

ANALYSE COMPARÉE DES MÉLANOMES CHEZ LE CHIEN ET L'HOMME

COMPARATIVE ANALYSIS OF CANINE AND HUMAN MELANOMAS

Par Edouard CADIEU^{1,2*}, Clotilde DE BRITO^{1,2*}, Marc GILLARD^{1,2}, Jérôme ABADIE³, Béatrice VERGIER⁴,
Anne-Sophie GUILLORY^{1,2}, Patrick DEVAUCHELLE⁵, Frédérique DEGORCE⁶, Laëtitia LAGOUTTE^{1,2},
Benoit HÉDAN^{1,2}, Marie-Dominique GALIBERT^{1,2}, Francis GALIBERT^{1,2} et Catherine ANDRÉ^{1,2}
Communication présentée le 20 février 2014

RÉSUMÉ

Cet article présente les données épidémiologiques et cliniques de 2350 cas de tumeurs mélanocytaires canines collectées en France. Nous avons réalisé la caractérisation histologique (n = 153) et génétique (n = 100) d'un sous-groupe de mélanomes dont les résultats ont été comparés aux données des mélanomes humains. Les mélanomes apparaissent aux mêmes sites anatomiques chez le chien et l'Homme, mais avec des fréquences et des sévérités différentes. Nous montrons les prédispositions raciales des mélanomes canins et l'intérêt de ce modèle pour rechercher les gènes prédisposant difficiles à identifier chez l'Homme. Des mutations somatiques dans les gènes NRAS et PTEN ont été détectées dans les mélanomes buccaux canins, précisément aux mêmes points chauds (hotspots) que les mutations de ces gènes chez l'homme. Au contraire, aucune mutation dans le gène BRAF n'a été retrouvée dans les échantillons canins analysés. Ce travail met en lumière les homologues et différences entre les types de mélanomes humains et canins et démontre la force du modèle canin pour analyser les voies de signalisation non UV-dépendantes des mélanomes humains, particulièrement dans les types muqueux et acraux.

Mots-clés : mélanomes, chiens, oncologie comparée, classification histogénétique, mutations somatiques, voies non-UV.

SUMMARY

This paper presents epidemiological and clinical data from 2350 cases of melanocytic tumours from dogs sampled in France. In addition, we present the histological and genetic characterization of subsets of melanoma cases (n=153 and n=100, respectively), with a comparative aspect to human melanomas. Dog melanomas occur at the same anatomical sites than human melanomas, but with different frequency and severity. We demonstrate that the specificities of dog melanomas make them good models to understand the non-UV pathways of human melanomas. Interestingly, somatic mutations in oral canine melanomas were detected in the NRAS and PTEN genes, precisely at the same hotspots as human mutations. In contrast, mutations in the BRAF gene were not detected. This paper highlights the similarities and differences of dog and human melanoma types and the strong potential of dog melanomas to decipher the non-UV light pathways in different melanoma types, especially mucosal and acral types.

Key words: melanomas, dogs, comparative oncology, histogenetic classification, somatic mutations, non-UV pathways.

(1) CNRS, UMR 6290, Institut de Génétique et Développement de Rennes, Rennes, France.

(2) Université Rennes 1, UEB, IFR140, Faculté de Médecine, Rennes, France.

(3) Laboratoire d'Histopathologie Animale, Oniris, École Nationale Vétérinaire, Nantes, France.

(4) Service de Pathologie, CHU Bordeaux and Université Bordeaux Segalen, France.

(5) MICEN-VET, Creteil, France.

(6) Laboratoire d'Anatomie Pathologique Vétérinaire du Sud-Ouest (LAPVSO), Toulouse, France.

INTRODUCTION

Chez le chien, les tumeurs mélanocytaires touchent de nombreuses races et présentent une forte homologie clinique avec les mélanomes humains. Ce cancer représente 7% des tumeurs malignes chez le chien (Smith *et al.* 2002). Comme chez l'Homme, différentes localisations existent chez le chien, avec des spécificités raciales très marquées. La localisation muqueuse est la plus fréquente et la plus grave, avec notamment les tumeurs buccales dont 90%, très invasives, sont de caractère malin et de pronostic sombre. Le caniche est particulièrement prédisposé mais d'autres races comme le golden retriever ou le labrador sont également touchées. Les localisations cutanées sont fréquentes chez le chien, et certaines races sont particulièrement prédisposées, mais dans 50 % des cas, ces tumeurs ne sont pas malignes : appelées mélanocytomes, elles se rapprochent des naevus humains. Le schnauzer développe presque exclusivement des mélanomes cutanés à localisation digitée et des mélanomes unguéaux, ceux-ci sont particulièrement malins. Certaines autres races, au contraire développent autant de mélanomes cutanés que de mélanocytomes. La caractérisation clinique et histologique de ces différents types de mélanomes canins, a déjà fait l'objet de plusieurs publications (Ramos-Vara *et al.* 2000 ; Smith *et al.* 2002 ; Bergman *et al.* 2007 ; Spangler & Kass, 2006 ; Smedley *et al.* 2011).

En revanche, les homologies cliniques, histologiques, et génétiques entre mélanomes humains et canins n'avaient à ce jour jamais été renseignées. Comme le chien est, après l'Homme, l'espèce bénéficiant du meilleur suivi médical, puisqu'il est un membre de la famille à part entière et qu'il partage notre environnement (alimentation, stress, toxiques et produits cancérigènes), il apparaissait intéressant de dresser les homologies et les différences entre les différents types de mélanomes chez l'Homme et le chien, étape préliminaire essentielle aux études génétiques et thérapeutiques envisagées avec ce modèle.

