



HAL
open science

Les mélanomes muqueux canins comme modèle génétique et thérapeutique des mélanomes muqueux humains

Anaïs Prouteau

► **To cite this version:**

Anaïs Prouteau. Les mélanomes muqueux canins comme modèle génétique et thérapeutique des mélanomes muqueux humains. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2020. Français. NNT : 2020REN1B024 . tel-03199443

HAL Id: tel-03199443

<https://theses.hal.science/tel-03199443>

Submitted on 15 Apr 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialités : *Cancérologie*

Par

Anaïs PROUTEAU

Les mélanomes muqueux canins comme modèle génétique et thérapeutique des mélanomes muqueux humains

Thèse présentée et soutenue à Rennes le 20/10/2020

Unité de recherche : UMR6290, CNRS- Université Rennes 1

Rapporteurs avant soutenance :

Sophie TARTARE – DECKERT, Directeur de recherche, INSERM, Université Côte d'Azur
Frédérique PONCE, Professeur, VetAgro-Sup, Université de Lyon

Composition du Jury :

Rapporteurs : Sophie TARTARE – DECKERT, Directeur de recherche, INSERM, Université Côte d'Azur
Frédérique PONCE, Professeur, VetAgro-Sup, Université de Lyon

Examineurs : Jean-Christophe MARINE, Professeur, Université de Louvain, Belgique
Anne PATSOURIS, Praticien hospitalier, Institut de Cancérologie de l'Ouest Paul Papin, Université d'Angers
Eve MAUBEC, Professeur, Hôpital Avicenne, Université Paris 13

Présidente : Marie-Dominique GALIBERT, Professeur, UMR 6290, IGDR, Université de Rennes1

Dir. de thèse : Catherine ANDRE, Directeur de recherche, UMR 6290, IGDR, CNRS-Université de Rennes 1

Co-dir. de thèse : Benoît HEDAN, Ingénieur de recherche, UMR 6290, IGDR, CNRS-Université de Rennes 1

Les mélanomes muqueux canins comme modèle génétique et thérapeutique des mélanomes muqueux humains

Mots clés : modèle chien, mélanome muqueux, génétique, thérapie ciblée

Résumé : Ma thèse s'inscrit dans le cadre de l'oncologie comparée et a porté sur l'étude génétique du mélanome muqueux (MM) chez le chien qui développe spontanément des mélanomes buccaux, fréquents dans certaines races et particulièrement sévères. Ils constituent de bons modèles naturels pour les MM humains, rares et très agressifs. L'analyse par séquençage d'exome de 70 cas de MM canin par l'équipe a permis d'identifier des altérations géniques somatiques récurrentes. J'ai d'abord travaillé sur les amplifications focales des chromosomes canins CFA30 et CFA10 sur une cohorte de 73 cas de MM canins. J'ai montré que ces altérations étaient présentes dans la moitié des cas et que l'amplification du CFA 30 avait une valeur pronostique péjorative. Nous avons montré que ces gènes amplifiés étaient surexprimés et avaient un rôle dans la prolifération cellulaire. Le séquençage de génomes entier de 4 lignées cellulaires canines a

montré que ces amplifications focales signaient des réarrangements chromosomiques complexes, à l'instar de ce qui est observé dans les MM humains. En parallèle, l'analyse transcriptomique de 32 cas de MM canins nous a permis de distinguer deux sous-groupes moléculaires : l'un caractérisé par la surexpression de gènes de l'immunité et l'autre par la surexpression d'oncogènes comme *TERT* et *MITF*. De plus, ces deux groupes se distinguent par leur type de variants structuraux, plus nombreux dans le second groupe. Ces résultats suggèrent l'utilisation de l'immunothérapie et de thérapies ciblées respectivement. Ces travaux ont permis de mieux caractériser les MM canins sur le plan génétique et ouvrent des perspectives thérapeutiques profitant à la recherche translationnelle en médecine humaine et vétérinaire pour les mélanomes non liés aux UV.

Canine mucosal melanoma as a genetic and therapeutic model for human mucosal melanoma

Keywords : dog model, mucosal melanoma, genetic, targeted therapy

Abstract : My PhD is in the frame of the comparative oncology field about the genetic study of mucosal melanoma (MM) in dogs, that spontaneously develop oral melanoma, frequent in some breed and severe. Thus, it constitutes a good natural model for human MM that is rare and very aggressive. The exome sequencing analysis of 70 canine MM cases by the team allowed to identify recurrent somatic alterations. I first focused on amplifications on canine chromosome (CFA) 10 and 30. On a cohort of 73 cases, I showed that the amplification of CFA 30 had a prognostic value. We showed that amplified genes were also overexpressed and had a role on tumour cell proliferation. The whole genome sequencing of canine cell lines showed that those amplifications signed

complex chromosomal rearrangements, as it is seen in human MM. In the same time, the transcriptomic analysis of 32 canine MM samples showed the existence of two molecular subgroups: the first characterized by the overexpression of genes related to immune microenvironment, and the second by overexpression of oncogenes like *TERT* and *MITF*. Moreover, those groups differ in their structural variants content, more important in the second one. Those results suggest the use of different therapies, immunotherapy and targeted therapy respectively. This work allowed to better characterize genetics of canine MM and opens therapeutic perspectives to benefit human and veterinary oncology for non UV-induced melanomas.

Les mélanomes muqueux canins comme modèle génétique et thérapeutique des mélanomes muqueux humains

REMERCIEMENTS

Je remercie très sincèrement les membres du jury pour le temps consacré à évaluer ce travail et leur lecture attentive de ce manuscrit.

- le Pr Frédérique Ponce et le Dr Sophie Tartare Deckert qui ont accepté de juger ce travail en assumant le rôle de rapportrices.
- le Pr Jean-Christophe Marine, le Pr Eve Maubec, le Dr Anne Patsouris et le Pr Marie-Dominique Galibert qui ont accepté de participer à ce jury en tant qu'examineurs.

Cette thèse a été financée durant 3 ans par la FHU CAMIn (Fédération Hospitalo-Universitaire Cancer-Microenvironnement Innovation) de Rennes ainsi que la région Bretagne, que je remercie chaleureusement.

Merci aux membres de mon CSI (Comité de suivi individuel) pour le suivi de ma thèse au cours des réunions annuelles : le Pr Eve Maubec, le Dr. Pauline de Fornel, et le Dr. David Gilot.

Je remercie également les collaborateurs ayant participé à ces travaux de recherche. Je commencerais par le binome de choc des anapath vétérinaires d'Oniris, Ecole vétérinaire de Nantes. Merci Jérôme Abadie et Flo pour votre aide tout au long de ces 3 années. Jérôme pour ton franc parler et tes conseils lors de nos réunions de travail et les bonnes soirées de l'ESVONC ! Flo, des journées entières à compter les mitoses au microscope et à s'extasier devant la beauté de nos lames colorées ! J'en garde un excellent souvenir, ainsi que la rédaction efficace de notre article pour VCO. Tu sais évidemment que tu es bien plus qu'un collaborateur à mes yeux ;)

Merci à l'équipe de Micen-Vet et en particulier Patrick Devauchelle, Pauline De Fornel, Romain Francois et Ophélie François pour leur accueil et leur aide pour la collecte des cas.

Merci aussi à Florian Cabillic et Laurence Cornevin du service de cytogénétique du CHR de Rennes (H3P3), à Gevorg et Alain Fautrel de la plateforme H2P2, à Stéphanie Dutertre et Xavier Pinson de la plateforme de microscopie pour leur collaboration.

Un grand merci aussi à l'équipe GEO de l'IGDR avec qui j'ai eu beaucoup de contacts: Laura tout particulièrement ! Merci pour ton aide, ta patience, ta bonne humeur et ta

rigueur, pour ce que tu m'as appris pendant ces 3 ans. Merci à David Gilot pour tous tes conseils, ta bienveillance et ta participation importante aux CSI. Cette collaboration a été très importante dans la réalisation et l'avancement du projet de thèse. Merci aussi aux Anaïs, Anne, Seb pour vos réponses à mes questions de « fonctionnel »^^.

Merci aux nombreux vétérinaires, éleveurs ..etc qui nous permettent d'implémenter la bio-banque Cani-DNA, sans qui nos travaux de recherche dans l'Equipe « Génétique du chien » ne seraient pas possibles.

Un graaaaaaand merci à Catherine André et Benoît Hédan pour avoir encadré mon travail de thèse pendant ces 3 années. Merci de m'avoir fait confiance pour mener ces projets de recherche alors que je n'avais aucune compétence en génétique. J'espère avoir été à la hauteur !! Catherine merci pour ta positive-attitude à toute épreuve, pour ton écoute et ton grand cœur. Même si on n'était pas toujours d'accord sur les délais (mouhahaha) je garde un souvenir impérrissable de notre nocturne pizza pour finir cette review ^^ . Merci pour ton accueil chaleureux ces 3 années, j'en garderais à tout jamais un excellent souvenir ! Benoît, merci pour tout ce que tu m'as apporté et appris ces 3 années, pour ta bienveillance (« je suis confiant ! » 😊), pour ces moments de rigolade en manip (avec blouse, sans blouse, c'est pareil !), pour ces longues discussions philosophiques sur comment bâtir un monde meilleur ou sur la profession vétérinaire...bref j'ai repris confiance en moi au fil du temps et j'en avais besoin ! Je me sens (je crois^^) prête à explorer de nouveaux horizons en clinique en oncologie 😊 J'espère qu'on pourra continuer à collaborer sur toutes nos idées de projets de recherches chaque jour plus nombreuses ^^ . Un grand Merci à toi.

Merci à tous les super-chercheurs de l'équipe « Génétique du chien » qui m'ont accueillie et supportée pendant ces 3 années. Je me suis vraiment sentie bien parmi vous, et j'avais vraiment plaisir à venir travailler chaque jours ! Vous me manquerez tous. Merci Stéphanie pour tous ces bons moments : les fous rire en fabriquant notre mascara et ton démaquillant gris, les spritz à gogo à la guigette, et j'en passe !! Sans oublier tes recettes végétariennes au top ! Merci Camille pour ton aide précieuse et ta pédagogie pour les stat, mais surtout pour ta bonne humeur et ton rire contagieux au quotidien. Je te souhaite un magnifique et heureux mariage 😊 Merci Thomas pour l'œil bienveillant que tu as porté sur le projet mélanome tout au long de ces 3 ans et pour ces derniers mois de travail sur l'article, mais aussi pour le reste : ton écoute attentive et tes conseils quand j'étais parfois perdue dans mes choix professionnels, ta bonne humeur et ton entrain clé pour les pots entre collègue ^^ . Merci Christophe pour tes comptes rendus de réunion hilarants et toujours parfaitement écrits, pour tes blagues toujours (presque) très fines (excepté la blague de la couverture qui, à mon goût est un poil répétitive ^^). Que serait la pause café de 10h30 sans tes interventions ?! Merci Nadine pour toute l'aide précieuse que tu m'as apportée pendant cette thèse. Tu as vraiment été un pilier pour moi et j'ai adoré travailler avec toi 😊 Merci aussi pour ces bons moments du midi ! J'ai aussi beaucoup aimé travailler avec toi Ed. Merci pour toute l'aide que tu m'as apportée et pour toutes ces manip faites ensemble. Merci aussi pour cet excellent café préparé avec amour tous les matins, base de ces moments de convivialité si typique de l'équipe Chien 😊 . On aura aussi bien rigolé ensemble (souvent à cause de mes

bêtises^^), et bien refait le monde !! Merci Pascale pour ta relecture attentive de cette thèse. C'était agréable de pouvoir compter sur toi et d'échanger à ce sujet. Merci aussi pour ces bons moments du midi ☺. Merci aussi aux autres membres de l'équipe, Ritchie, Fred et Naoual pour les moments partagés.

Steph/Jo, tu fais quasiment parti de l'équipe chien ! C'était vraiment top d'avoir quelqu'un comme toi au quotidien ; toujours le mot pour rire et à la fois une oreille attentive. Merci pour tout, pour les revues de presses du déconfinement, les repas partagés à la cantoché, les petites clopes de la déprime, les tutos bricolage, les outils dénichés pour mes oiseaux et tous les autres bons moments.

Vous êtes tous de belles rencontres que je n'oublierais pas !

Mille merci aussi à Géraldine, pour ton aide sans faille et ta patience dans la gestion de l'administratif (rien que d'en parler j'ai des boutons !), pour tes conseils en aquariophilie (même si ça n'a pas suffi... !!) et tous ces moments d'échanges toujours très sympathiques ☺

Je tenais aussi à remercier le trio de choc de la gestion (Nadine, Rolande et Isabelle) ainsi que Nathalie. Merci pour tous ces services rendus dans la bonne humeur. J'ai particulièrement eu à faire à la super Nadine, merci à toi d'avoir toujours rendu les choses simples ☺. Merci aussi Philippe pour le travail que tu fais au labo dans la gestion du matériel et des colis, et toujours avec le sourire !

Un merci tout spécial au binôme (ex binôme... !) de choc de l'équipe GPLD : Hélène et Gégé. Merci pour ces midis de rigolade et de partage de nourriture, de mots croisés, de coup de gueule... bref vous avez égayé mes journées plus d'une fois ☺. Hélène, toujours super présente et prête à faire la fête, merci d'avoir été là en toutes circonstances (pour le meilleur et pour le pire ^^) pendant ces 3 années ☺.

Merci aux thésards et post-doc que j'ai croisé sur ma route : les vieux : Flo, Solenne, Marie, Céline, et les plus récents : Thomas, Clara, Artem, Farah, Manu pour les bons moments, les soirées en villes et les apéros à rallonge ! Je ne dois pas oublier non plus Aslak et Mativre ;). Un merci tout spécial à ma Clarouille pour ta bonne humeur, ta gentillesse et ton écoute, pour les bons moments qu'on a partagé toutes les deux !

Merci à tous mes amis pour votre soutien et votre présence inconditionnels, je suis très chanceuse de vous avoir. Les vetos Rensters (et Yann ☺) pour les soirées rennaises, les soirées jeux du confinement, vous me manquez au quotidien à Lille ! Les vétos Nansters et mes colocs d'amour de l'AAC <3. Merci à mes amis de l'équipe des vieux, d'être toujours là malgré les années qui passent, merci à mes petites chipies pour leur amitié sans faille <3

Enfin je souhaitais remercier ma famille pour l'amour et le soutien qu'elle me porte depuis 30 ans. Ma petite Mamoune, Pap's, mes sœurs chéries et la petite famille Gégé, merci pour votre présence, vos encouragements et le regard toujours bienveillant que vous portez sur mes projets.

Merci à Martin, mon amour, de m'avoir ardemment soutenue durant ces 3 ans même si ce choix de thèse a été une fois de plus une épreuve pour notre couple. J'ai hâte de te retrouver pour de vrai et de faire ma vie avec toi. Je t'aime.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	1
LISTE DES TABLEAUX	2
ABRÉVIATIONS.....	3
INTRODUCTION	6
I. Le modèle canin en génétique et en oncologie.....	6
1. Le chien: évolution de l'espèce et création des races canines	6
1.1 La domestication du chien	6
1.2 La création des races canines	7
2. Outils de biologie moléculaire disponibles chez le chien pour l'étude de son génome.....	8
2.1 Le génome du chien est proche de celui de l'homme.....	8
2.2 Evolution des outils de génétique moléculaire disponibles chez le chien	9
2.3 Utilisation de tests génétiques en médecine vétérinaire.....	11
2.3.i Tests génétiques pour les maladies héréditaires.....	11
2.3.ii Tests génétiques pour l'oncologie: recherche d'altérations somatiques	11
Aide au diagnostic dans le lymphome et les carcinomes urothéliaux et prostatiques canins	12
Préciser le pronostic: le cas du mastocytome canin.....	12
Intérêt de ces altérations génétiques pour guider la thérapie: les thérapies ciblées en	
médecine vétérinaire	14
3. Oncologie comparée.....	15
3.1 Le chien, modèle spontané de cancers	15
3.2 Le chien, modèle d'étude de prédisposition génétique aux cancers	16
3.3 Le chien pour étudier la génétique somatique du cancer	17
3.4 Le chien en tant que patient dans les essais cliniques.....	19
II. Le mélanome oral canin comme modèle d'étude des mélanomes muqueux humains	22
.....	22
1. Les tumeurs mélanocytaires de l'homme et du chien.....	22
1.1 Les mélanomes chez l'homme, entité hétérogène de cancers.....	22
1.2 Les tumeurs mélanocytaires chez le chien : Oncologie comparée	26
2. Le mélanome muqueux (MM) chez l'homme	30
2.1 Epidémiologie.....	30
2.2 Présentation clinique des mélanomes muqueux	31
2.3 Histologie des mélanomes muqueux.....	31
2.4 Facteurs pronostiques des mélanomes muqueux	32
2.5 Génétique des mélanomes muqueux	32
2.6 Traitement des mélanomes muqueux	35
2.6.i La chirurgie.....	35
2.6.ii La radiothérapie	35
2.6.iii La chimiothérapie	36
2.6.iv Les thérapies ciblées	36
2.6.v L'immunothérapie.....	37
3. Le mélanome muqueux chez le chien.....	38
3.1 Aspects épidémiologiques et cliniques des mélanomes muqueux canins	38
3.2 Génétique comparée des mélanomes muqueux canins	39
RESULTATS.....	42
I. Contexte de la thèse	42

1. Cani-DNA, un Centre de Ressources Biologiques (CRB) d'ADN et de tissus canins créé par l'équipe	42
2. Le projet mélanome à mon arrivée au laboratoire.....	42
II. Revue: Les mélanomes canins comme modèles pour les mélanomes humains : comparaisons clinique, histologique et génétique	44
ARTICLE 1	44
Canine melanomas as model for human human melanomas : clinical, histological and genetic comparison, Prouteau A. and André C., Genes, 2019.....	44
III. L'amplification focale du CFA 30 est associée à un mauvais pronostic chez le chien atteint de MM.....	66
ARTICLE 2	66
Prognostic value of somatic chromosome 30 amplifications in canine oral melanoma, Prouteau et al. Veterinary and Comparative Oncology, 2019	66
IV. L'étude génétique du MM canin définit deux sous-groupes moléculaires avec différentes cibles thérapeutiques	78
ARTICLE 3	78
Canine oral melanoma genomic and transcriptomic study defines two molecular subgroups with different therapeutic targets, Prouteau et al. In prep.....	78
1. Analyses transcriptomique de 32 cas de MM canins	79
2. Classification des tumeurs selon leur profil en variants structuraux (SV)	79
3. Caractérisation des variants structuraux dans le MM canin	80
4. Etude des gènes ciblés par les réarrangements chromosomiques.....	82
V. L'ADN tumoral circulant, biomarqueur de cancers chez le chien.....	111
ARTICLE 4	111
Interest of circulating tumor DNA as a biomarker for canine cancers: illustration in histiocytic sarcoma, oral malignant melanoma and multicentric lymphoma. Prouteau et al., submitted to Scientific Report.....	111
DISCUSSION	140
I. Apport de ces résultats pour la médecine vétérinaire	140
II. Apport de ces résultats pour la médecine humaine.....	140
1. Un sous-groupe moléculaire candidat à l'immunothérapie	141
2. Un sous-groupe moléculaire riche en CNA et en cibles thérapeutiques	141
3. Cas particulier de l'expression de l'oncogène <i>TERT</i> dans ces sous-groupes.....	143
III. Thérapies ciblées pour le MM	144
1. La voie CDK4/6	144
2. La protéine TRPM7	146
IV. Apport du modèle chien pour les essais cliniques	147
CONCLUSION	150
REFERENCES	152
ANNEXES.....	170
ANNEXE 1	170
Intérêts de la génétique en oncologie vétérinaire. Anaïs Prouteau et Benoît Hédan, Le Point vétérinaire, juillet 2019.	170
ANNEXE 2	182
A retrospective epidemiological study of 402 canine melanocytic tumors (2008-2016) : clinical outcome, prognostic factors and comparative histopathology, Prouteau et al. In prep.....	182

LISTE DES ILLUSTRATIONS

- Figure 1: D'après Lindblad-Toh *et al.* 2005 et Dobson *et al.* 2013. L'évolution du chien est caractérisée par la présence de deux "goulets d'étranglement": l'un lié à la domestication et l'autre à la formation des races.....7
- Figure 2 : Représentation des séquences conservées (orthologues) entre l'homme (Hs, à droite) et le chien (à gauche). D'après Starkey *et al.* 2005.9
- Figure 3 : Représentation schématique du récepteur tyrosine kinase c-kit et de son activation par son ligand le stem cell factor (SCF). D'après A. Prouteau et B Hédan, le Point Vétérinaire n°397, adapté de London *et al.* SCF : *stem cell factor*, KIT : récepteur de la tyrosine kinase, RAS : protéine « ras » (tiré de l'origine de sa découverte dans le sarcome du rat), BRAF : *v-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma murine sarcoma viral oncogene homolog*, PTEN : *phosphatase and tensin homolog*, MEK : *Mitogen-activated protein kinase kinase*, ERK : *Extracellular signal-regulated kinases*, PI3K : *phosphoinositide 3-kinase*, AKT : *Protein kinase B*, mTOR : *mechanistic target of rapamycin13*
- Figure 4 : Pedigree de bouviers bernois montrant le caractère "familial" de la transmission des cancers dans cette race : ici, sarcome histiocytaire (en noir), lymphome (en bleu), mastocytome (en vert). Ce pedigree illustre aussi le mode de sélection associant consanguinité et étalons champions (B. Hédan)..... 17
- Figure 5 : Principales caractéristiques biologiques acquises par la cellule tumorale. D'après le Point Vétérinaire n°397, adapté de Hanahan and Weinberg 2011. 18
- Figure 6 : Approche intégrée de l'intérêt du chien de propriétaire atteint de cancer au cours des phases de développement d'un médicament anti-cancéreux. (Paoloni et Khanna 2008).20
- Figure 7 : Aspect macroscopique d'un mélanome cutané reconnaissable à son asymétrie, ses bordures irrégulières, sa couleur variable et son diamètre supérieur à 6mm. Crédit photo: National Institutes of Health.....24
- Figure 8 : Aspect macroscopique d'un mélanome acro-lentigineux plantaire. Crédit photo: Primary care dermatology society.....24
- Figure 9 : Aspect macroscopique d'un mélanome muqueux buccal atteignant la gencive et la muqueuse labiale. Crédit photo: Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. ...25
- Figure 10 : Courbe de Kaplan Meier réalisée à partir des données de 132 751 patients atteints de MM et de mélanome cutané montrant le pronostic péjoratif des MM. Les patients ayant un MM localisé ont un pronostic plus sombre que les patients atteints de mélanome cutané avec extension loco-régionale. D'après Altieri *et al.* 2019.....26
- Figure 11 : Aspect clinique des MM de la cavité buccale chez le chien (en haut) et l'homme (en bas). Crédit photo: P De Fornel-Thibaud, A Dupuy, T Jouary.....27
- Figure 12 : Aspect clinique du mélanome cutané canin (gauche) et du mélanome cutané nodulaire humain (droite). Crédit photo: P. Durieux et T. Jouary. D'après Prouteau and André 2019.27
- Figure 13 : Aspect clinique du mélanome acro-lentigineux humain et du mélanome digité canin. Les mélanomes digités du chien peuvent toucher le lit de l'ongle, la peau des doigts (A) et le coussinet (B) et sont souvent ulcérés. Chez l'homme, les mélanomes acro-lentigineux touchent la face palmaire des mains (C) et la face plantaire des pieds(D). Crédit photo: A. Muller (A), F.A. Fogel (B), A. Dupuy (C), and E. Maubec (D).D'après Prouteau and André 2019.....28
- Figure 14 : Courbe de Kaplan Meier réalisée à partir des données de 336 chiens atteints de mélanome cutané (rouge), digités (bleu) et buccaux (vert) issues du laboratoire (travail de Master 2, données recueillies par C. de Brito). La localisation buccale a le plus mauvais pronostic.28

Figure 15 : Les MM et les mélanomes acro-lentigineux présentent significativement plus d'altérations chromosomiques (changement du nombre de copies) que les mélanomes cutanés liés à l'exposition aux UV. D'après Curtin <i>et al.</i> 2005.....	33
Figure 16 : Profil de variation du nombre de copies (CNA) de MM humains (n=30) et MM canins (n=55). Les gains sont représentés en bleu et les délétions en orange, le long des chromosomes dans les deux espèces, le MM est caractérisé par un nombre important de CNA. D'après Wong <i>et al.</i>	41
Figure 17 : Résultat de FISH sur une lignée cellulaire canine présentant des amplifications focales du CFA 10 et du CFA 30. On observe que les sondes marquant le gène <i>MDM2</i> (CFA 10, en vert) et le gène <i>TRPM7</i> (CFA 30, en rouge) sont co-localisées, ce qui témoigne de réarrangements interchromosomiques complexes, compatibles avec du chromothripsis.....	81
Figure 18 : a) Le chromothripsis est une forme d'instabilité génomique provoquant de très nombreux réarrangements arrivant au cours d'un évènement unique. b) Un ou plusieurs chromosomes se fragmentent et se réassemblent de façon anarchique. D'après Rode <i>et al.</i> 2016.....	82
Figure 19 : Régulation de la transition G1/S du cycle cellulaire et rôle de CCND1 (Cyclin D1), CDK4/6 et CDKN2A (p16). La liaison avec la cycline D1 active la kinase CDK4 qui phosphoryle Rb, libérant ainsi le facteur de transcription E2F qui permet la progression du cycle cellulaire. D'après Akin <i>et al.</i> 2014.....	145
Figure 20 : Concentration inhibitrice médiane de l'inhibiteur de TRPM7, NSB593, sur 6 lignées cellulaires de MM canins en fonction du nombre de copies du gène <i>TRPM7</i> (qPCR). On observe que plus le nombre de copie du gène TRPM7 est élevé, moins la lignée est sensible à l'inhibiteur.....	147

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Sensibilité de 4 lignées cellulaires de MM canin au palbociclib en fonction des altérations de la voie CDK4 détectées en PCR quantitative (qPCR) ou séquençage d'exome (WES) ou génome entier (WGS).....	146
--	-----

ABRÉVIATIONS

ADNct: ADN tumoral circulant
AJCC: American Joint Comitee on Cancer
AKT : Protein kinase B
ALM: acral lentiginous melanoma
AMM: autorisation de mise sur le marché
ANGPT1: angiopoietin 1
APOBEC3A: Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme Catalytic Subunit 3A
AVMA: American Veterinary Medical Association
B2M: beta-2-microglobulin
BAC: bacterial artificial chromosome
BAP1: BRCA1 associated protein 1
BFB: breakage-fusion-bridge
BRAF: v-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma murine sarcoma viral oncogene homolog
BRCA1/2: BReast Cancer ½
BUB1: budding uninhibited by benzimidazoles 1
CCL3: chemokine ligand 3
CCND1: Cyclin D1
CCOGC: Canine Comparative Oncology and Genomics Consortium
CDK4 : Cyclin dependent kinase 4
CDKN2A : Cyclin dependent kinase inhibitor 2A
CD3: cluster of differentiation 3
CTLA-4: cytotoxic T lymphocyte antigen 4
CFA : Canis familiaris
CHOP protocol : cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, prednisone
CGH : Comparative genomic hybridization
COP : Comparative Oncology Program
COTC : comparative oncology trials consortium
CNA : Copy Number Alterations
CRB : Centre de ressources biologiques
CXCL12: C-X-C Motif Chemokine Ligand 12
ddPCR : digital droplet PCR
EGFR: epidermal growth factor receptor
ERK : Extracellular signal-regulated kinases

ENV : Ecole nationale vétérinaire

FCI : Fédération Cynologique Internationale

FDA: Food and Drug Administration
FISH : Fluorescence in situ hybridization
FFPE : formalin fixed paraffin embeded
FGF5: Fibroblast Growth Factor 5
FLT3 : Fms-like tyrosine kinase 3

GABPB1: GA Binding Protein Transcription Factor Subunit Beta 1
GIST: Tumeur des cellules stromales gastro-intestinales
GNAQ: Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha
GNA11: Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11
GWAS : Genome Wide Association Study
GZMB: granzyme B
HER2: Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
IFN-alpha: interferon alpha
IGFR2: Insulin Like Growth Factor 2 Receptor
IGH: Immunoglobulin heavy locus
IL-2: interleukine 2
ITK: inhibiteurs des récepteurs tyrosine kinase
KIT : Receptor Tyrosine Kinase
KNSTRN: kinetochore localized astrin (SPAG5) binding protein
KRT71: Keratin 71
LAG3: Lymphocyte-activation gene 3
LMM: lentigo maligna melanoma
lncRNA: ARN long non-codant
LOF : livre des origines françaises
MAP Kinase : mitogen-activated protein kinases
MC: mélanome cutané
MDM2: murine double minute 2
MEK : Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1
MITF: Melanocyte Inducing Transcription Factor
MM: mélanome muqueux
MST: median survival time ou durée de survie médiane
MTAP: methylthioadenosine phosphorylase
mTOR : mechanistic target of rapamycin

NCI: National Cancer Institute
ND : Nom déposé
NF1 : Neurofibromin 1
NGS : Next Generation Sequencing
NHLRC1: NHL Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 1
NOTCH2: Neurogenic locus notch homolog protein 2
NM: nodular melanoma
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PD-1 : programmed cell death 1
PD-L1 : programmed cell death ligand 1
PCR : polymerase chain reaction
PDGFR : Platelet Derived Growth Factor Receptor
PDX : Patient derived xenograft
PI3K : phosphoinositide 3-kinase
PNPLA1: Patatin Like Phospholipase Domain Containing 1
PPP6C: Protein Phosphatase 6 Catalytic Subunit

PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
PTK2: protein tyrosine kinase 2
PTPN11: protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11
PTPRD: Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type D
PTPRJ: Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type J
RAC1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Rb : protéine du rétinoblastome
RB1 : protéine du rétinoblastome 1
RPL29: Ribosomal Protein L29
RSPO2: R-Spondin 2
SCF: stem cell factor
SETD2: SET domain containing 2
SF3B1 : splicing factor 3b subunit 1
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
SH : Sarcome histiocytaire
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
SNV: single nucleotide variant
SPPL2A: Signal peptide peptidase-like 2A
SPRED1: Sprouty Related EVH1 Domain Containing 1
SSM: superficial spreading melanoma
SV: structural variant
VEGFR2 : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
TERT : télomérase reverse transcriptase
TCGA : the cancer genome atlas
TCR: T cell receptor
TIM3: T-cell immunoglobulin
TNM: Tumor, Node, Metastasis
UICC: Union Internationale contre le Cancer
USDA: United states department of agriculture
USP8: Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8
UV: rayons ultra-violets
WES : Whole Exome Sequencing
WGS : Whole Genome Sequencing

INTRODUCTION

I. Le modèle canin en génétique et en oncologie

1. Le chien: évolution de l'espèce et création des races canines

1.1 La domestication du chien

Le chien domestique *Canis familiaris* appartient à la grande famille des canidés qui regroupe 35 espèces réparties en 13 genres, dont les plus importants sont les genres *Vulpes* (renards) et *Canis* (loup, chacal, coyote, dhole, dingo et chien domestique). Il est maintenant admis que c'est le loup qui est à l'origine du chien sans qu'aucun autre canidé n'y soit impliqué¹⁻³. Ce sont les loups du Paléolithique supérieur qui sont les ancêtres communs du loup gris actuel (*Canis lupus*) et du chien domestique^{4,5}. Malgré les nombreuses études génétiques et phénotypiques réalisées, les origines géographiques du chien et de sa domestication divisent toujours la communauté scientifique, avec différentes localisations mentionnées comme l'Europe², l'Asie centrale⁶, l'Asie du sud-est⁷ et le Moyen-Orient³. Certains auteurs suggèrent que la domestication du chien a une double origine et aurait eu lieu en Europe et en Asie du sud-est⁸, alors que d'autres soutiennent l'hypothèse d'une seule origine en Asie du sud-est⁹. Au fil des études, plusieurs éléments ont tout de même rassemblé les chercheurs. Le chien est le premier animal à avoir été domestiqué il y a 15 000 à 30 000 ans par les hommes « chasseurs-cueilleurs », nomades, et les autres espèces comme l'auroch ou le cheval, l'ont été plus tard, par les premiers hommes « agriculteurs », il y a 10 000 ans^{1,2,4,8,10,11}. Parmi les scénarios et hypothèses avancées, les premiers loups partageaient les mêmes niches écologiques que les hommes, et se seraient approchés d'eux pour finir les carcasses laissées sur les camps. L'intérêt aurait été mutuel : les loups habitués à l'homme les protégeaient/prévenaient de certains prédateurs, tandis que les hommes laissaient aux loups des restes de nourriture. De ces contacts, est probablement née la relation homme-chien unique basée sur la coopération. Il est cependant très difficile et controversé de savoir si les premiers chiens paléolithiques ont pu interagir avec les humains à un niveau suffisant pour jouer un rôle clé dans les stratégies de subsistance. Une étude a suggéré que les hommes auraient également appris beaucoup aux côtés des loups, notamment sur la territorialité, la chasse et la défense en groupe et les comportements sociaux. Les hommes se sont ensuite sédentarisés il y a près de 7000 ans, sur une vaste période qui correspond à la révolution culturelle, sociale et économique du Néolithique. La sédentarisation de l'homme et le développement de l'agriculture ont exercé de nouvelles formes de pression de sélection visibles à l'échelle du génome du chien. Ainsi, le rôle de l'agriculture sur le changement de régime alimentaire du chien a entraîné la sélection de modifications génétiques^{12,13} dont l'expansion du nombre de copie du gène *AMY2B* qui permet au pancréas de produire l'amylase, une enzyme responsable de la digestion de l'amidon, retrouvé dans le blé, le maïs et autres céréales. Avec l'expansion de l'élevage du bétail, le chien a également dû s'adapter à un

mode de vie plus sédentaire et durant cette période a eu lieu une sélection de chiens plus petits, et plus aptes à l'aide au travail avec le bétail ⁵.

Les études sur l'évolution du chien suggèrent un modèle de domestication avec deux « goulets d'étranglement » responsables de la diminution de la variabilité génétique ¹⁴ (Figure 1): l'un associé aux premiers loups domestiqués, qui étaient naturellement les moins agressifs, les moins peureux, et moins dominants, et donc les meilleurs candidats à la domestication. Le second « goulet d'étranglement » correspond à la sélection de chiens avec des critères morphologiques et comportementaux particuliers pour créer les races canines. Cependant, tout au long de la domestication du chien, des croisements ont eu lieu entre différentes populations de chiens et de loups⁵. Chacune de ces étapes de la domestication a laissé ses marques sur le génome canin en réduisant la variabilité génétique.

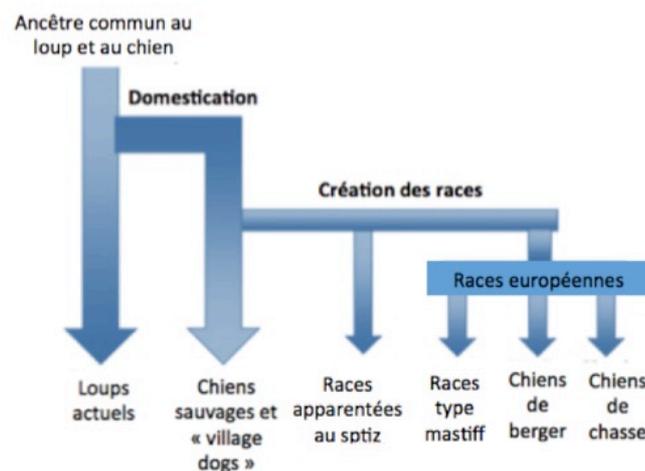


Figure 1: D'après Lindblad-Toh *et al.* 2005 et Dobson *et al.* 2013. L'évolution du chien est caractérisée par la présence de deux "goulets d'étranglement": l'un lié à la domestication et l'autre à la formation des races.

1.2 La création des races canines

Le chien moderne et les pratiques d'élevage actuelles ont émergé dès l'époque médiévale, et ces dernières se sont intensifiées à l'Âge Victorien (XIX^{ème} siècle), avec l'apparition des clubs de races et des premiers registres ⁵. Cette sélection artificielle pour répondre à des standards phénotypiques spécifiques a permis d'obtenir des individus très homogènes au sein d'une même race, sur les plans morphologiques et comportementaux, et parfois très différents d'une race à l'autre. Beaucoup de ces races canines ont été créées pour répondre à des besoins de l'homme comme la chasse, la garde de troupeaux, le sauvetage ou la compagnie. Ainsi, les races modernes ont une diversité phénotypique très importante entre

elles, résultant de la sélection d'un petit nombre de variants génétiques définissant entre autre la taille ¹⁵, la morphologie ¹⁶, la couleur du poil ¹⁷⁻¹⁹ ou sa texture ²⁰.

