PIP3	: Phosphoinositol triphosphate
PTEN	: Phosphate-tensine
Rb	: Rétinoblastome
SNC	: Système nerveux central
TT	: Tissu tumoral
VEGF	: Vascular endothelial growth factor

Karine FAUCHER DURAND

Intérêt de la classification histo-moléculaire des gliomes diffus dans la prise en charge thérapeutique des patients

Résumé

Les gliomes diffus de l'adulte sont les tumeurs primitives les plus fréquentes du système nerveux central. Leur prise en charge est problématique et leur pronostic sombre la plupart du temps, car ce sont des tumeurs infiltrantes et très hétérogènes du point de vue clinique, radiologique et histologique. Depuis plusieurs années, la recherche fondamentale et clinique s'est concentrée sur l'analyse de marqueurs moléculaires, génétiques, génomiques, épigénétiques et protéiques qui pourraient améliorer le pronostic des gliomes. L'objectif de ce travail est d'expliquer comment certains marqueurs moléculaires spécifiques, tels que des pertes de bras chromosomiques entiers ou des altérations de gènes du métabolisme ou du maintien des télomères, vont radicalement changer le diagnostic et la prise en charge thérapeutique de ces tumeurs. Enfin, nous expliquerons comment notre équipe, par ses travaux, a participé à l'élaboration de la future classification histo-moléculaire de l'OMS qui combine les paramètres histologiques et moléculaires de la tumeur et va très prochainement entrer en vigueur.

Mots clés : Gliomes, classification OMS, perte 1p19q, P53, IDH, marqueurs histo-moléculaires, prise en charge thérapeutique

Abstract

Adult's diffuse gliomas are the most frequent primary tumors of the central nervous system. Their therapeutic care are difficult due to their invasive nature and their clinical heterogeneity. Over the last years, clinical and fundamental research have focused on the analysis of molecular, genetic, genomic and epigenetic markers and on proteins in order to improve prognosis. This thesis reviews how certain genomic markers such as the lost of entire chromosome arms, alteration in metabolism or telomere integrity genes will dramatically change diagnosis and therapeutic management of these tumors. We show also how our research team has contributed to the next WHO histo-molecular classification on gliomas.

Keywords : Glioma, WHO classification, 1p19q loss, P53, IDH, histo-molecular markers, therapeutic care