L'objectif de notre étude est, à partir de cohortes de chiens de différentes races, d'identifier les types de mélanomes par la clinique et l'anatomo-pathologie et d'entreprendre leur analyse génétique afin de rechercher si des homologies existent avec certains types de mélanomes humains. Notre hypothèse est que certains types de mélanomes dans certaines races canines constitueraient des modèles d'étude intéressants pour des types de mélanomes homologues chez l'Homme. Après un rappel de la pathologie humaine, nous présenterons nos résultats et discuterons de leur portée.

LES MÉLANOMES CHEZ L'HOMME

Chez l'Homme, le mélanome, dans sa forme cutanée, reste le cancer de la peau le plus grave, dont l'incidence est en constante augmentation, notamment du fait de l'exposition accrue des populations caucasiennes au soleil. Pour les autres localisations anatomiques, plutôt cachées du soleil (muqueuses, localisations acrales⁷ dont unguéales, oculaires), l'étiologie est mal connue et le pronostic est généralement sombre. Les mélanomes sont très hétérogènes, selon leur localisation anatomique et leur origine génétique. L'hétérogénéité de leur réponse aux traitements et leur résistance résultent des différentes voies de signalisation impliquées et d'une part environnementale peu connue. Actuellement, il n'existe aucune thérapie efficace pour lutter contre les formes métastatiques ; aussi les efforts de recherche portent-ils sur la recherche des mécanismes cellulaires et moléculaires assurant l'apparition et la croissance de ces différents types de mélanomes et sur le développement de traitements alternatifs (thérapies ciblées, radiothérapie, immunothérapies).

Selon leur localisation et leurs caractéristiques cliniques et histopathologiques, on distingue :

- les mélanomes cutanés : le SSM (mélanome à extension superficielle) et le mélanome de Dubreuilh sont les plus fréquents (90%) et touchent principalement les individus à peau claire. Ils sont induits, entre autres, par les modifications structurales causées à l'ADN par les UV solaires (Tran *et al.* 2008) ;
- les mélanomes muqueux et cutanéomuqueux, comme les acrolentigineux⁸ et mucolentigineux, sont moins fréquents et affectent des zones du corps non exposées au soleil et les muqueuses. Ces formes touchent tous les phototypes et plus souvent les individus à peau très pigmentée ;
- d'autres types sont plus rarement diagnostiqués, comme les mélanomes simulant des naevus, les mélanomes de type animal, très rares de bon pronostic, formés de foyers ou d'un nodule dermique de mélanocytes épithélioïdes hyperpigmentés similaires à ceux des mélanomes équins, les mélanomes congénitaux de l'enfant, les mélanomes oculaires ...

Ces types de mélanomes ont donc pour origine des mécanismes génétiques et physiopathologiques très différents qui, pour les mélanomes ne résultant pas forcément d'une exposition au soleil, restent encore largement inexplorés. Ces cancers ont un impact majeur en santé publique et la médecine se retrouve face à des impasses thérapeutiques. Malgré les efforts déjà engagés avec des modèles murins pour identifier de nouveaux gènes et développer des thérapies innovantes, la disponibilité d'un modèle de grande taille présentant des tumeurs spontanées, partageant de surcroît notre environnement, constitue une occasion unique pour mieux comprendre les mécanismes en cause dans ces différents types de mélanomes.

(7) En dermatologie en particulier, l'adjectif acral désigne à la fois la tête, les coudes, les mains, les genoux et les pieds.

(8) Le mélanome acral lentigineux est un mélanome des zones non photo-exposées: paumes, plantes et ongles.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Pour réaliser ce travail, nous avons recueilli les données de tumeurs mélanocytaires, grâce à la collaboration avec des laboratoires d'histopathologie vétérinaire (LAPVSO et IDEXX), qui nous ont donné accès à leurs données. Nous avons ainsi travaillé sur 2350 cas de tumeurs mélanocytaires canines. Nous nous sommes également appuyés sur la Bio banque CaniDNA, créée et développée par notre équipe au CNRS de Rennes (<http://canidna.univ-rennes1.fr>) (**figure 1**). Cette Biobanque est constituée d'ADN extraits du sang de chiens atteints de différentes maladies et de chiens indemnes des mêmes races, comme témoins sains, d'ARN et d'ADN extraits de tissus de ces mêmes chiens ; tous ces prélèvements ont été effectués par des vétérinaires, essentiellement en France, grâce à un réseau incluant les vétérinaires praticiens, les laboratoires d'histopathologie, des éleveurs et plus récemment, les quatre Écoles nationales vétérinaires. Cette Biobanque est entrée dans un réseau de biobanques d'animaux domestiqués CRB-Anim, soutenu par un projet « Investissement d'avenir », lui donnant ainsi une dimension nationale.

Par ce réseau, très efficace, nous avons mis l'accent sur la collecte de prélèvements de cas de mélanomes et près de 700 prélèvements sanguins et 250 prélèvements de tissus tumoral et tissus sains, de chiens atteints de tous types de mélanomes ont

ainsi été obtenus à ce jour, accompagnés des informations cliniques et généalogiques correspondantes. La mise à jour régulière du statut des individus atteints a été effectuée pour assurer le suivi du chien (traitements, longévité). À ce jour, nous avons suivi 300 des cas collectés pendant quatre ans. Cette collecte, avec suivi clinique des chiens, se poursuit pour compléter les cohortes de chiens qui seront utilisées pour les analyses génétiques.