Aujourd'hui on dénombre près de 400 races, classées en 10 groupes selon la FCI (Fédération Cynologique Internationale). Pour être utilisés pour la reproduction, les chiens de race doivent être inscrits au Livre des Origines Français (LOF), et provenir de parents eux-mêmes inscrits si le livre des origines de la race est fermé, ce qui limite fortement le brassage génétique. Dans les races modernes, la sur-utilisation pour la reproduction de certains mâles « étalons champions » correspondant aux standards de race et la pratique répétée de mariages consanguins ont largement contribué à la diminution de la variabilité génétique et à la perte de certains allèles dans chacune des races. Ainsi, la forte homogénéité génétique intra-race fait que chacune des races peut être considérée comme un « isolat génétique ». Malheureusement, dans de nombreuses races canines, la sélection artificielle d'un phénotype a également entraîné la co-sélection de mutations causales de maladies génétiques monogéniques ou d'allèles à risques prédisposant à certaines maladies complexes dont des cancers.

2. Outils de biologie moléculaire disponibles chez le chien pour l'étude de son génome

2.1 Le génome du chien est proche de celui de l'homme

Depuis l'annotation du génome humain en 2003, les outils de biologie moléculaire sont en amélioration croissante au service d'une médecine de plus en plus sophistiquée et personnalisée. Chez le chien, le développement de ces outils suit de très près ce qui est réalisé chez l'homme, et a permis de montrer une grande similitude entre les génomes canin et humain. Le génome canin est composé de plus de 20 000 gènes répartis sur 38 paires d'autosomes et une paire de chromosomes sexuels, avec une taille d'environ 2,4 Gigabases ¹⁴. Il est plus proche de celui de l'homme que l'est celui de la souris, avec une divergence nucléotidique de 0,35 substitution par site pour le chien, contre 0,51 pour la souris ^{14,21}. Entre l'homme et le chien, il a été mis en évidence de nombreux gènes orthologues descendant d'un même gène ancestral, et conservés entre les deux espèces (Figure 2), parfois en bloc: on parle alors de blocs de synténie²².

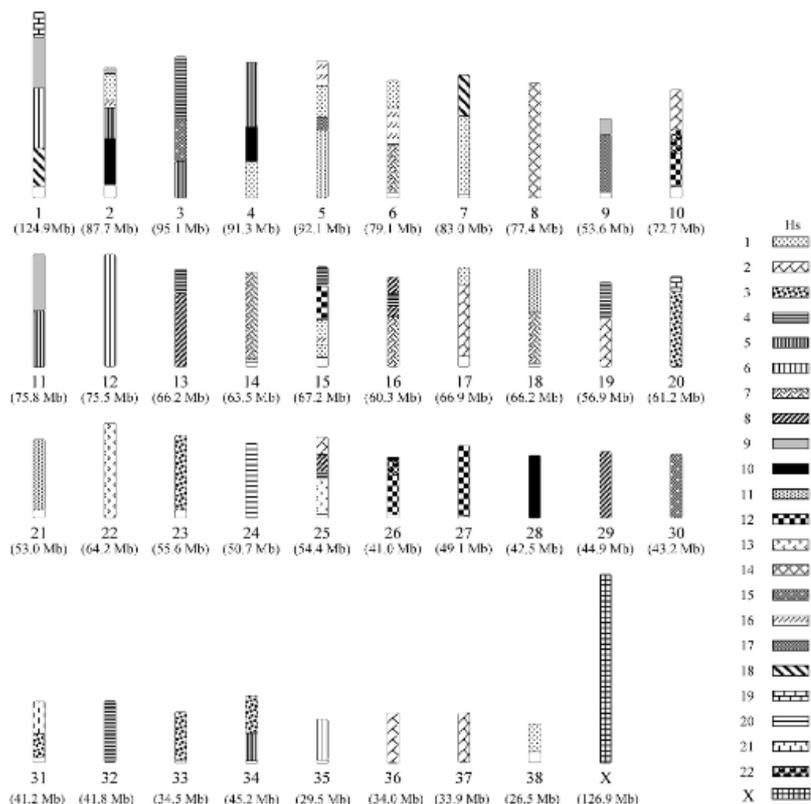


Figure 2 : Représentation des séquences conservées (orthologues) entre l'homme (Hs, à droite) et le chien (à gauche). D'après Starkey *et al.* 2005.

Ces orthologies ont été découvertes grâce à l'évolution rapide des outils de biologie moléculaire chez le chien, et renforcent l'utilisation du chien comme modèle pour l'homme, notamment en génétique.

2.2 Evolution des outils de génétique moléculaire disponibles chez le chien

En 2003, le séquençage du génome d'un caniche donne pour la première fois accès au génome du chien ²³. Cependant, le recouvrement assez faible (1,5X) de ce séquençage a poussé le Broad Institute (Etats-Unis) quelques années plus tard, à séquencer le génome d'un autre chien, le boxer Tasha, avec une couverture plus importante de 7,5X (Lindblad-Toh *et al.* 2005). Cette séquence est souvent ré-analysée pour en améliorer l'annotation. Cette amélioration suit l'évolution des outils de génétique moléculaire dont le séquençage haut débit nouvelle génération (NGS) et la mise en place d'outils bio-informatiques ²⁴⁻²⁷. Le séquençage du génome canin dans son ensemble a permis d'affiner la connaissance des microsatellites et d'autres marqueurs génétiques polymorphes comme les SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Ces marqueurs polymorphes répartis sur tout le génome permettent l'identification de régions chromosomiques associées à la transmission de certains caractères ou de maladies génétiques. Deux méthodes d'analyses sont utilisées: l'analyse de liaison génétique lorsqu'on suit la ségrégation des allèles dans une famille, et l'analyse génétique d'association appelée GWAS (Genome Wide Association Study) lorsqu'on étudie la répartition des fréquences alléliques dans une population. La bonne annotation des régions

codantes et non codantes permet ensuite de rechercher les gènes impliqués et les mutations causales. D'autres techniques, comme l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) permettant de visualiser au microscope des régions cibles sur l'ADN de cellules en division, et l'hybridation génomique comparative (CGH) qui permet d'analyser les variations de nombre de copies (CNA), ont été adaptées au génome du chien.

Peu à peu les techniques de génotypage se sont améliorées pour voir apparaître le génotypage sur puce SNP haute densité. Les puces développées par la société Illumina avec 22 000 SNP et Affymetrix avec 50 000 SNP, sont désormais dépassées par les puces Illumina CanineHD (173 000 SNP) et Affymetrix Axiom Canine Genotyping Array Set (710 000 SNP). Ces progrès ont permis d'identifier de nombreux gènes responsables de traits phénotypiques par analyse GWAS, comme par exemple les gènes *FGF5*, *KRT71* et *RSPO2* liés à la longueur et à la texture du poil ²⁰. Un autre exemple de l'utilisation de ces outils chez le chien est la découverte par notre équipe de la mutation d'un gène, responsable de l'ichtyose chez le golden retriever. Cette maladie très fréquente dans cette race provoque une desquamation plus ou moins importante de la peau du dos et du ventre. En 2012, notre équipe a montré que la maladie se transmettait selon un mode autosomal récessif et était associée à la mutation du gène *PNPLA1*. Ce même gène a ensuite été retrouvé muté dans des familles humaines également atteintes d'ichtyose ²⁸. Cet exemple illustre l'intérêt du chien comme modèle génétique naturel efficace pour l'étude de maladies fréquentes dans certaines races et rares chez l'homme où il est difficile d'en identifier les causes génétiques. Plus tard, l'apparition du NGS en génétique humaine a aussi bénéficié à la génétique canine, permettant de séquencer le génome entier (Whole Genome Sequencing, WGS) ou juste les parties codantes (Whole Exome Sequencing, WES). Aujourd'hui, l'ADN ou l'ARN provenant du sang, de tissus sains ou de tumeurs de chiens peut être séquencé de façon efficace et à moindre coût.

La bonne annotation du génome canin est un prérequis pour les études génétiques sur ce modèle, et celle-ci a largement été améliorée au fil du temps. Ainsi, l'annotation du génome canin CanFam 1¹⁴ a laissé place à l'annotation CanFam 3.1, bien plus complète, intégrant des régions codantes mal couvertes par l'ancienne annotation, mais également des gènes codant des micro-ARN et des ARN non-codants, ainsi que des régions régulatrices. Plus récemment notre équipe a contribué au développement de l'outil FEELnc où sont référencées les données de 10 000 ARN long-non codants (lncRNA) canins ^{29,30}. Le Broad Institute (Boston, USA) a créé une base de données, Barkbase (barkbase.org), contenant des données d'expression de 27 tissus différents, et qui discerne des transcrits tissus-spécifiques chez le chien ³¹. Enfin, le Consortium International du Séquençage du Génome Canin (Dog 10 K) a récemment lancé l'audacieux projet de séquencer 10 000 génomes de chiens de races différentes et de canidés sauvages, dans le but de préciser l'annotation du génome de référence existant et de mettre à disposition de la communauté scientifiques ces nouvelles annotations de races ³². Des données de séquençage de génomes de dogue allemand, de basenji et de dingos sont également disponibles. Très récemment, un nouveau génome de référence, CanFam GSD a été publié, et provient d'une femelle Berger Allemand dont l'ADN a été entièrement séquencé par la méthode dite de "longs fragments" (long read) ³³.

Tous ces nouveaux outils permettent d'améliorer les connaissances du modèle canin sur le plan génétique, et de pouvoir répondre à un panel agrandi de questions scientifiques et

de manière plus précises. Ils permettent non seulement de pointer des altérations génétiques impliquées dans des maladies à transmission mendélienne, mais aussi dans des maladies plus complexes et multifactorielles comme les cancers. Avec la découverte de mutations responsables de maladies monogéniques ou d'allèles de prédisposition, des tests génétiques ont été développés chez le chien.

2.3 Utilisation de tests génétiques en médecine vétérinaire

Il existe deux types de test génétiques utilisés en médecine vétérinaire : les tests réalisés sur l'ADN constitutionnel des individus ou ADN germlinal, permettant aux éleveurs de sélectionner leurs reproducteurs, et les tests recherchant des altérations somatiques, présentes uniquement dans les cellules cancéreuses et propres à celles-ci, de plus en plus utilisés en oncologie vétérinaire.

2.3.i Tests génétiques pour les maladies héréditaires

Comme nous l'avons vu précédemment, la pression de sélection exercée par l'homme pour créer les races canines a entraîné la sélection de maladies spécifiques. De ce fait, les tests génétiques sont aujourd'hui des outils importants pour les éleveurs. Par exemple, le test génétique de l'ichtyose chez le golden retriever a été développé par le laboratoire Antagène suite à l'identification de la mutation et du gène en cause par notre équipe. La maladie ayant un mode de transmission autosomal récessif, les individus homozygotes mutés pour le gène *PNPLA1* sont atteints de la maladie, les hétérozygotes sont porteurs mais non atteints, et les homozygotes non mutés sont indemnes. En cas de suspicion de la maladie, ce test permet donc au vétérinaire d'identifier avec certitude un chien atteint, et ainsi de prévenir l'éleveur qui peut utiliser ces informations pour sélectionner des chiens indemnes ou porteurs, mais non atteints pour la reproduction. Plus récemment, notre équipe a également permis le développement d'un test génétique de risque pour le sarcome histiocytaire (SH) chez le bouvier bernois (test SH, avec l'aide du laboratoire Antagène). Ce test utilisant 9 marqueurs (SNP) délivre un indice génétique qui évalue le risque (à risque, neutre, protégé) pour le chien de développer et de transmettre un sarcome histiocytaire, et aide ainsi les éleveurs à prévoir des mariages qui donneront des portées moins touchées par ce cancer. L'utilisation de tels tests de risque permet peu à peu aux éleveurs de diminuer significativement la prévalence de ces maladies héréditaires dans leurs élevages. Ceci a été démontré par Ahonen et al. sur la maladie de Lafora des teckels à poils durs provoquant une dégénérescence neurologique sévère (homologue de la maladie de Lafora chez l'homme), et associée à la mutation du gène *NHLRC1*³⁴. Après 6 ans d'utilisation du test, ils ont montré que la fréquence d'individus homozygotes mutés était passée de 10.4% à 2.7%, et la fréquence d'individus porteurs hétérozygotes était passée de 41.5% à 25.7%³⁴.

2.3.ii Tests génétiques pour l'oncologie: recherche d'altérations somatiques

En oncologie vétérinaire, les tests visant à rechercher une altération génétique somatique spécifique de cancer se développent peu à peu, à la lueur de ce qui est effectué chez l'homme. Ils peuvent avoir différentes applications comme aider au diagnostic, préciser le pronostic, guider la thérapie ou permettre un suivi de la maladie résiduelle.

Dans le but de diagnostiquer le lymphome, la méthode dite *polymerase chain reaction for antigen receptor rearrangement* (PARR), ou test de clonalité, a été développée chez l'homme, puis chez le chien, pour différencier une prolifération lymphocytaire néoplasique d'une lymphoprolifération non néoplasique. Elle consiste à amplifier les régions génomiques spécifiques des lymphocytes qui codent pour les récepteurs aux antigènes, correspondant au TCR pour les lymphocytes T (*T cell receptor*) et à l'IGH (chaîne lourde de l'immunoglobuline) pour les lymphocytes B. Cette région amplifiée par *polymerase chain reaction* (PCR) est spécifique d'un clone lymphocytaire et chaque clone sera représenté par un produit de PCR unique. Lors de l'analyse d'un échantillon (tissus, sang, épanchement), la présence d'un seul et unique produit de PCR indique la présence d'un clone lymphocytaire majoritaire, qui est fréquemment un clone tumoral, alors que de multiples produits de PCR soulignent l'existence de différents lymphocytes présents lors de l'inflammation. Ce test est utilisé en plus d'autres outils diagnostiques (histologie, immunomarquages, cytométrie en flux) pour préciser ou confirmer un diagnostic de lymphome, notamment dans les formes digestives qui peuvent être confondues avec une maladie inflammatoire chronique ³⁵.

Un laboratoire américain a récemment développé un test diagnostique pour le carcinome urothélial canin et le carcinome prostatique grâce à l'identification de la mutation V595E du gène *BRAF* (équivalente à la mutation V600E du gène *BRAF* chez l'homme) dans les urines des chiens atteints ^{36,37}. Chez le chien, comme chez l'homme, les cellules tumorales libèrent de l'ADN tumoral libre dans les liquides physiologiques comme le sang, les épanchements, ou l'urine, par le biais de mécanismes de nécrose ou d'apoptose ³⁸. Chez le chien, la mutation *BRAF*_{V595E} est présente dans 67 à 87% des cas de carcinomes urothéliaux et 80% des carcinomes prostatiques, et sa recherche dans l'urine permet un diagnostic aisé et non invasif, ainsi qu'un suivi thérapeutique. Ce test a une concordance de 100 % (n = 9) ³⁶ entre la détection de la mutation dans la tumeur et dans l'urine, une sensibilité de 85% et une spécificité de 100% pour diagnostiquer un carcinome urothélial ou prostatique avec la technique de ddPCR (digital droplet PCR)³⁷. Ces tests entrent dans la catégorie innovante des "biopsies liquides", permettant un diagnostic de certains cancers de façon non-invasive chez l'homme. Au cours de ma thèse, j'ai également travaillé sur le développement de tests utilisant l'ADN tumoral circulant (ADNct) dans le plasma des chiens comme biomarqueur de cancers pour le diagnostic et suivi de la maladie résiduelle (MRD) (cela sera détaillé dans la partie Résultats).

Préciser le pronostic: le cas du mastocytome canin

Dans certains cas, l'étude d'altérations génétiques de la tumeur peut compléter les données histologiques et préciser un pronostic. Le récepteur tyrosine kinase c-kit est une protéine transmembranaire codée par le gène *KIT*, présente sur de nombreux types cellulaires et particulièrement sur les mastocytes. Ce récepteur est activé par le *stem cell factor* (SCF) qui induit une cascade de signalisations et active la prolifération, la motilité et la survie des cellules ³⁹ (Figure 3). Lorsqu'il est muté, le récepteur est continuellement activé, indépendamment de sa liaison avec le SCF. Les mutations du gène *KIT* sont maintenant bien connues dans le mastocytome canin et constituent un facteur pronostique supplémentaire des deux systèmes de classification existants (systèmes de grade de Patnaik et de Kiupel).

Plusieurs études montrent que les mutations du gène *KIT*, qui ont lieu le plus souvent dans l'exon 11, sont corrélées à un grade élevé (entre 30 et 55 % des tumeurs de grade II-III de Patnaik ou haut grade de Kiupel) et signent un phénotype agressif du mastocytome associé à un pronostic plus sombre ⁴⁰⁻⁴⁴. La détection de la mutation peut être réalisée par certains laboratoires d'anatomo-pathologie vétérinaires, par séquençage du gène (de l'exon 11 plus particulièrement) sur un prélèvement tumoral. Les mutations de *KIT* sont corrélées à un pattern d'expression aberrant de sa protéine au sein de la cellule tumorale ⁴⁵. Ce pattern, observé par immunohistochimie, peut être membranaire (cas normal) ou cytoplasmique (focal ou diffus) et a également une valeur pronostique ^{41,46}.

D'autres marqueurs génétiques restent à définir dans les différents types de cancers pour mieux prédire leur comportement biologique et leur pronostic.

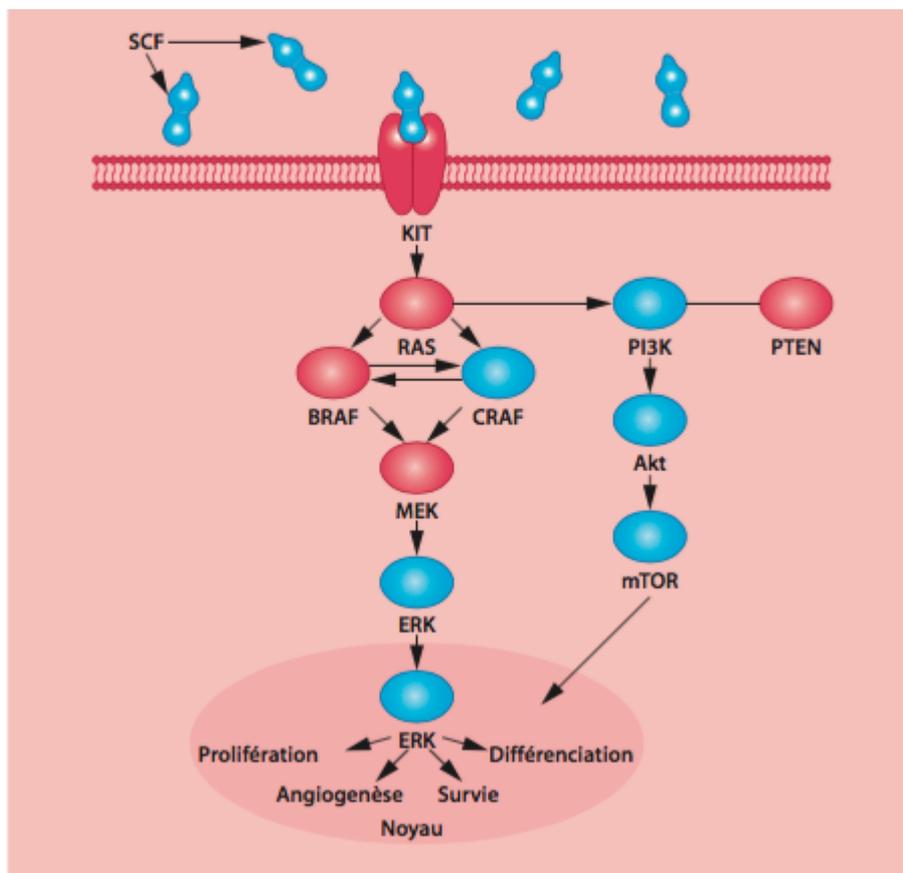


Figure 3 : Représentation schématique du récepteur tyrosine kinase c-kit et de son activation par son ligand le stem cell factor (SCF). D'après A. Prouteau et B Hédan, le Point Vétérinaire n°397, adapté de London *et al.* SCF : *stem cell factor*, KIT : récepteur de la tyrosine kinase, RAS : protéine « ras » (tiré de l'origine de sa découverte dans le sarcome du rat), BRAF : *v-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma murine sarcoma viral oncogene homolog*, PTEN : *phosphatase and tensin homolog*, MEK : *Mitogen-activated protein kinase kinase*, ERK : *Extracellular signal-regulated kinases*, PI3K : *phosphoinositide 3-kinase*, AKT : *Protein kinase B*, mTOR : *mechanistic target of rapamycin*

En plus de leur potentielle valeur pronostique, les altérations génétiques du cancer peuvent constituer des cibles thérapeutiques intéressantes. En oncologie humaine et vétérinaire, il existe différents axes de traitement du cancer : la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie/biothérapie (qui inclut l'immunothérapie), et les techniques d'oncologie interventionnelles (chimioembolisation, cryoablation, radiofréquence, etc.) qui tendent à se développer chez le chien et le chat. Ces dernières années, la compréhension des mécanismes fonctionnels de la cellule cancéreuse a permis l'essor de l'immunothérapie et des thérapies ciblées chez l'homme. Les thérapies ciblées consistent à bloquer une voie oncogénique activée dans la cellule cancéreuse, responsable de la prolifération et de la survie cellulaire. Ces médicaments reposent sur le profil moléculaire de la tumeur (présence ou absence de mutations somatiques spécifiques) et non plus uniquement sur son type histologique. Ainsi, une même thérapie peut se révéler efficace sur des cancers qui touchent des organes différents ayant les mêmes altérations moléculaires.

Chez l'homme, de nombreuses molécules de thérapie ciblée ont déjà obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) ou sont en cours d'essais cliniques. En médecine vétérinaire, seules deux molécules de thérapie ciblée disposent actuellement d'une AMM: il s'agit du tocéranib (Palladia®) et du masitinib (Masivet®), qui font partie de la classe des inhibiteurs des récepteurs tyrosine kinase (ITK). Ces deux molécules n'ont pas tout à fait les mêmes cibles et disposent d'une AMM légèrement différente. Le masitinib agit notamment sur le récepteur *c-kit*, le *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) et le *fibroblast growth factor receptor* (FGFR3). Il est indiqué dans le traitement du mastocytome canin de grades II et III de Patnaik non opérable portant la mutation du gène *KIT*^{39,47}. Le tocéranib possède un spectre plus large, et cible notamment les récepteurs *c-kit*, PDGFR- β et le vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR-2)^{46,47}. Ses indications sont les mastocytomes canins de grades II et III non opérables ou récidivants. Les différents essais cliniques montrent une efficacité des deux molécules en monothérapie, avec un meilleur taux de réponse clinique chez les chiens porteurs d'une mutation du gène *KIT*^{41,47}. Il est également démontré que lors de mastocytome métastasé, le gène *KIT* est muté dans la tumeur primaire et dans les métastases, ce qui illustre l'intérêt des ITK dans la prise en charge des maladies à un stade avancé⁴⁸. Leur utilisation hors AMM dans le traitement d'autres cancers du chien se révèle intéressante, notamment lors de carcinome thyroïdien, de carcinome des glandes apocrines des sacs anaux, des carcinomes de la tête et du cou et des tumeurs stromales gastro-intestinales^{49,50}. Chez le chat, les ITK sont également bien tolérés^{51,52}, et des études rétrospectives suggèrent que le tocéranib est intéressant dans le traitement du mastocytome^{53,54} et du carcinome épidermoïde buccal félins⁵⁵.

Les éléments de ce chapitre sur l'intérêt de la génétique en oncologie vétérinaire ont fait l'objet d'une publication dans le journal francophone « Le Point vétérinaire »⁵⁶ présentée en Annexe 1.

3. Oncologie comparée

3.1 Le chien, modèle spontané de cancers

Comme chez l'homme, l'incidence du cancer est croissante chez le chien, avec 99 à 852 nouveaux cas / 100 000 chiens par an selon les pays étudiés⁵⁷. Certaines études ont rapporté que le cancer était à l'origine d'environ 30% des décès dans cette espèce⁵⁸⁻⁶⁰. Une étude réalisée en Suisse a montré que les cancers les plus fréquemment diagnostiqués chez chien étaient le mastocytome, les sarcomes des tissus mous, les lymphomes, l'ostéosarcome et le carcinome mammaire⁶¹. L'amélioration des soins vétérinaires, l'attachement toujours plus fort des propriétaires à leurs animaux de compagnie et le développement d'outils diagnostics précis font apparaître dans la population canine plus de maladies liées à l'âge, dont les cancers⁶². Aujourd'hui, un arsenal thérapeutique important est disponible pour la prise en charge des animaux atteints de cancers incluant chirurgie, chimiothérapie, radiothérapie, immunothérapie et oncologie interventionnelle, souvent dispensées par des vétérinaires spécialistes en oncologie et radiothérapie, de plus en plus nombreux. Les protocoles de chimiothérapie en médecine vétérinaire sont généralement issus de la médecine humaine. Le chien développe des cancers homologues à ceux de l'homme, partageant de nombreux points communs sur les plans histologiques, génétiques avec la présence des mêmes cibles thérapeutiques, le comportement biologique et la réponse aux thérapies conventionnelles. Ceci est bien illustré par le lymphome multicentrique de haut-grade. Ses caractéristiques histologiques le rapprochent très fortement du lymphome B diffus à grandes cellules humain, avec qui il partage la même présentation clinique et une efficacité similaire au traitement de type CHOP (cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, prednisone)⁶²⁻⁶⁴. D'autres cancers canins sont comparables à leur homologue humain, comme l'ostéosarcome^{1,65}, le mastocytome⁶⁶, les sarcomes^{57,67}, le carcinome urothélial^{68,69}, les tumeurs intracrâniennes⁷⁰⁻⁷² ou les mélanomes^{57,73-75}. Certains de ces cancers sont rares chez l'homme et ont une incidence élevée dans certaines races de chien, du fait de la sélection artificielle chez le chien. C'est le cas par exemple du sarcome histiocytaire chez le bouvier bernois, de l'ostéosarcome chez les chiens de races grandes à géantes ou du mélanome buccal chez le caniche⁵⁷.

De ce fait, le modèle chien en cancérologie se distingue complètement des autres modèles animaux et notamment du modèle murin où des tumeurs sont le plus souvent induites dans des souris immunodéprimées ou se développent dans des souris génétiquement modifiées. En effet, les cancers du chien se développent spontanément, dans un organisme immunocompétent partageant notre environnement, et présentent la même complexité biologique que les cancers humains, avec une hétérogénéité intra-tumorale à l'origine de récurrences, de métastases et de résistance aux thérapies.

De ces constats est née l'oncologie comparée, qui intègre les données de ces cancers spontanés développés par des « patients chiens », dans l'étude plus large de la biologie du cancer et des thérapies anti-cancéreuses. Grâce à toutes ses caractéristiques, aux outils de biologie moléculaires disponibles et à la qualité du soin vétérinaire, le modèle canin permet l'identification de gènes associés aux cancers, l'étude de facteurs de risques environnementaux, de comprendre les mécanismes d'initiation et de progression tumorales,

l'étude des mécanismes de résistance, et surtout, l'évaluation et le développement de nouvelles thérapies ⁷⁶. C'est dans ce but que le Comparative Oncology Program (COP; ccr.cancer.gov/resources/cop) du National Cancer Institute (NCI) a été développé dès 2003 aux Etats-Unis par le Pr. Chand Khanna et le Pr. Vail, avec le Canine Comparative Oncology and Genomics Consortium (CCOGC), cofinancé par Pfizer.

3.2 Le chien, modèle d'étude de prédisposition génétique aux cancers

Comme nous l'avons vu précédemment, les races canines ont une structure de population unique et chacune d'entre elles provient d'un nombre restreint d'individus précisément sélectionnés. Ces pratiques d'élevage, en sélectionnant des caractéristiques morphologiques typiques ont également sélectionné des facteurs génétiques de susceptibilité à de nombreuses maladies, dont les cancers. De ce fait, certaines races présentent un taux de mortalité dû aux cancers plus important, comme le bouvier bernois, le boxer, le golden retriever, le rottweiler ou l'irish wolfhound^{60,77}. Plus précisément, certaines races semblent prédisposées principalement à un type de cancer comme l'irish wolfhound et l'ostéosarcome, alors que d'autres semblent développer différents types avec une forte prévalence. C'est le cas par exemple des golden retriever, qui sont prédisposés au lymphome, au mastocytome et à l'hémangiosarcome, ou des bouviers bernois qui présentent principalement des sarcomes histiocytaires, mais sont aussi prédisposés au lymphome et mastocytome (Figure 4). Cette fréquence élevée de plusieurs cancers dans une race canine est comparable aux familles humaines atteintes du syndrome de Li Fraumeni (mutations germinales du gène *TP53*) qui sont prédisposés à différents cancers, ou aux femmes portant des mutations germinales des gènes *BRCA1/2*, prédisposés aux cancers du sein et de l'ovaire⁷⁷. Une étude européenne rassemblant des données sur les cas de lymphomes canins de 8 pays a montré que certaines races étaient prédisposées à un sous-type particulier ⁷⁸: les rottweiler par exemple semblent prédisposés au lymphome B alors que les boxers tendent à développer des lymphomes T (haut ou bas grades). De plus, des variations des races prédisposées ont été observées selon les pays: par exemple, le golden retriever qui, aux Etats-Unis est prédisposé au lymphome des zones T ⁷⁹, ne l'est pas en Europe ^{78,80}. Cela pourrait être le résultat de facteurs environnementaux différents ou bien de divergences génétiques entre les lignées de golden retriever américaines et européennes ⁷⁸. La prédisposition de certaines races canines à des cancers spécifiques offre une opportunité unique d'étudier et de mieux comprendre les mécanismes génétiques qui régissent la susceptibilité aux cancers ⁸¹.

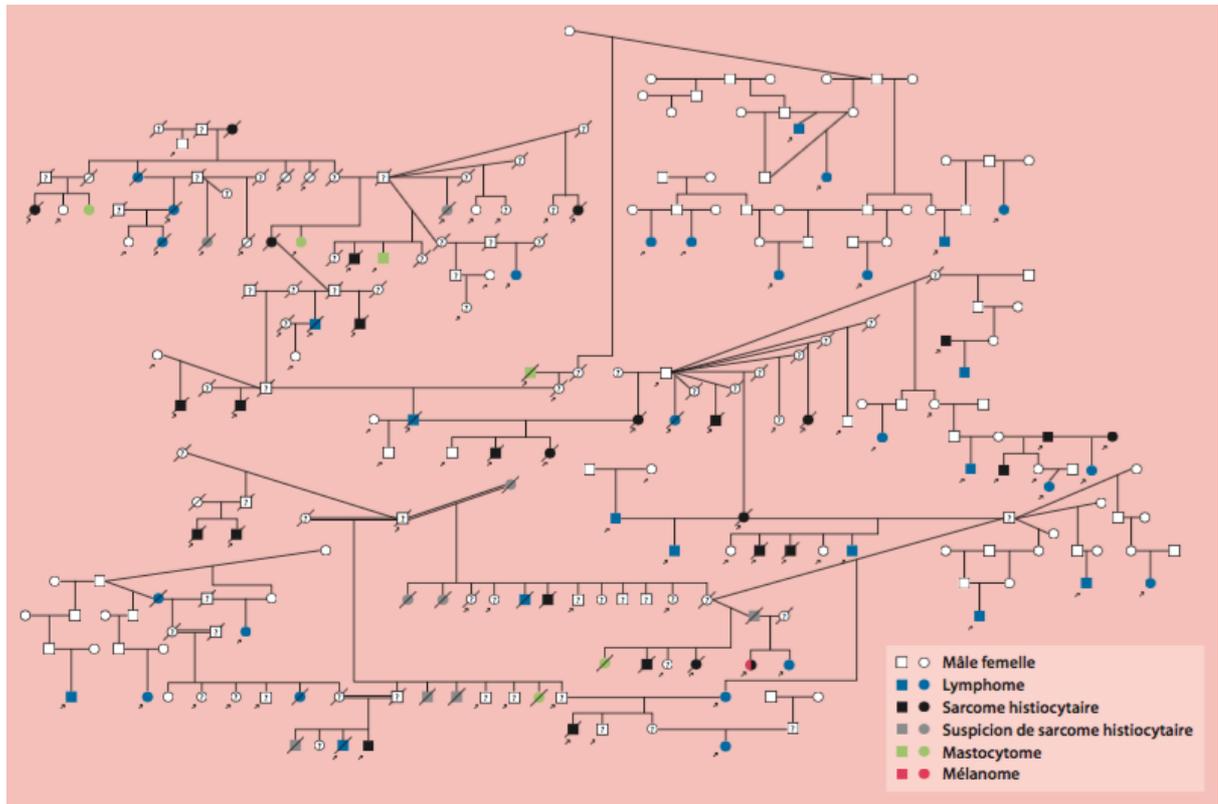


Figure 4 : Pedigree de bouviers bernois montrant le caractère “familial” de la transmission des cancers dans cette race : ici, sarcome histiocytaire (en noir), lymphome (en bleu), mastocytome (en vert). Ce pedigree illustre aussi le mode de sélection associant consanguinité et étalons champions (B. Hédan).

Ces 20 dernières années, le développement d’outils de biologie moléculaire adaptés au chien comme les puces SNP ou les puces d’hybridation génomique comparative (CGH - Comparative Genomic Hybridization) a déjà permis d’identifier des altérations génétiques associées à certains cancers canins par la méthode de GWAS, et cela est grandement facilité par la proximité génétique des individus d’une même race ^{21,62,77,82,83}. Le sarcome histiocytaire (SH) est un cancer rare chez l’homme mais très fréquent chez le flat-coated retriever et le bouvier bernois où il touche 25% des chiens ⁸⁴. Une étude collaborative entre notre équipe et le laboratoire d’Elaine Ostrander, aux USA, utilisant la méthode GWAS ⁸⁵ a montré que des loci couvrant les gènes *CDKN2A* et *MTAP* étaient associés au SH chez le bouvier bernois. D’autres loci associés au cancer ont été identifiés chez le chien pour le carcinome mammaire ⁸⁶, l’ostéosarcome ^{17,65,87}, le carcinome épidermoïde ^{83,88} ou le mastocytome ⁵⁷. Chez le golden retriever, une région commune a été associée au développement de lymphome B et d’hémangiosarcome, impliquant des gènes ayant un rôle dans la réponse immunitaire des lymphocytes T ⁸⁹.

3.3 Le chien pour étudier la génétique somatique du cancer

Contrairement aux altérations génétiques germinales qui sont présentes dans l’ADN constitutionnel d’un individu, les altérations génétiques somatiques sont acquises par les

cellules au cours des cycles cellulaires et participent à la tumorigénèse. Ces altérations génétiques confèrent aux cellules des «caractéristiques du cancer»⁹⁰, comme par exemple l'échappement au système immunitaire, une prolifération accrue, la résistance à la mort cellulaire ou l'induction de l'angiogénèse péri-tumorale (Figure 5). Depuis plus d'une décennie, l'étude de la cytogénétique des cellules tumorales a montré son importance en clinique pour préciser le pronostic et guider la thérapie pour un certain nombre de cancers chez l'homme. Les cancers du sein sont aujourd'hui pris en charge selon leur profil moléculaire, les mélanomes cutanés ayant la mutation *BRAF_{V600E}* bénéficient du vémurafénib ou du dabrafénib, et bien d'autres cancers sont maintenant traités avec des inhibiteurs spécifiques appelés « thérapie ciblée ».

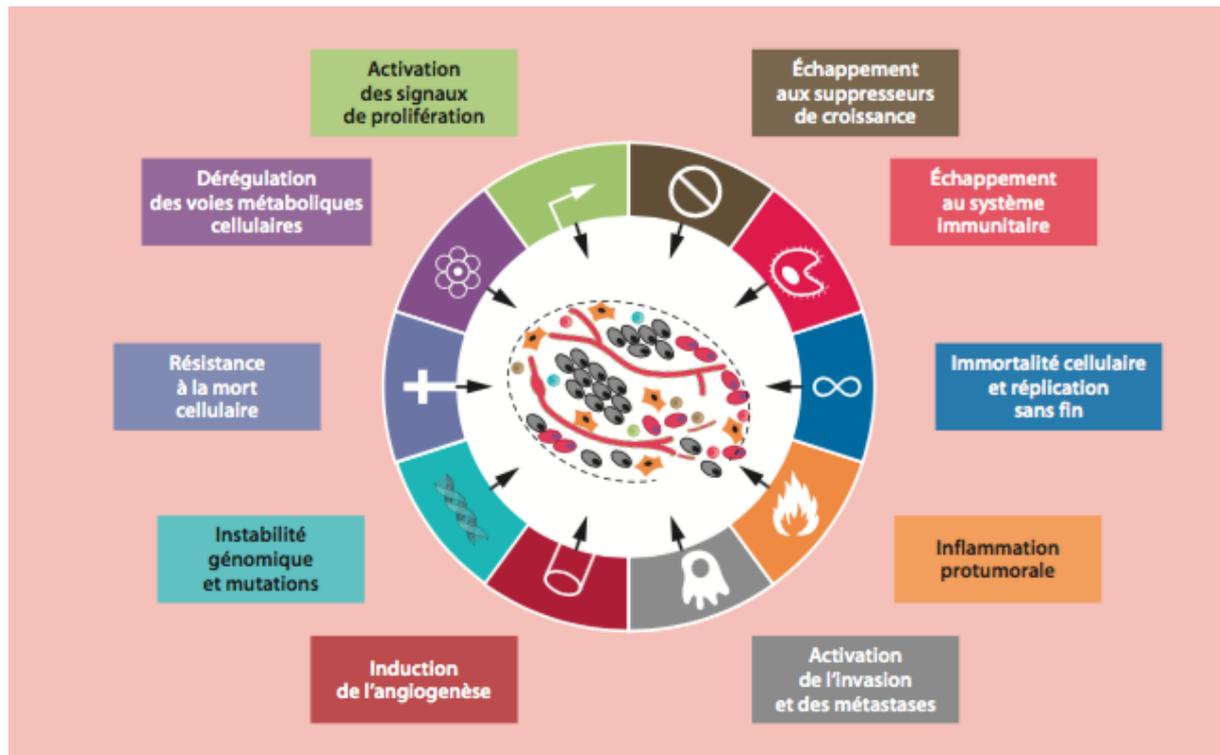


Figure 5 : Principales caractéristiques biologiques acquises par la cellule tumorale. D'après le Point Vétérinaire n°397, adapté de Hanahan and Weinberg 2011.