RÉSULTATS

La caractérisation des mélanomes du chien a été réalisée sur les plans épidémiologique et clinique, histopathologique et génétique. Ce travail a fait l'objet d'une publication (Gillard *et al.* 2014).

Résultats épidémiologiques

Grâce à l'analyse de 2350 cas de tumeurs mélanocytaires, nous démontrons l'existence de prédispositions raciales selon le type de mélanome, avec des valeurs statistiques significatives (**tableau 1**). La race Caniche est notamment prédisposée aux mélanomes de la cavité buccale (77%), les races Berger de Beauce, Rottweiler et Schnauzer l'étant aux mélanomes cutanés et digités (80%, 69% et 63%). Toutefois, les retrievers développent les deux types de mélanome, buccal et cutané (**tableau 1**). Globalement, si l'on considère l'ensemble des tumeurs méla-

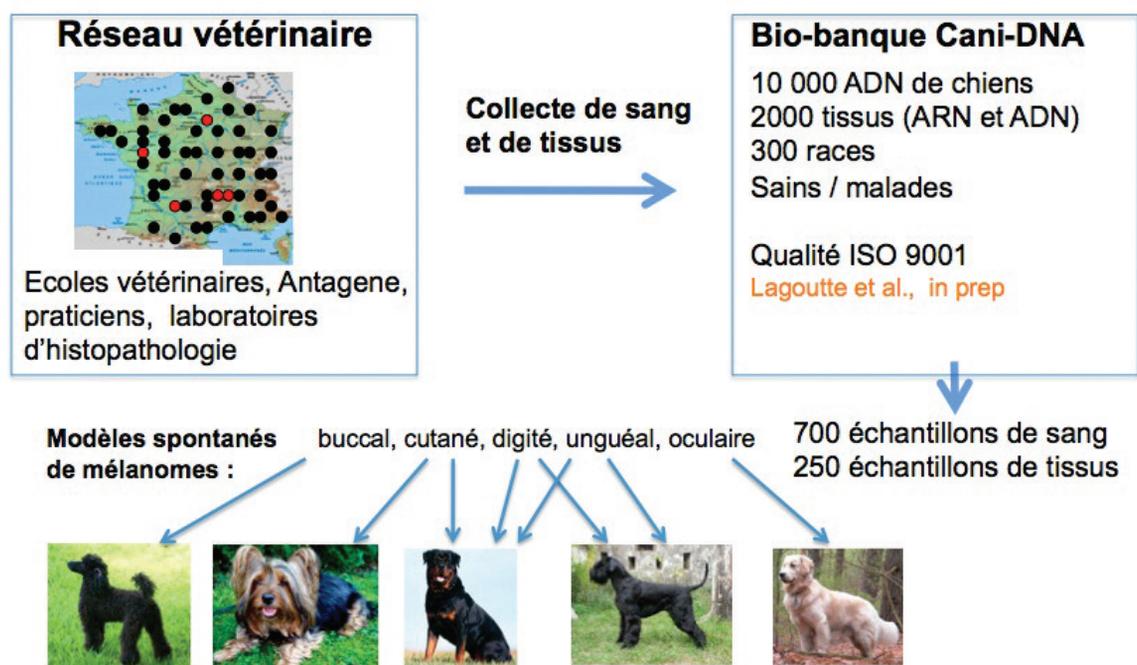


Figure 1 : Illustration de la Bio banque CaniDNA (<http://canidna.univ-rennes1.fr>). Elle est constituée d'ADN extraits de prélèvements sanguins de chiens et d'ARN extraits de tissus, prélevés grâce à un réseau incluant les écoles vétérinaires, des laboratoires d'anatomopathologie, des vétérinaires praticiens et spécialisés et des éleveurs.

	Muqueux	Cutané	Oculaire
Toutes races	45% (1063/2350)	51% (1205/2350)	4% (82/2350)
Caniche	77% (181/237) ***	22% (53/237)	1% (3/237)
Beauceron (Berger de Beauce)	20% (15/76)	80% (61/76) ***	0% (0/76)
Rottweiler	27% (53/193)	69% (133/193) ***	4% (7/193)
Schnauzer	38% (12/32)	63% (20/32)	0% (0/32)
Retriever du Labrador	43% (94/217)	52% (112/217)	5% (11/217)

Tableau 1 : Distribution des 2350 tumeurs mélanocytaires canines et corrélation entre le site anatomique et la prédisposition raciale. Proportion de mélanomes muqueux, cutanés ou oculaires au sein des tumeurs mélanocytaires. Les caniches sont particulièrement prédisposés aux mélanomes buccaux, alors que les beaucerons, rottweilers and schnauzers sont plus souvent atteints de mélanomes cutanés ; chez les Labrador retrievers, les mélanomes peuvent présenter les deux localisations, cutanée ou buccale.

Les astérisques indiquent la significativité statistique (P value < 0.001).

nocytaires (mélanomes et mélanocytomes), 45% sont buccales et 44% sont cutanées, (figure 3A). Mais la malignité de la tumeur et la sévérité de l'affection sont à considérer selon la localisation de la lésion ; 62% des mélanomes sont buccaux et seulement 27% sont cutanés, (figure 3B). Si l'on calcule les proportions de mélanomes pour chaque type de localisation, parmi les tumeurs mélanocytaires (figure 4), on observe que 97 % des mélanomes buccaux canins sont malins avec un fort pouvoir métastatique ; au contraire, les mélanomes cutanés apparaissent moins agressifs avec seulement 43% de mélanomes malins ; les mélanomes digités et unguéaux, comportant respectivement 84% et 100% de tumeurs malignes, sont de loin

plus agressifs que ceux affectant une peau recouverte de poils ; les mélanomes oculaires sont les mélanomes les moins agressifs comparés à ceux des autres sites, avec seulement 29% de forme maligne. Quant à la prédisposition liée au sexe, nous n'avons pas observé de différence pour les mélanocytomes, mais une nette différence pour les mélanomes, les mâles étant plus atteints que les femelles, selon un rapport de 1,4 mâles pour une femelle (pour les localisations buccales). De même pour l'âge d'apparition, les mélanocytomes se déclarent à l'âge moyen de 8,8 ans, alors que les mélanomes apparaissent chez les vieux chiens, d'un âge moyen de 11 ans, significativement différent.

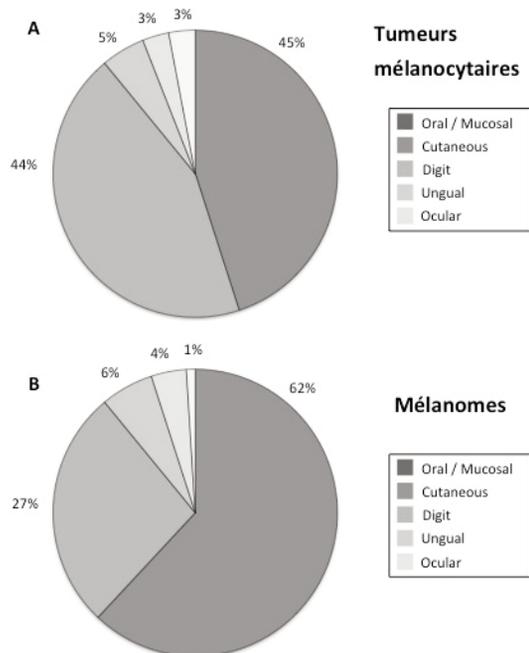


Figure 3 : Distribution des tumeurs mélanocytaires, (mélanomes et mélanocytomes) (A) ; et des mélanomes seulement (B), selon la localisation anatomique.

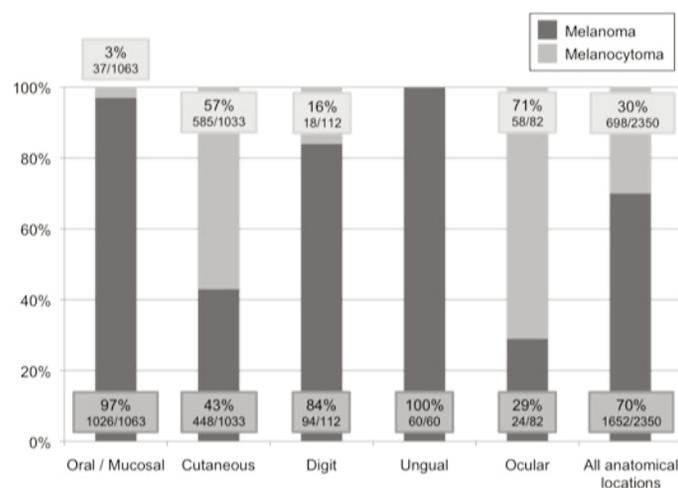


Figure 4 : Malignité de la tumeur en fonction de la localisation anatomique. Proportions de mélanomes par rapport au (bénignes et malignes) pour chaque type de localisation : Pour les tumeurs mélanocytaires buccales, 97 % sont malignes ; pour les mélanomes cutanés on observe seulement 43% de mélanomes malins ; pour les mélanomes digités et unguéaux, on observe 84% et 100%, respectivement, de tumeurs malignes ; pour les mélanomes oculaires, les moins agressifs on observe seulement 29% de forme maligne.

Résultats anatomopathologiques

Sur le plan histologique, contrairement à la majorité des tumeurs mélaniques humaines, les proliférations mélanocytaires chez le chien sont très majoritairement dermiques, sans effraction de la lame basale et ce, quelle que soit leur localisation, cutanée ou buccale (**figure 5A**). Des correspondances morphologiques entre les mélanomes canins les plus fréquents et les mélanomes humains ont été établies. Deux types de prolifération ont été repérées: les mélanomes simulant un naevus (de type naevocytoïde) et les mélanomes de type animal (**figure 5B et 5C et tableau 2**). Les mélanomes simulant un naevus représentent 70 % des mélanomes canins et correspondent en général à de petites cellules rondes ou fusiformes, peu pigmentées, avec beaucoup de mitoses ; macroscopiquement ce sous-type est une forme grave de mélanome qui peut se développer à partir d'un naevus dermique préexistant (naevus de Spitz, naevus bleu et naevus congénital géant). Les mélanomes de type animal représentent 17% des mélanomes canins et sont le plus souvent des proliférations bénignes, très pigmentées, avec peu de mitoses qui, paradoxalement, peuvent présenter la particularité de posséder un fort pouvoir métastatique (Zembowicz *et al.* 2004 ; Zembowicz *et al.* 2011).