Dans le contexte d'oncologie comparée, la génomique des tumeurs canines est elle aussi de plus en plus étudiée et permet d'identifier de nouvelles voies oncogéniques ou sous-groupes de tumeurs partageant le même profil moléculaire, aussi bien chez l'homme que chez le chien. En effet, sur le plan moléculaire également, les cancers du chien et de l'homme sont souvent similaires. C'est le cas par exemple de l'ostéosarcome : dans les deux espèces, ce cancer est caractérisé par une faible charge mutationnelle, un grand nombre d'altérations du nombre de copies (CNA), et des altérations récurrentes des gènes *TP53* et *SETD2*⁹¹⁻⁹³.

De façon intéressante, certains cancers canins se rapprochent d'un sous-type humain particulier et sont donc de bons modèles d'étude pour ces sous-types. C'est le cas par exemple du carcinome mammaire de la chienne, où la plupart des cas (76%) sont similaires aux cancers du sein triple négatif (non mutés pour les récepteurs aux hormones, non muté pour le

gène *HER2*) de la femme, sur le plan clinique et moléculaire ⁹⁴. Dans le cas du sarcome histiocytaire, des études récentes de l'équipe ont montré que la mutation du gène *PTPN11* était présente dans 56% des tumeurs chez le bouvier Bernois, et que cette mutation était associée à une forme plus agressive, disséminée d'emblée, chez le chien et chez l'homme⁶⁷. L'adénocarcinome pulmonaire canin serait quant à lui un excellent modèle d'étude spontanée des cancers pulmonaires non liés au tabac, portant la mutation *HER2* ⁹⁵. Concernant le gliome canin, une étude très récente intégrant des données de séquençage de génome complet, de transcriptome et de méthylome de 83 tumeurs a montré que ceux-ci étaient très similaires aux gliomes pédiatriques⁷². Ceci était déjà suspecté par l'équipe grâce aux travaux de recherche de fusions de gènes, mettant en évidence une fusion de *BRAF* dans le gliome canin, similaire à ce qui est observé chez l'homme ⁹⁶. De façon générale, l'étude génétique de ces cancers canins peut permettre d'identifier des gènes candidats et/ou des voies oncogéniques pouvant être transférées à l'homme. Le chien peut également être un modèle dans des essais thérapeutiques pour des thérapies ciblées, ou pour l'étude des mécanismes de résistance. Cette dernière application est soutenue par le fait que certaines mutations récurrentes et drivers dans des cancers humains sont retrouvées dans des cancers canins, comme les mutations *BRAF*_{v600E} (*BRAF*_{v595E} chez le chien) et les mutations des gènes *RAS* à de très fortes fréquences et aux mêmes hotspots de mutations ⁹⁷. La mutation *BRAF*_{v595E} est présente dans 67% des carcinomes urothéliaux et 80% des carcinomes prostatiques canins⁹⁸, et est très importante dans le mélanome cutané et le carcinome thyroïdien humains. Les mutations des gènes *HRAS* et *KRAS*, également importantes dans certains cancers humains, ont récemment été retrouvées dans le carcinome pulmonaire et le carcinome épidermoïde buccal chez le chien⁹⁷. En 2014, les chercheurs du COTC ("Comparative Oncology Trials Consortium") ont démontré qu'il était possible dans le cadre d'un essai clinique, d'obtenir des données de génomique sur des échantillons tumoraux de chiens en 5 jours, démontrant la possibilité d'intégrer de telles données dans un essai clinique vétérinaire ⁹⁹.

3.4 Le chien en tant que patient dans les essais cliniques

Le développement d'une molécule anti-cancéreuse prend en moyenne 10 ans et passe par différentes phases. L'étude préclinique de la molécule sur des modèles animaux expérimentaux (souris, rat, lapin, chien, singe) permet de définir sa toxicité aiguë et chronique. Les essais de phase I permettent de déterminer la dose maximale tolérée chez l'homme ainsi que les paramètres pharmacocinétique/pharmacodynamie dans le corp humain. La phase II évalue son efficacité et la posologie optimale sur un petit nombre de patients atteints de la maladie ciblée. La phase III valide ensuite l'efficacité de la drogue sur un grand nombre de patients et la compare au traitement de référence.

Aujourd'hui il est estimé que seulement 10% des molécules engagées dans les essais cliniques sont approuvées par la FDA (Food and Drug Administration) ¹⁰⁰. Cela est dû à des problèmes de toxicité chez l'homme, mais surtout à un manque d'efficacité thérapeutique, mettant en avant les limites des modèles précliniques actuels. Le chien peut alors être intégré dans le développement de médicaments comme modèle intermédiaire, entre les modèles précliniques classiques et les essais cliniques chez l'homme (Figure 6), pour mieux sélectionner les molécules avec un index thérapeutique favorable et les meilleures chances

d'être efficace chez l'homme ^{101,102}. Les avantages du modèle canin sont nombreux : sa grande taille et le plateau technique vétérinaire permettent de réaliser des prélèvements réguliers (tumeur, sang, autres liquides biologiques) pour étudier la pharmacocinétique et la pharmacodynamie d'une molécule ; mais surtout, le modèle chien permet d'évaluer son efficacité sur une tumeur homologue à l'homme, entourée de son micro-environnement, au sein d'un organisme immunocompétent^{57,62}. De plus, la durée de vie naturellement plus courte des patients canins permet d'évaluer l'efficacité d'un médicament plus rapidement au cours d'un essai clinique que chez l'homme (en 6 à 18 mois). En 2004, le Comparative Oncology Program du NCI a mis en place le Comparative Oncology Trials Consortium (COTC), un réseau d'une vingtaine de centres universitaires vétérinaires d'oncologie afin de faciliter la mise en place d'essais cliniques chez le chien¹⁰². Tous les essais cliniques vétérinaires sont maintenant recensés dans la base de données « American Veterinary Medical Association (AVMA), Animal Health Studies Database ». A ce jour, de nombreux essais cliniques vétérinaires ont été initiés et ont produit des informations précieuses pour l'oncologie humaine.

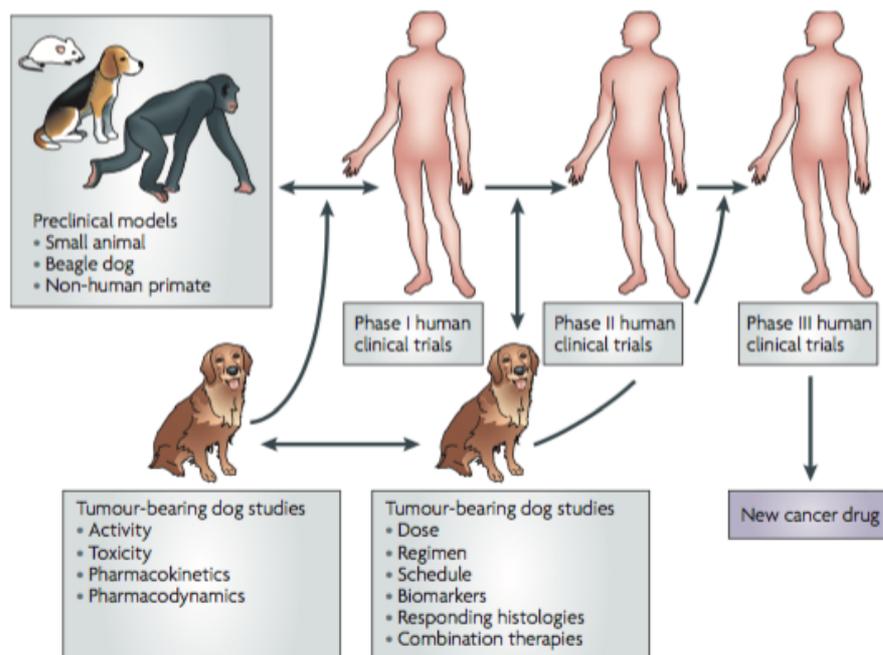


Figure 6 : Approche intégrée de l'intérêt du chien de propriétaire atteint de cancer au cours des phases de développement d'un médicament anti-cancéreux. (Paoloni et Khanna 2008).

En médecine vétérinaire en France, seuls quelques centres spécialisés et écoles vétérinaires disposent d'un plateau technique et des compétences pour prendre en charges les cancers des animaux de compagnie. Le coût élevé des soins (chimiothérapie, électrochimiothérapie, chirurgie, radiothérapie, curiethérapie...) et le faible taux de guérison pour certains cancers peuvent décourager le propriétaire. Très récemment, l'accès aux essais cliniques vétérinaires incluant des thérapies/protocoles innovant(e)s tels que proposés par le laboratoire OCR de Lille (Oncovet Clinical Research) sont une alternative intéressante pour les

propriétaires d'animaux malades. Ces essais cliniques sont l'opportunité d'accéder à des thérapies innovantes, avant ou après une thérapie conventionnelle. De ce fait, certains essais cliniques chez le chien ont permis la mise sur le marché de médicaments anti-cancéreux vétérinaires, illustrant bien le « double bénéfice » (bénéfice pour l'homme et pour le chien) généré par l'oncologie comparée.

C'est le cas des deux inhibiteurs des tyrosines kinases disponibles en médecine vétérinaire évoqués dans la partie 2.3.ii. Le masitinib (Masivet ND) a été la première thérapie ciblée commercialisée en médecine vétérinaire par AB Sciences en 2008. Une première étude randomisée en double aveugle contre placebo incluant 202 chiens atteints de mastocytome non métastatiques, récidivants ou non opérables a montré une augmentation significative de la survie sans progression dans le groupe traité au masitinib (118 jours vs. 75 jours) et une bonne tolérance à la dose quotidienne de 12,5mg/kg/j per os ¹⁰³. D'autres études ont ensuite confirmé l'efficacité du masitinib chez des chiens répondant aux mêmes critères, avec notamment des taux de survie à 12 et 24 mois significativement augmentés (62% vs. 36% et 40% vs 15% respectivement) ¹⁰⁴. L'efficacité de la molécule semble meilleure chez les chiens n'ayant reçu aucun traitement au préalable ^{103,105}, et lorsque la tumeur porte la mutation du gène *KIT* ^{41,47}. Ces résultats très encourageants chez le chien ont motivé l'étude de cette molécule dans de nombreux cancers humains comme le myélome multiple, le GIST (Tumeur des cellules stromales gastro-intestinales), le mélanome, l'adénocarcinome pancréatique ou encore les mastocytoses ¹⁰⁶. Concernant le GIST, une première étude de phase II a montré que le masitinib était efficace sur les formes métastatiques en première ligne de traitement avec une durée de survie sans progression supérieure à 3 mois ¹⁰⁷. Une seconde étude sur des patients atteints de GIST résistants à l'imatinib (première ligne de traitement) a montré que le masitinib était efficace et mieux toléré que le sunitinib, actuel traitement de seconde ligne ¹⁰⁸. L'essai de phase III mené sur des patients atteints d'adénocarcinome pancréatique a montré que l'association du masitinib avec la gemcitabine n'apportait pas de bénéfice en terme de durée de survie des patients. En revanche, l'analyse en sous-groupe a révélé que l'ajout du masitinib bénéficiait aux patients de plus mauvais pronostic ayant une surexpression de l'acyl-coA-oxidase1 et une douleur de grade élevé ¹⁰⁹. Enfin plus récemment, l'essai clinique de phase III incluant des patients atteints de mastocytose systémique indolente avec symptômes sévères a montré une efficacité du masitinib par rapport au placebo ¹¹⁰. De nombreux essais cliniques avec le masitinib sont actuellement en cours chez l'homme, sur différents cancers comme les carcinomes ovariens, prostatiques, colo-rectaux, et sur des maladies non cancéreuses comme l'arthrite rhumatoïde, la sclérose latérale amyotrophique ou le psoriasis (https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=masitinib&term=&type=&rslt=&age_v=&gndr=&intr=&titles=&outc=&spons=&lead=&id=&cntry=&state=&city=&dist=&locn=&rsub=&strd_s=&strd_e=&prcd_s=&prcd_e=&sfpd_s=&sfpd_e=&rfpd_s=&rfpd_e=&lupd_s=&lupd_e=&sort=).

Le tocéranib est le deuxième inhibiteur des récepteurs tyrosine kinase disponible en médecine vétérinaire et cible VEGFR2, KIT, PDGFR et FLT3. Une première étude sur des chiens atteints de divers cancers ^{111,112} a montré un taux de réponses objectives de 28%, avec un taux plus élevé chez les chiens atteints de mastocytome portant la mutation du gène *KIT*. En plus de ces résultats, les données de pharmacocinétiques /pharmacodynamie, et d'effets

secondaires ont permis les essais chez l'homme d'un inhibiteur très proche, le sunitinib. Grâce aux données fournies par les essais cliniques canins, les effets secondaires ont pu être anticipés, et une activité anti-tumorale était particulièrement attendue pour les tumeurs avec altération de KIT, comme les GIST chez l'homme⁵⁷. Ces études ont abouti à la mise sur le marché du sunitinib chez l'homme ¹¹³, et du tocéranib chez le chien.

Ces deux exemples illustrent parfaitement l'intérêt du chien en tant que modèle spontané de cancers et le bénéfice mutuel qui s'en dégage pour les médecines humaine et vétérinaire, s'intégrant parfaitement dans le concept "One Health". Avec l'avancée des connaissances en génétique canine, d'autres cancers canins pourraient être utilisés comme modèles moléculaires de cancers humains, même de nature histologique différente, et permettre le développement /repositionnement de thérapies ciblées.

II. Le mélanome oral canin comme modèle d'étude des mélanomes muqueux humains

1. Les tumeurs mélanocytaires de l'homme et du chien

1.1 Les mélanomes chez l'homme, entité hétérogène de cancers

Chez l'homme, les tumeurs mélanocytaires forment un groupe hétérogène atteignant différents organes, et aux comportements biologiques variés. Elles proviennent des mélanocytes, cellules provenant des mélanoblastes de la crête neurale localisées dans les épithélia comme la peau ou les muqueuses, mais aussi dans le globe oculaire ou les organes internes, définissant différents types de mélanomes : cutanés, muqueux et oculaires. Le mélanome muqueux, objet de cette étude, sera davantage développé dans les parties suivantes.

Le mélanome cutané est le mélanome le plus fréquent chez l'homme, il représente 75% des cancers de la peau entraînant la mort ^{114,115}, et a une incidence croissante dans la population d'ascendance européenne, avec 80 000 nouveaux cas par an aux Etats-Unis ¹¹⁶. Actuellement, la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) distingue 4 types de mélanomes cutanés selon la localisation et le type d'extension de la tumeur: les mélanomes superficiels extensifs ou SSM (superficial spreading melanoma), les mélanomes lentigineux ou LMM (lentigo maligna melanoma), les mélanomes acro-lentigineux ou ALM (acral lentiginous melanoma) et les mélanomes nodulaires ou NM (nodular melanoma) ^{114,115,117} (Figure 7). L'exposition aux rayons ultraviolets (UV) est une cause majeure du développement de la plupart des mélanomes cutanés¹¹⁴. Le pronostic dépend en partie du stade clinique de la maladie, et la survie à 5 ans va de 98% pour les stades I (tumeur localisée, épaisseur inférieure à 2 mm), à 77% pour un stade III (tumeur avec extension loco-régionale) ¹¹⁸. Même

si la plupart des patients atteints de mélanome cutané sont diagnostiqués à un stade précoce, environ 10% présentent des tumeurs non opérables ou déjà métastasées au moment du diagnostic ¹¹⁹. Pour ces patients, l'efficacité des traitements s'est considérablement améliorée depuis 2011 en partie grâce à l'étude moléculaire des mélanomes et au développement de thérapies ciblées, faisant passer la médiane de survie de 9 mois à plus de 2 ans ^{120,121}. En effet, les mélanomes cutanés induits par les UV sont caractérisés par une forte charge mutationnelle (c'est à dire un nombre élevé de mutations ponctuelles), avec une signature particulière impliquant la mutation V600E du gène *BRAF* dans environ 50% des cas ^{114,122-126}. La mutation *BRAF*_{V600E} active la protéine correspondante et la voie oncogénique des MAP kinase, aboutissant à la croissance et la prolifération des cellules tumorales. Cette connaissance a permis le développement de thérapies ciblées, avec les inhibiteurs de BRAF (vémurafénib et dabrafénib), et de MEK (tramétinib et cobimetinib) utilisés aujourd'hui dans le traitement des patients métastatiques portant la mutation *BRAF*_{V600E}. Alors que les associations de ces inhibiteurs sont très efficace, la durée médiane de survie sans progression n'est que de 10-12 mois et la tumeur échappe soudainement au traitement ¹²¹ en acquérant de nouvelles mutations, des fusions de *BRAF* ¹²⁷ ou en modifiant sa matrice extracellulaire via les protéines YAP et MRTF ¹²⁸. D'autres gènes sont fréquemment altérés comme le driver NRAS qui active également la voie des MAP kinases, ou les gènes *NF1*, *CDKN2A*, *PTEN*, *TP53*, *MITF*, *PPP6C* et *RAC1*^{114,124,126,129,130}. Récemment, un nouveau gène suppresseur de tumeur, la tyrosine kinase FES, a été identifiée dans le modèle murin de mélanome muté *BRAF*_{V600E} et *NRAS*_{Q61K} ¹³¹. L'infiltration fréquente par des lymphocytes T et la charge mutationnelle importante font des mélanomes cutanés des tumeurs particulièrement immunogènes et sensibles à l'immunothérapie ^{120,132-134}. De ce fait, l'ajout des anti-CTLA4 (ipilimumab) et anti PD-1 (pembrolizumab et nivolumab) ont également largement amélioré la survie des patients métastatiques en donnant des réponses plus durables^{120,121}.

Les mélanomes acro-lentigineux se distinguent clairement des autres mélanomes cutanés : ils se développent dans des zones non exposées au soleil, comme la paume des mains, les pieds, et la matrice unguéale (Figure 8). Ils sont plus rares, ne représentent que 2-3% des mélanomes ¹³⁵, et leur pronostic est plus sombre que les mélanomes cutanés, avec une survie à 5 ans de 80% ^{135,136}. Sur le plan génomique, ils sont également distincts : la mutation *BRAF* n'est retrouvée que dans 15% des cas, alors que *KIT* est plus fréquemment muté. Surtout, ils sont caractérisés par un grand nombre de variants structuraux avec des amplifications d'oncogènes comme *CDK4*, *CCND1*, *TERT*, *MDM2*, *PDGFRA* et *KIT* ^{114,125,137,138}.



Figure 7 : Aspect macroscopique d'un mélanome cutané reconnaissable à son asymétrie, ses bordures irrégulières, sa couleur variable et son diamètre supérieur à 6mm. Crédit photo: National Institutes of Health.



Figure 8 : Aspect macroscopique d'un mélanome acro-lentigineux plantaire. Crédit photo: Primary care dermatology society.

Le mélanome uvéal est le cancer intra-oculaire le plus fréquent, touchant principalement la choroïde et les corps ciliaires. Il représente 5% des cas de mélanomes^{114,139}, et son incidence est plutôt stable avec 1500 nouveaux cas par an aux Etats-Unis^{114,139}. Le traitement de première ligne repose principalement sur la chirurgie et la radiothérapie¹³⁹. Cependant, même si seulement 5% des patients présentent des métastases à distance (principalement au foie) au moment du diagnostic, 50% finissent par en développer, parfois plusieurs années après le premier traitement¹³⁹. La survie des patients après la découverte de métastases ne dépasse généralement pas 12 mois¹³⁹. De nombreuses études ont alors

contribué à étudier la génétique de ces tumeurs pour prédire leur comportement biologique. Sur le plan génomique, elles présentent dans plus de 80% des cas des mutations de *GNAQ* ou *GNA11* menant à une activation de la voie MAP Kinase via la protéine RasGRP3^{140,141}. Les mutations du gène *BAP1* sont également fréquentes et sont associées au développement de métastases¹⁴². D'autres altérations sont fréquentes comme celles de *SF3B1*, ou la perte du chromosome 3, associée à un mauvais pronostic¹⁴³. Ces mélanomes sont classés en deux groupes aux pronostics différents selon leur profil transcriptomique, associé à un risque faible ou accru de développement de métastases¹⁴⁴. Une étude récente intégrant des données génomique, transcriptomique et de méthylome a montré l'existence de 4 sous-types moléculaires associés au pronostic¹⁴¹.

Le mélanome muqueux (MM) est un mélanome rare, il ne représente que 1-2% des mélanomes et son incidence est de 800 nouveaux cas par an aux Etats-Unis¹¹⁶. On le trouve généralement dans les régions de la tête et du cou (muqueuse buccale, nasale, sinus, larynx...) et dans les régions ano-génitales (Figure 9). Son étiologie n'est pas connue et différentes études génomiques supportent le fait que l'exposition aux UV n'est pas un facteur impliqué^{125,130,145-148}. Les mélanomes muqueux font parti des mélanomes les plus agressifs et tendent à métastaser rapidement à distance, vers les poumons et le foie. Le taux de survie à 5 ans est seulement de 25 à 30%^{116,149-151}. Son pronostic est bien plus sombre que les autres types de mélanomes, notamment les formes cutanées. Ceci est bien illustré dans l'étude récente d'Altieri *et al.* concernant 132 751 patients atteints de mélanome, dont 1824 patients atteints de MM. La survie à 5 ans chez ces derniers était significativement inférieure à celle des patients atteints de mélanome cutané (27% vs 76%) (Figure 10). Nous aborderons la biologie, la génétique et les thérapies de ces MM plus en détail dans les prochaines parties.



Figure 9 : Aspect macroscopique d'un mélanome muqueux buccal atteignant la gencive et la muqueuse labiale. Crédit photo: Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.

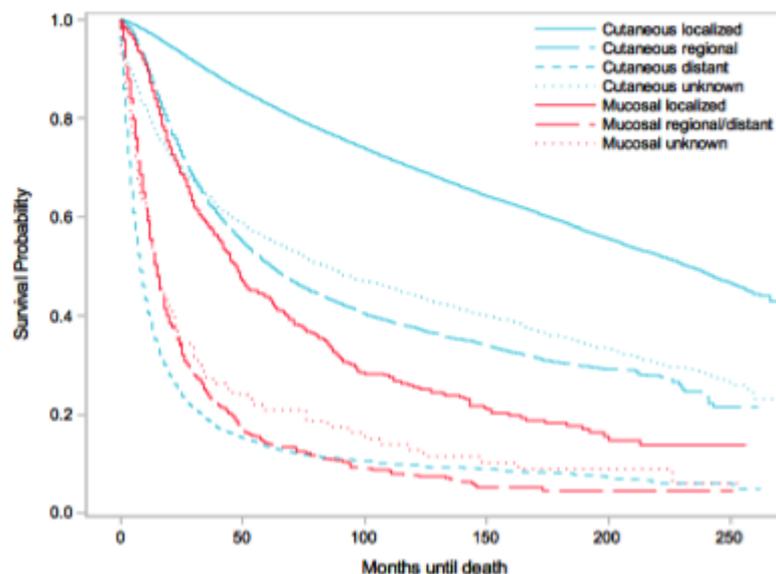


Figure 10 : Courbe de Kaplan Meier réalisée à partir des données de 132 751 patients atteints de MM et de mélanome cutané montrant le pronostic péjoratif des MM. Les patients ayant un MM localisé ont un pronostic plus sombre que les patients atteints de mélanome cutané avec extension loco-régionale. D'après Altieri *et al.* 2019.

1.2 Les tumeurs mélanocytaires chez le chien : Oncologie comparée

Les tumeurs mélanocytaires sont assez fréquentes chez le chien, et la plupart d'entre elles sont des tumeurs malignes¹⁵²⁻¹⁵⁵. Dans une étude réalisée au laboratoire sur 2350 tumeurs mélanocytaires, 70% étaient malignes¹⁵².

On trouve également chez le chien plusieurs types de mélanomes avec différentes localisations anatomiques. Le mélanome buccal, ressemblant fortement au mélanome muqueux humain, est le plus fréquent chez le chien (62%) (Figure 11). Les mélanomes canins peuvent aussi se développer sur la peau recouverte de poils (27%) (Figure 12), les doigts, coussinets et griffes (10%) (Figure 13) et dans le globe oculaire (1%)¹⁵² et leur présentation clinique est similaire à celle observée chez l'homme. Chez le chien aussi, le pronostic dépend fortement de la localisation anatomique^{75,154,155}. Ceci est bien illustré par l'étude effectuée dans l'équipe durant mon master 2, sur 402 cas de tumeurs mélanocytaires canines (cf Article en Annexe 2), les chiens atteints de mélanomes buccaux avaient le pronostic le plus sombre avec une médiane de survie (MST median survival time) de 6 mois, alors que dans le groupe de chiens atteints de mélanomes cutanés la médiane était non atteinte et supérieure à 18 mois (Figure 14). Les chiens ayant un mélanome digité (unguéal, coussinet, interdigité) avaient un pronostic intermédiaire avec une MST de 11,8 mois, mimant les mélanomes acro-lentigineux humains (cf Article en Annexe 2).



Figure 11 : Aspect clinique des MM de la cavité buccale chez le chien (en haut) et l'homme (en bas). Crédit photo: P De Fornel-Thibaud, A Dupuy, T Jouary.



Figure 12 : Aspect clinique du mélanome cutané canin (gauche) et du mélanome cutané nodulaire humain (droite). Crédit photo: P. Durieux et T. Jouary. D'après Prouteau and André 2019.



Figure 13 : Aspect clinique du mélanome acro-lentigineux humain et du mélanome digité canin. Les mélanomes digités du chien peuvent toucher le lit de l'ongle, la peau des doigts (A) et le coussinet (B) et sont souvent ulcérés. Chez l'homme, les mélanomes acro-lentigineux touchent la face palmaire des mains (C) et la face plantaire des pieds(D). Crédit photo: A. Muller (A), F.A. Fogel (B), A. Dupuy (C), and E. Maubec (D).D'après Prouteau and André 2019.

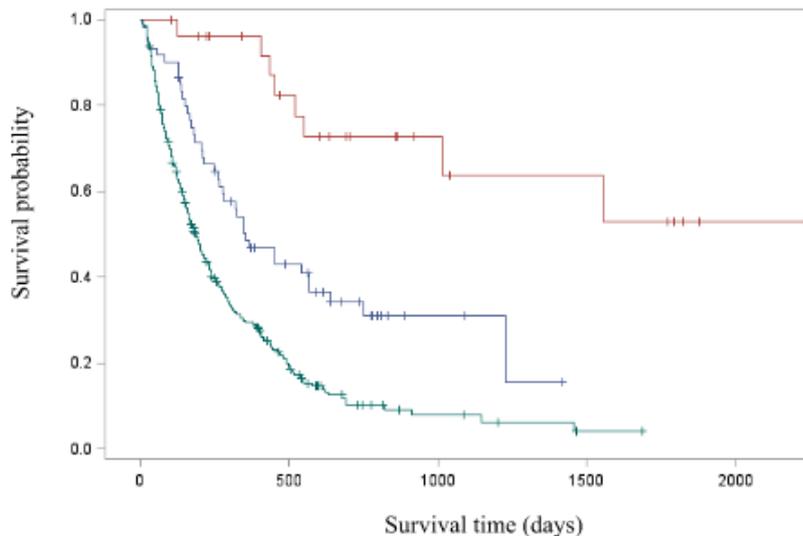


Figure 14 : Courbe de Kaplan Meier réalisée à partir des données de 336 chiens atteints de mélanome cutané (rouge), digités (bleu) et buccaux (vert) issues du laboratoire (travail de Master 2, données recueillies par C. de Brito). La localisation buccale a le plus mauvais pronostic.

Sur le plan histologique, l'étude réalisée par Gillard *et al.* sur 153 lames histologiques de tumeurs mélanocytaires canines a montré qu'elles se rapprochaient de 4 catégories humaines : le type « animal », le type nevocytoïde, le type epithelioïde et le type composite ou mixte.

L'étiologie des mélanomes canins n'est pas connue, mais il est très probable que les UV n'aient pas de rôle dans leur développement. En effet, les mélanomes cutanés apparaissent sur des zones recouvertes de poils, et ainsi protégées des UV. De manière intéressante, certaines races de chiens semblent présenter de façon plus fréquente un sous-type particulier ce qui souligne la prédisposition génétique de certaines races canines à certains types de mélanomes. Les caniches et les cockers spaniel par exemple, sont plus sujets aux formes buccales, alors que le scottish terrier présente plutôt des formes cutanées, et les schnauzers, des formes digitées ^{74,77,152,156-158}.

La génétique des mélanomes canins a été de plus en plus étudiée ces dernières années, principalement les formes buccales qui seront détaillées ultérieurement. Relativement peu de données sont disponibles sur les autres mélanomes. Une étude utilisant la technique de CGH sur 5 mélanomes cutanés a montré que les altérations les plus récurrentes étaient des gains sur le CFA 20 ciblant le gène *MITF* et des délétions sur les CFA 6 et 18 ¹⁵⁹. La recherche de mutations sur les gènes *BRAF*, *NRAS*, *PTEN*, *KIT* et *CDK4*, connus dans les mélanomes cutanés humains, sur 18 mélanomes cutanés n'a pas montré d'altération sur ces gènes ¹⁵². Une étude plus récente intégrant le séquençage ciblé d'oncogène sur deux cas a montré la présence de mutations sur les gènes *NRAS*, *KRAS*, *KIT*, et *TP53* ¹⁶⁰. Même peu nombreuses, ces données confirment que les mélanomes cutanés canins et les mélanomes humains UV-induits sont différents sur le plan moléculaire et ne sont pas issus des mêmes événements moléculaires. Seulement 3 mélanomes digités/acro-lentigineux canins ont été étudiés sur le plan génétique ¹⁶⁰, et ces 3 tumeurs présentaient une mutation *KRAS* (2/3) ou *NRAS* (1/3). De manière générale, les mélanomes canins (buccaux, acro-lentigineux et cutanés) présentent peu de mutations ponctuelles, sont plutôt caractérisés par des CNAs et des variants structuraux (SV) et présentent fréquemment des altérations des voies oncogéniques MAP kinase et PI3 kinase ^{160,161}.

Les mélanomes canins semblent donc être de bons modèles d'étude moléculaire/thérapeutique des mélanomes non UV-induits, sans mutation de *BRAF* ^{73-75,83,152,159-163}.

Dans la suite de cette étude, nous nous intéresserons particulièrement au mélanome buccal canin comme modèle des mélanomes muqueux humains.

2. Le mélanome muqueux (MM) chez l'homme

2.1 Epidémiologie

Comme nous l'avons vu précédemment, le MM est le type de mélanome le plus rare, il est 100 fois moins fréquent que le mélanome cutané ¹¹⁶. Divergent sur les plans étiologiques, épidémiologiques, thérapeutiques et génétiques, le MM est maintenant vu comme une entité bien distincte de son homologue cutané.

Au sein des MM, la région de la tête et du cou représente 31 à 55% des sites primaires, suivis de la région génitale (18 à 40%), ano-rectale (17 à 24%) et d'autres sites sont touchés de façon beaucoup plus rares comme la muqueuse gastro intestinales, les poumons ou le système nerveux central ^{116,149-151,164,165}. Les MM de la tête et du cou se développent principalement dans la région sino-nasale (70%) et la cavité buccale (30%), et plus rarement sur le larynx et le nasopharynx ^{116,150}. Les MM génitaux sont majoritairement présents chez la femme, localisés à la vulve (77%) et dans le vagin (5 à 20%). La plupart des MM ano-rectaux sont localisés dans le rectum (39%), le canal anal (17%) et l'anus (17%) ¹⁶⁶. De manière générale, les MM sont des cancers très agressifs souvent diagnostiqués tardivement ^{116,149}. Environ 21% des patients présentent des métastases aux noeuds lymphatiques au moment du diagnostic, et 23% présentent des métastases à distance, principalement hépatiques et pulmonaires ¹⁶⁵.

L'âge d'apparition du MM se situe aux alentours de 60-70 ans ^{116,150} alors que le mélanome cutané apparaît aux alentours de 55 ans ¹⁵⁰. De façon intéressante, les MM de la cavité orale apparaissent à un âge plus jeune, et jusqu'à 18% sont diagnostiqués chez des patients de 40 ans ou moins ¹⁶⁷.

Contrairement aux mélanomes cutanés pour lesquels le rôle des UV dans la cancérogenèse a été clairement démontré, les facteurs étiologiques des MM restent inconnus. Dans l'étude de Newell *et al.*, 6 MM sur 67 (9%) présentaient une signature mutationnelle relative aux UV, et toutes ces tumeurs sauf une (de localisation inconnue) étaient localisées dans la région de la tête et du cou ¹⁶⁸. Certaines études suggèrent que le tabac pourrait être un facteur de risque ¹⁴⁷. Le MM représente 5 à 23% des mélanomes dans les populations d'origine africaine et asiatique, contre 1 à 2% dans les populations d'ascendance européenne ¹⁵⁰. Ceci reflète en fait la faible incidence de mélanomes cutanés dans les populations avec des peaux pigmentées. En effet, une étude américaine a montré que l'incidence du MM était deux fois plus importante dans la population d'ascendance européenne que dans la population afro-américaine ¹⁶⁹.

L'incidence du MM est plus importante chez les femmes, du fait de leur plus grande fréquence à développer des MM génitaux où l'incidence est 10 fois plus grande que chez l'homme ¹⁵⁰. Les femmes auraient également un risque augmenté de présenter un MM ano-rectal par rapport à l'homme (1,6 à 2,3 fois) ^{166,169}. Cependant, les hommes seraient légèrement plus représentés dans les MM de la tête et du cou ¹¹⁶.

2.2 Présentation clinique des mélanomes muqueux

Les signes cliniques du MM ne sont pas spécifiques et dépendent de la localisation anatomique.

Les patients présentant un MM sino-nasal peuvent souffrir de congestion et d'épistaxis, et à l'endoscopie la tumeur a un aspect de masse pigmentée ou non, en plaque ou polypoïde sur les cornets nasaux ou le septum nasal, plus rarement dans les sinus para-nasaux^{116,150,170}. Les MM de la cavité orale sont souvent découverts de façon fortuite, avec l'observation d'une lésion en plaque ou nodulaire, souvent pigmentée sur la gencive ou le palais^{116,150} (Figures 9 et 11). Au moment du diagnostic, 25%¹⁷¹ à 33%¹⁶⁴ des patients ont déjà des métastases dans les nœuds lymphatiques drainant, reflétant probablement un diagnostic plus tardif que les mélanomes cutanés¹¹⁶.

Les patientes atteintes de mélanomes vulvo-vaginaux présentent souvent des saignements ou des écoulements vaginaux, et les lésions peuvent être amélaniques ou pigmentées, maculaires ou nodulaires^{149,150}. Sur la vulve, les lésions sont principalement présentes sur la petite lèvre et les zones glabres (95% des MM vulvaires), moins fréquemment sur la grande lèvre et les zones non glabres. Les MM vaginaux sont principalement localisés dans le tiers distal du vagin¹⁵⁰.

Les mélanomes rectaux sont longtemps asymptomatiques jusqu'à atteindre un stade avancé où le patient souffre de saignements, douleurs, prurit ou troubles digestifs. Une étude sur 260 cas a montré que 31% des patients avaient des métastases à distance au moment du diagnostic¹⁶⁶.

2.3 Histologie des mélanomes muqueux

Sur le plan histologique, les MM peuvent avoir des aspects très différents, ce qui ne facilite pas leur diagnostic. Parmi les MM de la tête et du cou, jusqu'à la moitié des tumeurs sont amélaniques^{116,172}. Les cellules tumorales peuvent avoir différents aspects : fusiforme (cellules allongées), épithélioïde (allant de cellules avec un gros noyau sans nucléole proéminent à des cellules grandes et pléomorphes, avec un gros nucléole), à morphologie plasmocytaire ou musculaire striée. Une partie des tumeurs (jusqu'à 90% des MM oraux et 60% des sino-nasaux) présente une activité jonctionnelle, mise en évidence par la présence intra-épithéliale de groupes de cellules mélanocytaires tumorales^{116,172}.