Résultats génétiques

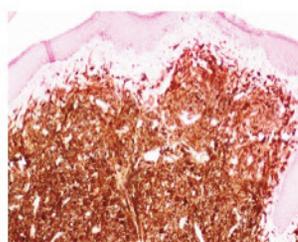
Recherche de mutations somatiques participant au développement tumoral : étude pilote

Afin de rechercher la présence de mutations somatiques dans les tissus tumoraux de chiens atteints de mélanomes nous avons cherché, dans un premier temps, si nous retrouvions de manière récurrente des mutations déjà connues dans certains types de mélanomes chez l'Homme. En effet, la mise en évidence d'altérations génétiques somatiques spécifiques des localisations anatomiques et du type d'exposition au rayonnement solaire a ouvert la voie à une nouvelle classification des mélanomes humains reposant sur le type d'altérations génétiques et les caractéristiques histologiques de la tumeur (Whiteman *et al.* 2011). Nous avons ainsi sélectionné six gènes fréquemment mutés dans différents types de mélanomes humains : BRAF, NRAS, PTEN, KIT, GNAQ et CDK4 et nous avons recherché des mutations dans les gènes orthologues du chien. Pour ce faire, les ADNc (ADN complémentaires) d'une centaine de cas de mélanomes canins (80 mélanomes buccaux et 20 mélanomes cutanés) ont été préparés à partir des ARN extraits des tissus collectés.

	Tous sites anatomiques	Muqueux	Cutané	Oculaire
Type Nevocytoïde	72% (110/153)	77% (85/110)	66% (25/38)	0% (0/5)
Type Animal	16.5% (25/153)	14.5% (16/110)	10.5% (4/38)	100% (5/5)
Composite	4.5% (7/153)	5.5% (6/110)	2.5% (1/38)	0% (0/5)
Pléomorphique	6.5% (10/153)	3% (3/110)	18.5% (7/38)	0% (0/5)
SSM	0.5% (1/153)	0% (0/110)	2.5% (1/38)	0% (0/5)

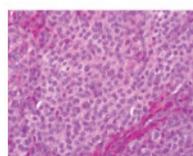
Tableau 2: Distribution des mélanomes canins muqueux (n=110), cutanés (n=38) et oculaires (n=5) selon la classification histologique des mélanomes en cours chez l'Homme. Par exemple, sur 110 mélanomes canins de type névocytoïde, 85 sont muqueux et 25 cutanés. SSM: *superficial spreading melanoma*.

A Mélanomes dermiques

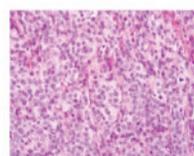


B

Mélanomes « type congenital » (nevocytoïd): 70 %



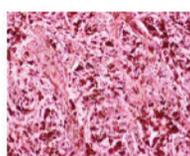
Human



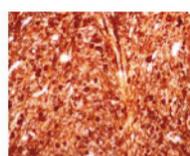
(Rouki)

C

Mélanomes « type animal » :17%



Human



(Ringo)

Photos - B. Vergier

Figure 5 : Données histologiques : A: prolifération dermique de mélanocytes, sans effraction de la lame basale, observée dans la majorité des cas de mélanomes canins. B et C : correspondances morphologiques entre les mélanomes humains et canins: B : le mélanome névocytoïde «simulant un naevus» ou névus congénital, représente 72% des mélanomes canins, il comporte de nombreuses atypies cellulaires et beaucoup de mitoses, il n'est pas pigmenté et C: le mélanome de «type animal», représente 17% des mélanomes canins, il fortement pigmenté et en fonction du nombre de mitoses, invasif (mélanome) ou non invasif (mélanocytome) (Clichés : Dr. B. Vergier).

Les gènes d'intérêt ont été amplifiés à partir des ADNc, puis séquencés. Ce séquençage, bien que concernant un petit nombre de gènes, nous a permis de montrer l'existence, chez le chien, de mutations somatiques dans les mêmes gènes que chez l'Homme et plus précisément, aux mêmes points chauds (hotspots). Ainsi, sur 80 cas de tumeurs buccales : deux chiens présentent des mutations somatiques dans le gène NRAS, sur le hotspot de mutation du codon Q61 et deux autres chiens, des mutations dans le gène PTEN au codon G251, hotspot de mutations complexes chez l'Homme (figure 6).

Recherche systématique d'altérations somatiques par approche RNAseq (en cours)

Les compétences en bioinformatique de l'équipe et la disponibilité d'acides nucléiques (ADN et ARN) issus de tissus tumoraux et sains nous permettent d'entreprendre, d'une façon systématique, l'identification de variants somatiques, présents dans les tissus tumoraux et absents des tissus sains, ainsi que le différentiel d'expression des transcrits (DE) entre tissus sains et tissus atteints.

Pour étudier le transcriptome des mélanomes canins (ensemble des ARN présents dans l'échantillon et reflétant les gènes exprimés dans le tissu concerné), des prélèvements de tissus ont été collectés à la fois dans la tumeur et dans le tissu sain correspondant (échantillons appariés), pour 30 cas de mélanomes, essentiellement des mélanomes buccaux. À l'heure actuelle, nous sommes dans la phase de production des données pour ces échantillons appariés répartis en trois différentes races particulièrement prédisposées aux mélanomes (caniche, golden retriever et labrador retriever).

Nous avons d'abord séquencé les ARN appariés issus de trois échantillons qui correspondent à un projet pilote pour le séquençage massif de tous les ARN par une approche appelée «RNA-seq », réalisée au Centre National de Génotypage (CNG Evry, France). Nous avons identifié, en fonction des trois cas de mélanome, entre 118 et 234 variants somatiques non synonymes dans les ARN de gènes ; ces mutations somatiques ont été trouvées de façon récurrente dans 44 gènes. Cette liste de 44 gènes mutés chez le chien est en cours d'analyse et nous la comparerons avec la liste de mutations somatiques identifiées chez l'Homme.

Cette première approche nous a servi à définir les meilleures stratégies de fabrication des banques d'ARN et de séquençage, à tester les logiciels d'analyses et le cas échéant, à développer des améliorations. Nous avons pu également vérifier la qualité des ARN, la couverture du séquençage, la longueur et la qualité des lectures. Les résultats permettront d'établir un catalogue de l'ensemble des mutations somatiques dans les régions transcrites du génome canin, des événements de fusion de gènes non contigus, leur conférant des expressions différentes dans les tumeurs étudiées, ainsi que des expressions géniques différentielles entre individus malades et individus sains. Ces altérations somatiques (fusions de gènes, nouveaux transcrits, expressions différentielles et mutations somatiques) sont-elles bien spécifiques des individus atteints ? Ont-elles un sens biologique, autrement dit, ont-elles un rôle dans l'apparition des mélanomes (variants driver⁹) ? Répondre à ces questions requiert des outils bioinformatiques de plus en plus performants et des outils de validation biologique, comme des clonages en vecteur d'expression, des modèles murins, ou tout autre méthode de validation biologique, voire de modélisation moléculaire.

Séquençage des cDNA de gènes fréquemment mutés dans différents types de mélanomes chez l'Homme : : BRAF, NRAS, KIT, PTEN, GNAQ de 100 cas de mélanomes de chiens

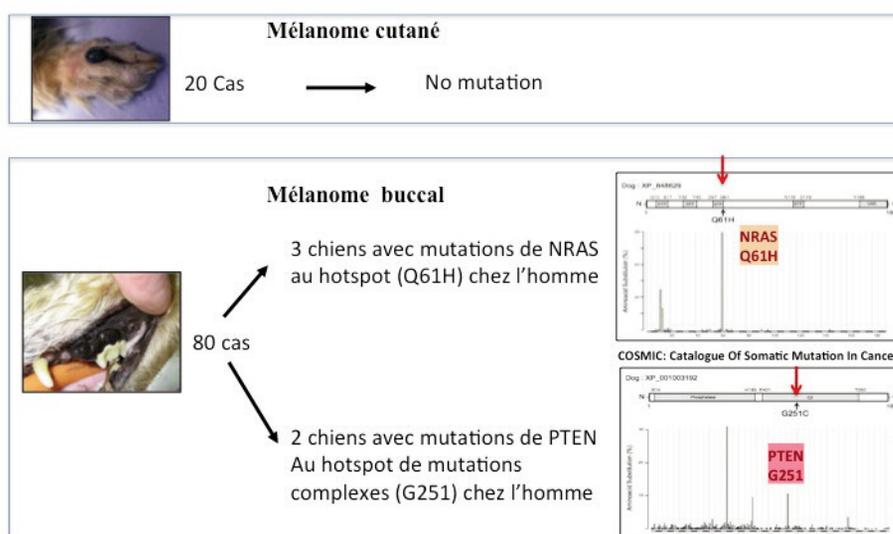


Figure 6 : Données génétiques : mise en évidence de mutations somatiques des gènes NRAS et PTEN dans les mélanomes muqueux chez le chien, aux mêmes points chauds (hotspots) que dans les mélanomes humains. (clichés : Dr. Delverdier et Dr. Péricard).

(9) Le cancer est une maladie associée à de nombreuses mutations de gènes entraînant la perte du contrôle des fonctions cellulaires vitales. Parmi ces gènes mutés, on définit les gènes driver lorsque leur mutation joue un rôle causal dans l'oncogenèse, alors que les gènes passager sont considérés comme étant sans rapport avec le développement du cancer.

Recherche de gènes de prédisposition aux différents types de mélanomes par approche GWAS (genome wide association studies) (en cours)

La mise en place d'une recherche de gènes de prédisposition s'appuie sur des collections de prélèvements d'ADN d'un grand nombre de chiens atteints d'un type de mélanome et d'ADN de chiens indemnes, de la même race. Nous disposons, à l'heure actuelle, de 700 prélèvements sanguins de chiens, de différentes races, atteints de mélanomes de différents types. Afin de réaliser ces analyses génétiques dans tout le génome (analyses pan-génomiques par approche GWAS), nous avons organisé nos échantillons d'ADN par race et par type de mélanome : l'objectif est de trouver des régions génomiques de prédisposition spécifiques aux mélanomes étudiés, par race, par type et des régions génomiques de prédisposition communes aux mélanomes buccaux et cutanés, par exemple. Ainsi, nous avons sélectionné 100 échantillons d'ADN provenant de caniches porteurs d'un mélanome buccal, pour lesquels nous possédons les informations cliniques détaillées et le diagnostic histologique et 100 autres échantillons d'ADN, provenant de caniches indemnes de cancer, d'âge supérieur à 12 ans. Les analyses génétiques de type GWAS, autrement dit le génotypage de ces 200 échantillons est réalisé avec des puces canines pan-génomiques de 170 000 SNPs (Illumina HD) et les analyses statistiques sur le génome entier sont actuellement en cours à l'aide d'outils informatiques tel que le logiciel PLINK. (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink>). Pour compléter ces analyses, 300 autres échantillons d'ADN sont en cours de génotypage : ils proviennent de chiens, de plusieurs races, atteints de mélanomes cutanés ou muqueux.