Pour confirmer le diagnostic, différents marqueurs connus dans les autres types de mélanomes sont utilisés pour les MM, comme la protéine S100, Melan-A, tyrosinase et HMB45, avec des sensibilité et spécificité différentes. D'autres marqueurs ont été développés comme SOX10 ou CD117 (c-Kit) qui renseigne en même temps sur l'utilisation de thérapie ciblée. La plupart du temps, c'est un panel de plusieurs marqueurs qui est réalisé pour obtenir une sensibilité et une spécificité maximales¹¹⁶.

2.4 Facteurs pronostiques des mélanomes muqueux

L'identification des facteurs pronostiques de MM est particulièrement difficile du fait de la rareté de la maladie et la diversité des localisations. Cependant, au fil des études certains facteurs ont peu à peu été reconnus.

Le stade clinique au moment du diagnostic a été associé à la durée de survie des patients dans plusieurs études ^{151,171,173-175}. Dans la plupart des études, les patients ont été classés en 3 stades : tumeur localisée, extension loco-régionale (nœuds lymphatiques drainants) et extension à distance. En 2010, une classification pour les mélanomes de la tête et du cou (cavités nasales et sinus) a été proposée par l'Union Internationale contre le Cancer (UICC) et publiée par l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) utilisant le système TNM (Tumor, Node, Metastasis), et sa valeur pronostique a été démontrée ^{116,172,176}. Cependant il n'existe pas de classification officielle pour les autres types de MM.

La localisation de la tumeur est un autre facteur pronostique largement démontré. Dans plusieurs études, les patients atteints de MM de la tête et du cou et de la région ano-rectale avaient un pronostic plus sombre que les MM génitaux ^{151,173,174}. En effet, les taux de survie à 5 ans rapportés sont autour de 33-36% pour les MM génitaux ^{150,151,174}, 17-35% pour les MM de la tête et du cou ^{150,151,174,176} et 10-16% pour les MM ano-rectaux ^{151,174,177}. L'étude d'ampleur d'Altieri *et al.* intégrant une grande diversité de MM a montré que les MM les plus rares, localisés dans la muqueuse gastro intestinale, le système nerveux central ou les poumons avaient le pronostic le plus réservé ¹⁵¹. De plus, dans une même région les MM n'ont pas tous le même pronostic. Ainsi, les MM des cavités nasales et orale ont un meilleur pronostic que les MM des sinus et du nasopharynx ^{150,175}, et les MM vulvaires sont de meilleur pronostic que les MM vaginaux¹⁵⁰.

Certaines études ont mis en évidence l'importance de l'âge des patients au moment du diagnostic ^{174,175}.

Parmi les facteurs d'anatomo-pathologie, un index mitotique supérieur à 10 mitoses sur 10 champs est associé à un pronostic péjoratif ^{116,149,170}, tout comme l'absence de pigmentation de la tumeur ¹⁷⁸.

2.5 Génétique des mélanomes muqueux

Les premières études génétiques du MM utilisant des techniques de séquençage haut débit étaient intégrées dans des études plus larges sur les différents types de mélanomes (cutané, acral...), et se sont attachées à comparer les MM aux mélanomes cutanés ^{129,145,179,180}. Elles concernaient un petit nombre d'échantillons, mais ont toutefois permis de montrer que sur le plan génétique, les MM se distinguent très nettement des mélanomes cutanés (MC). Ils sont caractérisés par un grand nombre de CNA (Copy Number alterations) et de variants structuraux (SV, structural variants) (translocations, inversions, délétions, amplifications) (Figure 15), et jusqu'à 10 fois moins de mutations ponctuelles (SNV, single nucleotide variant) que les MC ¹⁵⁰. En effet, les MM comptent en moyenne 8000 SNV par tumeur, alors que les MC en présentent environ 86 000 ^{129,130,145,147,168,179,181,182}. Concernant les signatures mutationnelles, ces études ont trouvé peu ou pas de signature UV dans les MM

129,145,147,168,179,182 et les rares cas ayant cette signature provenaient de tumeurs localisées à des sites potentiellement exposés (conjonctive, muqueuse nasale) ^{168,182}. Une autre études suggère la présence d'une signature liée au tabac ¹⁴⁷. Ces dernières années, le MM a été la cible de plus en plus d'études, notamment sur le plan génétique. Ces études réalisées sur des cohortes de plus en plus grandes et des populations plus ciblées, ont permis de pointer des altérations génétiques récurrentes, voire même plus spécifiques de certaines localisations anatomiques.

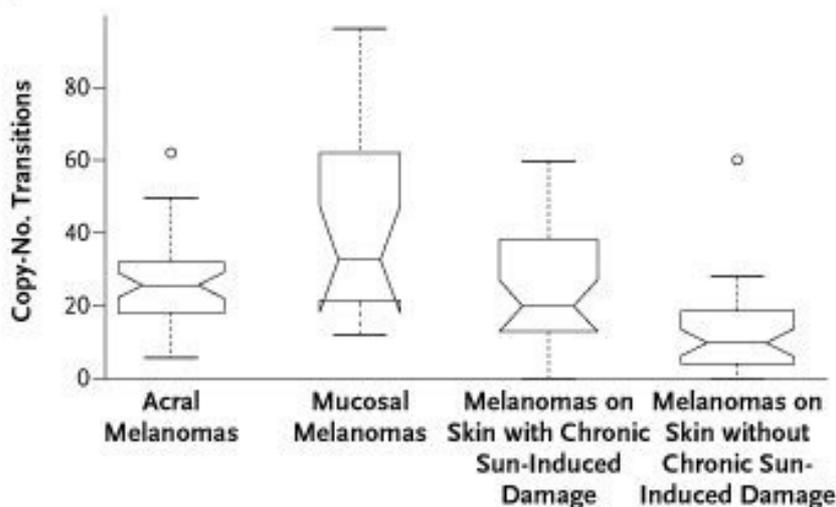


Figure 15 : Les MM et les mélanomes acro-lentigineux présentent significativement plus d'altérations chromosomiques (changement du nombre de copies) que les mélanomes cutanés liés à l'exposition aux UV. D'après Curtin *et al.* 2005.

Alors que les mélanomes cutanés présentent très souvent des mutations des gènes de la voie des MAP kinases tels que *BRAF* (environ 50% des cas) et *NRAS* (environ 30% des cas), celles-ci sont beaucoup moins fréquentes dans les MM, allant de 3,5 à 16% et 17 à 20% respectivement ^{145,168,174,179,180}. A l'inverse, d'autres mutations sont présentes de façon plus récurrentes dans les MM, comme les mutations du gène *KIT* sur les exons 9, 11, 13, 17 et 18 présentes dans 5-35% des tumeurs selon les études ^{146,168,174,178,181-188}, ou du gène *SF3B1* dans 20% des cas, sur un hotspot en position R625 ^{129,146,168,182}. D'autres gènes sont significativement mutés dans les MM, comme *TP53*, *PTEN*, *NF1*, *TERT*, *GNAQ/GNA11*, *PTPRD*, *IGFR2* ou *SPRED1* ^{129,145,146,168,181-183,189}. Sur une cohorte de 284 patients atteints de MM, Sheng *et al.* ont montré que les mutations exclusives *GNAQ/11* étaient présentes dans 9,5% des cas, et qu'elles étaient associées à un mauvais pronostic ¹⁸⁹.

Comme mentionné plus haut, les MM présentent un grand nombre de variants structuraux (SV). Deux études de séquençage de génome complet ont été effectuées récemment sur un nombre conséquent de patients atteints de MM (n=65 et n=67) d'origine asiatique uniquement ¹⁸¹, ou asiatique et australienne ¹⁶⁸. Ces études ont décrit en moyenne 925 et 260 SV par tumeur respectivement, bien que ce nombre soit très variable entre les échantillons ^{168,181}. Ainsi, on observe dans ces tumeurs un grand nombre de translocations inter et intra

chromosomiques, de points de cassures regroupés en cluster, d'hypermutations localisées (kataegis), et d'évènements encore plus complexes compatibles avec du chromothripsis (oscillations de nombre de copies, points de cassures en clusters) ou du breakage-fusion-bridge (BFB, perte des télomères et régions riches en inversions) ^{168,181}. Les amplifications focales avec translocations chromosomiques se retrouvent principalement sur les chromosomes 12 englobant les régions de *CDK4* et *MDM2*, le chromosome 5 avec la région de *TERT*, et le chromosome 11 comprenant la région de *CCND1* ^{147,168,181,182}. Les translocations interchromosomiques des chromosomes 5 et 12 sont retrouvées fréquemment dans les MM oraux¹⁸¹, chez des patients significativement plus jeunes¹⁶⁸, et signent un plus mauvais pronostic¹⁸¹. Dans ce même sous-type, la présence de BFB dans la tumeur est également associée à une durée de survie plus courte pour les patients¹⁸¹. Le chromothripsis est un type de remaniement massif caractérisé par la fragmentation d'un ou plusieurs segment(s) chromosomique(s) et le réassemblage aléatoire de ces fragments au cours d'un seul évènement cellulaire. Cet évènement témoin d'une instabilité génomique majeure est suspecté dans une proportion de MM, et est présent dans d'autres cancers dont le mélanome cutané ¹⁹⁰. Ces altérations chromosomiques (SV et CNA) observés dans les MM touchent des oncogènes parmi lesquels *TERT*, *CCND1*, *KIT*, *MITF*, *MDM2*, *CDK4* et *NOTCH2* qui sont amplifiés de façon récurrente, et des gènes suppresseurs de tumeur comme *NF1*, *PTEN*, *CDKN2A*, *TP53* et *SPRED1* qui sont fréquemment délétés ^{147,168,181}. Ces SV et CNA, bien que caractéristiques de tous les MM, sont différemment distribués entre les tumeurs. En effet, Newell *et al.* ont montré qu'il existait deux sous-groupes de MM basés sur leur profil de SV, l'un définit par un grand nombre de SV en cluster, et l'autre par un nombre plus faible et des SV non clusterisés¹⁶⁸. Ces sous-groupes ne ségrègent pas avec l'âge des patients ni le site anatomique de la tumeur, et pourrait être le reflet de différents sous-types moléculaires¹⁶⁸.

Au fil des études il s'est avéré que certaines altérations génétiques n'avaient pas la même fréquence en fonction de la localisation des MM, indiquant probablement des mécanismes différents selon le site d'apparition. Les MM ano-rectaux et vulvo-vaginaux présentent de façon plus fréquente des mutations du gène *SF3B1*, et du gène *KIT*, dans 20-50% et 14-53% des cas respectivement ^{146,168,182,191}. De plus, dans 32% des cas les mutations de *KIT* sont associées à la présence de mutations sur le gène *NF1* dans ces sous-types ¹⁴⁶. Les formes sino-nasales ne présentent peu ou pas de mutations du gène *BRAF* ^{168,192}, mais les mutations de *NRAS* sont relativement fréquentes et sont retrouvées dans 14 à 22% des cas ^{178,182,186,192}. Enfin, les MM de la cavité buccale sont caractérisés par la présence de translocations intra et interchromosomiques des chromosomes 12 et 5, comprenant les oncogènes *CDK4* et *TERT* respectivement ^{147,168,181}. Ce remaniement complexe est présent dans près de la moitié des cas de MM de la cavité buccale¹⁸¹. Les mutations du gène *POM121* ont été également mises en évidence avec une fréquence de 15% dans cette cohorte de MM oraux, et sont associées à un Ki67 élevé¹⁸¹.

A ce jour, chez l'homme, il n'a pas été produit de données d'expression pour les MM. Cependant, les profils de mutations et de CNA permettent d'identifier des voies impliquées dans l'initiation et la progression tumorale. La voie des MAP kinase et la voie PI3 kinase ont été identifiées dans toutes les études ^{129,146,147,168,181,182,191,192} sont activées dans 90% des cas¹⁶⁸. D'autres voies semblent jouer un rôle clé, comme la voie du cycle cellulaire ^{147,168,181,193} et de la pigmentation¹⁴⁷.

Alors que certains évènements “drivers” connus dans d’autres cancers ont été identifiés dans les MM comme l’altération des gènes *KIT*, *NF1*, *BRAF*, *NRAS*, *TP53*, *MDM2*, *CDK4* ou *TERT*, l’inactivation du gène *SPRED1* a récemment été étudiée. *SPRED1* est un gène qui code une protéine régulatrice de la voie des MAP kinase. Il est inactivé dans 37% des MM ¹⁸⁰, essentiellement dans les MM “triples négatifs” (absence d’altérations de *BRAF*, *RAS* et *NF1*). L’équipe d’Ablain *et al.* a montré sur le modèle du poisson zèbre que *SPRED1* était un gène suppresseur de tumeur, et que son altération était driver dans l’oncogénèse des MM, particulièrement en présence de co-mutations des gènes *KIT* et *TP53*, ou *KIT* et *CDKN2A* ¹⁸⁰. De plus, dans les MM portant la mutation *KIT*, l’inactivation de *SPRED1* entraîne une résistance aux inhibiteurs de *KIT* en activant la voie MAP kinase. De fait, l’étude suggère l’utilisation d’inhibiteurs de MEK pour ces MM porteurs de la mutation *KIT* et une altération de *SPRED1* ¹⁸⁰.

Contrairement au MC où il a été identifié différents locus de prédisposition sur de grandes cohortes de patients ¹⁹⁴, il n’existe pas à ce jour de données génétiques sur la prédisposition aux MM.

2.6 Traitement des mélanomes muqueux

2.6.i La chirurgie

La chirurgie reste la première ligne de traitement des MM. Comme dans le mélanome cutané, l’exérèse complète de la tumeur reste le traitement de choix et offre une durée de survie sans progression prolongée, voire la guérison. Cependant, du fait de localisations complexes difficiles à opérer, de présentations parfois multifocales ou très étendues, l’exérèse complète n’est pas toujours possible ^{165,195,196}.

2.6.ii La radiothérapie

La radiothérapie est utilisée comme thérapie définitive dans les cas de MM non résecables, ou comme thérapie adjuvante après la chirurgie. Lorsqu’elle est utilisée en seul traitement, elle permet une réponse complète dans environ 30% des cas de MM de la tête et du cou, et un contrôle local dans 40-58% des cas ^{197,198}. Généralement un plan de traitement avec une dose totale de 66 Gray (Gy) à 70 Gy avec une dose par fraction de 2,2 à 2 Gy est utilisé (recommandations du National Comprehensive Cancer Network ¹⁵⁰). Etant donnée la proximité avec d’autres organes sains, les techniques avancées comme la radiothérapie conformationnelle avec modulation d’intensité ou la protonthérapie doivent être envisagées. En effet, une étude pilote sur 14 patients avec MM de la tête et du cou traités uniquement par protonthérapie a montré de très bons résultats (contrôle local dans 12/14 cas), avec une survie à 3 ans de 58% ¹⁹⁹. Une méta-analyse concernant l’effet de la radiothérapie adjuvante à la chirurgie dans les cas de MM de la tête et du cou a montré que celle-ci diminue

significativement le risque de récurrence locale de 49%, mais n'augmente pas la durée de survie des patients ²⁰⁰. Ceci est confirmé par d'autres études ^{165,201,202}. Des résultats encourageants ont également été observés chez les patients atteints de MM ano-rectaux où la radiothérapie permet d'effectuer une chirurgie moins délabrante tout en assurant un contrôle loco-régional de la maladie ^{203,204}. Le traitement de la zone opérée ainsi que des noeuds lymphatiques pelviens est recommandée²⁰⁴.

2.6.iii La chimiothérapie

L'efficacité des traitements systémiques pour les patients atteints de MM reste controversée. Certaines études ont montré que la dacarbazine (agent alkylant) et le paclitaxel (poison du fuseau mitotique) avaient une efficacité similaire à ce qui est observé pour les mélanomes cutanés de stade avancé, avec un taux de réponse objective autour de 25% ²⁰⁵⁻²⁰⁷. La biochimiothérapie utilisant l'association de dacarbazine, cisplatine (sel de platines, agent alkylant), vinblastine (vinca-alkaloïde, anti-microtubule) avec l'interferon-alpha (IFN) ou l'interleukine 2 a aussi démontré des résultats encourageants dans des MM de localisations diverses, avec des taux de réponses significatives de 36 à 46% et jusqu'à 27% de réponses complètes ^{208,209}.

2.6.iv Les thérapies ciblées

Du fait de la présence relativement fréquente d'altération du gène *KIT*, le traitement des patients avec des inhibiteurs spécifiques comme l'imatinib est apparu intéressant ^{165,207}. Plusieurs études de phase II ont évalué l'efficacité de l'imatinib chez des patients atteints de MM et mélanomes acro-lentigineux de stade avancé avec altération (mutation ou amplification) du gène *KIT* et ont démontré un contrôle de la maladie (réponse complète, partielle ou maladie stable) dans 50% des cas et une réponse objective dans 16 à 30% des cas ^{195,210,211}. Les patients présentant une mutation des exons 11 et 13 étaient les meilleurs répondeurs, et 40% d'entre eux présentaient une réponse objective^{195,211}. D'autres inhibiteurs de *KIT* ont été étudiés comme le sunitinib et le sorafénib, démontrant également un effet bénéfique sur les patients avec MM mutés pour le gène *KIT* ^{212,213}. Les réponses durables sont peu fréquentes et les études rapportent une durée médiane de survie sans progression de seulement 3 mois^{195,211}. Malheureusement, mêmes pour les bons répondeurs, la maladie finit par échapper au traitement et les mécanismes de résistance ne sont pas encore bien élucidés. Une hypothèse pourrait être l'acquisition de mutation du gène *NRAS*, activant la voie des MAP kinase en aval de *KIT* ¹⁵⁰.

De fait, le développement de l'immunothérapie ces dernières années a fait naître l'espoir d'atteindre des réponses plus durables pour ces patients.

L'immunothérapie a révolutionné la prise en charge de certains cancers, notamment avec le développement des inhibiteurs de points de contrôle immunitaires (checkpoint). Ce sont des anticorps monoclonaux dirigés contre des checkpoints comme CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) et PD-1 (PD-1, programmed cell death 1), présents à la surface des lymphocytes T, ou contre leur ligand (PD-L1, programmed cell death ligand 1). Ces protéines "points de contrôle" interviennent dans la modulation de l'activation des cellules immunitaires afin de limiter la durée et l'intensité de la réaction immunitaire; ils sont donc très importants à l'état physiologique. Dans certains cancers, ces checkpoints sont activés de façon constante et participent à l'immunotolérance des cellules cancéreuses. Le rôle des inhibiteurs de checkpoint est alors de réactiver le système immunitaire pour qu'une immunité anti-tumorale se mette en place.

A ce jour, peu d'études ont été effectuées sur l'immunothérapie dans les MM. Trois études ont évalué l'efficacité de l'ipilimumab, un anti CTLA-4, chez 24, 33 et 71 patients de stade avancé, et ont montré un taux de réponse objective allant de 6,6 à 12% et un contrôle de la maladie dans 17 à 36% des cas ²¹⁴⁻²¹⁶. Deux études ont évalué l'effet des anti PD-1 (nivolumab et pembrolizumab) chez 20 et 35 patients et ont montré un taux de réponse objective de 23 à 35% ^{216,217} et un contrôle de la maladie chez 45% des patients ²¹⁶. Une étude de plus grande ampleur a comparé l'efficacité de l'immunothérapie (monothérapie et bithérapie) chez des patients atteints de mélanomes cutanés (MC) et des patients atteints de MM, de stade avancé ²¹⁸. Dans le groupe traité avec le nivolumab seul, le taux de réponse objective était de 23% pour les MM et de 41% pour les MC et les médianes de survie sans progression étaient de 3 mois et de 6 mois respectivement. Dans le groupe traité avec le nivolumab + ipilimumab, le taux de réponse objective était plus important avec 37% et 60% de réponses pour les MM et MC, et une médiane de survie sans progression de 6 et 11 mois respectivement. De fait, cette étude a montré que les MM répondent moins bien à l'immunothérapie que les mélanomes cutanés, et que l'utilisation concomitante d'anti PD-1 et d'anti CTLA-4 était plus efficace qu'une monothérapie. De plus, en immunohistochimie, les MM expriment significativement moins PD-1 que les mélanomes cutanés, et cette donnée n'était pas prédictive d'une réponse au traitement ²¹⁸. Même si ces résultats semblent encourageants, l'immunothérapie ne bénéficie pas à tous les patients et des outils moléculaires sont nécessaires pour mieux distinguer les futurs répondeurs et mieux stratifier les patients.

3. Le mélanome muqueux chez le chien

3.1 Aspects épidémiologiques et cliniques des mélanomes muqueux canins

Chez le chien, le mélanome muqueux se développe essentiellement dans la cavité buccale, et c'est la tumeur maligne la plus fréquente de ce site dans cette espèce. Il apparaît principalement sur les gencives, mais aussi sur les babines, la langue, les amygdales, le palais et l'oropharynx^{152,154-156,219}. D'autres cas de MM chez le chien ont été décrits dans la région ano-rectale²²⁰, les intestins²²¹ ou les cavités nasales^{164,222,223}, mais cela reste extrêmement rare. Dans la suite de cette étude, lorsque nous mentionnerons le MM du chien il s'agira du mélanome buccal. C'est une tumeur du chien âgé, la moyenne d'âge au diagnostic est de 10-11 ans, et certaines races ont été identifiées comme étant plus à risque comme le caniche, le golden retriever, le Labrador, le rottweiler, le Yorkshire terrier, le cocker spaniel, le chow-chow, le scottish terrier ou le teckel^{77,152,155-157,224}.

L'aspect clinique du mélanome buccal canin est variable; il peut se présenter sous la forme d'une masse ou d'une plaque surélevée, très pigmentée ou peu pigmentée, voire amélanique (Figure 11). Cliniquement, les chiens atteints peuvent souffrir d'halitose, de dysphagie, ptyalisme, saignement voire de fractures de la mâchoire en cas d'invasion osseuse^{154,155}. Le mélanome buccal est une tumeur très agressive localement et tend à métastaser rapidement, principalement aux nœuds lymphatiques drainants puis aux poumons^{155,157}. La médiane de survie des animaux atteints varie entre 3 et 24 mois selon le stade clinique au moment du diagnostic¹⁵⁵. Chez le chien, le stade clinique est défini de I à IV selon les critères modifiés de l'OMS et le système TNM (Taille de la tumeur, Nœuds lymphatiques, Métastases à distance). Certaines études ont montré que 30 à 50% des chiens développent des métastases à distance au cours de la maladie²²⁵⁻²²⁷.

Comme chez l'homme, en histologie on observe différentes morphologies cellulaires avec des tumeurs à cellules fusiformes, épithélioïdes, parfois mixtes, et moins fréquemment des cellules en ballon ou "signet ring cell"^{153,228}. Un sous-groupe de mélanomes à comportement plus bénin, caractérisé par une forte pigmentation, un faible index mitotique et l'absence d'atypies cellulaires a été identifié, et représente environ 10% des mélanomes buccaux²²⁹.

Concernant la prise en charge du MM chez le chien, elle repose d'abord sur l'exérèse chirurgicale, la plus complète possible. Les tumeurs à proximité ou envahissant l'os sont traitées par héli-mandibulectomie/maxillectomie, et cette intervention, bien qu'invasive, est souvent bien tolérée^{155,226,227,230,231}. Cependant, malgré cette prise en charge radicale, la durée médiane de survie des chiens s'étend de 7 à 9 mois seulement, à cause de la survenue de récurrence ou de métastases^{226,230}. Une autre étude sur 70 chiens mentionne une durée de survie médiane de 24 mois mais elle incluait une majorité de chiens avec un stade I²²⁷.

De façon identique à l'homme, la radiothérapie est utilisée en traitement palliatif des tumeurs non opérables, en traitement néoadjuvant avant une chirurgie ou après une chirurgie

lorsque les marges d'exérèse ne sont pas saines. Chez le chien, le taux de réponse objective (partielle et complète) lors de maladie macroscopique est environ de 80 à 90% selon les études ^{225,232-235}, mais à ce jour, il n'y a pas de protocole standard indiquant le nombre de séances et la dose par séance.

Dans la mesure où le MM canin présente une agressivité locale et une forte expansion métastatique, les thérapies systémiques sont indispensables pour augmenter la durée de survie et diminuer ou prévenir le développement de métastases. Différentes molécules de chimiothérapie ont été étudiées chez le chien, comme le carboplatine, le cisplatine, le melphalan ou le temozolomide, montrant des résultats contradictoires en terme d'efficacité ^{224,225,232,234,236,237}. Cependant, la plupart des études ont conclu que ces traitements n'apportaient pas de bénéfices en terme de durée de survie et de survie sans progression, et à ce jour, aucun traitement systémique de type chimiothérapie ne fait consensus chez les vétérinaires pour le traitement du MM canin.

Il y a 13 ans, Bergman et son équipe ²³⁸ ont développé un vaccin à ADN codant la tyrosinase humaine pour traiter des chiens atteints de MM. Un premier essai de phase I a démontré des résultats encourageants avec des individus présentant un stade avancé (métastases à distance) qui ont montré une durée de survie étonnamment longue, et un individu qui a présenté une réponse complète avec disparition de ses métastases pulmonaires ²³⁹. La production d'anticorps anti-tyrosinase humaine, croisant avec la tyrosinase canine a été objectivée sur 3/9 chiens ayant été vaccinés, et ceci concordait avec l'apparition d'une réponse clinique ²⁴⁰. Depuis, le vaccin a été approuvé par l'USDA (United States Department of Agriculture), mais différentes études évaluant son efficacité sur un plus grand nombre de chiens ont rapporté des résultats contradictoires ^{241,242}. Les dernières études réalisées suggèrent un bénéfice sur la durée de survie des chiens traités, mais l'hétérogénéité des critères d'inclusion et l'absence de groupe contrôle dans certaines études rendent l'interprétation difficile ²⁴³⁻²⁴⁵. Verganti *et al.* ont tout de même rapporté une réponse sur 8/13 chiens présentant une maladie macroscopique²⁴⁵.

De ce fait, chez le chien également, il y a un grand besoin de nouvelles thérapies systémiques efficaces dans le traitement du mélanome buccal.

3.2 Génétique comparée des mélanomes muqueux canins

Les premières études génétiques réalisées sur les MM canins visaient principalement à étudier les gènes connus, fréquemment mutés dans les mélanomes humains. Une première étude de séquençage de 6 gènes candidats réalisée par notre équipe sur 77 MM canins a montré la présence de mutations dans les gènes *NRAS* (4%) et *PTEN* (2,6%) correspondant aux hotspot humains¹⁵². Cependant, la mutation *BRAF*_{V595E} (correspondant à la mutation V600E chez l'homme), très présente dans les mélanomes cutanés humains était absente des 77 cas, et les gènes *GNAQ* et *KIT* n'étaient pas mutés non plus¹⁵². Une autre étude a confirmé l'absence de mutation du gène *KIT* sur l'exon 11 (17 cas) alors que la protéine est fortement exprimée dans 50% des cas ²⁴⁶. Deux autres études ciblant particulièrement la mutation *BRAF*_{V595E} ont montré qu'elle était peu (2/47)⁹⁸ ou pas présente (0/17) ²⁴⁷ dans les MM

canins. La très faible proportion de mutations du gène *BRAF* confirmait déjà l'hypothèse selon laquelle les MM canins ne sont pas liés à l'exposition aux UV, tout comme les MM humains.

Un peu plus tard, des études génétiques plus globales incluant l'analyse du profil de CNA, en utilisant du CGH, du FISH ou des techniques de séquençage haut débit ont confirmé que les MM canins avaient de nombreux points communs avec leurs homologues humains. Chez le chien, le MM se caractérise également par de nombreux SV et CNA^{159,160,182,248,249} (Figure 16). Parmi les altérations les plus fréquentes, on note les gains des chromosomes canins (CFA) 13 et 17, les pertes des CFA 2 et 22^{159,182,249}, et d'autres altérations plus focales sur les CFA 1, 11, 15, et X, (délétions) et les CFA 10, 11, 13, 30 (amplifications)¹⁶⁰. Ainsi, les oncogènes *MYC*, *KIT*, sont amplifiés dans 80% et 65% des cas respectivement et les gènes suppresseur de tumeur *CDKN2A* et *RB1* sont délétés dans 68% et 35% des cas respectivement^{159,160}. Ces études ont décrit l'existence de profils « sigmoïdes » (alternances de fortes amplifications et de délétions) sur le CFA 30, évoquant des réarrangements complexes de type chromothripsis^{159,160,182,248,249}. Une région d'environ 600 kb, autour de la position 16-17 Mb est fortement amplifiée dans 35 à 60% des cas^{159,160,182,249} et en amont, la région contenant les gènes *Bub1B*, *KNSTRN*, *B2M* et *SPRED1* (de 2Mb à 12 Mb) est très souvent délétée¹⁸². Cette dernière correspond à une région délétée de façon récurrente chez l'homme, sur le chromosome (HSA) 15^{159,182,249}. Dans les MM canins, le CFA 10 présente aussi des amplifications focales de façon récurrente, ciblant en particuliers les gènes *MDM2* et *CDK4* souvent co-amplifiés^{160,182}. Ces altérations sont également observées chez l'homme, dans les MM buccaux notamment^{147,181}.

Grâce au séquençage haut débit, notre équipe ainsi que celles de Wong et de Hendricks ont pu préciser le profil mutationnel des MM canins. Comme chez l'homme, les MM canins ont une faible charge mutationnelle: l'étude de Wong (n=65) et celle de l'équipe (n=69) n'ont pas mis en évidence de signature UV^{182,250}. Les gènes les plus fréquemment mutés sont les gènes *RAS* (13 à 16%), *TP53* (8 à 19%), *KIT* (0 à 8%)^{160,182,250} et *PTPRJ* (23%)¹⁶⁰. En revanche, les gènes *GNAQ* et *SF3B1*, mutés chez l'homme n'ont pas été retrouvés mutés chez le chien¹⁸², et le gène *BRAF* a été retrouvé muté seulement dans 3% des cas dans l'étude de Wong *et al.*, alors qu'aucune mutation n'a été retrouvée dans les études d'Hendricks *et al.* De plus, d'autres études suggèrent que l'amplification du gène *MDM2* et les mutations du gène *TP53* sont des événements exclusifs¹⁶⁰.

Comme chez l'homme, les MM canins sont caractérisés par l'activation des voies des MAP kinase et PI3 kinase^{160,182,249,251}. L'étude de Brocca *et al.* visait particulièrement à définir les voies oncogéniques modifiées par les nombreux CNA, et a démontré également l'importance de la voie de l'angiogénèse, avec l'intervention des gènes *ANGPT1*, *VEGFR2*, *PDGFRA*, et *PTK2*²⁴⁹.

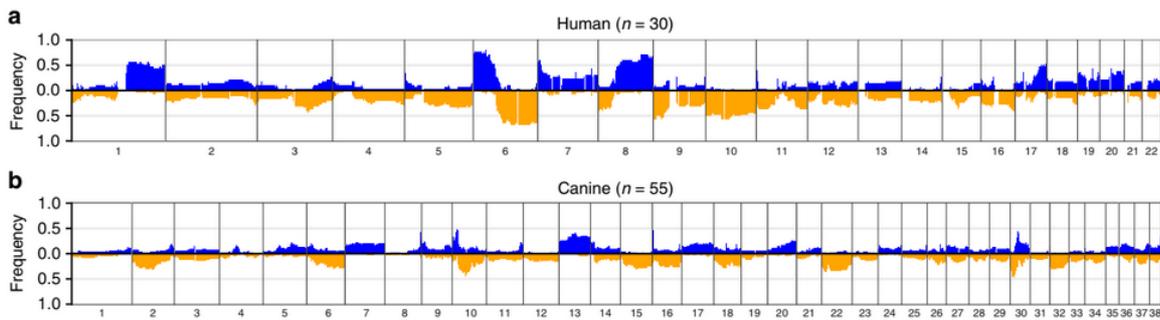


Figure 16 : Profil de variation du nombre de copies (CNA) de MM humains (n=30) et MM canins (n=55). Les gains sont représentés en bleu et les délétions en orange, le long des chromosomes dans les deux espèces, le MM est caractérisé par un nombre important de CNA. D'après Wong *et al.*

De plus, une étude récente a analysé les profils d'expression de MM canins qui ont métastasé, en comparaison avec des MM n'ayant pas métastasé, et a mis en évidence 3 gènes dont l'expression diffère fortement entre ces deux groupes: *CXCL12*, *APOBEC3A* et *RPL29*²⁵². *CXCL12* code une chimiokine impliquée dans la migration cellulaire, la croissance et l'angiogenèse alors que la protéine *APOBEC3A* est responsable de cassure double brin de l'ADN. Ces gènes constituent des cibles intéressantes pour des thérapies "anti-métastases".

Une autre cible thérapeutique connue a été étudiée dans le MM canin: le checkpoint PD-1/PD-L1. L'expression de PD-L1 a d'abord été mise en évidence sur des lignées cellulaires canines de mélanome buccal²⁵³⁻²⁵⁵, puis sur des échantillons de tumeurs grâce à l'immunohistochimie²⁵⁴⁻²⁵⁶. Il a été montré que 90% (36/40) des MM canins exprimaient PD-L1, et que les lymphocytes infiltrant la tumeur surexprimaient PD-1 de façon significative en comparaison avec des lymphocytes sanguins de chiens sains²⁵⁶. Ces recherches ont abouti au développement d'un anticorps monoclonal anti PD-L1 canin^{257,258} qui a été utilisé lors d'une étude pilote sur 7 chiens atteints de MM (1 stade II, 2 stades III et 4 stades IV, avec métastases pulmonaires)²⁵⁸. Un seul chien sur les sept a présenté une réponse objective à la dose de 5 mg/kg toutes les deux semaines, avec une disparition de la tumeur qui avait récidivé, et un des 4 chiens qui présentaient initialement des métastases pulmonaires a eu une survie très longue de 222 jours²⁵⁸. D'autres études sont nécessaires pour compléter ou infirmer ces résultats et préciser les raisons de ces disparités de réponses.

Les analyses génétiques réalisées ces dernières années sur différentes cohortes de MM canins^{159,160,182,249} démontrent la proximité des mécanismes génétiques en jeu dans les MM humains et canins. En effet, les types d'altération, les gènes mutés et leur fréquence sont très comparables entre l'homme et le chien, faisant ainsi des MM canins de très bons modèles génétiques et thérapeutiques des MM humains.

RESULTATS

I. Contexte de la thèse

1. Cani-DNA, un Centre de Ressources Biologiques (CRB) d'ADN et de tissus canins créé par l'équipe

Depuis les années 2000, l'équipe a créé et développé une biobanque de prélèvements canins appelée Cani-DNA, grâce à un réseau vétérinaire sollicité par l'équipe au fil des années. Cette biobanque comportant actuellement plus de 26 000 prélèvements sanguins extraits en ADN et plus de 8 000 tissus essentiellement issus de tumeurs, s'est développée et organisée en partenariat avec les 4 Écoles Vétérinaires (ENV) et la société Antagene depuis 2012, pour devenir en 2017 un CRB, de la plateforme de Biosit (structure fédérative des EPST du site rennais, Université de Rennes1). Cani-DNA fait partie du projet CRB-Anim qui rassemble les biobanques d'animaux domestiques en France, financé entre 2012 et 2022 par un PIA1. La biobanque permet de collecter des prélèvements et des données généalogiques, épidémiologiques et cliniques provenant de chiens atteints de diverses maladies génétiques et cancers et de chiens indemnes de tous âges. Ces prélèvements représentent environ 300 races de chiens et une centaine de maladies génétiques et cancers homologues à l'homme. Ces prélèvements de chiens des races atteintes de différentes pathologies représentent une ressource inestimable pour des études en pathologie comparée que ce soit sur des ADN constitutionnels, tumoraux (somatique) et des ARN. Cani-DNA est un support indispensable aux projets de recherche de l'équipe, dont le projet mélanome sur lequel j'ai travaillé.

2. Le projet mélanome à mon arrivée au laboratoire

L'équipe travaille en oncologie comparée chien-homme sur plusieurs cancers, dont les mélanomes, depuis une quinzaine d'années et a déjà généré de nombreuses données épidémiologique et génétique. Grâce à Cani-DNA, de nombreux prélèvements de mélanomes buccaux, oculaires, digités/unguéraux et cutanés ont été collectés. A ce jour, la bio-banque contient des échantillons sanguins de 910 chiens atteints de mélanomes et des échantillons de tissus tumoraux de 509 individus, dont 313 avec de l'ARN disponible. Une vétérinaire, C. de Brito, en charge de ce projet avant mon arrivée, avait collecté des données épidémiologiques et de survie sur plus de 400 cas (issus des bases de données des laboratoires d'anatomopathologie vétérinaires français), ce qui a constitué la base de mon étude de master 2 (cf Article en Annexe 2), et d'une partie de ma thèse.

En 2014, l'équipe a publié la première étude comparée sur les mélanomes, réalisée sur une importante cohorte de 2 350 chiens atteints de différents types de mélanomes dans le journal

Pigment Cell Melanoma Research¹⁵². Cette étude a démontré que certaines races étaient particulièrement touchées par un sous-type: le caniche a un risque augmenté de développer un mélanome buccal, alors que le schnauzer et le beauceron sont plutôt atteints de mélanomes cutanés et les retrievers des 2 types: cutanés et buccaux. La relecture croisée de lames histologiques de 153 cas par deux anatomo-pathologistes, l'un en médecine humaine (Béatrice Vergier, CHU de Bordeaux) et l'autre en médecine vétérinaire (Jérôme Abadie, Oniris, ENV de Nantes) a montré que l'architecture des mélanomes canins se rapprochait de types « névocytoïdes » et « type animal » humains. Six gènes candidats impliqués dans les mélanomes humains, *BRAF*, *NRAS*, *PTEN*, *KIT*, *GNAQ* et *CDK4* ont été séquencés pour rechercher des mutations sur les hotspots connus. Les résultats ont montré que les mélanomes canins présentaient les mêmes hotspots de mutations que chez l'homme pour les gènes *NRAS* et *PTEN*, mais aucune mutation du gène *BRAF* n'a été retrouvée, alors que ce gène est très fréquemment muté dans les mélanomes cutanés humains induits par les UV. De ce fait, cette étude a montré que le modèle canin était un modèle spontané pertinent pour l'étude des mélanomes humains, particulièrement les mélanomes non liés aux UV¹⁵².

L'équipe a également généré des données d'exome sur 70 cas de MM (buccaux) provenant de 3 races prédisposées (caniche, labrador et golden retriever) et des données d'expression provenant de 32 cas (RNA-seq)²⁵⁰. L'analyse des données d'exome a montré la présence de gènes fréquemment mutés comme *TP53*, *RAS* et *PTEN*, et surtout que les MM présentaient de manière générale de nombreuses amplifications et délétions de gènes appelées CNA (Copy Number Alterations). Des amplifications massives et focales étaient présentes de façon récurrente (jusqu'à 50% des cas) sur une région du CFA 30 (située entre 16 et 17 Mb) et sur le CFA 10, englobant les oncogènes *MDM2* et *CDK4*. L'identification de ces amplifications a été confortée par des travaux de CGH, et l'exploration de leur implication biologique a constitué le début de mon projet de thèse. En parallèle, les données d'expression ont montré que des ARN longs non-codants étaient différentiellement exprimés dans les échantillons de mélanomes et les tissus sains^{30,259}.

C'est dans ce contexte que j'ai démarré mon projet de thèse, avec un double objectif, à la fois appliqué en médecine vétérinaire et fondamental :

1. Chercher si ces altérations récurrentes ont une valeur pronostique chez le chien atteint de MM
2. Chercher et comprendre leur rôle sur la progression tumorale, leur intérêt en tant que cible thérapeutique et leur potentielle implication chez l'homme.

Ceci a donné lieu à deux articles publiés dans les revues *Genes*⁷³ et *Veterinary and comparative oncology*²⁶⁰, ainsi qu'à un troisième article en cours d'écriture. De plus, le travail sur l'ADN tumoral circulant a fait l'objet d'un article soumis en juillet à *Scientific Report*. Ces travaux sont présentés dans les parties suivantes.

II. Revue: Les mélanomes canins comme modèles pour les mélanomes humains : comparaisons clinique, histologique et génétique

ARTICLE 1

Canine melanomas as model for human human melanomas : clinical, histological and genetic comparison,
Prouteau A. and André C., Genes, 2019

J'ai commencé par rédiger une revue de la littérature sur l'oncologie comparée des mélanomes chez l'homme et le chien. Au moment de la rédaction de cet article, 5 revues avaient été publiées en oncologie comparée sur le mélanome chez le chien^{74,75,161-163}, démontrant l'intérêt du chien comme modèle pré-clinique^{75,161-163}, pour les études génétiques^{75,161} et le développement de l'immunothérapie¹⁶². Nous avons rassemblé les données de la littérature et les données de l'équipe non publiées pour rédiger une revue d'oncologie comparée sur les différents types de mélanomes du chien et de l'homme: cutané, acral, muqueux et oculaire. Nous avons comparé les aspects épidémiologique, clinique, histologique et thérapeutique, chez l'homme et le chien en insistant particulièrement sur la génétique comparée. Cette revue met en évidence que les mélanomes canins représentent un bon modèle des mélanomes non UV-induits de l'homme, et particulièrement les mélanomes buccaux, très proches des mélanomes muqueux humains. La discussion de notre revue s'articule notamment autour des thérapies innovantes dans les deux espèces, ouvrant des perspectives sur l'intérêt des essais cliniques chez le chien, en amont des essais humains. Ainsi, le chien naturellement atteint de mélanome offre la possibilité d'étudier la génétique de ce cancer et d'explorer les pistes thérapeutiques dans un modèle immunocompétent et physiologiquement plus proche de l'homme que d'autres modèles comme la souris par exemple. De ce fait, l'originalité et la force de ce modèle sont que ces résultats peuvent bénéficier aux deux espèces.

L'intérêt du modèle canin dans l'étude du mélanome a déjà été développé dans l'introduction de la thèse et ne sera donc pas repris en détail dans ce chapitre de résultats.

Review

Canine Melanomas as Models for Human Melanomas: Clinical, Histological, and Genetic Comparison

Anaïs Prouteau and Catherine André *

Univ Rennes, CNRS, IGDR - UMR 6290, F-35000 Rennes, France

* Correspondence: catherine.andre@univ-rennes1.fr; Tel.: +33-2-23-23-41-75

Received: 4 May 2019; Accepted: 22 June 2019; Published: 30 June 2019



Abstract: Despite recent genetic advances and numerous ongoing therapeutic trials, malignant melanoma remains fatal, and prognostic factors as well as more efficient treatments are needed. The development of such research strongly depends on the availability of appropriate models recapitulating all the features of human melanoma. The concept of comparative oncology, with the use of spontaneous canine models has recently acquired a unique value as a translational model. Canine malignant melanomas are naturally occurring cancers presenting striking homologies with human melanomas. As for many other cancers, dogs present surprising breed predispositions and higher frequency of certain subtypes per breed. Oral melanomas, which are much more frequent and highly severe in dogs and cutaneous melanomas with severe digital forms or uveal subtypes are subtypes presenting relevant homologies with their human counterparts, thus constituting close models for these human melanoma subtypes. This review addresses how canine and human melanoma subtypes compare based on their epidemiological, clinical, histological, and genetic characteristics, and how comparative oncology approaches can provide insights into rare and poorly characterized melanoma subtypes in humans that are frequent and breed-specific in dogs. We propose canine malignant melanomas as models for rare non-UV-induced human melanomas, especially mucosal melanomas. Naturally affected dogs offer the opportunity to decipher the genetics at both germline and somatic levels and to explore therapeutic options, with the dog entering preclinical trials as human patients, benefiting both dogs and humans.

Keywords: melanoma; dogs; spontaneous model; clinics; histology; genetics; comparative oncology

1. Introduction

Human malignant melanoma is a highly heterogeneous cancer that affects numerous anatomical sites with different clinical behaviours. It originates from melanocytes, which are dendritic cells located in epithelia such as skin or mucosa, but also in the eye or internal organs, thus defining major subtypes with specific anatomic locations and pathogenesis. The major subtypes include cutaneous (UV-induced and non-UV-induced types), acral, mucosal, and ocular melanomas. Epidemiology, UV-radiation status, histopathological features, genetics, prognosis, and outcomes vary considerably between these subtypes.

Cutaneous melanomas account for approximately 75% of skin cancer deaths [1,2], and their incidence is rising among populations of European descent, with 80,000 cases per year in the USA [3]. The current World Health Organization (WHO) classification for cutaneous melanoma is based on morphologic aspects of the early growth phase and the body site of the primary melanoma, to distinguish four main types: superficial spreading melanoma (SSM), lentigo maligna melanoma (LMM), nodular melanoma (NM), and acral lentiginous melanoma (ALM) [1–5]. Chronic and intermittent ultraviolet exposures are a major cause of melanoma development in sun-exposed skin. UV-induced melanoma with cumulative sun-induced damage (CSD) and non-CSD melanoma are the most common

types in peoples of European descent and occur at around 60 and 40 years of age, respectively [1]. Another type of melanoma affecting non-sun-exposed or specific sites is acral melanoma, with locations on the palms of the hands, soles of the feet, and the nail apparatus, which occurs at similar incidences across all world populations [6]. Additional rare categories of melanomas present distinct clinical, epidemiological, and histopathological features, such as desmoplastic melanoma, spitzoid melanoma, blue nevus-like melanoma, melanoma in giant congenital nevus, and other types arising from dermal melanocytes (nevus of Ota, nevus of Ito) [1]. Even if the major part of cutaneous melanoma is diagnosed at an early stage, approximately 10% of melanoma cases are unresectable or already metastatic at diagnosis [7]. For those latter patients, the prognosis is poor, with a 5 year survival rate of around 12% [8], whereas it is around 90% for cutaneous melanomas of all stages [9,10]. Acral subtypes carry the worst prognosis among cutaneous melanomas, with a 5 year survival rate of around 80% [11]. The impact of other subtypes on prognosis is not known [5].

Mucosal melanomas originate from melanocytes within mucosal epithelia and constitute a rare clinical entity representing 0.8–3.7% of all melanomas [12], with an incidence of 800 cases per year in the USA [3]. Although rare in the general population, these account for 9–22% of melanoma cases in Asian and black populations where cutaneous melanoma is less common [12] and occur around the age of 60–70 [3]. They exhibit a pathogenic mechanism different from cutaneous subtypes and a much worse prognosis. They can originate from the anogenital regions, oropharynx and paranasal sinuses, as well as the conjunctiva (head and neck localisations), and can also arise from parotid glands, oesophagus, and the middle ear [13]. Local and/or distant metastasis to lungs and liver occur in 50% of cases with head and neck melanoma [3]. Mucosal melanomas carry a poor prognosis, with a 5 year survival rate between 25% and 33%, according to disease stage and location [3,14].

Uveal melanoma is the most common intraocular human cancer and accounts for approximately 5% of all melanoma in the United States [1], occurring at around 60 years of age [15]. The incidence of uveal melanoma is stable with 2500 new cases per year in the USA [3]. The most frequent sites are the choroid and the ciliary body. Although uveal melanoma is rare, the disease is still lethal. Almost half of patients with effective primary therapy will develop metastases [16], and these patients have a poor prognosis, with a median survival time ranging from 4 to 15 months [17].

2. Comparative Oncology, Model Specificities

Melanomas are generally aggressive, with a high metastatic propensity toward several organs including lungs, bones, liver, and the central nervous system. Even though the development of targeted therapy and immunotherapy has improved outcomes, there is still a lack of knowledge to enable the development of efficient treatments with sustainable response and to provide clues to the mechanisms of resistance. Despite numerous efforts to better understand the genetics and physiopathology of melanomas, previous studies mainly focused on cutaneous melanoma and often considered different melanoma types as a single disease entity. Fortunately, recent published data in the discipline has highlighted and precisely described molecular specificities based on the different melanoma subtypes.

The discovery of genetic alterations has led to the development of targeted therapies, such as tyrosine kinase inhibitors or BRAF inhibitors, new therapeutic options, and stratification of patients. However, melanoma research could certainly benefit from additional models to those currently used. Indeed, the popular mouse model used over the last decades in the study of cancer has revealed some limits: patient-derived xenograft mouse models lack a fully functional immune system, and genetically engineered mouse models are expensive and do not carry the same mutagenic load and genetic background as human cancers [18]. It is also now recognized that mice were not as efficient as expected to objectify drug response in Phase III clinical trials. Researchers then became more and more interested in naturally occurring cancers in pet animals, because they are immuno-competent individuals sharing our environment, and the natural history of cancer in animals occurs in a generally shorter period than in humans. Thus, many cancers in pet dogs show similar features to their human counterparts, including clinical and histological appearance, biological behaviour, tumor genetics,

molecular pathways and targets, and response to therapies [19–22]. Most recent genetic analyses of cancer in pet dogs has shown their usefulness in specifically identifying key somatic genes and relevant mutational mechanisms [22–30]. Their advantages require no further demonstration and, considering the ethical constraints in the use of experimental models in respect of the 3R rules (Replace, Refine, Reduce), the use of naturally affected pets in their environment and followed-up by their veterinarians should be encouraged in comparative oncology programs.

For melanomas, obvious unmet needs remain to better manage, treat, and prevent this disease, considering their numerous specific subtypes. To this end, recent reviews have demonstrated the strength of spontaneous canine melanomas as relevant genetic and therapeutic models for specific human melanoma subtypes [18,21,31–35].

3. Canine Melanomas

Melanocytic tumors are quite common in the dog, and most of them are malignant [34,36–40]. Of over 2350 cases of melanocytic tumors, 70% were malignant melanomas and 30% benign tumors (called melanocytomas) [34]. Melanoma represents 7% of all malignant tumors in dogs [37], and the most frequent location is the oral cavity, mimicking human mucosal melanomas [32–34]. Canine melanomas also occur in the haired skin, nail bed, footpad, eye (Figure 1), gastro-intestinal tract, central nervous system, or muco-cutaneous junction [37,38,41], and it is well known that prognosis greatly depends on tumor location (Figures 2 and 3); oral melanomas presenting the worse prognosis with a median survival time (MST) of 6 months, whereas MST was not reached in cutaneous forms. Digital forms seem to have intermediate prognosis, with an MST of 11.8 months [30,32–37]. Melanoma is a tumor of older dogs, with no sex predilection, but some breeds are more prone to develop a specific melanoma subtype [18,34,42–44]. Contrary to human cutaneous melanoma, which are the most frequent and for which UV light exposure and fair skin are known to be important etiological factors, canine melanoma etiology is not known. However, UV light exposure is not thought to be an etiological factor. Indeed, dog skin is covered with fur, and dogs with dark coat colours are more prone to develop melanoma. Most canine melanomas arise from the dermis, but melanocytes and melanocyte precursors in the dog skin are located in both layers: in the basal layer of the epidermis and in the dermis. In dogs, of course, the presence of melanocytes in the numerous hair follicles of the dermis is to be taken into consideration, but is not fully explored so far.

A major interest with dog melanomas is that specific breeds are at higher risk to develop specific melanomas subtypes, and thus the breed is an etiological factor underlying genetic predisposition differing from breed to breed. Altogether, striking homologies have been observed between canine melanomas and human non-UV-induced melanomas; mostly oral and non-UV-induced cutaneous melanomas, like acral melanomas, also observed in people with a dark phototype [11,12].

Concerning histopathology, there are also striking homologies. Using a comparative approach, we previously reviewed 153 melanocytic tumors from oral, cutaneous, and ocular locations, and found four categories resembling human histological subtypes [34]: animal-type melanoma, melanoma simulating nevus, melanoma with epithelioid cells, and melanoma with composite cells (Figure 1) [32–34,39,41,42].

Thus, canine melanomas constitute relevant spontaneous models for human mucosal, acral, uveal, and non-UV-induced cutaneous melanomas.

In this review, we attempt to provide the key contributions from canine melanomas in the context of comparative oncology. We present state-of-the-art epidemiology, pathology, genetics, and therapy of canine melanomas based on the different subtypes: mucosal, cutaneous, digital, and uveal melanomas.

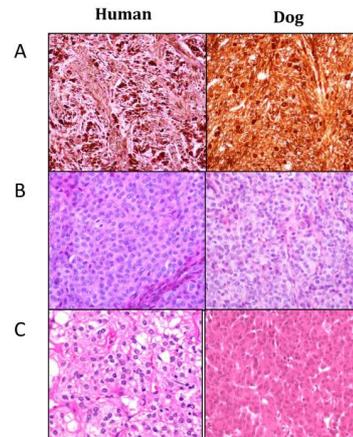


Figure 1. Histopathological aspects of human (left) and dog (right) melanoma morphological subtypes. Hematoxylin–Eosin–Safranin (HES) staining of formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. Photo credit: B. Vergier and J. Abadie. (A) “Animal type”: sheets or bundles of highly pigmented large epithelioid to spindle-shaped neoplastic melanocytes; (B) “Simulating (congenital or cellular blue) naevi type”: sheets with a high cellular density of small oval to spindle cells with a small central nucleus containing one to several small nucleoli; (C) “Epithelioid type”: large round to polygonal epithelioid cells with a high amount of variably pigmented cytoplasm and a large nucleus.

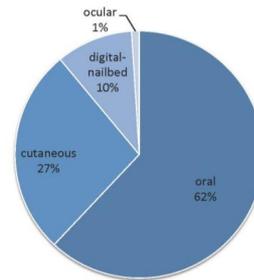


Figure 2. Distribution of canine malignant melanomas (n = 1652) depending on the anatomical site [34].

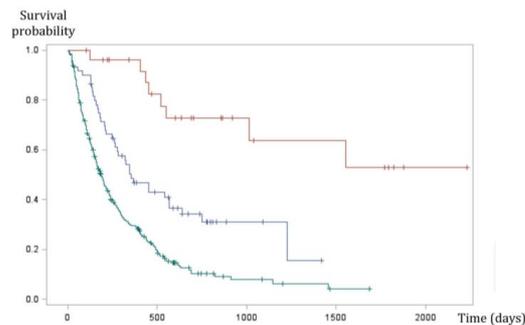


Figure 3. Kaplan Meier survival curve of 335 dogs with malignant melanoma. Oral (green line), digital (blue line), and cutaneous (red line) melanomas have significantly different prognosis ($p < 0.0001$, log-rank test). Oral melanomas have the worse prognosis with a MST (median survival time) of six months, whereas survival times were highest in cutaneous forms (MST not reached). Digital forms seem to have intermediate prognosis with an MST of 11.8 months (Prouteau et al., in preparation [39]).

4. Canine Mucosal Melanoma

4.1. Epidemiology

Canine oral melanoma is the most common type of mucosal melanoma in dogs and the most common oral malignancy in this species. It occurs mostly on the gingiva, but also on the lips, tongue, tonsils, palate, and oropharynx [34,37,38,41,42]. Mean age at diagnosis is around 10–11 years of age, and several studies have identified breeds more prone to develop this oral form, such as poodles, golden and Labrador retrievers, Rottweilers, Yorkshire terrier, cocker spaniels, chow-chows, Scottish terriers, and daschunds (Figure 4A) [34,38–40,42–44]. Other mucosal sites comprise the anorectal region [45], intestines [46], and nasal cavity, but these entities are very rare in dogs [47–49].

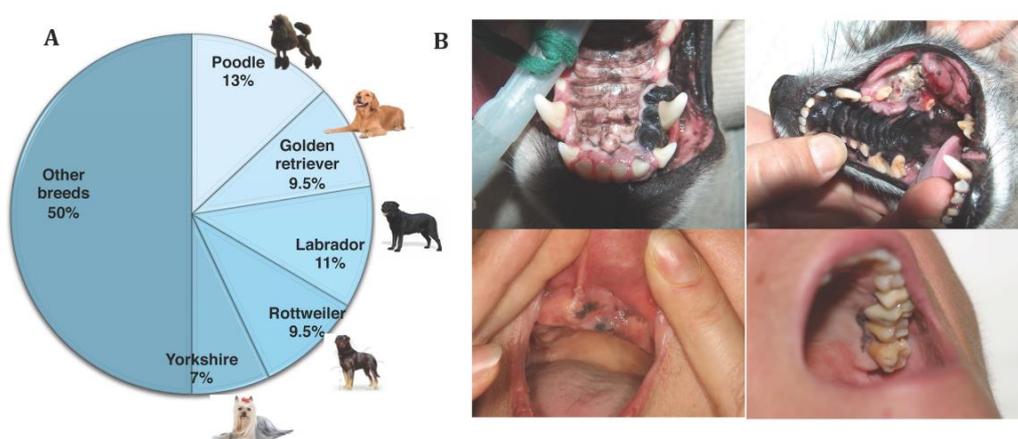


Figure 4. (A) Breed distribution in a study of 247 canine oral melanomas. Five breeds represent 50% of cases, illustrating the breed predisposition (Prouteau et al., in preparation [39]). (B) Pictures of canine oral melanoma involving the gingiva; that can be pigmented (on the top left) or amelanotic (on the top right). Pictures of human mucosal melanoma (pigmented tumors) arising on the gingiva of the oral cavity. Photo credit: P. De Fornel, A. Dupuy and T. Jouary.

4.2. Clinical Signs and Biological Behaviour

The clinical presentation of canine melanomas varies considerably; it can consist of small brown-to-black masses, but can also appear as large, flat, and/or wrinkled masses, highly to slightly pigmented or amelanotic (Figure 4B). Clinical signs of oral melanoma include dysphagia, halitosis, ptyalism, bleeding, and occasionally fracture of the mandible in case of bone invasion [37,38]. This is an aggressive tumor with a local invasiveness and a high metastatic propensity to regional lymph nodes and lungs [32,33,35]. Recent studies suggest that the prevalence of pulmonary metastasis in canine oral melanoma is around 17%–51%, highlighting the aggressiveness of this disease [50–52]. Some cases of intranasal or anal sac melanoma have been reported, but these are rare and prognosis is poor. In a recent study, 12 anal sac melanoma cases were treated with surgery most of the time with or without adjuvant chemotherapy, and 10/12 dogs experienced local recurrence or metastasis to regional lymph nodes, penis, or lungs [45].

4.3. Histopathology

Previous histopathological characterization of canine oral melanoma showed several major cell types, such as epithelioid cells, spindle cells, mixed types containing both patterns, and less frequent balloon or signet ring cells [36,53]. These histological types were not found to be prognostic [54]. One third of canine melanomas are amelanotic, and immunohistochemistry is sometimes needed to differentiate them from carcinomas or sarcomas [31]. Recently, oral melanoma cases with an infrequent

cancer-related death rate were characterized by a limited size, an intense pigmentation, a low mitotic index, and a lack of cellular atypia, representing up to 10% of oral melanomas [33,55].

4.4. Treatment

The first line and most effective local treatment is surgical excision [38]. Oral melanomas which invade or are in proximity to the bones are treated with partial mandibulectomy/maxillectomy, and these interventions, while highly invasive, are usually well tolerated [51,52,56–58].

Radiation therapy is generally used as a palliative treatment for unresectable tumors [59], as a neoadjuvant therapy before surgery, or as an adjuvant therapy when surgical margins are incomplete. The reported ranges of partial and complete responses to radiation therapy are 25–44% and 41–69%, respectively, yielding overall response rates of 82% to 94%, according to the studies [50,60–63]. In spite of the evident radiosensitivity of oral melanoma, there is no standard treatment indicating the number of fractions and dose per fraction.

The aggressiveness and high metastatic propensity of canine oral melanoma make systemic therapies very interesting to extend survival and slow or prevent metastases occurrence. Several studies used systemic chemotherapy with carboplatin, cisplatin, melphalan, or temozolomide [40,50,60,62,64–66] and showed conflicting results, but the majority of them concluded that there were no differences in terms of survival time or time to progression compared with surgery or radiation therapy.

Thirteen years ago, Bergman et al. developed a xenogenic human tyrosinase DNA vaccine for dogs with oral melanoma, and a Phase I trial demonstrated that some dogs with advanced stage disease (presence of distant metastases) experienced long-term survival [43,67]. Since then, this DNA vaccine has been licensed by USDA (United States Department of Agriculture, Oncept TM), but further studies evaluating its efficacy reported controversial results (reviewed in Atherton et al. (2016)) [43,68–70]. More recent studies showed extended survival times, but the heterogeneity of inclusion criteria makes interpretation difficult [71–73]; in particular, a clinical response in 8/13 dogs with macroscopic tumors was reported by Verganti et al. (2017) [73].

4.5. Prognosis

In canine melanomas, location is the major prognostic factor (Figure 2). Indeed, the oral subtype carries the worse prognosis, with reported median survival times (MST) between 3 months and 24 months, according to the stage (modified WHO staging system from I to IV, with tumor size, lymph node involvement, and metastases) and treatment [33,34,45,46,52,59,60,65,68–70]. The MST for dogs with surgically resected stage II–III oral melanoma is only 3–12 months, with an estimated one year survival rate of only 20% [70,74]. Even with a radical surgical excision, recurrence rates are still high (22–48%) [50–52,56,57], underlying the need for efficient systemic therapies. Regardless of the clinical stage, a threshold for Ki67 above 19.5 % predicted melanoma-related death within a year of diagnosis [75]. Among other pathological criteria, low pigmentation, a high nuclear atypia score, and a high mitotic index (>4 mitosis figures over ten fields) are linked to a poor outcome [33,37]. Most cases of oral melanoma carry a very poor prognosis, however, a small proportion of well-differentiated, slowly growing tumors has been described [52,55]. Such entities also exist in humans, for who the prognosis criteria are mainly based on histopathological features, ulceration, and Breslow parameters, but they do not constitute a given subtype.

4.6. Genetic Features and Comparative Aspects

Canine mucosal melanomas have been recently studied at the molecular level. Obviously different from human cutaneous melanomas, the main genetic alterations do resemble that of human mucosal melanomas.

First analysed through candidate gene approaches, mutations were reported on *NRAS*, at the same hotspots as in human cancers (*NRAS*^{Q61}), and on *PTEN*, but not on *BRAF*^{V600} and *KIT* [34,76,77].

Then, using array-comparative genomic hybridization (aCGH), recurrent deletions including *CDKN2A* and *PTEN* tumor suppressor genes were described [78]. Substantial recurrent gains of chromosomes, notably, CFA13 (*Canis familiaris*) and CFA17 (involving at least *KIT* and *MYC* oncogenes) were identified, the most recurrent aberrations being a complex copy number profile on CFA30 with alternate losses and gains and CFA 10 rearrangements encompassing the oncogenes *MDM2* and *CDK4* [78]. Most recent findings from NGS methods on canine oral melanoma of several breeds, through whole genome sequencing of five cases and targeted sequencing of 26 cases [29], exome sequencing of 65 FFPE (formalin fixed and paraffin embedded) cases [30], and exome sequencing of 69 cases [79] showed concordant results: mutations on *NRAS*, *KRAS*, occurred in 10–20% of cases, *PTEN* and *TP53* in 10% and 8–28% of cases, respectively [29,30].

Importantly, canine oral melanoma presents numerous copy number alterations (CNA) and a relatively low single nucleotide variation (SNV) rate with general non-UV mutation signatures, as first shown in human mucosal melanomas [9]. The “chromotripsis like” profile on CFA30 was reported in canine oral melanomas concerning 60% of affected dogs and corresponds to the HSA15 alteration observed in human cases [80]. SNV detected in canine oral melanomas are also present in human mucosal melanoma [30,81,82], with exceptions for *SF3B1*, *ATRX*, and *SPRED1* mutations, that were not identified in dogs [30,83]. Conversely, recurrently altered genes such as *PTPRJ*, suggested to be inactivated in 23% of canine mucosal melanomas are not yet found in human cancers [29]. Indeed, in human mucosal melanoma cases, mutation profiles seem to vary slightly according to the mucosal anatomical site. For example, *NRAS* mutations are mostly seen in sinonasal forms [30,84], whereas mutations in *KIT*, *NF1*, and *SFB31* are recurrent in anogenital forms [30,85]. Further studies in canine oral melanomas should shed some light on these aspects, revealing recurrent mutations with strong effect in specific locations and specific breeds, reflecting different genetic backgrounds that are easiest to investigate in dog breeds. These data were very recently enriched by comparative expression profiling of 28 cases of oral malignant melanoma, comparing metastatic/primary situations [86].

In both species, the MAPK and PI3K pathways are involved in mucosal melanoma formation and progression [29–31,82,85,87]. All of these data suggest that canine and human mucosal melanomas share similarities and that dog could be a good preclinical model for this rare human cancer.

The search for predisposing mutations has not been extensively investigated in canine melanomas, however, recent analyses of exome sequence data have been performed in human, dog, and horse mucosal melanomas [30]. The authors looked for pathogenic germline variants already established in human melanoma susceptibility genes [88], including *CDKN2A*, *BAP1*, *POT1*, and *TP53*, based on their orthologs in the canine genome, but to date none have been identified in canine oral melanoma.

5. Canine Cutaneous Melanoma

Malignant melanoma is a relatively common cancer in dogs and accounts for 9–20% of skin tumors in that species [89]. Interestingly, tumors in cutaneous locations are often benign; 60% of them are benign melanocytomas [34,90], according to pathological criteria, such as nuclear atypias and mitotic index <3 mitoses over ten fields [90,91].

In contrast to human cutaneous melanoma for which UV-light exposure is a major etiologic factor, dogs are naturally protected against sun exposure by their hair. Furthermore, black-coated breeds with pigmented skin are at increased risk, as is the case with schnauzers, Scottish terriers, poodles, golden retrievers, dachshunds, cocker spaniels and chow-chows [18,34,42–44].

Melanocytic neoplasms in dogs are usually dermal, arising on hair-bearing skin of the head, ears, neck, trunk, and limbs [32–34]. Whereas melanocytomas are usually solitary, small, pigmented, firm, and freely moveable over deeper structures, malignant melanomas tend to be fast-growing tumors, often ulcerated and pigmented (Figure 5) [92].



Figure 5. Canine cutaneous melanoma (left) and human nodular melanoma (right). Photo credit: P. Durieux and T. Jouary.

Usually, surgical resection is curative [32–34,87,89], although some pathological characteristics, such as a mitotic index ≥ 3 over ten fields (otf) the presence of ≥ 20 nuclear atypia, a Ki67 index $> 15\%$, ulceration, lymphatic invasion, and tumors extending beyond the dermis, have a negative influence on prognosis [33,35,37,90,91]. More recently, Silvestri et al. showed that Breslow thickness is significantly associated with histological malignancy, clinical outcome, and presence of recurrence/metastasis [93].

Cutaneous melanoma has a relatively benign behavior in dogs. Recent studies, evaluating outcomes after surgical excision, showed that the MST was 1363 days and not reached with 77%–88% of dogs alive at 1 year and 54% alive at 2 years [36,39,40,93,94] (Figure 2). In the series of 87 dogs (Laver et al., 2018), 12% of dogs had lymph node metastases and 3.7% had pulmonary metastases at diagnosis. Interestingly, the authors proposed that a mitotic index threshold of 20 mitosis figures over ten fields accurately predicts the outcome. It appears that local resection alone is sufficient for most localized canine cutaneous melanomas, and the clinical benefit of adjuvant therapies like chemotherapy or DNA vaccines has not been shown [40,94].

Genetic Features and Comparative Aspects

The data available on somatic alterations are based on few cases of canine cutaneous melanoma. First, aCGH experiments on five tumors identified copy number alterations such as gains on the CFA 20 and losses on the CFA 6 and 18 [78]. A candidate gene approach with 20 cutaneous melanomas found no variant in *BRAF*, *NRAS*, *PTEN*, *KIT*, *GNAQ*, and *CDK4* [34]. Hendricks et al., (2018) provided genetic results of two cutaneous melanoma cases: an *NRAS* mutation and a translocation in chromosome 10 (region 10–12 Mbases) for one case (Whole Genome Sequencing) and *KRAS*, *TP53*, and *KIT* mutations with amplification of chromosome 30 (region 16,164,778–16,525,074 Mbases) for the other case (targeted sequencing) [29]. These preliminary data, together with the fact that canine cutaneous melanocytic tumors are most often benign and not linked to UV-light exposure, confirm that these canine cutaneous forms arise from a distinct mechanism, different from that of most human cutaneous melanomas. Indeed, human UV-induced cutaneous melanomas carry a clear UV-mutational signature and an important mutation burden with recurrent mutated genes such as *BRAF*, *NRAS*, *HRAS*, *NF1*, *CDKN2A*, *TP53*, and *PTEN* and the recently identified genes, such as *PPP6C* and *RAC1* [80,82,95]. However, the identification of genetic alterations in canine cutaneous tumors should provide interesting results and new data for the less investigated non-UV-induced subtypes of melanomas in humans, such as acral melanoma, or rare categories of dermal melanomas [1].

In terms of research on human cutaneous melanoma predisposition, numerous GWAS (Genome Wide Association Study) have been performed on large worldwide cohorts of patients and controls over the last 10 years, which has led to the identification of over 20 genome-wide significant melanoma risk regions [30,95–97]. While several dog breeds are predisposed to cutaneous melanoma, germline variants are worth exploring to inform the genetics of the rare non-UV-induced subtypes of human melanomas.

6. Canine Digital Melanoma

Melanoma is the second most common canine digital tumor after squamous cell carcinoma and accounts for 15%–17% of neoplasias of the digits [98,99]. It arises on the skin digits, footpad, or nail bed and mimics human acral melanoma (plantar surface of the foot, palms of hands, and fingers) (Figure 6). Previous studies showed that between 49–86% of canine melanocytic tumors of the digits were malignant and that all nail bed melanocytic tumors were malignant [34,90,91]. It is a tumor of old dogs, occurring around 10 years of age [98]; some breeds are over-represented like Scottish terrier [98], schnauzer, Beauce shepherds, and Rottweilers [34,99].



Figure 6. Canine digital melanomas mimic human acral melanomas. Canine digital melanomas can occur on the digit (A) or the footpad (B) and are often ulcerated. Human acral melanomas typically occur on the palmar/plantar surface of the hand/feet (C,D). Photo credit: A. Muller (A), F.A. Fogel (B), A. Dupuy (C), and E. Maubec (D).

These melanomas have a biological behaviour intermediate between oral and cutaneous melanomas (Figure 3). They are locally aggressive, with bone lysis occurring in 40–58% of cases [99,100] and have a high metastatic propensity, with regional or distant pulmonary metastasis in 30% to 40% of cases at presentation [99,101]. Without regional or distant metastases, the first-line treatment is amputation of the digit; then, the MST is 12 months, with 42–57% of dogs alive at 1 year and 11–13% alive at 2 years [38,98,99,101]. These data confirm the aggressiveness of digital melanomas, their poor prognosis, and the need for adjuvant therapy. A few studies have reported that chemotherapy does not lead to a survival benefit [40]; xenogeneic DNA vaccine is safe and resulted in an MST of 476 days, but still 50% of dogs treated developed metastases during the course of treatment [100].

Genetic Features and Comparative Aspects

To date, only 3 canine acral tumors have been studied and all harboured *RAS* mutations (2 *KRAS* and 1 *NRAS*), and CNA involving *CFA30* was found in one case [29]. In humans, a series of 35 samples of acral melanomas [82] have been shown to present a complex copy number alteration profile more similar to mucosal than cutaneous melanomas [9,82,102]. Significantly mutated genes such as *BRAF*, *NRAS* and *NF1* have been identified in half of the cases [82].

Concerning germline variants, there are no data available in dogs or humans, whereas predispositions are known in black-coated dogs from several terrier breeds, and their genetic analyses would greatly inform the rare and severe corresponding human subtypes.

7. Canine Uveal Melanoma

Melanocytic tumors are the most common primary ocular neoplasms in dogs. They can be limbal or epibulbar, but the most common site is the anterior uvea (iris and ciliary body) [103–105]. The biological behavior of these ocular melanomas depends on their location, with uveal melanoma being the most frequent and aggressive [31]. In contrast to humans, primary choroidal melanoma is rare in dogs [32,33]. Between 15 and 29% of canine intraocular melanocytic tumors are histologically malignant [34,37,105], and they are defined by their cytologic abnormalities and a mitotic index superior to four mitosis figures over ten fields [103,106]. More recently, a study tended to discriminate between benign (“melanocytoma-like melanoma”) and malignant uveal melanocytic cases based on morphological criteria such as smaller tumor size, high degree of pigmentation, and low mitotic activity [106]. At examination, the first abnormality commonly observed is a dark-pigmented mass in the anterior segment of the eye [101], but melanoma can be amelanotic in rare cases (Figure 7). Associated clinical signs include iris thickening, irregular pupil with blindness and ocular pain, or secondary symptoms such as keratitis, uveitis, or glaucoma [37,103,104].

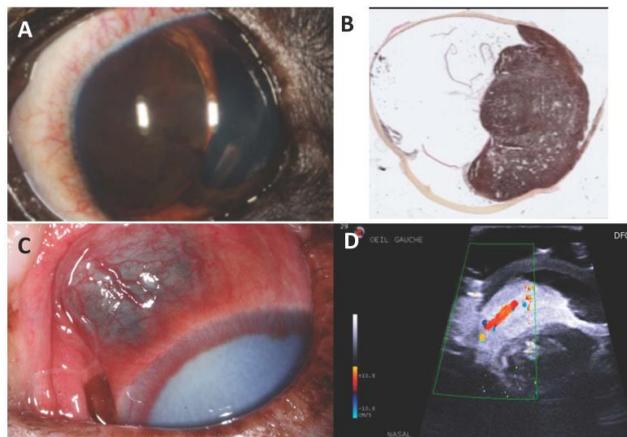


Figure 7. Canine uveal melanoma: (A) dog eye with an iridal melanoma; (B) Histological section of a canine uveal melanoma; (C) Melanoma of the ciliary body in a dog. Localized dilation of the episcleral vessels indicating, as in human, a melanoma of the ciliary bodies; (D) Ultrasonography of an affected eye. We notice the high surface echogenicity with rapid decay of this echogenicity Photo credit: P. Durieux.