Les races canines se prêtent bien à ce type de criblage des génomes car, lors de leur création et de leur maintien, des altérations génomiques spécifiques ont été sélectionnées, comme des altérations simples (mutations ponctuelles) ou des altérations complexes [(mutations concernant un plus grand nombre de bases, indels¹⁰, combinaisons de mutations ponctuelles et d'indels, variations du nombre de copies d'une région génomique (CNV), etc.]

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ce projet d'oncologie comparée et de recherche des bases génétiques des mélanomes canins est maintenant bien engagé. En près de cinq ans, nous avons caractérisé différents types de mélanomes canins et démontré leur homologie avec des types de mélanomes chez l'Homme : muqueux, acral, unguéal (ALM Acral lentiginous melanoma) (Gillard *et al.* 2014). Ce travail montre que les mélanomes buccaux chez le chien dans des races prédisposées peuvent servir de modèles spontanés de mélanomes muqueux non-UV induits chez l'Homme, mais aussi de mélanomes UV-induits.

Les mélanomes chez le chien constituent de bons modèles du développement naturel des mélanomes humains, particulièrement pour en explorer les voies de signalisation non-UV dépendantes, puisque les mélanomes chez le chien ne sont pas directement liés à l'exposition aux UV. Effectivement, ces mélanomes, quasi-exclusivement intra-dermiques, affectent des races canines, le plus souvent noires, et sont essentiellement des mélanomes buccaux (muqueux) ou bien affectent des parties de peau couvertes de poils. De façon concordante, nous trouvons chez le chien, dans les mélanomes muqueux (3/80 cas de mélanomes buccaux), des mutations somatiques de NRAS, gène muté dans les situations de moindre exposition au soleil chez l'Homme (exposition faible et non régulière, dite intermittente). Au contraire, l'oncogène BRAF, qui est muté dans plus de 50 % des cas de mélanomes liés au soleil (exposition régulière et répétée, dite chronique) chez l'homme, n'a jamais été trouvé muté chez le chien. Ainsi, fort de ces premiers résultats de séquençage de gènes candidats, nous avons engagé la recherche systématique de mutations somatiques récurrentes, par RNAseq. L'objectif est de déterminer les variants récurrents driver¹⁰, les différences d'expression et les transcrits de fusion dans les échantillons de chiens atteints par rapport à ceux de chiens sains ; si des altérations sont mises en évidence dans de nouveaux gènes chez le chien, nous rechercherons leur présence chez l'homme, dans les types de mélanomes homologues. Dans une recherche des gènes de prédisposition, lors d'études d'association génétiques (GWAS), on peut espérer obtenir des locus de prédisposition, par race de chien, par type de mélanomes et vérifier si ces locus sont déjà décrits chez l'Homme ou proposer l'implication potentielle de nouveaux gènes prédisposant.

CONCLUSION

Ce premier travail sur des cas rétrospectifs de mélanomes chez le chien et les données d'oncologie comparée sur les plans clinique, histopathologique, épidémiologique nous ont renseignés sur les spécificités des mélanomes de chaque espèce (homme/chien) et sur les sous-types de mélanomes homologues entre l'Homme et le chien.

De plus, l'efficacité du réseau vétérinaire que nous avons mis en place pour la collecte des prélèvements de mélanomes canins a déjà permis l'analyse des mutations somatiques, par une approche de gènes ciblés sur des gènes d'intérêt dans les mélanomes humains et aussi par une approche «omique», non ciblée, visant le séquençage de la totalité des gènes transcrits dans un tissu atteint (transcriptome) pour les comparer aux transcrits dans le même tissu sain (travail en cours). Ces approches sont importantes pour comprendre la progression tumorale sur un terrain génétique et un environnement donné, mais ce qui fait tout l'intérêt du modèle Chien est la prédisposition tout à fait remarquable de certaines races à développer certains types de

(10) désigne une insertion ou une délétion dans une séquence d'ADN par rapport à une séquence de référence. On peut mettre en évidence des indels lorsqu'on effectue des comparaisons au moyen de programmes d'alignement de séquences.

mélanomes. Nous faisons l'hypothèse que les gènes de prédisposition à certains types tumoraux dans les races canines à risque reflètent l'hétérogénéité des gènes de prédisposition impliqués chez l'homme, pour les types tumoraux homologues. Ainsi, nous avons engagé des analyses génétiques sur 200 échantillons d'ADN de Caniches (100 atteints de mélanomes buccal et 100 indemnes) et le travail de génotypage et d'analyses statistiques est en cours.