Only 4% to 8% of malignant uveal melanomas metastasize to lungs and liver, generally within 3 months following enucleation, consistent with what it is seen in localized human iris melanomas [103,107,108]. A few cases with late metastases have been reported in dogs, occurring more than 1.5 years after initial diagnosis [109,110]. Canine intraocular melanomas are treated with enucleation if there is concern about malignancy or complications. In order to preserve the eye and vision, local resection may be performed on isolated primary masses involving only the iris or a portion of the ciliary body, but long-term results are often unsatisfactory. Other available treatments for uveal melanoma include laser therapy, which holds promise for the palliation or potential cure while preserving vision [38].

The prognosis for dogs with histologically benign uveal melanoma (“melanocytoma-like melanoma”) is excellent. However, dogs with malignant uveal melanoma have significantly shorter lifespans [105,106]. In human uveal melanoma, despite successful local treatment, up to 25% and 34% of patients still develop metastases within 5 and 10 years [111]. This situation highlights the importance of genetically discriminating benign and malignant forms. Recently, gene expression profiles (class 1

and 2), Ki67 positivity, and loss of chromosome 3 allowed metastasising from non-metastasising human uveal melanomas to be distinguished [112]. Based on those findings, Malho et al. found that four of these genes (*HTR2B*, *FXR1*, *LTA4H*, and *CDH1*) were overexpressed in metastasising canine uveal melanoma [107]. For one of those, *FXR1*, immunohistochemical expression was shown to be different between 10 oral and 10 uveal canine melanoma cases, but the link with the biological behaviour has still to be determined [113].

Genetic Features and Comparative Aspects

In dogs, there are no genetic somatic or germline alterations identified to date. However, in humans, frequent somatic activating mutations in *GNAQ* or *GNA11* have been found, leading to the stimulation of both MAPK and PIK3/AKT pathways [114–116]. Another major gene, *BAP1*, has been involved in uveal melanomas, both through somatic alterations and germline variants [117,118]. Moreover, additional risk polymorphisms have recently been identified in human uveal melanomas [119]. Most recently, Robertson et al. (2017) performed an integrated study of 80 uveal melanoma patients, and genetic alterations, such as chromosome 3 monosomy/disomy, alterations in *EIF1AX*, *SF3B1*, and *BAP-1*, together with CNA and the global DNA methylation status, have been demonstrated to carry a prognostic value [17]. It would be relevant to determine if and how these alterations can discriminate canine uveal “melanocytoma-like melanoma” from malignant melanoma cases.

8. Innovative Therapies in Human and Canine Melanomas

In human and dogs, complete surgical excision is the first-line treatment of localized melanomas [38,120,121]. Radiation therapy can improve local control and decrease tumor recurrence after surgery for mucosal melanoma and is effective to treat some types of human cutaneous melanomas, like lentigo maligna melanomas [38,120,121]. However, for advanced stage and metastatic diseases, systemic therapies are essential.

Targeted therapies and immunotherapy have been developed in the last decade and strongly improved some cancer’s management.

Immunotherapy is a novel treatment modality which consists of treating cancers using and stimulating the patient’s immune system. It has revolutionized some advanced cancer’s treatment and outcome, particularly with the development of checkpoint inhibitors targeting cytotoxic T lymphocytes antigen 4 (CTLA-4) and programmed cell death 1 (PD-1) [122,123]. Those molecules are mainly expressed on activated T lymphocytes, and the binding to their ligands (several clusters of differentiation for CTLA-4 and programmed cell death ligands 1 and 2 for PD-1) suppresses T-cell activity. Upregulation of these inhibitory pathways is observed in many human cancers, particularly melanoma, and is responsible for the suppression of antitumor immune response, which promotes cancer immune evasion. Recently, phase III trials showed that anti PD-1 (pembrolizumab, nivolumab) and anti CTLA-4 (ipilimumab) provided high response rate and durable long-term survival in responding patients, and they are now part of the first-line treatment in advanced stage and metastatic melanomas [122,124]. Checkpoint inhibitors, and particularly the combination of nivolumab and ipilimumab also showed promising results in human mucosal melanomas and should be considered as a good treatment option for advanced stage and metastatic diseases [121,125]. In canine oncology, the tumor microenvironment and immune system are less investigated. However, it has been recently shown that PD-1 and CTLA-4 are significantly overexpressed by peripheral blood T lymphocytes in cancer-bearing dogs compared with in healthy controls [126,127] and that PD-1 blockade enhances T-cell activation [127]. Alongside that, PD-L1 was shown to be expressed in many canine cancers, including oral melanoma [35,128,129]. Those data led to a pilot clinical study in dogs with oral melanoma, using a canine chimeric monoclonal antibody targeting PD-L1. This drug was safe and well tolerated in dogs, and 1/7 dogs showed an objective response [130]. These recent data make the dog an interesting model for translational immunotherapeutic studies that could predict novel drugs efficacy.

Targeted therapies have also improved outcomes of human metastatic cutaneous melanomas. Those therapies are used according to the molecular profile of the tumors, and cutaneous melanomas with *BRAF* V600 mutations are likely to benefit from the combination of BRAF (vemurafenib, dabrafenib) and MEK inhibitors (trametinib) [124]. Although typically of short duration, antitumor activity with KIT inhibitors like imatinib has been observed in mucosal melanoma harboring *KIT* mutations [121,131]. To date, there are no available targeted therapies against melanoma in dogs. The screening of 21 drugs on nine canine melanomas cell lines showed that they were not sensible to BRAF and KIT inhibitors (vemurafenib, masitinib, imatinib), but to bortezomib, a proteasome inhibitor involved in the NF- κ B pathway, that could be a promising targeted therapy [132].

9. Discussion

In this review, we attempt to summarize the present knowledge about the different canine melanomas in the context of comparative oncology.

The dog appears to be the best-known spontaneous model for human oncology, but there are other interesting species like horse, cat, or pig, which can develop melanomas, and genetic studies have been performed in some of these. Advances in our understanding of melanomas have been facilitated by a range of animal models, which contributed to basic biology, characteristics and roles of driver genes, and efficiency of targeted therapies. In horses, melanocytic tumors represent up to 19% of cutaneous tumors and often occur in grey horses [133]. As in dogs, equine melanomas are not thought to be associated with UV-light exposure. Predisposing alterations have been found in grey horses, such as a 4.6kb duplication in *STX17* [134,135]. In cats, melanocytic neoplasms are a rare entity, the most frequent site being the eye; uveal melanoma biologic behaviour is quite similar to human uveal melanoma, because tumors metastasize to internal organs in up to 60% of the cases [38]. However, common mutations present in human uveal melanoma were not found in the feline counterpart [136]. Recently, melanomas of the oral cavity and the skin have also been described, as a retrospective study, in 30 cats [137]. Lastly, the MeLiM pig model is a spontaneous model of cutaneous melanoma, with tumors appearing a few weeks after birth, followed by regression [138]. MeLiM pig genetic data recently led to the identification of new risk loci [139], but no somatic variants have been identified to date.

At present, there is an opportunity to use these spontaneous models to define new genes and loci that influence melanoma risk, to define recurrent molecular alterations that could be drivers, and to identify therapeutic targets in order to use these data to guide the development of new therapeutic options and achieve better prognosis in humans.

The great advantage with dogs is the existence of anatomic locations corresponding to those of human melanomas. Canine and human melanomas share many features, such as clinical presentation, pathology, and molecular mechanisms. Particularly, canine oral and digital melanomas display an aggressive behaviour that mimics human mucosal and acral melanomas. However, canine cutaneous melanomas arising on the hair-bearing skin are not linked to UV exposure, contrary to the majority of human cutaneous melanoma, and thus might represent relevant models for the rare non-UV-induced cutaneous melanomas, but not for the classical SSM forms of human cutaneous melanomas.

To date, genetic studies of canine melanomas, mainly based on oral subtypes, showed that their genomic landscapes are similar to those reported in human non-UV-induced melanomas, with a low point mutation frequency but a high structural variation burden. Those features, as well as the absence of UV signature make the dog a good opportunity to study any form of non-UV-induced human melanomas (cutaneous and noncutaneous).

Another advantage of the dog is the existence of breeds that constitute genetic isolates. Some breeds are at higher risk to develop melanomas, such as breeds with pigmented skin or mucosa, and are ideal spontaneous models to screen for pathogenic germline alterations. Moreover, as there is a likely association between the specific genetic background of breeds and the landscape of somatic mutations, dog can help to identify relevant alterations in human melanoma subtypes.

Genetic analyses in dogs such as whole genome sequencing, exome, RNA sequencing, or a CGH are now routinely performed. Canine sample collection is facilitated by the prevalence of melanoma in predisposed breeds, and thanks to the efforts of the community. Biological Resource Centres have been set up, like the French Cani-DNA BRC (<http://dog-genetics.genouest.org>) or the American Canine Comparative Oncology Genomics Consortium (CCOGC) (<https://ccogc.net/>), which have significant collections of canine melanoma samples.

Those resources and methods can be used to identify therapeutic targets and enhance clinical trials in pet dogs [35]. This concept of “first-in dogs trials” has been launched by the National Cancer Institute’s (NCI’s) Comparative Oncology Trials Consortium (COTC; <http://ccr.cancer.gov/resources/cop/COTC.asp>), with the aim of answering biological questions that can inform the development of novel agents for future use in human cancer patients [140,141]. Clinical trials in pet dogs offer several advantages. First, they are not constrained by traditional Phase I, Phase II, and Phase III trial designs, and make it possible to address many questions in one study (toxicity, pharmacokinetics, pharmacodynamics, response etc.) to inform future human clinical studies. Moreover, dogs present a shorter lifespan and a relatively rapid disease course for most cancers, thus providing the cancer natural history with earlier outcome measures compared with those from human patients. Since many canine cancers do not have well-established standards of care, novel agents can be offered to pet dogs alternatively to conventional therapies, leading to trials benefiting the health of both dogs and humans.

Author Contributions: C.A. and A.P. both wrote, reviewed and edited the manuscript.

Acknowledgments: The authors are grateful to Marc Gillard, Clotilde de Brito, Anne-Sophie Guillory, Edouard Cadieu, Christophe Hitte, Aline Primot, Thomas Derrien and Benoit Hédan from the Canine Genetics team, (IGDR, Rennes, France) for their historical and strong input in the study of canine melanomas. Melanoma data were gathered through the Cani-DNA BRC (<http://dog-genetics.genouest.org>), which is part of the CRB-Anim infra-structure, ANR-11-INBS-0003. The authors thank M.D. Galibert (IGDR Rennes, France), F. Demenais (Université de Paris, UMR-1124 INSERM, Paris, France), E. Maubec (Université de Paris, UMR-1124 INSERM and AP-HP, Paris, France), B. Vergier (CHU Bordeaux, France), F. Mouriaux and Elodie Bourreau (CHU Rennes, France), P. Devauchelle (MICEN-Vet, Creteil, France), J.P. Jegou (Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire d’Alfort, France), Frédérique Degorce-Rubiale (LAPVSO, Toulouse France), M. Lagadic (IDEXX, Paris, France) and A. Fautrel (Platform H2P2 Biosit Rennes, France) for their knowledge and involvement in melanomas, with helpful discussions and advice on the comparative aspects. Authors warmly thank Susan Cure (Paris, France) for careful reading and correcting of the manuscript. The authors thank P. de Fornel (MICEN-Vet, France), A. Dupuy (CHU Rennes, France), T. Jouary (Centre Hospitalier de Pau, France), J. Abadie (ENVN Oniris, France), B. Vergier (CHU Bordeaux, France), A. Muller (Clinique vétérinaire Lommes, France), F.A. Fogel (Facultad de Ciencias Veterinarias, Tandil, Argentina), E. Maubec (Université de Paris, UMR-1124 INSERM and AP-HP, Paris, France) and P. Durieux (Centre Hospitalier Vétérinaire des Cordeliers, Meaux) for their pictures illustrating the review.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bastian, B.C. The molecular pathology of melanoma: An integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annu. Rev. Pathol.* **2014**, *9*, 239–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Weiss, S.; Hanniford, D.; Hernando, E.; Osman, I. Revisiting determinants of prognosis in cutaneous melanoma. *Cancer* **2015**, *121*, 4108–4123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Williams, M.D. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Mucosal Melanomas. *Head Neck Pathol.* **2017**, *11*, 110–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. LeBoit, P.E.; Burg, G.; Weedon, D.; Sarasain, A. World Health Organization Classification of Tumours. In *Pathology and Genetics of Skin Tumours*; IARC Press: Lyon, France, 2006.
5. Greenwald, H.S.; Friedman, E.B.; Osman, I. Superficial spreading and nodular melanoma are distinct biological entities: A challenge to the linear progression model. *Melanoma Res.* **2012**, *22*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Tsao, H.; Chin, L.; Garraway, L.A.; Fisher, D.E. Melanoma: From mutations to medicine. *Genes Dev.* **2012**, *26*, 1131–1155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

7. Leonardi, G.C.; Falzone, L.; Salemi, R.; Zanghi, A.; Spandidos, D.A.; McCubrey, J.A.; Candido, S.; Libra, M. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). *Int. J. Oncol.* **2018**, *52*, 1071–1080. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Lee, N.; Barthel, S.R.; Schatton, T. Melanoma Stem Cells and Metastasis: Mimicking Hematopoietic Cell Trafficking? *Lab. Investig.* **2014**, *94*, 13–30. [[CrossRef](#)]
9. Furney, S.J.; Turajlic, S.; Stamp, G.; Nohadani, M.; Carlisle, A.; Thomas, J.M.; Hayes, A.; Strauss, D.; Gore, M.; van den Oord, J.; et al. Genome sequencing of mucosal melanomas reveals that they are driven by distinct mechanisms from cutaneous melanoma. *J. Pathol.* **2013**, *230*, 261–269. [[CrossRef](#)]
10. Lian, B.; Cui, C.L.; Zhou, L.; Song, X.; Zhang, X.S.; Wu, D.; Si, L.; Chi, Z.H.; Sheng, X.N.; Mao, L.L.; et al. The natural history and patterns of metastases from mucosal melanoma: An analysis of 706 prospectively-followed patients. *Ann. Oncol.* **2017**, *28*, 868–873. [[CrossRef](#)]
11. Criscito, M.C.; Stein, J.A. Improving the diagnosis and treatment of acral melanocytic lesions. *Melanoma Manag.* **2017**, *4*, 113–123. [[CrossRef](#)]
12. Yde, S.S.; Sjoegren, P.; Heje, M.; Stolle, L.B. Mucosal Melanoma: A Literature Review. *Curr. Oncol. Rep.* **2018**, *20*, 28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Marcus, D.M.; Marcus, R.P.; Prabhu, R.S.; Owonikoko, T.K.; Lawson, D.H.; Switchenko, J.; Beitler, J.J. Rising Incidence of Mucosal Melanoma of the Head and Neck in the United States. *J. Skin Cancer* **2012**, *2012*, 231693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Kirchoff, D.D.; Deutsch, G.B.; Foshag, L.J.; Lee, J.H.; Sim, M.-S.; Faries, M.B. Evolving Therapeutic Strategies in Mucosal Melanoma Have not Improved Survival Over Five Decades. Available online: <https://www.ingentaconnect.com/content/sesc/tas/2016/00000082/00000001/art00002> (accessed on 25 April 2019).
15. Andreoli, M.T.; Mieler, W.F.; Leiderman, Y.I. Epidemiological trends in uveal melanoma. *Br. J. Ophthalmol.* **2015**, *99*, 1550–1553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Eskelin, S.; Pyrhönen, S.; Summanen, P.; Hahka-Kemppinen, M.; Kivelä, T. Tumor doubling times in metastatic malignant melanoma of the uvea: Tumor progression before and after treatment. *Ophthalmology* **2000**, *107*, 1443–1449. [[CrossRef](#)]
17. Robertson, A.G.; Shih, J.; Yau, C.; Gibb, E.A.; Oba, J.; Mungall, K.L.; Hess, J.M.; Uzunangelov, V.; Walter, V.; Danilova, L.; et al. Integrative Analysis Identifies Four Molecular and Clinical Subsets in Uveal Melanoma. *Cancer Cell* **2018**, *33*, 151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Van der Weyden, L.; Patton, E.E.; Wood, G.A.; Foote, A.K.; Brenn, T.; Arends, M.J.; Adams, D.J. Cross-species models of human melanoma. *J. Pathol.* **2016**, *238*, 152–165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Gardner, H.L.; Fenger, J.M.; London, C.A. Dogs as a Model for Cancer. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **2016**, *4*, 199–222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Ostrander, E.A.; Dreger, D.L.; Evans, J.M. Canine Cancer Genomics: Lessons for Canine and Human Health. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **2019**, *7*, 449–472. [[CrossRef](#)]
21. Schiffman, J.D.; Breen, M. Comparative oncology: What dogs and other species can teach us about humans with cancer. *Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci.* **2015**, *370*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Ulvé, R.; Rault, M.; Bahin, M.; Lagoutte, L.; Abadie, J.; De Brito, C.; Coindre, J.-M.; Botherel, N.; Rousseau, A.; Wucher, V.; et al. Discovery of Human-Similar Gene Fusions in Canine Cancers. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 5721–5727. [[CrossRef](#)]
23. Thomas, R.; Borst, L.; Rotroff, D.; Motsinger-Reif, A.; Lindblad-Toh, K.; Modiano, J.F.; Breen, M. Genomic profiling reveals extensive heterogeneity in somatic DNA copy number aberrations of canine hemangiosarcoma. *Chromosome Res.* **2014**, *22*, 305–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Decker, B.; Parker, H.G.; Dhawan, D.; Kwon, E.M.; Karlins, E.; Davis, B.W.; Ramos-Vara, J.A.; Bonney, P.L.; McNiel, E.A.; Knapp, D.W.; et al. Homologous Mutation to Human BRAF V600E Is Common in Naturally Occurring Canine Bladder Cancer—Evidence for a Relevant Model System and Urine-Based Diagnostic Test. *Mol. Cancer Res.* **2015**, *13*, 993–1002. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Elvers, I.; Turner-Maier, J.; Swofford, R.; Koltookian, M.; Johnson, J.; Stewart, C.; Zhang, C.-Z.; Schumacher, S.E.; Beroukhi, R.; Rosenberg, M.; et al. Exome sequencing of lymphomas from three dog breeds reveals somatic mutation patterns reflecting genetic background. *Genome Res.* **2015**, *25*, 1634–1645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Sakthikumar, S.; Elvers, I.; Kim, J.; Arendt, M.L.; Thomas, R.; Turner-Maier, J.; Swofford, R.; Johnson, J.; Schumacher, S.E.; Alföldi, J.; et al. SETD2 Is Recurrently Mutated in Whole-Exome Sequenced Canine Osteosarcoma. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 3421–3431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

27. Arendt, M.L.; Melin, M.; Tonomura, N.; Koltookian, M.; Courtay-Cahen, C.; Flindall, N.; Bass, J.; Boerkamp, K.; Megquair, K.; Youell, L.; et al. Genome-Wide Association Study of Golden Retrievers Identifies Germ-Line Risk Factors Predisposing to Mast Cell Tumours. *PLoS Genet.* **2015**, *11*, e1005647. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Thaiwong, T.; Sirivisoot, S.; Takada, M.; Yuzbasiyan-Gurkan, V.; Kiupel, M. Gain-of-function mutation in PTPN11 in histiocytic sarcomas of Bernese Mountain Dogs. *Vet. Comp. Oncol.* **2018**, *16*, 220–228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Hendricks, W.P.D.; Zismann, V.; Sivaprakasam, K.; Legendre, C.; Poorman, K.; Tembe, W.; Perdigones, N.; Kiefer, J.; Liang, W.; DeLuca, V.; et al. Somatic inactivating PTPRJ mutations and dysregulated pathways identified in canine malignant melanoma by integrated comparative genomic analysis. *PLoS Genet.* **2018**, *14*, e1007589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Wong, K.; van der Weyden, L.; Schott, C.R.; Foote, A.; Constantino-Casas, F.; Smith, S.; Dobson, J.M.; Murchison, E.P.; Wu, H.; Yeh, I.; et al. Cross-species genomic landscape comparison of human mucosal melanoma with canine oral and equine melanoma. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Nishiya, A.T.; Massoco, C.O.; Felizzola, C.R.; Perlmann, E.; Batschinski, K.; Tedardi, M.V.; Garcia, J.S.; Mendonça, P.P.; Teixeira, T.F.; Zaidan Dagli, M.L. Comparative Aspects of Canine Melanoma. *Vet. Sci.* **2016**, *3*, 7. [[CrossRef](#)]
32. Hernandez, B.; Adissu, H.A.; Wei, B.-R.; Michael, H.T.; Merlino, G.; Simpson, R.M. Naturally Occurring Canine Melanoma as a Predictive Comparative Oncology Model for Human Mucosal and Other Triple Wild-Type Melanomas. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Simpson, R.M.; Bastian, B.C.; Michael, H.T.; Webster, J.D.; Prasad, M.L.; Conway, C.M.; Prieto, V.M.; Gary, J.M.; Goldschmidt, M.H.; Esplin, D.G.; et al. Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2014**, *27*, 37–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Gillard, M.; Cadieu, E.; De Brito, C.; Abadie, J.; Vergier, B.; Devauchelle, P.; Degorce, F.; Dréano, S.; Primot, A.; Dorso, L.; et al. Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2014**, *27*, 90–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Barutello, G.; Rolih, V.; Arigoni, M.; Tarone, L.; Conti, L.; Quagliano, E.; Buracco, P.; Cavallo, F.; Riccardo, F. Strengths and Weaknesses of Pre-Clinical Models for Human Melanoma Treatment: Dawn of Dogs' Revolution for Immunotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 799. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Spangler, W.L.; Kass, P.H. The histologic and epidemiologic bases for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia. *Vet. Pathol.* **2006**, *43*, 136–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Smith, S.H.; Goldschmidt, M.H.; McManus, P.M. A comparative review of melanocytic neoplasms. *Vet. Pathol.* **2002**, *39*, 651–678. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Withrow, S.J.; Vail, D.M.; Page, R.L. (Eds.) *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, 5th ed.; Elsevier: St. Louis, MO, USA, 2013; ISBN 978-1-4377-2362-5.
39. Prouteau, A.; De Brito, C.; Cadieu, E.; Gillard, M.; Abadie, J.; Botherel, N.; Degorce, F.; Lagoutte, L.; Lagadic, M.; Guillory, A.S.; et al. A prospective study of 420 canine melanocytic tumors: survival analysis and prognostic factors. in prep 2019.
40. Brockley, L.K.; Cooper, M.A.; Bennett, P.F. Malignant melanoma in 63 dogs (2001–2011): The effect of carboplatin chemotherapy on survival. *N. Z. Vet. J.* **2013**, *61*, 25–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Schultheiss, P.C. Histologic features and clinical outcomes of melanomas of lip, haired skin, and nail bed locations of dogs. *J. Vet. Diagn. Investig.* **2006**, *18*, 422–425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Ramos-Vara, J.A.; Beissenherz, M.E.; Miller, M.A.; Johnson, G.C.; Pace, L.W.; Fard, A.; Kottler, S.J. Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. *Vet. Pathol.* **2000**, *37*, 597–608. [[CrossRef](#)]
43. Bergman, P.J. Canine oral melanoma. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* **2007**, *22*, 55–60. [[CrossRef](#)]
44. Dobson, J.M. Breed-predispositions to cancer in pedigree dogs. *ISRN Vet. Sci.* **2013**, *2013*, 941275. [[CrossRef](#)]
45. Vinayak, A.; Frank, C.B.; Gardiner, D.W.; Thieman-Mankin, K.M.; Worley, D.R. Malignant anal sac melanoma in dogs: Eleven cases (2000 to 2015). *J. Small Anim. Pract.* **2017**, *58*, 231–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Spugnini, E.P.; Dragonetti, E.; Murace, R.; Cassandro, R.; Groeger, A.M.; Marino, M.D.; Baldi, A. Spontaneous Intestinal Melanoma in Dogs. *In Vivo* **2005**, *19*, 1051–1054. [[PubMed](#)]
47. Hicks, D.G.; Fidel, J.L. Intranasal malignant melanoma in a dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **2006**, *42*, 472–476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

48. Davies, O.; Spencer, S.; Necova, S.; Holmes, E.; Taylor, A.; Blackwood, L.; Lara-Garcia, A. Intranasal melanoma treated with radiation therapy in three dogs. *Vet. Q.* **2017**, *37*, 274–281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Lemetayer, J.; Al-Dissi, A.; Tryon, K.; MacDonald-Dickinson, V. Primary intranasal melanoma with brain invasion in a dog. *Can. Vet. J.* **2017**, *58*, 391–396.
50. Proulx, D.R.; Ruslander, D.M.; Dodge, R.K.; Hauck, M.L.; Williams, L.E.; Horn, B.; Price, G.S.; Thrall, D.E. A retrospective analysis of 140 dogs with oral melanoma treated with external beam radiation. *Vet. Radiol. Ultrasound* **2003**, *44*, 352–359. [[CrossRef](#)]
51. Sarowitz, B.N.; Davis, G.J.; Kim, S. Outcome and prognostic factors following curative-intent surgery for oral tumours in dogs: 234 cases (2004 to 2014). *J. Small Anim. Pract.* **2017**, *58*, 146–153. [[CrossRef](#)]
52. Tuohy, J.L.; Selmic, L.E.; Worley, D.R.; Ehrhart, N.P.; Withrow, S.J. Outcome following curative-intent surgery for oral melanoma in dogs: 70 cases (1998–2011). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2014**, *245*, 1266–1273. [[CrossRef](#)]
53. Smedley, R.C.; Spangler, W.L.; Esplin, D.G.; Kitchell, B.E.; Bergman, P.J.; Ho, H.-Y.; Bergin, I.L.; Kiupel, M. Prognostic markers for canine melanocytic neoplasms: A comparative review of the literature and goals for future investigation. *Vet. Pathol.* **2011**, *48*, 54–72. [[CrossRef](#)]
54. Millanta, F.; Fratini, F.; Corazza, M.; Castagnaro, M.; Zappulli, V.; Poli, A. Proliferation activity in oral and cutaneous canine melanocytic tumours: Correlation with histological parameters, location, and clinical behaviour. *Res. Vet. Sci.* **2002**, *73*, 45–51. [[CrossRef](#)]
55. Esplin, D.G. Survival of dogs following surgical excision of histologically well-differentiated melanocytic neoplasms of the mucous membranes of the lips and oral cavity. *Vet. Pathol.* **2008**, *45*, 889–896. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Wallace, J.; Matthiesen, D.T.; Patnaik, A.K. Hemimaxillectomy for the treatment of oral tumors in 69 dogs. *Vet. Surg.* **1992**, *21*, 337–341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Kosovsky, J.K.; Matthiesen, D.T.; Marretta, S.M.; Patnaik, A.K. Results of Partial Mandibulectomy for the Treatment of Oral Tumors in 142 Dogs. *Vet. Surg.* **1991**, *20*, 397–401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Boston, S.E.; Lu, X.; Culp, W.T.N.; Montinaro, V.; Romanelli, G.; Dudley, R.M.; Liptak, J.M.; Mestrinho, L.A.; Buracco, P. Efficacy of systemic adjuvant therapies administered to dogs after excision of oral malignant melanomas: 151 cases (2001–2012). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2014**, *245*, 401–407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Tollett, M.A.; Duda, L.; Brown, D.C.; Krick, E.L. Palliative radiation therapy for solid tumors in dogs: 103 cases (2007–2011). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2016**, *248*, 72–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Murphy, S.; Hayes, A.M.; Blackwood, L.; Maglennon, G.; Pattinson, H.; Sparkes, A.H. Oral malignant melanoma—The effect of coarse fractionation radiotherapy alone or with adjuvant carboplatin therapy. *Vet. Comp. Oncol.* **2005**, *3*, 222–229. [[CrossRef](#)]
61. Kawabe, M.; Mori, T.; Ito, Y.; Murakami, M.; Sakai, H.; Yanai, T.; Maruo, K. Outcomes of dogs undergoing radiotherapy for treatment of oral malignant melanoma: 111 cases (2006–2012). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2015**, *247*, 1146–1153. [[CrossRef](#)]
62. Cancedda, S.; Rohrer Bley, C.; Aresu, L.; Dacasto, M.; Leone, V.F.; Pizzoni, S.; Gracis, M.; Marconato, L. Efficacy and side effects of radiation therapy in comparison with radiation therapy and temozolomide in the treatment of measurable canine malignant melanoma. *Vet. Comp. Oncol.* **2016**, *14*, e146–e157. [[CrossRef](#)]
63. Bateman, K.E.; Catton, P.A.; Pennock, P.W.; Kruth, S.A. 0-7-21 radiation therapy for the treatment of canine oral melanoma. *J. Vet. Intern. Med.* **1994**, *8*, 267–272. [[CrossRef](#)]
64. Freeman, K.P.; Hahn, K.A.; Harris, F.D.; King, G.K. Treatment of dogs with oral melanoma by hypofractionated radiation therapy and platinum-based chemotherapy (1987–1997). *J. Vet. Intern. Med.* **2003**, *17*, 96–101.
65. Dank, G.; Chien, M.B.; London, C.A. Activating mutations in the catalytic or juxtamembrane domain of c-kit in splenic mast cell tumors of cats. *Am. J. Vet. Res.* **2002**, *63*, 1129–1133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Rassnick, K.M.; Ruslander, D.M.; Cotter, S.M.; Al-Sarraf, R.; Bruyette, D.S.; Gamblin, R.M.; Meleo, K.A.; Moore, A.S. Use of carboplatin for treatment of dogs with malignant melanoma: 27 cases (1989–2000). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2001**, *218*, 1444–1448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Liao, J.C.F.; Gregor, P.; Wolchok, J.D.; Orlandi, F.; Craft, D.; Leung, C.; Houghton, A.N.; Bergman, P.J. Vaccination with human tyrosinase DNA induces antibody responses in dogs with advanced melanoma. *Cancer Immun.* **2006**, *6*, 8. [[PubMed](#)]
68. Atherton, M.J.; Morris, J.S.; McDermott, M.R.; Lichty, B.D. Cancer immunology and canine malignant melanoma: A comparative review. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2016**, *169*, 15–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

69. Otnod, J.M.; Smedley, R.C.; Walshaw, R.; Hauptman, J.G.; Kiupel, M.; Obradovich, J.E. A retrospective analysis of the efficacy of Oncept vaccine for the adjunct treatment of canine oral malignant melanoma. *Vet. Comp. Oncol.* **2013**, *11*, 219–229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Grosenbaugh, D.A.; Leard, A.T.; Bergman, P.J.; Klein, M.K.; Meleo, K.; Susaneck, S.; Hess, P.R.; Jankowski, M.K.; Jones, P.D.; Leibman, N.F.; et al. Safety and efficacy of a xenogeneic DNA vaccine encoding for human tyrosinase as adjunctive treatment for oral malignant melanoma in dogs following surgical excision of the primary tumor. *Am. J. Vet. Res.* **2011**, *72*, 1631–1638. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. McLean, J.L.; Lobetti, R.G. Use of the melanoma vaccine in 38 dogs: The South African experience. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **2015**, *86*, 1246. [[CrossRef](#)]
72. Treggiari, E.; Grant, J.P.; North, S.M. A retrospective review of outcome and survival following surgery and adjuvant xenogeneic DNA vaccination in 32 dogs with oral malignant melanoma. *J. Vet. Med. Sci.* **2016**, *78*, 845–850. [[CrossRef](#)]
73. Verganti, S.; Berlato, D.; Blackwood, L.; Amores-Fuster, I.; Polton, G.A.; Elders, R.; Doyle, R.; Taylor, A.; Murphy, S. Use of Oncept melanoma vaccine in 69 canine oral malignant melanomas in the UK. *J. Small Anim. Pract.* **2017**, *58*, 10–16. [[CrossRef](#)]
74. MacEwen, E.G.; Patnaik, A.K.; Harvey, H.J.; Hayes, A.A.; Matus, R. Canine oral melanoma: Comparison of surgery versus surgery plus *Corynebacterium parvum*. *Cancer Investig.* **1986**, *4*, 397–402. [[CrossRef](#)]
75. Bergin, I.L.; Smedley, R.C.; Esplin, D.G.; Spangler, W.L.; Kiupel, M. Prognostic evaluation of Ki67 threshold value in canine oral melanoma. *Vet. Pathol.* **2011**, *48*, 41–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Murakami, A.; Mori, T.; Sakai, H.; Murakami, M.; Yanai, T.; Hoshino, Y.; Maruo, K. Analysis of KIT expression and KIT exon 11 mutations in canine oral malignant melanomas. *Vet. Comp. Oncol.* **2011**, *9*, 219–224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Mochizuki, H.; Kennedy, K.; Shapiro, S.G.; Breen, M. BRAF Mutations in Canine Cancers. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0129534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Poorman, K.; Borst, L.; Moroff, S.; Roy, S.; Labelle, P.; Motsinger-Reif, A.; Breen, M. Comparative cytogenetic characterization of primary canine melanocytic lesions using array CGH and fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Res.* **2015**, *23*, 171–186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Hitte, C.; Cadieu, E.; Primot, A.; Hedan, B.; Abadie, J.; Prouteau, A.; Gillard, M.; Botharel, N.; Vergier, B.; De Brito, C.; et al. Integrated Genetic Analysis of Canine Mucosal Melanoma from Three Predisposed Breeds. in prep. 2019.
80. Cancer Genome Atlas Network. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* **2015**, *161*, 1681–1696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Lyu, J.; Song, Z.; Chen, J.; Shepard, M.J.; Song, H.; Ren, G.; Li, Z.; Guo, W.; Zhuang, Z.; Shi, Y. Whole-exome sequencing of oral mucosal melanoma reveals mutational profile and therapeutic targets. *J. Pathol.* **2018**, *244*, 358–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Hayward, N.K.; Wilmott, J.S.; Waddell, N.; Johansson, P.A.; Field, M.A.; Nones, K.; Patch, A.-M.; Kakavand, H.; Alexandrov, L.B.; Burke, H.; et al. Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature* **2017**, *545*, 175–180. [[CrossRef](#)]
83. Ablain, J.; Xu, M.; Rothschild, H.; Jordan, R.C.; Mito, J.K.; Daniels, B.H.; Bell, C.F.; Joseph, N.M.; Wu, H.; Bastian, B.C.; et al. Human tumor genomics and zebrafish modeling identify SPRED1 loss as a driver of mucosal melanoma. *Science* **2018**, *362*, 1055–1060. [[CrossRef](#)]
84. Amit, M.; Tam, S.; Abdelmeguid, A.S.; Roberts, D.B.; Takahashi, Y.; Raza, S.M.; Su, S.Y.; Kupferman, M.E.; DeMonte, F.; Hanna, E.Y. Mutation status among patients with sinonasal mucosal melanoma and its impact on survival. *Br. J. Cancer* **2017**, *116*, 1564–1571. [[CrossRef](#)]
85. Hintzsche, J.D.; Gorden, N.T.; Amato, C.M.; Kim, J.; Wuensch, K.E.; Robinson, S.E.; Applegate, A.J.; Coutts, K.L.; Medina, T.M.; Wells, K.R.; et al. Whole-exome sequencing identifies recurrent SF3B1 R625 mutation and comutation of NF1 and KIT in mucosal melanoma. *Melanoma Res.* **2017**, *27*, 189–199. [[CrossRef](#)]
86. Bowlt Blacklock, K.L.B.; Birand, Z.; Selmic, L.E.; Nelissen, P.; Murphy, S.; Blackwood, L.; Bass, J.; McKay, J.; Fox, R.; Beaver, S.; Starkey, M. Genome-wide analysis of canine oral malignant melanoma metastasis-associated gene expression. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 6511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Fowles, J.S.; Denton, C.L.; Gustafson, D.L. Comparative analysis of MAPK and PI3K/AKT pathway activation and inhibition in human and canine melanoma. *Vet. Comp. Oncol.* **2015**, *13*, 288–304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

88. Potrony, M.; Badenas, C.; Aguilera, P.; Puig-Butille, J.A.; Carrera, C.; Malveyh, J.; Puig, S. Update in genetic susceptibility in melanoma. *Ann. Transl. Med.* **2015**, *3*, 210. [[PubMed](#)]
89. Modiano, J.F.; Ritt, M.G.; Wojcieszyn, J. The molecular basis of canine melanoma: Pathogenesis and trends in diagnosis and therapy. *J. Vet. Intern. Med.* **1999**, *13*, 163–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Bostock, D.E. Prognosis after surgical excision of canine melanomas. *Vet. Pathol.* **1979**, *16*, 32–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Laprie, C.; Abadie, J.; Amardeilh, M.F.; Net, J.L.; Lagadic, M.; Delverdier, M. MIB-1 immunoreactivity correlates with biologic behaviour in canine cutaneous melanoma. *Vet. Dermatol.* **2001**, *12*, 139–147. [[CrossRef](#)]
92. Goldschmidt, M.H. Pigmented lesions of the skin. *Clin. Dermatol.* **1994**, *12*, 507–514. [[CrossRef](#)]
93. Silvestri, S.; Porcellato, I.; Mechelli, L.; Menchetti, L.; Rapastella, S.; Brachelente, C. Tumor Thickness and Modified Clark Level in Canine Cutaneous Melanocytic Tumors. *Vet. Pathol.* **2018**. [[CrossRef](#)]
94. Laver, T.; Feldhaeusser, B.R.; Robat, C.S.; Baez, J.L.; Cronin, K.L.; Buracco, P.; Annoni, M.; Regan, R.C.; McMillan, S.K.; Curran, K.M.; et al. Post-surgical outcome and prognostic factors in canine malignant melanomas of the haired skin: 87 cases (2003–2015). *Can. Vet. J.* **2018**, *59*, 981–987.
95. Zhang, T.; Dutton-Regester, K.; Brown, K.M.; Hayward, N.K. The genomic landscape of cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2016**, *29*, 266–283. [[CrossRef](#)]
96. Law, M.H.; Bishop, D.T.; Lee, J.E.; Brossard, M.; Martin, N.G.; Moses, E.K.; Song, F.; Barrett, J.H.; Kumar, R.; Easton, D.F.; et al. Genome-wide meta-analysis identifies five new susceptibility loci for cutaneous malignant melanoma. *Nat. Genet.* **2015**, *47*, 987–995. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Duffy, D.L.; Zhu, G.; Li, X.; Sanna, M.; Iles, M.M.; Jacobs, L.C.; Evans, D.M.; Yazar, S.; Beesley, J.; Law, M.H.; et al. Novel pleiotropic risk loci for melanoma and nevus density implicate multiple biological pathways. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4774. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Wobeser, B.K.; Kidney, B.A.; Powers, B.E.; Withrow, S.J.; Mayer, M.N.; Spinato, M.T.; Allen, A.L. Diagnoses and clinical outcomes associated with surgically amputated canine digits submitted to multiple veterinary diagnostic laboratories. *Vet. Pathol.* **2007**, *44*, 355–361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Henry, C.J.; Brewer, W.G.; Whitley, E.M.; Tyler, J.W.; Ogilvie, G.K.; Norris, A.; Fox, L.E.; Morrison, W.B.; Hammer, A.; Vail, D.M.; et al. Canine digital tumors: A veterinary cooperative oncology group retrospective study of 64 dogs. *J. Vet. Intern. Med.* **2005**, *19*, 720–724. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Manley, C.A.; Leibman, N.F.; Wolchok, J.D.; Riviere, I.C.; Bartido, S.; Craft, D.M.; Bergman, P.J. Xenogeneic murine tyrosinase DNA vaccine for malignant melanoma of the digit of dogs. *J. Vet. Intern. Med.* **2011**, *25*, 94–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Marino, D.J.; Matthiesen, D.T.; Stefanacci, J.D.; Moroff, S.D. Evaluation of dogs with digit masses: 117 cases (1981–1991). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1995**, *207*, 726–728. [[PubMed](#)]
102. Curtin, J.A.; Fridlyand, J.; Kageshita, T.; Patel, H.N.; Busam, K.J.; Kutzner, H.; Cho, K.-H.; Aiba, S.; Bröcker, E.-B.; LeBoit, P.E.; et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *353*, 2135–2147. [[CrossRef](#)]
103. Wilcock, B.P.; Peiffer, R.L. Morphology and behavior of primary ocular melanomas in 91 dogs. *Vet. Pathol.* **1986**, *23*, 418–424. [[CrossRef](#)]
104. Diters, R.W.; Dubelzig, R.R.; Aguirre, G.D.; Acland, G.M. Primary Ocular Melanoma in Dogs. *Vet. Pathol.* **1983**, *20*, 379–395. [[CrossRef](#)]
105. Giuliano, E.A.; Chappell, R.; Fischer, B.; Dubielzig, R.R. A matched observational study of canine survival with primary intraocular melanocytic neoplasia. *Vet. Ophthalmol.* **1999**, *2*, 185–190. [[CrossRef](#)]
106. Zoroquiain, P.; Mayo-Goldberg, E.; Alghamdi, S.; Alhumaid, S.; Perlmann, E.; Barros, P.; Mayo, N.; Burnier, M.N. Melanocytoma-like melanoma may be the missing link between benign and malignant uveal melanocytic lesions in humans and dogs: A comparative study. *Melanoma Res.* **2016**, *26*, 565–571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Malho, P.; Dunn, K.; Donaldson, D.; Dubielzig, R.R.; Birand, Z.; Starkey, M. Investigation of prognostic indicators for human uveal melanoma as biomarkers of canine uveal melanoma metastasis. *J. Small Anim. Pract.* **2013**, *54*, 584–593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Bussanich, N.M. Canine uveal melanoma: Series and literature review. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **1987**, *23*, 415–422.

109. Rovesti, G.L.; Guandalini, A.; Peiffer, R. Suspected latent vertebral metastasis of uveal melanoma in a dog: A case report. *Vet. Ophthalmol.* **2001**, *4*, 75–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Delgado, E.; Silva, J.X.; Pissarra, H.; Peleteiro, M.C.; Dubielzig, R.R. Late prostatic metastasis of an uveal melanoma in a miniature Schnauzer dog. *Clin. Case Rep.* **2016**, *4*, 647–652. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Diener-West, M.; Reynolds, S.M.; Agugliaro, D.J.; Caldwell, R.; Cumming, K.; Earle, J.D.; Hawkins, B.S.; Hayman, J.A.; Jaiyesimi, I.; Jampol, L.M.; et al. Development of metastatic disease after enrollment in the COMS trials for treatment of choroidal melanoma: Collaborative Ocular Melanoma Study Group Report No. 26. *Arch. Ophthalmol.* **2005**, *123*, 1639–1643.
112. Onken, M.D.; Worley, L.A.; Tuscan, M.D.; Harbour, J.W. An accurate, clinically feasible multi-gene expression assay for predicting metastasis in uveal melanoma. *J. Mol. Diagn.* **2010**, *12*, 461–468. [[CrossRef](#)]
113. Nordio, L.; Marques, A.T.; Lecchi, C.; Luciano, A.M.; Stefanello, D.; Giudice, C. Immunohistochemical Expression of FXR1 in Canine Normal Tissues and Melanomas. *J. Histochem. Cytochem.* **2018**, *66*, 585–593. [[CrossRef](#)]
114. Van Raamsdonk, C.D.; Bezrookove, V.; Green, G.; Bauer, J.; Gaugler, L.; O'Brien, J.M.; Simpson, E.M.; Barsh, G.S.; Bastian, B.C. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature* **2009**, *457*, 599–602. [[CrossRef](#)]
115. Griewank, K.G.; van de Nes, J.; Schilling, B.; Moll, I.; Sucker, A.; Kakavand, H.; Haydu, L.E.; Asher, M.; Zimmer, L.; Hillen, U.; et al. Genetic and clinico-pathologic analysis of metastatic uveal melanoma. *Mod. Pathol.* **2014**, *27*, 175–183. [[CrossRef](#)]
116. Van Raamsdonk, C.D.; Griewank, K.G.; Crosby, M.B.; Garrido, M.C.; Vemula, S.; Wiesner, T.; Obenaus, A.C.; Wackernagel, W.; Green, G.; Bouvier, N.; et al. Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 2191–2199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Walpole, S.; Pritchard, A.L.; Cebulla, C.M.; Pilarski, R.; Stautberg, M.; Davidorf, F.H.; de la Fouchardière, A.; Cabaret, O.; Golmard, L.; Stoppa-Lyonnet, D.; et al. Comprehensive Study of the Clinical Phenotype of Germline BAP1 Variant-Carrying Families Worldwide. *J. Natl. Cancer Inst.* **2018**, *110*, 1328–1341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Ewens, K.G.; Lalonde, E.; Richards-Yutz, J.; Shields, C.L.; Ganguly, A. Comparison of Germline versus Somatic BAP1 Mutations for Risk of Metastasis in Uveal Melanoma. *BMC Cancer* **2018**, *18*, 1172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Mobuchon, L.; Battistella, A.; Bardel, C.; Scelo, G.; Renoud, A.; Houy, A.; Cassoux, N.; Milder, M.; Cancel-Tassin, G.; Cussenot, O.; et al. A GWAS in uveal melanoma identifies risk polymorphisms in the CLPTM1L locus. *NPJ Genom. Med.* **2017**, *2*, 5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Barker, C.A.; Lee, N.Y. Radiation Therapy for Cutaneous Melanoma. *Dermatol. Clin.* **2012**, *30*, 525–533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Tyrrell, H.; Payne, M. Combatting mucosal melanoma: Recent advances and future perspectives. *Melanoma Manag.* **2018**, *5*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Sullivan, R.J.; Atkins, M.B.; Kirkwood, J.M.; Agarwala, S.S.; Clark, J.I.; Ernstoff, M.S.; Fecher, L.; Gajewski, T.F.; Gastman, B.; Lawson, D.H.; et al. An update on the Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on tumor immunotherapy for the treatment of cutaneous melanoma: Version 2.0. *J. Immunother. Cancer* **2018**, *6*, 44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Almela, R.M.; Ansón, A. A Review of Immunotherapeutic Strategies in Canine Malignant Melanoma. *Vet. Sci.* **2019**, *6*, 15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Luke, J.J.; Flaherty, K.T.; Ribas, A.; Long, G.V. Targeted agents and immunotherapies: Optimizing outcomes in melanoma. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2017**, *14*, 463–482. [[CrossRef](#)]
125. D'Angelo, S.P.; Larkin, J.; Sosman, J.A.; Lebbé, C.; Brady, B.; Neyns, B.; Schmidt, H.; Hassel, J.C.; Hodi, F.S.; Lorigan, P.; et al. Efficacy and Safety of Nivolumab Alone or in Combination With Ipilimumab in Patients With Mucosal Melanoma: A Pooled Analysis. *J. Clin. Oncol.* **2017**, *35*, 226–235. [[CrossRef](#)]
126. Tagawa, M.; Kurashima, C.; Takagi, S.; Maekawa, N.; Konnai, S.; Shimbo, G.; Matsumoto, K.; Inokuma, H.; Kawamoto, K.; Miyahara, K. Evaluation of costimulatory molecules in dogs with B cell high grade lymphoma. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0201222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Coy, J.; Caldwell, A.; Chow, L.; Guth, A.; Dow, S. PD-1 expression by canine T cells and functional effects of PD-1 blockade. *Vet. Comp. Oncol.* **2017**, *15*, 1487–1502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

128. Hartley, G.; Faulhaber, E.; Caldwell, A.; Coy, J.; Kurihara, J.; Guth, A.; Regan, D.; Dow, S. Immune regulation of canine tumour and macrophage PD-L1 expression. *Vet. Comp. Oncol.* **2017**, *15*, 534–549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Maekawa, N.; Konnai, S.; Ikebuchi, R.; Okagawa, T.; Adachi, M.; Takagi, S.; Kagawa, Y.; Nakajima, C.; Suzuki, Y.; Murata, S.; et al. Expression of PD-L1 on canine tumor cells and enhancement of IFN- γ production from tumor-infiltrating cells by PD-L1 blockade. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e98415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Maekawa, N.; Konnai, S.; Takagi, S.; Kagawa, Y.; Okagawa, T.; Nishimori, A.; Ikebuchi, R.; Izumi, Y.; Deguchi, T.; Nakajima, C.; et al. A canine chimeric monoclonal antibody targeting PD-L1 and its clinical efficacy in canine oral malignant melanoma or undifferentiated sarcoma. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 8951. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
131. Hodi, F.S.; Corless, C.L.; Giobbie-Hurder, A.; Fletcher, J.A.; Zhu, M.; Marino-Enriquez, A.; Friedlander, P.; Gonzalez, R.; Weber, J.S.; Gajewski, T.F.; et al. Imatinib for Melanomas Harboring Mutationally Activated or Amplified KIT Arising on Mucosal, Acral, and Chronically Sun-Damaged Skin. *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 3182–3190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Ito, K.; Kobayashi, M.; Kuroki, S.; Sasaki, Y.; Iwata, T.; Mori, K.; Kuroki, T.; Ozawa, Y.; Tetsuka, M.; Nakagawa, T.; et al. The proteasome inhibitor bortezomib inhibits the growth of canine malignant melanoma cells in vitro and in vivo. *Vet. J.* **2013**, *198*, 577–582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Valentine, B.A. Survey of equine cutaneous neoplasia in the Pacific Northwest. *J. Vet. Diagn. Investig.* **2006**, *18*, 123–126. [[CrossRef](#)]
134. Rosengren Pielberg, G.; Golovko, A.; Sundström, E.; Curik, I.; Lennartsson, J.; Seltenhammer, M.H.; Druml, T.; Binns, M.; Fitzsimmons, C.; Lindgren, G.; et al. A cis-acting regulatory mutation causes premature hair graying and susceptibility to melanoma in the horse. *Nat. Genet.* **2008**, *40*, 1004–1009. [[CrossRef](#)]
135. Sundström, E.; Imsland, F.; Mikko, S.; Wade, C.; Sigurdsson, S.; Pielberg, G.R.; Golovko, A.; Curik, I.; Seltenhammer, M.H.; Sölkner, J.; et al. Copy number expansion of the STX17 duplication in melanoma tissue from Grey horses. *BMC Genom.* **2012**, *13*, 365. [[CrossRef](#)]
136. Rushton, J.G.; Ertl, R.; Klein, D.; Nell, B. Mutation analysis and gene expression profiling of ocular melanomas in cats. *Vet. Comp. Oncol.* **2017**, *15*, 1403–1416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Chamel, G.; Abadie, J.; Albaric, O.; Labrut, S.; Ponce, F.; Ibisch, C. Non-ocular melanomas in cats: A retrospective study of 30 cases. *J. Feline Med. Surg.* **2017**, *19*, 351–357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Rambow, F.; Piton, G.; Bouet, S.; Leplat, J.-J.; Baulande, S.; Marrau, A.; Stam, M.; Horak, V.; Vincent-Naulleau, S. Gene expression signature for spontaneous cancer regression in melanoma pigs. *Neoplasia* **2008**, *10*, 714–726. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Bourneuf, E.; Estellé, J.; Blin, A.; Créchet, F.; del Pilar Schneider, M.; Gilbert, H.; Brossard, M.; Vaysse, A.; Lathrop, M.; Vincent-Naulleau, S.; et al. New susceptibility loci for cutaneous melanoma risk and progression revealed using a porcine model. *Oncotarget* **2018**, *9*, 27682–27697. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
140. Gordon, I.; Paoloni, M.; Mazcko, C.; Khanna, C. The Comparative Oncology Trials Consortium: Using spontaneously occurring cancers in dogs to inform the cancer drug development pathway. *PLoS Med.* **2009**, *6*, e1000161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. LeBlanc, A.K.; Breen, M.; Choyke, P.; Dewhirst, M.; Fan, T.M.; Gustafson, D.L.; Helman, L.J.; Kastan, M.B.; Knapp, D.W.; Levin, W.J.; et al. Perspectives from man's best friend: National Academy of Medicine's Workshop on Comparative Oncology. *Sci. Transl. Med.* **2016**, *8*, 324ps5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

III. L'amplification focale du CFA 30 est associée à un mauvais pronostic chez le chien atteint de MM

ARTICLE 2

Prognostic value of somatic chromosome 30 amplifications in canine oral melanoma, Prouteau et al. *Veterinary and Comparative Oncology*, 2019

Comme mentionné précédemment, les données internes de l'équipe ont pointé l'importance des amplifications focales des CFA 10 et 30 dans les MM canins. Pour mieux caractériser la fréquence de ces événements et connaître leur potentielle valeur pronostique chez le chien, j'ai travaillé sur une cohorte de 111 chiens atteints de MM pour lesquels un bloc de tumeur en paraffine (FFPE -(formalin fixed paraffin embedded)) et des données épidémiologiques et de survie étaient disponibles. Avec l'aide des vétérinaires anatomo-pathologistes de l'école vétérinaire Oniris (Dr. F. Chocteau et Dr. J. Abadie), nous avons relu les lames histologiques de chaque chien pour intégrer des données histologiques telles que l'architecture de la tumeur, la présence d'activité jonctionnelle, la présence d'embolies vasculaires, la forme des cellules, l'index mitotique, le degré de pigmentation et la présence d'atypie cellulaire. Pour les 111 cas, j'ai réalisé l'extraction d'ADN tumoral à partir des blocs FFPE et j'ai recherché les amplifications de *CDK4* et *MDM2* sur le CFA 10, et de la région du CFA 30 fréquemment amplifiée en ciblant le gène *TRPM7* (16,5 Mb) avec la méthode de PCR quantitative (q-PCR). Le gène *Bub1B* situé sur le CFA 30 (7,3 Mb) et fréquemment délété dans les MM canins a également été ciblé. Pour faire partie de l'étude, les individus devaient répondre aux critères d'inclusion suivants: avoir un diagnostic de MM confirmé en histopathologie et relu par les vétérinaires d'anatomo-pathologie d'Oniris, avoir été traités par exérèse chirurgicale sans autre traitement (chimiothérapie, radiothérapie...), et avoir un suivi minimal de 6 mois. Finalement, 73 chiens ont été inclus dans cette étude.

La durée de survie médiane de la cohorte entière (n=73) était de 220 jours. Les amplifications focales sur les CFA 10 et 30 étaient très récurrentes. Les gènes *CDK4*, *MDM2* et *TRPM7* étaient amplifiés dans 41%, 49% et 50% des 73 cas respectivement. En revanche, aucune amplification du gène *Bub1B* n'a été détectée, comme attendu. *CDK4* et *MDM2* (sur le CFA10) étaient significativement co-amplifiés (p=0,0002). L'amplification focale du CFA 30 était associée à l'amplification du gène *CDK4* du CFA 10 (p=0,041) et cette co-amplification a été explorée plus en détail avec des expériences de FISH (cf Article 3). Concernant les paramètres histologiques, l'amplification focale du CFA 30 était associée à un index mitotique élevé (p=0,0039) et à l'absence de pigmentation des cellules tumorales (tumeurs achromiques) (p=0,046). De plus, en analyse univariée, l'amplification focale du CFA 30 était associée à une survie plus courte des animaux (Hazard Ratio (HR): 2,34, p=0,0005), avec une médiane de survie de 159 jours contre 317 jours pour les animaux n'ayant pas cette altération. L'analyse multivariée a montré que la présence de cette altération avait une valeur pronostique péjorative indépendamment d'autres facteurs pronostiques comme la localisation de la tumeur et le degré de pigmentation.

Cette étude a montré que l'amplification focale du CFA 30 était très récurrente dans les MM canins et était associée à des tumeurs plus agressives (index mitotique élevé, tumeurs achromiques, survie plus courte). Comme pour le mélanome cutané humain, les fortes amplifications focales signent un sous-type plus agressif de tumeur dans le MM canin ¹⁹⁰. En revanche, comme dans le MM humain, l'amplification de *CDK4* était fréquente chez le chien mais non corrélée à une durée de survie plus courte ¹⁹³.

Prognostic value of somatic focal amplifications on chromosome 30 in canine oral melanoma

Anais Prouteau¹  | Florian Chocteau² | Clotilde de Brito¹ | Edouard Cadieu¹ | Aline Primot¹ | Nadine Botherel¹ | Frédérique Degorce³ | Laurence Cornevin⁴ | Marie A. Lagadic⁵ | Florian Cabillic⁴ | Pauline de Fornel-Thibaud⁶ | Patrick Devauchelle⁶ | Thomas Derrien¹ | Jerome Abadie² | Catherine André¹ | Benoît Hédan¹

¹CNRS-University of Rennes 1, UMR6290, Institute of Genetics and Development of Rennes, Faculty of Medicine, Rennes, France
²Oniris, Laboniris – Department of Biology, Pathology and Food Sciences, Nantes, France
³LAPVSO Veterinary Pathology laboratory – Toulouse, Toulouse, France
⁴Department of Cytogenetics and Cell Biology, Hospital of Rennes, INSERM, University of Rennes, INRA, Institut NuMeCan (Nutrition, Metabolisms and Cancer), Rennes, France
⁵Idexx Veterinary Pathology laboratory, Saint-Denis, France
⁶Micen Vet, Créteil, France

Correspondence

Catherine André, CNRS-University of Rennes 1, UMR6290, Institute of Genetics and Development of Rennes, Faculty of Medicine, SFR Biosit, Rennes, France.
Email: catherine.andre@univ-rennes1.fr
Benoît Hédan, CNRS-University of Rennes 1, UMR6290, Institute of Genetics and Development of Rennes, Faculty of Medicine, SFR Biosit, Rennes, France.
Email: benoit.hedan@univ-rennes1.fr

Funding information

Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Number: 11-INBS-0003; FHU CAMIn, Grant/Award Number: 2018-2020 of the University of Rennes 1 France; Institut National Du Cancer, Grant/Award Number: TS-2012-08

Abstract

Canine oral melanoma is the first malignancy of the oral cavity in dogs and is characterized by a local invasiveness and a high metastatic propensity. A better knowledge of genetic alterations is expected to improve management of this tumour. Copy number alterations are known characteristics of mucosal melanomas both in dogs and humans. The goal of this study was to explore the prognostic value of somatic focal amplifications on chromosomes (*Canis Familiaris* [CFA]) 10 and 30 in canine oral melanoma. The cohort included 73 dogs with oral melanoma confirmed by histology, removed surgically without adjuvant therapy and with a minimal follow-up of 6 months. Epidemiological, clinical and histological data were collected and quantitative-PCR were performed on formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples to identify specific focal amplifications. The 73 dogs included in the study had a median survival time of 220 days. Focal amplifications on CFA 10 and 30 were recurrent (49.3% and 50.7% of cases, respectively) and CFA 30 amplification was significantly associated with the amelanotic phenotype ($P = .046$) and high mitotic index (MI; $P = .0039$). CFA 30 amplification was also linked to poor prognosis ($P = .0005$). Other negative prognostic factors included gingiva location ($P = .003$), lymphadenomegaly ($P = .026$), tumour ulceration at diagnosis ($P = .003$), MI superior to 6 mitoses over 10 fields ($P = .001$) and amelanotic tumour ($P = .029$). In multivariate analyses using Cox proportional hazards regression, CFA 30 amplification (Hazard ratio [HR] = 2.08; $P = .011$), tumour location (HR = 2.20; $P = .005$) and histological pigmentation (HR = 1.87; $P = .036$) were significantly associated with shorter survival time. Focal amplification of CFA 30 is linked to an aggressive subset and constitutes a new prognostic factor.

KEYWORDS

chromosome 30, dog, focal amplification, oral melanoma, prognosis

Anais Prouteau and Florian Chocteau should be considered joint first authors.

1 | INTRODUCTION

Malignant melanoma is a relatively common tumour in dogs and is the first oral malignancy, accounting for 14.4% to 45.5% of oral tumours.^{1,2} It arises in individuals older than 10 years^{3,4} and some breeds are over-represented in several studies including breeds such as cocker spaniel, golden and Labrador Retrievers, Scottish terrier, poodle, dachshund, chow-chow and Boston terrier.³⁻⁷ Oral malignant melanoma (OMM) is an aggressive tumour type with a rapid growth and local invasiveness. The metastatic propensity is high with invasion of regional lymph nodes, lung and abdominal organs, with reported metastatic rates between 59-74% and 17-51% for lymph node^{8,9} and lungs,^{2,6,10} respectively. The prognosis of affected dogs is often poor and survival time after surgery varies from 3 to 24 months, in particular depending on the clinical stage at diagnosis.⁴

The first line treatment is wide surgical resection of the primary tumour sometimes associated with radiation therapy. Aggressive surgical excision with at least 1-cm-margins or hemimaxillectomy/mandibulectomy (if necessary) result in survival times between 7 and 10 months, but recurrence rate is still high (between 22% and 48%).^{2,11,12} Radiation therapy can also be a primary treatment when surgery is not feasible, and can induce partial or complete clinical response in 82% to 94.4% of cases.^{4,6,13} Canine melanoma is a chemoresistant tumour and adjuvant chemotherapy using mostly platinum agents failed to show any clinical benefits.^{4,5,14,15} In the last decade, the development of a xenogeneic melanoma DNA vaccine has shown some promising results in terms of safety, clinical response and survival, but needs further investigations with randomized controlled trials.¹⁶⁻²⁰ Effective systemic therapies, including targeted therapies and immunotherapy are strongly needed to treat this cancer.

The knowledge of somatic genetic alterations is crucial to better understand tumour biology and to identify valuable therapeutic targets. Canine OMM genetics is characterized by an abundance of chromosome or chromosomal regions gains or losses, also called copy number alterations (CNAs).²¹⁻²³ These alterations include whole chromosome gains of the *Canis Familiaris* (CFA) 13, 17, 20, 29, 36, losses of CFA 2, 22, 27, as well as focal losses and gains on CFA 10, encompassing *MDM2* and *CDK4*, and on CFA 30.²¹⁻²³ Particularly, the focal amplification of a 600 kb region (16.1-16.7 Mb canFam3) of CFA 30 has been found to be highly recurrent in canine OMM.^{22,24} Single nucleotide variations (SNVs) have also been recently identified in some genes such as *NRAS*, *TP53*, *PTEN*, *KIT* and *PTPRJ*, but were absent in *BRAF* gene, which is concordant with the non-UV aetiology of this cancer.^{7,21-28}

The objective of this study was to evaluate the frequency of CFA 10 and CFA 30 focal amplifications in a cohort of dogs with OMM, to define if these alterations were associated to clinical or histopathological features and to investigate their potential prognostic significance.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Cases selection

Cases recruitment was performed thanks to Cani-DNA biological resource centre and three French veterinary histopathology laboratories,

and included dogs with OMM removed surgically and diagnosed between June 2008 and January 2015. A questionnaire was sent to referring veterinarians to gather epidemiological and survival data such as age at diagnosis, sex, breed, tumour characteristics (size, pigmentation, ulceration, location), regional lymphadenomegaly at diagnosis, surgical characteristics (type of surgery and macroscopic evaluation of margins status) and follow-up (development of metastasis, tumour recurrence, date and cause of death). We excluded dogs that had other malignancies, received an adjuvant treatment to surgery and dogs with a follow-up of less than 6 months. The measured outcome was melanoma related death to get the specific survival time (SST).

2.2 | Histological data

After surgical removal, melanomas were fixed in formalin 10% and embedded in paraffin (FFPE). Histological examination was performed on 3- μ m-thick haematoxylin-eosin-saffron (HES) stained sections by a board-certified pathologist. For each case, evaluation included architectural features (nests, sheets, bundles, mixed architecture), percentage of necrosis, lymphocytic infiltration, ulceration, pathological margin status, lymphovascular invasion and junctional activity (nest of tumoral cells within the epithelium). Cellular tumoral morphology was also specified with shape (epithelioid, spindle cell, mixed), pigmentation, size, degree of nuclear atypia (% of cells presenting atypias) and mitotic index (MI; number of mitotic figures by 10 most proliferative high-power fields [x400, diameter of the field of view 0.55 mm]). Prognostic metrics were evaluated in relation with specificity, sensitivity, positive and negative predictive value in terms of 6-month survival rate.²⁹

2.3 | Genetic study

For DNA isolation, ten 6- μ m-thick sections were cut from each FFPE tissue and were collected in DNase-free sterile microcentrifuge tubes. Genomic DNA was extracted using a FFPE Tissue DNA Kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's protocol. The quality and the quantity of the isolated DNA were determined using our routine laboratory protocols (dosage with Nanodrop).

Quantitative-PCR (q-PCR) was performed to detect focal amplifications on CFA 10 and CFA 30. We used primer pairs targeting two genes on CFA 10 (*MDM2* and *CDK4*) and two distinct regions on CFA 30: a recurrent lost region, and the recurrent 600 kb amplified region as previously shown,²¹⁻²⁴ by targeting *BUB-1* (7.3 Mb) and *TRPM7* (16.5 Mb), respectively, since they are strong candidate driver genes in these regions²¹⁻²⁴ (Table 1). A primer pair targeting a region of CFA 9 was used as internal control as it was shown to have the higher stability of copy number in previous data,^{23,24} and each experiment was carried out with DNA of an unaffected dog as an external control. q-PCR was performed on tumour DNA samples after pre-amplification with the SYBR green PCR master mix (Thermo Fisher Scientific) on a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using standard procedures. Each sample was measured in triplicate, and relative amounts of the sequence were determined using the $\Delta\Delta$ Ct method

TABLE 1 Characteristics of the primers used for CNA detection on CFA 10 and CFA 30

Targeted region on the canine genome	Forward/reverse	Primer sequence	Primer size (pb)	Amplicon size (pb)
CFA 9: 43651120-43 730 748 (Control)	F	GCCCAACTCACTGGACTTTG	20	95
	R	CAACTCCATCTGGGAGCATT	20	
CFA 10: 10936607-10 962 527 (<i>MDM2</i> gene)	F	TTGGAGTGCCAAGCTTCTCT	20	73
	R	CCCAGCTGGCTTTTACAAC	20	
CFA 10: 1814134-1 814 208 (<i>CDK4</i> gene)	F	GATACAGCCGACACTCCACA	20	73
	R	TGGTATCGTGCTCCAGAAGTT	21	
CFA 30:16466910-16 556 480	F	TGGTATAATCCTCACATTACCTGTGT	26	63
	R	GTTACAACCGGAGCCTGGAT	20	
CFA 30: 7361964-7 425 992	F	GTCCACACTTCAGGGAGCAT	20	98
	R	ACAGGTTGACATCCCACCAT	20	

(relative amount of target = $2^{-\Delta\Delta C_t}$). A gene was considered amplified in the tumour when it was present five times more than in the control sample. This threshold was chosen with the aim to detect high number of amplifications, and after performing q-PCR with the same probes on healthy oral mucosa FFPE samples.

In order to confirm the q-PCR results, fluorescence in situ hybridization (FISH) was performed on 4 μ m sections of FFPE tissue blocs using 199H02 and 1E17 BAC (bacterial artificial chromosome) clones ordered at <http://bacpacresources.org/library.php?id=253>. BAC 199H02 overlapped *MDM2* and BAC 1E17 overlapped CFA 30:16.5 Mb region. These BAC clones were labelled with green-dUTP (Abbott Molecular) and Cy3-dCTP (Amersham Biosciences) respectively. Slides were analysed by an experienced cytogeneticist (FC), using a fluorescence microscope (Axioskop2, Axio Imager Z2, Zeiss, Göttingen, Germany) and Isis imaging software (Metasystems, Altlußheim, Germany). At least 100 non-overlapping tumour nuclei were examined for each case.

2.4 | Statistical analyses

The R statistical software (R Core Team 2018, <https://www.R-project.org/>) was used for statistical analyses. Continuous variables were expressed as median [range], mean \pm SD. Correlations between categorical variables were analysed using the Pearson χ^2 test or Fisher exact test. Correlations between categorical and numerical variables were analysed using Student's *t*-test. SST was defined as the time between histopathological diagnosis and death attributable to melanoma. Dogs that were lost to follow-up or that have died because of unrelated cause were censored. The Kaplan-Meier method and log-rank tests were used for univariate survival analyses, and Cox proportional hazards models for multivariate survival analyses, whose results are reported using the hazard ratio (HR), its confidence interval (95%-CI), and the *P*-value of each covariate. The statistical evaluation of the prognostic value of a factor was based on the following strategy: all the factors (clinical, histological and genetic) were tested by an univariate analysis to test its significance in terms of specific survival. Then all the prognostic factors which were significant in univariate analysis were tested using bivariate models with the variable « CFA

30 amplification ». This allowed us to test if the « CFA 30 amplification » prognostic value was complementary to the other variables. We then determined the best multivariate models in terms of AIC including significant variables using a stepwise selection (glmulti function of R glmulti library).

3 | RESULTS

The characteristics of the cohort are summarized in Table 2 and in Table S1.

3.1 | Descriptive analysis

The cohort comprised 73 dogs diagnosed with oral melanoma, including 18 spayed females (24.7%), 18 intact females (24.7%), 1 spayed male (1.4%) and 36 intact males (49.3%). The mean age at diagnosis was 12.2 ± 1.9 years [range (7.5-17.2), median 12.3 years]. The most common breeds were poodle (19.2%), golden retriever (9.6%), Labrador retriever (8.2%) and Brie shepherd (5.5%). In most cases, melanoma developed on the oral mucosa of the lips or cheeks (47.8%) then on the gingiva (40.6%), and other sites including the tongue (7.2%), the pharynx (1.4%) and the hard palate (1.4%). Tumour size was superior to 3 cm at time of diagnosis for 30 dogs (45.5%) and 34 tumours were ulcerated (46.6%). The most common clinical sign was dysorexia (16%), and 21.7% of dogs showed lymphadenomegaly of draining lymph nodes by palpation. Macroscopic surgical margin status was available for 46 dogs (63%) and 14 of these (30.4%) did not show tumour infiltration.

Tumour recurrence on the primary site was observed in 40 dogs (54.8%) after surgery, and pulmonary metastases were diagnosed by radiography in 10 dogs during follow-up (13.7%).

Regarding histopathology, the predominant tumour architecture were sheets on 28 tumours (38.4%) and bundles on 22 tumours (36%) whereas only 7 tumours (9.6%) showed nest organization (Figure 1). Lymphocytic infiltration was marked in 22 tumours (30.2%) and mucosal ulceration was present in 59 tumours (80.8%). Visible tumour

TABLE 2 Main descriptive features of the cohort (n = 73)

	Total	CFA 30 amplification	P-value
Age at diagnosis (years)	12.2 ± 2.0	12.5 ± 1.8	.09 ^a
Sex			.57 ^b
Female	36/73 (49%)	20/36 (56%)	
Male	37/73 (51%)	16/37 (44%)	
Breed			.40 ^c
Poodles	14/73 (19%)	8/14 (57%)	
Golden retriever	7/73 (10%)	3/7 (43%)	
Other	52/73 (71%)	26/52 (50%)	
Location			.014 ^{c,*}
Lips/cheeks	33/69 (48%)	11/33 (33%)	
Gingiva	28/69 (41%)	18/28 (64%)	
Other	8/69 (11%)	4/8 (50%)	
Tumour size			.15 ^b
≥ 3 cm	30/66 (45%)	18/30 (60%)	
< 3 cm	36/66 (55%)	14/36 (39%)	
Margins status			.73 ^b
Complete removal	32/58 (55%)	15/32 (47%)	
Incomplete removal	26/58 (45%)	17/26 (65%)	
Recurrence			.56 ^b
Yes	40/73 (55%)	22/40 (55%)	
No	33/73 (45%)	15/33 (45%)	
Metastasis			.69 ^c
Yes	10/73 (14%)	4/10 (40%)	
No	63/73 (86%)	33/63 (60%)	
Tumour architecture			.80 ^c
Sheets	28/73 (38%)	13/28 (46%)	
Bundles	27/73 (37%)	15/27 (56%)	
Nests	7/73 (10%)	5/7 (71%)	
Mixt	11/73 (15%)	4/11 (36%)	
Junctional activity			.49 ^b
Yes	36/66 (55%)	18/36 (50%)	
No	30/66 (45%)	14/30 (47%)	
Pigmentation cell			.0461 ^{b,*}
Yes	52/73 (71%)	22/52 (42%)	
No	21/73 (29%)	15/21 (71%)	
Mitotic index			.0039 ^{b,*}
> 6 mitoses over 10 HPF	51/73 (70%)	32/51 (63%)	
≤ 6 mitoses over 10 HPF	22/73 (30%)	5/22 (23%)	

^aStudent's t-test.^bPearson χ^2 test.^cFisher exact test.

Note: *p-value <.05 was considered significant.

Abbreviation: HPF, high power fields.

emboli were found in 5 melanomas (6.8%) and junctional activity was observed in 36 tumours (49.3%). Concerning cell morphology, 40 melanomas (54.8%) showed mainly an epithelioid shape, 26 cases (35.6%) a mainly spindle shape and 7 cases (9.6%) had a mixed morphology.

Fifty-nine tumours (80.6%) were mainly composed of large cells with a diameter higher than 20 μm , 21 (28.8%) were characterized by the absence of melanin pigments in the cytoplasm (amelanotic melanomas) and 57 (78.1%) showed nuclear atypia on more than 40% of

tumour cells. The mean MI was 17 ± 17 mitoses over 10 high-power fields (HPFs; range [1-80], median 10 mitoses) and the threshold of 6 mitoses over 10 HPF had the best predictive value in terms of 6 months survival probability (Table 3). Fifty-one dogs (69.9%) had tumour with a MI higher than this threshold. Amelanotic melanomas were associated with a MI higher than 6 over 10 HPF compared with tumours with melanic pigments in the cytoplasm ($P = .0065$). Histopathological evaluation of surgical margins was available for 46 dogs, and 30/46 dogs had infiltrated margins. OMM located on the gingiva were associated with an incomplete resection of the tumour ($P = .035$).

Regarding CNA detected through q-PCR, the CFA 10 or CFA 30 analysed regions were amplified in 52/73 tumours (72%). Regarding CFA 10, the *MDM2* gene was amplified in 36/73 dogs (49.3%), and *CDK4* was amplified in 30/73 dogs (41.1%). Although *MDM2* and *CDK4* are not so close along the CFA 10 (spaced 9 Mb apart), their amplification was often associated ($P = .0002$).