L'intégration de ces données « qualitatives » d'expression avec les études d'association génétiques (GWAS) nous donnera des éléments sur les liens entre les gènes de prédisposition identifiés et les voies de signalisation dérégulées, affinant ainsi la caractérisation des mécanismes impliqués dans l'apparition et la pro-

gression des mélanomes cutanés et buccaux canins. Ces éléments offriront des pistes à étudier dans les mélanomes homologues chez l'Homme.

Les mélanomes canins représentent de bons modèles pour la génétique et la thérapie des mélanomes muqueux ou acraux chez l'Homme, ils représentent également des modèles intéressants pour les mélanomes humains, exposés au soleil, dont les voies de signalisation non UV-dépendantes ne sont par particulièrement analysées. Les mélanomes canins constituent donc des modèles pertinents pour les mélanomes humains liés aux UV ou non, qui utilisent les deux types de voies pour leur développement et leur progression tumorale.

REMERCIEMENTS

Ces études ont été financées par le CNRS (France) and l'INCa (Institut National du Cancer, France): INCa 2010 HAP Biobanque "Can-DNA" and INCa 2012-1 PL-Bio-08 "Mélanomes"). M.G. et E.D. ont bénéficié d'une bourse de thèse de la Région Bretagne (France) et de la Ligue Nationale Contre le Cancer (France).

Nous remercions Laetitia Lagoutte et Nadine Botharel pour les manipulations d'échantillons et la responsabilité de la Bio-Banque CaniDNA (CNRS, Rennes, France).

Nous remercions chaleureusement les autres laboratoires d'histopathologie vétérinaire (autres que Idexx et LAPVSO), ainsi que les praticiens sur toute la France, qui ont accepté de réaliser un prélèvement tumoral, comme OncoVet (Lille, France), les Dr. D. Lanore (Clinique Alliance, Bordeaux), T. Bord (Clinique de l'Arche, Salon de Provence), D. Rosenberg (Micen-Vet, Creteil).

Nous remercions Antagene (La Tour de Salvagny, France) pour l'aide à la collecte d'échantillons et le suivi des chiens !

Nous remercions beaucoup les Dr. X. Bizière, Dr. M. Delverdiere, Dr. Isabelle Raymond, et le Dr. B. Vergier pour nous avoir confié des photos de mélanomes.

Nous remercions aussi le Dr. A. Fautrel et P. Bellaud de la plateforme d'histopathologie H2P2, Biosit (Rennes, France).

BIBLIOGRAPHIE

- Bauer J, Curtin JA, Pinkel D, Bastian BC. Congenital melanocytic nevi frequently harbor NRAS mutations but no BRAF mutations. *J Invest Dermatol.* 2007; 127(1):179-82. Epub 2006 Aug 3.
- Beadling C, Jacobson-Dunlop E, Hodi FS, Le C, Warrick A, Patterson J et al. KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(21):6821-8.
- Bergman PJ. Canine oral melanoma. *Clin Tech Small Anim Pract.* 2007; 22: 55-60.
- Dahl C & Guldberg P. The genome and epigenome of malignant melanoma. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica?APMIS.* 2007; 115(10):1161-76.
- Fecher LA, Amaravadi RK, Flaherty KT. The MAPK pathway in melanoma. *Curr Opin Oncol.* 2008; 20: 183-9.
- Gillard M, Cadieu E, De Brito C, Abadie J, Vergier B, Devauchelle P et al. Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014; 27(1):90-102. doi: 10.1111/pcmr.12170. Epub 2013 Nov 1. (2014)
- Kunz M. Oncogenes in melanoma: An update. *Eur J Cell Biol.* 2014; 93(1-2):1-10. doi: 10.1016/j.ejcb.2013.12.002. Epub 2013 Dec 31.
- Palmieri G, Capone M, Ascierto ML, Gentilcore G, Stronck DF et al. Main roads to melanoma. *J Transl Med.* 2009; 7:86. doi: 10.1186/1479-5876-7-86. Review.
- Ramos-Vara JA, Beissenherz ME, Miller MA, Johnson GC, Pace LW, Fard A, Kottler SJ. Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. *Vet Pathol.* 2000; 37(6):597-608.
- Smedley RC, Spangler WL, Esplin DG, Kitchell BE, Bergman PJ, Ho HY et al. Prognostic markers for canine melanocytic neoplasms: a comparative review of the literature and goals for future investigation. *Vet Pathol.* 2011; 48, 54-72.
- Smith SH, Goldschmidt MH, Mcmanus PM. A comparative review of melanocytic neoplasms. *Vet Pathol.* 2002; 39: 651-78.
- Spangler WL & Kass PH. The histologic and epidemiologic bases for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia. *Vet Pathol.* 2006; 43, 136-49.
- Tran TT, Schulman J, Fisher DE. UV and pigmentation: molecular mechanisms and social controversies. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2008; 21(5):509-16. Review.
- Whiteman DC, Pavan WJ, Bastian BC. The melanomas: a synthesis of epidemiological, clinical, histopathological, genetic, and biological aspects, supporting distinct subtypes, causal pathways, and cells of origin. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011; 24(5):879-97
- Zembowicz A & Phadke PA. Blue nevi and variants: an update. *Arch Pathol Lab Med.* 2011; 135, 327-36.
- Zembowicz A, Carney JA, Mihm MC. Pigmented epithelioid melanocytoma: a low-grade melanocytic tumor with metastatic potential indistinguishable from animal-type melanoma and epithelioid blue nevus. *Am J Surg Pathol.* 2004; 28 : 31-40.