Focal amplification on CFA 30 was detected in 50.7% of cases. Interestingly, amplifications were always detected with the same probe (16.5 Mb), whereas the region targeted by the second probe (7.3 Mb) was never amplified (Table S1). This finding is concordant with the fact that this last region is recurrently found lost²¹⁻²⁴ alongside with the focal gain of CFA 30:16.5 Mb, and with the fact that the amplification involves a focal region and not the whole chromosome. Moreover, there was an enrichment of cases presenting the amplification of *CDK4* gene when these cases also had amplification of CFA 30:16.5 Mb ($P = .041$), and 27.4% of dogs had both alterations. Melanomas with a focal amplification on CFA 30 showed higher MI ($P = .0039$) and were significantly associated to achromia ($P = .0461$). To support the q-PCR results, FISH was performed on 12 cases (3 cases with no amplifications, 3 cases with only *MDM2* amplification,

TABLE 3 Characteristics of thresholds for mitotic index (MI) in terms of 6-month survival rate

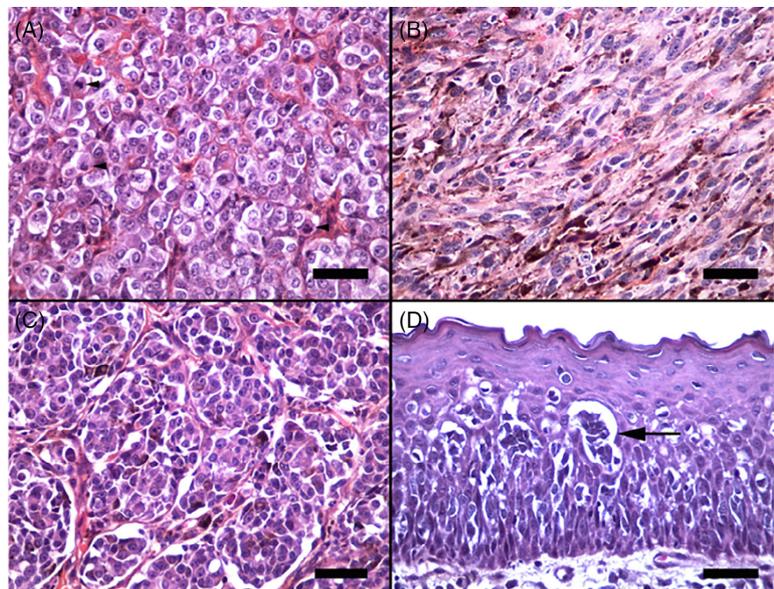
Performance metrics	MI > 6 mitoses	MI > 4 mitoses
Sensitivity	80.0%	83.3%
Specificity	37.2%	27.9%
Positive predictive value	47.1%	44.6%
Negative predictive value	72.7%	70.6%
Overall correct classification	54.8%	50.7%

3 cases with only CFA 30:16.5 Mb amplification and 3 cases with both *MDM2* and CFA 30 amplifications). Over the 24 FISH experiments performed (12 cases \times 2 regions), only 2 had discordant results between q-PCR and FISH. With a P -value of .0001 (Fisher exact test), we concluded that the FISH results validated the q-PCR results (Table 2, Figure 2).

3.2 | Survival analysis

The median time to death attributable to melanoma was 220 days [range (14-1147)] and the mean time to death was 236 days \pm 201 days. By univariate analysis (Figure 3), reduced SST was observed for dogs with gingival melanoma (median survival time-MST = 169 days for gingiva location vs 309 for other locations, HR = 2.05; $P = .0033$), with macroscopic ulceration (HR = 2.06; $P = .0033$) and with locoregional lymphadenomegaly (HR = 1.89; $P = .0259$). Regarding histological criteria, the two main prognostic parameters were the pigmentation and the MI. Dogs with an amelanotic melanoma had a significantly reduced survival time compared with others (HR = 1.80; $P = .0296$), and dogs with a MI > 6 mitosis figures over 10 HPF had

FIGURE 1 Light microscopic images of canine oral melanomas. haematoxylin-eosin-saffron. Objective $\times 40$. Bar = 100 μ m. A, Non-pigmented large epithelioid cells organized in sheets with numerous mitoses (arrowheads). B, Pigmented spindle cells organized in bundles. C, Pigmented large epithelioid cells organized in nests. D, Mucosal epithelium showing junctional activity (arrow)



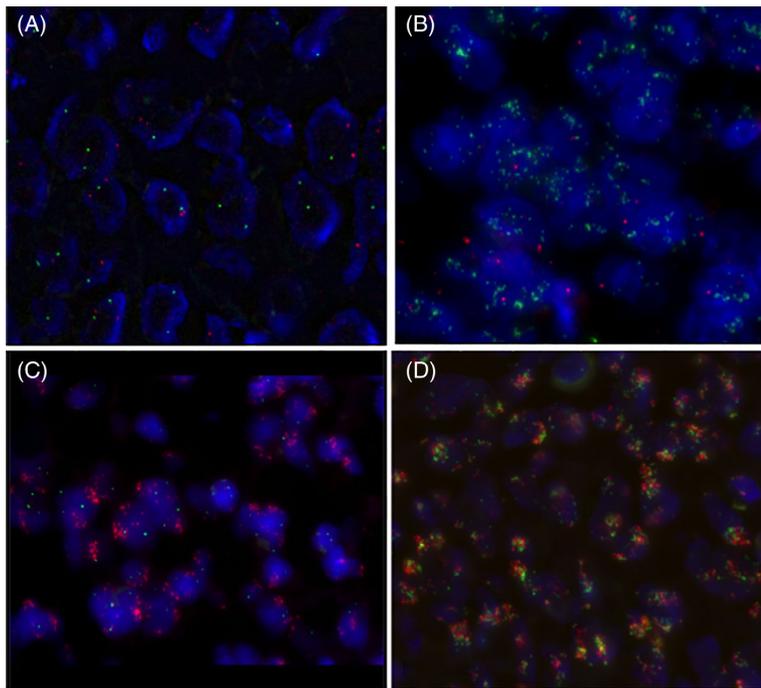


FIGURE 2 Light microscopic image of FISH on 4 canine oral melanomas $\times 1000$. Green (dUTP) probe targets MDM2 region on CFA 10 and red (Cy3-dCTP) probe targets CFA 30:16.5 Mb. A, Canine oral melanoma case with normal copy numbers of MDM2 (CFA 10) and CFA 30:16.5 Mb. B, Canine oral melanoma case with MDM2 (CFA 10) amplification and normal copy number of CFA 30:16.5 Mb. C, Canine oral melanoma case with CFA 30:16.5 Mb amplification and normal copy number of MDM2 (CFA 10). D, Canine oral melanoma case with MDM2 (CFA 10) and CFA 30:16.5 Mb amplification

also a poorer outcome (HR = 2.49; $P = .0011$). Concerning genetic features, the amplification detected on CFA 30:16.5 Mb in the tumour was associated with reduced SST (MST = 159 days for dogs with the amplification vs 317 days for dogs without the amplification, HR = 2.34; $P = .0005$). However, the analysed somatic alterations on CFA 10 were not linked to prognosis in this cohort.

In bivariate analysis, Cox proportional hazards models showed that the amplification of CFA 30:16.5 Mb was still a significant prognostic factor in association with other variables that were significant in univariate analysis, particularly with MI, a well-known and used prognostic parameter (Table 4, model 1). These results strongly suggest that CFA 30:16.5 Mb amplification is a novel prognostic factor that brings information complementary to known prognostic factors in canine oral melanoma.

On this cohort, the best predictive models are presented in Table 4 (models 2 and 3). The first one is a bivariate model containing tumour location and the MI (HR: 2.67; $P = .00045$ and HR: 3.16; $P = .00088$, respectively). The second one is a trivariate model including the focal amplification on CFA 30:16.5 Mb (HR = 2.08; $P = .011$), pigmentation (HR = 1.87; $P = .036$) and tumour location (HR = 2.20; $P = .005$), with a reduced SST for dogs carrying the amplification, amelanotic and gingival tumour.

4 | DISCUSSION

The epidemiological characteristics of our cohort of 73 dogs are similar to data presented in other studies about canine OMM, with a mean

age at diagnosis of 12.2 years.^{1,3,7,30} Our study also confirms the over-representation of particular breeds like poodle, Labrador and golden Retriever. The median survival time of the whole cohort is comparable to those described in the literature, ranging from 3 months to 24 months depending on disease stage and treatment.^{2,10,13-16,19,31-33} Recently, Sarowitz et al specified a median SST of 206 days for dogs with OMM treated by surgery as a unique treatment, very similar to the MST of 220 days described here.⁹

In our study, the first anatomic location of the tumour is the labial and buccal mucosae whereas most studies showed higher prevalence of gingival melanocytic tumours.^{9,29} Moreover, gingival location appears as a significant negative prognostic parameter in univariate and multivariate analyses in our results. This can be explained by the difficulty to perform a complete surgical removal of the tumour because of the proximity of bone and tooth. Indeed, there was a significant positive correlation between gingival tumour location and incomplete resection. To avoid this, many authors recommend performing wide complete resection with partial mandibulectomy/maxillectomy when needed.^{2,10-12} To our knowledge, no study confirmed this poor outcome of dogs with gingival melanomas but a significant difference was established between tumour in rostral and caudal parts of the oral cavity, showing a better prognosis for dogs with rostral melanomas because of earlier detection.⁶ It should be noted that higher prevalence of labial and buccal mucosae melanomas in this cohort could have influenced other variables such as median survival time, MI and CNAs rate, even if the two last parameters are not associated with tumour location. Nevertheless, bivariate and trivariate models showed that

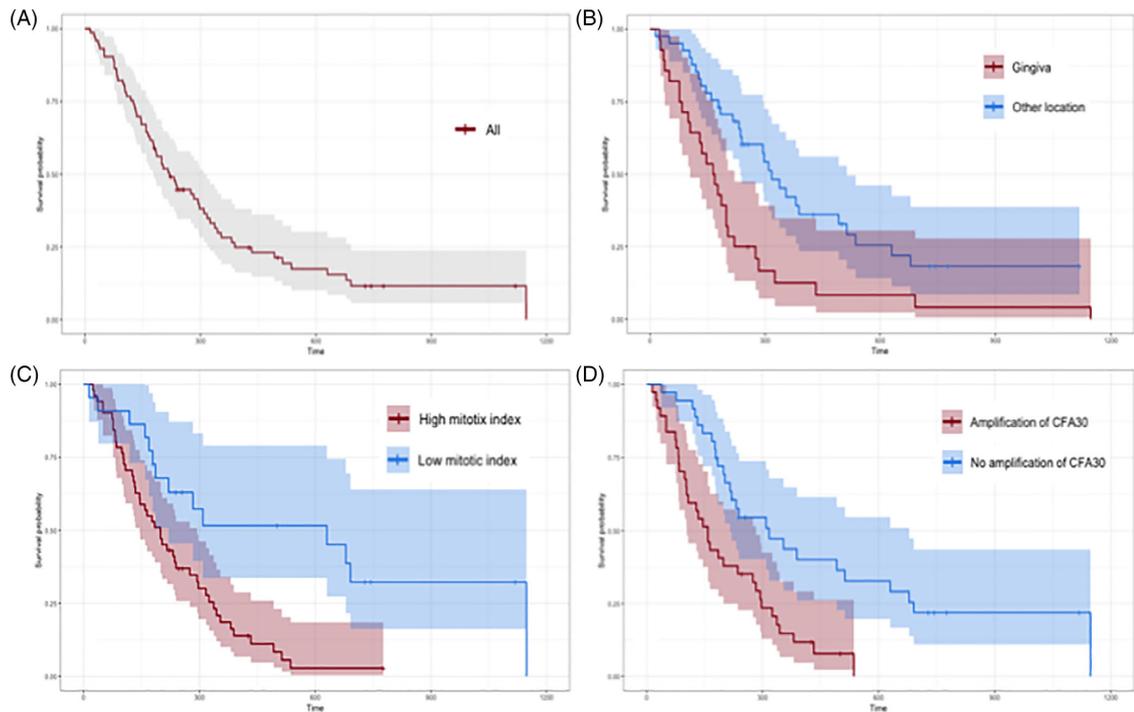


FIGURE 3 Cancer-specific survival times in dogs with oral melanoma. A, Cancer-specific survival of all dogs of the cohort with a median survival time of 220 days. B, Dogs with gingival melanoma displayed significantly shorter survival (HR = 2.05 [1.17-3.60], Log-rank test, $P = .0033$, Kaplan-Meier curves) than dogs with melanoma in other locations. C, Dogs with high mitotic melanoma (cut-off of 6) displayed significantly shorter survival (HR = 2.49 [1.49-4.14], Log-rank test, $P = .0011$, Kaplan-Meier curves) than dogs with low mitotic melanoma. D, Dogs with amplification on CFA 30 displayed significantly shorter survival (HR = 2.34 [1.38-3.96], Log-rank test, $P = .0005$, Kaplan-Meier curves) than dogs without

TABLE 4 Multivariate Cox models with variables identified to have significant association with survival time after surgical resection of oral melanoma in 73 dogs

	HR	Lower 95%	Upper 95%	P-value
<i>Model 1</i>				
CFA 30 amplification in the tumour vs no CFA 30 amplification	1.98	1.12	3.52	.019
MI > 6 vs MI ≤ 6	2.23	1.12	4.47	.023
<i>Model 2</i>				
Gingival tumour vs other location	2.67	1.54	4.63	.00045
MI > 6 vs MI ≤ 6	3.16	1.60	6.22	.00088
<i>Model 3</i>				
CFA 30 amplification in the tumour vs no CFA 30 amplification	2.09	1.18	3.68	.011
Amelanotic tumour vs pigmented tumour	1.88	1.04	3.37	.036
Gingival tumour vs other location	2.20	1.27	3.82	.005

Abbreviations: CFA, canine chromosome; HR, hazard ratio; MI, mitotic index.

CFA 30:16.5 Mb amplification has a prognostic value complementary to tumour anatomical location.

In the present study, locoregional lymphadenomegaly constitutes a significant negative prognostic factor. This is in agreement with previous studies which assessed the prognostic value of clinical staging

including lymph node infiltration.^{11,31} However, in the absence of systematic microscopic evaluation, the increased size of the lymph nodes may not reflect a true tumour infiltration but may correspond to reactive hyperplasia because of tumour ulceration or periodontal disease. This is confirmed with a recent study that compared lymph nodes

evaluation in case of melanocytic tumour by palpation, cytology and histology with a high percentage of false positive and negative results.⁴⁰

After clinical staging and complete surgical excision, a histological analysis is recommended to confirm the malignancy of melanocytic tumour and to precise prognostic histological factors. Among these markers, our study shows that MI is an objective parameter with a strong prognostic value both in univariate and multivariate analysis. These findings highlight the poor outcome of dogs with higher MI, confirming previous results.^{29,34} Bergin et al, in 2011, thus suggested thus a threshold of 4 mitoses over 10 HPF predicting a pejorative outcome; however, in their study, the cohort included dogs with melanocytic tumours (comprising oral melanocytomas) and this threshold helps more to differentiate malignant from benign tumours. In our cohort, we excluded melanocytomas and proposed the cut-off of 6 mitoses over 10 HPF because it showed better sensitivity and specificity than the cut-off of 4 mitoses in terms of 6-month survival rate.

Another prognostic factor in our cohort is the degree of pigmentation of the tumour, with amelanotic melanomas (absence of cytoplasmic pigment in all tumour cells) showing a poorer prognosis. This result confirms those of Bergin et al who showed that high pigmentation (more than 50% of tumour cells with pigments) is correlated with a better outcome compared with other categories (0%, 1-10% and 11-50% tumours cells with pigments). However, they did not find any significant correlation between survival and achromia.³⁴

In the last decade, it has been suggested that canine cancers can constitute relevant spontaneous models for their human counterparts and that comparative oncology approaches may be valuable for human.³⁵⁻³⁷ In particular, canine oral melanomas share many similar features with human mucosal melanomas, considering epidemiology, clinical behaviour and pathology.^{7,27,38-40} The need to better understand the underlying genetic characteristics of this rare and devastating human cancer has led to the emergence of comparative genetic studies. As human mucosal melanomas, canine OMM harbour extensive somatic CNAs and structural variants, and the genetic features of these tumours have been highly studied these years.²¹⁻²⁴ In both species, the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathways are frequently activated.^{22,41} Other common genetic features include the mutational landscape of human and canine mucosal melanoma, with mutations on the RAS family members genes, TP53 gene and the absence of BRAF mutation.^{21,23,25,27} In the present study, we only focused on focal amplifications on CFA 10 and CFA 30, and found that these alterations were highly recurrent in canine OMM, with 72% of dogs having at least one of these. Although we did not evaluate the whole CFA 10 and 30 chromosomes, previous studies described those amplifications as focal.²¹⁻²³ Moreover, the high copy numbers observed in our cohort as well as the fact that the CFA 30:7.3 Mb region was never found amplified are in favour of focal amplifications. As it was suggested by Hendricks et al, this could be the results of telomere crisis or chromothripsis, in which one or a few chromosomes are shattered into tens to hundreds of pieces and reassembled incorrectly with the

consequence of defined copy number changes.²¹ Such events have been associated to poor prognosis in human cutaneous melanoma.⁴² We found here that focal amplification on CFA 30:16.5 Mb is associated with an aggressive behaviour of canine OMM (higher MI and an amelanotic phenotype) and is linked to a poor outcome. In our study, bivariate analyses showed that this amplification is an informative prognostic factor complementary to other known factors and is partly responsible for canine oral melanoma aggressiveness. Nevertheless, taking into account the MI and the tumour location, the CFA 30 amplification was not any more significant, probably because of its strong association with the MI. Indeed, genes lying on this recurrent amplified region probably bring an advantage for the proliferation and progression of the tumour, such as TRPM7 involved in the MAPK pathway.^{21,43-45} Focal amplifications along CFA 10 were often found in two distinct regions covering the targeted genes MDM2 and the cycline-dependent-kinase CDK4, and this association was demonstrated in a previous study.²¹ Both are known oncogenes that could constitute therapeutic targets. CDK4 is involved in the early phase of the cell cycle, and is frequently amplified in human oral melanoma.⁴⁶ MDM2 is able to block the tumour suppressor P53 and promotes its degradation, and its gene is also focally amplified in human mucosal melanomas.²³ Our results confirm those of Poorman et al, who studied the genetics of 44 canine OMM, 5 cutaneous melanomas and 18 melanocytomas, and found that molecular aberrations correlated with cell phenotype and histology. Particularly, malignant melanomas that clustered with melanocytomas according to their copy number profile had a higher pigmentation level and a lower MI.²² It has to be noted that canine OMM carries a lot of other alterations, other than those studied here, that can be important for tumour initiation and progression. For example, the recurrent lost region on the CFA 30 described by Wong et al is located at 2 to 12 Mb and contains our targeted gene BUB1 (7.3 Mb), as well as KNSTRN and B2M. Those genes are involved in chromosome segregation and immune evasion.²³ This region also contains the mucosal melanoma driver gene SPRED1.²³ Moreover, this deletion has been recently identified in the orthologous chromosomal region in human mucosal melanomas, reinforcing the interest of the dog model in comparative oncology studies.²³

5 | CONCLUSION

This study highlights the presence, in canine OMM, of a highly recurrent focal amplification on CFA 30 that is associated to a poor outcome and to pejorative factors such as a high MI and an amelanotic phenotype. To our knowledge, this is the first time that genetic features of canine oral melanoma are confronted to clinical and histopathological data, providing a significant prognostic marker in this canine cancer. Further prospective studies are warranted to confirm these results and to determine if this chromosomal region indeed contains interesting genes that could be further used as therapeutic targets both in dogs and humans.

CONFLICT OF INTEREST

No conflict of interest to declare.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The table containing epidemiological, histopathological, genetic and survival information is available on request.

ORCID

Anais Prouteau  <https://orcid.org/0000-0001-6735-7774>

REFERENCES

- Nishiya AT, Massoco CO, Felizzola CR, et al. Comparative aspects of canine melanoma. *Vet Sci.* 2016;3(1):E7. <https://doi.org/10.3390/vetsci3010007>.
- Sarowitz BN, Davis GJ, Kim S. Outcome and prognostic factors following curative-intent surgery for oral tumours in dogs: 234 cases (2004 to 2014). *J Small Anim Pract.* 2017;58(3):146-153. <https://doi.org/10.1111/jsap.12624>.
- Ramos-Vara JA, Beissenherz ME, Miller MA, et al. Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. *Vet Pathol.* 2000;37(6):597-608. <https://doi.org/10.1354/vp.37-6-597>.
- Withrow SJ, Vail DM, Page RL, eds. *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 5th ed. St. Louis, MO: Elsevier; 2013.
- Murphy S, Hayes AM, Blackwood L, Maglennon G, Pattinson H, Sparkes AH. Oral malignant melanoma - the effect of coarse fractionation radiotherapy alone or with adjuvant carboplatin therapy. *Vet Comp Oncol.* 2005;3(4):222-229. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5810.2005.00082.x>.
- Proulx DR, Ruslander DM, Dodge RK, et al. A retrospective analysis of 140 dogs with oral melanoma treated with external beam radiation. *Vet Radiol Ultrasound.* 2003;44(3):352-359.
- Gillard M, Cadieu E, De Brito C, 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. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12170>.
- Bostock DE. Prognosis after surgical excision of canine melanomas. *Vet Pathol.* 1979;16(1):32-40. <https://doi.org/10.1117/030098587901600103>.
- Todoroff RJ, Brodey RS. Oral and pharyngeal neoplasia in the dog: a retrospective survey of 361 cases. *J Am Vet Med Assoc.* 1979;175(6):567-571.
- Tuohy JL, Selmic LE, Worley DR, Ehrhart NP, Withrow SJ. Outcome following curative-intent surgery for oral melanoma in dogs: 70 cases (1998-2011). *J Am Vet Med Assoc.* 2014;245(11):1266-1273. <https://doi.org/10.2460/javma.245.11.1266>.
- Wallace J, Matthiesen DT, Patnaik AK. Hemimaxillectomy for the treatment of oral tumors in 69 dogs. *Vet Surg.* 1992;21(5):337-341.
- Kosovsky JK, Matthiesen DT, Marretta SM, Patnaik AK. Results of partial mandibulectomy for the treatment of oral tumors in 142 dogs. *Vet Surg.* 1991;20(6):397-401. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.1991.tb00346.x>.
- Freeman KP, Hahn KA, Harris FD, King GK. Treatment of dogs with oral melanoma by hypofractionated radiation therapy and platinum-based chemotherapy (1987-1997). *J Vet Intern Med.* 2003;17(1):96-101.
- Brockley LK, Cooper MA, Bennett PF. Malignant melanoma in 63 dogs (2001-2011): the effect of carboplatin chemotherapy on survival. *N Z Vet J.* 2013;61(1):25-31. <https://doi.org/10.1080/00480169.2012.699433>.
- Boston SE, Lu X, Culp WTN, et al. Efficacy of systemic adjuvant therapies administered to dogs after excision of oral malignant melanomas: 151 cases (2001-2012). *J Am Vet Med Assoc.* 2014;245(4):401-407. <https://doi.org/10.2460/javma.245.4.401>.
- Grosenbaugh DA, Leard AT, Bergman PJ, et al. Safety and efficacy of a xenogeneic DNA vaccine encoding for human tyrosinase as adjunctive treatment for oral malignant melanoma in dogs following surgical excision of the primary tumor. *Am J Vet Res.* 2011;72(12):1631-1638. <https://doi.org/10.2460/ajvr.72.12.1631>.
- Ottod JM, Smedley RC, Walshaw R, Hauptman JG, Kiupel M, Obradovich JE. A retrospective analysis of the efficacy of Oncept vaccine for the adjunct treatment of canine oral malignant melanoma. *Vet Comp Oncol.* 2013;11(3):219-229. <https://doi.org/10.1111/vco.12057>.
- Treggiari E, Grant JP, North SM. A retrospective review of outcome and survival following surgery and adjuvant xenogeneic DNA vaccination in 32 dogs with oral malignant melanoma. *J Vet Med Sci.* 2016;78(5):845-850. <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0510>.
- Verganti S, Berlato D, Blackwood L, et al. Use of Oncept melanoma vaccine in 69 canine oral malignant melanomas in the UK. *J Small Anim Pract.* 2017;58(1):10-16. <https://doi.org/10.1111/jsap.12613>.
- McLean JL, Lobetti RG. Use of the melanoma vaccine in 38 dogs: the south African experience. *J S Afr Vet Assoc.* 2015;86(1):1246. <https://doi.org/10.4102/jsava.v86i1.1246>.
- Hendricks WPD, Zismann V, Sivaprakasam K, et al. Somatic inactivating PTPRJ mutations and dysregulated pathways identified in canine malignant melanoma by integrated comparative genomic analysis. *PLoS Genet.* 2018;14(9):e1007589. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007589>.
- Poorman K, Borst L, Moroff S, et al. Comparative cytogenetic characterization of primary canine melanocytic lesions using array CGH and fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Res Int J Mol Supramol Evol Asp Chromosome Biol.* 2015;23(2):171-186. <https://doi.org/10.1007/s10577-014-9444-6>.
- Wong K, van der Weyden L, Schott CR, et al. Cross-species genomic landscape comparison of human mucosal melanoma with canine oral and equine melanoma. *Nat Commun.* 2019;10(1):353. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08081-1>.
- Hitte C, André C. Integrated genetic analysis of canine mucosal melanoma from three predisposed breeds. In preparation 2019.
- Mochizuki H, Kennedy K, Shapiro SG, Breen M. BRAF mutations in canine cancers. *PLoS One.* 2015;10(6):e0129534. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129534>.
- Modiano JF, Ritt MG, Wojcieszyn J. The molecular basis of canine melanoma: pathogenesis and trends in diagnosis and therapy. *J Vet Intern Med.* 1999;13(3):163-174.
- van der Weyden L, Patton EE, Wood GA, et al. Cross-species models of human melanoma. *J Pathol.* 2016;238(2):152-165. <https://doi.org/10.1002/path.4632>.
- Shelly S, Chien MB, Yip B, et al. Exon 15 BRAF mutations are uncommon in canine oral malignant melanomas. *Mamm Genome off J Int Mamm Genome Soc.* 2005;16(3):211-217. <https://doi.org/10.1007/s00335-004-2441-x>.
- Spangler WL, Kass PH. The histologic and epidemiologic bases for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia. *Vet Pathol.* 2006;43(2):136-149. <https://doi.org/10.1354/vp.43-2-136>.
- Bergman PJ. Canine oral melanoma. *Clin Tech Small Anim Pract.* 2007;22(2):55-60. <https://doi.org/10.1053/j.ctsap.2007.03.004>.
- MacEwen EG, Patnaik AK, Harvey HJ, Hayes AA, Matus R. Canine oral melanoma: comparison of surgery versus surgery plus *Corynebacterium parvum*. *Cancer Invest.* 1986;4(5):397-402.
- Tollett MA, Duda L, Brown DC, Krick EL. Palliative radiation therapy for solid tumors in dogs: 103 cases (2007-2011). *J Am Vet Med Assoc.* 2016;248(1):72-82. <https://doi.org/10.2460/javma.248.1.72>.

33. Dank G, Rassnick KM, Sokolovsky Y, et al. Use of adjuvant carboplatin for treatment of dogs with oral malignant melanoma following surgical excision. *Vet Comp Oncol*. 2014;12(1):78-84. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2012.00338.x>.
34. Bergin IL, Smedley RC, Esplin DG, Spangler WL, Kiupel M. Prognostic evaluation of Ki67 threshold value in canine oral melanoma. *Vet Pathol*. 2011;48(1):41-53. <https://doi.org/10.1177/0300985810388947>.
35. Gordon I, Paoloni M, Mazcko C, Khanna C. The comparative oncology trials consortium: using spontaneously occurring cancers in dogs to inform the cancer drug development pathway. *PLoS Med*. 2009;6(10):e1000161. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000161>.
36. LeBlanc AK, Breen M, Choyke P, et al. Perspectives from man's best friend: National Academy of Medicine's workshop on comparative oncology. *Sci Transl Med*. 2016;8(324):324ps5. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf0746>.
37. Garden OA, Volk SW, Mason NJ, Perry JA. Companion animals in comparative oncology: one medicine in action. *Vet J Lond Engl 1997*. 2018;240:6-13. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.08.008>.
38. Prouteau A, André C. Canine melanomas as models for human melanomas: clinical, histological and genetic comparison. *Genes*. 2019;10:501.
39. Hernandez B, Adissu HA, Wei B-R, Michael HT, Merlino G, Simpson RM. Naturally occurring canine melanoma as a predictive comparative oncology model for human mucosal and other triple wild-type melanomas. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2):E394. <https://doi.org/10.3390/ijms19020394>.
40. Yde SS, Sjoegren P, Heje M, Stolle LB. Mucosal Melanoma: a Literature Review. *Curr Oncol Rep*. 2018;20(3):28. <https://doi.org/10.1007/s11912-018-0675-0>.
41. Fowles JS, Denton CL, Gustafson DL. Comparative analysis of MAPK and PI3K/AKT pathway activation and inhibition in human and canine melanoma. *Vet Comp Oncol*. 2015;13(3):288-304. <https://doi.org/10.1111/vco.12044>.
42. Hirsch D, Kemmerling R, Davis S, et al. Chromothripsis and focal copy number alterations determine poor outcome in malignant melanoma. *Cancer Res*. 2013;73(5):1454-1460. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0928>.
43. Giannuzzi D, Marconato L, Elgendy R, et al. Longitudinal transcriptomic and genetic landscape of radiotherapy response in canine melanoma. *Vet Comp Oncol*. 2019;17(3):308-316. <https://doi.org/10.1111/vco.12473>.
44. Yee NS. Role of TRPM7 in cancer: potential as molecular biomarker and therapeutic target. *Pharm Basel Switz*. 2017;10(2):E39. <https://doi.org/10.3390/ph10020039>.
45. Meng X, Cai C, Wu J, et al. TRPM7 mediates breast cancer cell migration and invasion through the MAPK pathway. *Cancer Lett*. 2013;333(1):96-102. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.01.031>.
46. Lyu J, Song Z, Chen J, et al. Whole-exome sequencing of oral mucosal melanoma reveals mutational profile and therapeutic targets. *J Pathol*. 2018;244(3):358-366. <https://doi.org/10.1002/path.5017>.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Prouteau A, Chocteau F, de Brito C, et al. Prognostic value of somatic focal amplifications on chromosome 30 in canine oral melanoma. *Vet Comp Oncol*. 2019;1-10. <https://doi.org/10.1111/vco.12536>

IV. L'étude génétique du MM canin définit deux sous-groupes moléculaires avec différentes cibles thérapeutiques

ARTICLE 3

Canine oral melanoma genomic and transcriptomic study defines two molecular subgroups with different therapeutic targets, Prouteau et al. In prep

Au cours de ma thèse, plusieurs articles ont été publiés sur les MM humains, intégrant des données de séquençage d'exome ou de génome complet^{168,181,182,193}. Ces auteurs ont montré que, comme chez le chien, les oncogènes *CDK4* et *MDM2* étaient fréquemment amplifiés^{168,181}, et que près de la moitié des MM buccaux présentaient une amplification des gènes *CDK4* et *TERT* et des réarrangements inter-chromosomiques complexes impliquant ces oncogènes¹⁸¹. De plus, comme nous l'avons mentionné en introduction, chez les patients atteints de MM buccaux la présence de ces réarrangements inter-chromosomiques ainsi que la présence d'événements dits de "breakage-fusion-bridge" (BFB) avaient une valeur pronostique péjorative¹⁸¹, ce qui suggère comme chez le chien que certains SV complexes sont associés à l'agressivité de la tumeur. Dans leur article analysant les données de séquençage de génome complet de 67 MM humains, Newell *et al.* ont défini deux sous-groupes de tumeur distingués par leur degré de réarrangements complexes localisés¹⁶⁸.

Dans la suite du projet de thèse, nous avons cherché à mieux caractériser les remaniements et les gènes ciblés par ces altérations somatiques. Ce travail faisant appel aux techniques de FISH, de séquençage de génomes complets de lignées cellulaires, et d'analyse du transcriptome font l'objet d'un 3ème article en cours de rédaction.

L'objectif de ce travail a été de déterminer si les profils de CNA des MM canins signaient différents sous-groupes moléculaires, pouvant bénéficier de stratégies thérapeutiques différentes et donc contribuer à mieux stratifier les patients.

1. Analyses transcriptomique de 32 cas de MM canins

Nous avons commencé par analyser les données transcriptomiques de 32 échantillons de MM canins en les comparant entre eux. Cette analyse non supervisée a montré que les échantillons se différencient en deux groupes: le premier groupe comprend 12 tumeurs caractérisées principalement par la surexpression de gènes de l'immunité comme par exemple ceux qui codent pour les récepteurs des lymphocytes T (*CD3E*, *CD3D*, *CD3G* et *CD247*), des gènes de la fonction cytotoxique (*GZMB*) et de la voie IFN- γ , de nombreuses cytokines (*IL-18*, *CCL3*, *CCL4*, *CCL13*, *CCL22*) et des points de contrôle immunitaires (checkpoint) comme *CTLA-4*, *TIM3*, *LAG3*. Le deuxième groupe comprend 20 tumeurs qui ont une signature d'expression de gènes de la pigmentation et du métabolisme de la mélanine, illustrée par la surexpression de *MITF*. D'autres oncogènes sont surexprimés dans ce groupe comme *TERT*, *KIT* et *POM121*, fréquemment altérés dans les MM humains, particulièrement de localisation buccale¹⁸¹.

2. Classification des tumeurs selon leur profil en variants structuraux (SV)

Parallèlement, nous avons analysé les caractéristiques des variants structuraux (SV) de ces tumeurs (fréquence, intensité des amplifications, regroupement des altérations sur les chromosomes altérés) pour les classer en deux groupes comme proposé par Newell *et al.*: “SV low” et “SV high”. De façon intéressante, le groupe 1 avec la signature d’expression immunitaire était enrichi en tumeurs à faible taux de remaniements (“SV low”), alors que le groupe 2, caractérisé par la surexpression d’oncogènes connus était enrichi en tumeurs à forts remaniements (“SV high”), et cette association est significative ($p= 0,021$ test exact de Fisher). Ceci est concordant avec les données récentes de la littérature qui ont montré que l’instabilité chromosomique et les CNA étaient associés à une diminution de l’infiltrat immunitaire des tumeurs, et à une résistance à l’immunothérapie^{133,261,262}. Nos résultats indiquent que les tumeurs “SV high” présentent très fréquemment des amplifications focales du CFA 10 ciblant particulièrement les oncogènes *CDK4* et *MDM2*, ainsi que des amplifications focales ciblant principalement la région comprise entre 16 et 17 Mb du CFA 30.

Ces premiers résultats suggèrent que dans les MM canins, deux sous-groupes moléculaires se distinguent par leur profil d’expression et plus précisément par leur micro-environnement, et cela est corrélé aux caractéristiques génomiques des tumeurs comme le taux et le type de SV. Ces deux sous-groupes présentent des cibles thérapeutiques différentes: le premier groupe serait potentiellement plus susceptible de répondre aux inhibiteurs de checkpoint, et le deuxième à des thérapies ciblées comme les inhibiteurs de CDK4/6. Cette classification selon le taux de SV est proche de celle décrite dans le MM humain par Newell *et al.*, et soulève l’intérêt d’une stratification des patients chiens et probablement humains pour la prise en charge thérapeutique¹⁶⁸.

3. Caractérisation des variants structuraux dans le MM canin

Comme la présence de nombreux variants structuraux a été associée à la résistance à l’immunothérapie, notamment dans les mélanomes cutanés¹³³, et à un mauvais pronostic dans les MM buccaux humains¹⁸¹ et canins²⁶⁰, nous avons choisi de mieux caractériser ces altérations chez le chien dans le but de trouver des cibles thérapeutiques. En effet, mieux comprendre les mécanismes mis en jeu et décrire de nouveaux oncogènes tels que ceux présents sur le CFA 30 sont des étapes importantes pour mieux comprendre ces mélanomes agressifs.

Le séquençage de génome complet de 4 lignées cellulaires de MM canin a montré que trois des quatre lignées présentaient un profil avec de nombreux SV, impliquant le CFA 30 et/ou le CFA 10, alors que la dernière lignée présentait peu d’amplifications focales. Sur les 3 lignées “SV high”, les amplifications focales étaient associées à des translocations inter et intra-chromosomiques impliquant les CFA 30 et 10 avec parfois d’autres chromosomes comme le CFA 7 ou le CFA 33. Des analyses de FISH ont ensuite été réalisées en collaboration avec le service de cytogénétique du CHU de Rennes, sur une de nos lignées cellulaires canines qui présente de fortes amplifications focales sur le CFA 10 et le CFA 30. L’analyse a montré que les sondes vertes (Bacterial artificial chromosome (BAC) pour *MDM2* sur le CFA 10) et rouges (BAC pour *TRPM7* sur le CFA 30) étaient co-localisées de façon anarchique pour former des chromosomes “dérivés”,

témoignant de nombreux réarrangements interchromosomiques compatibles avec le mécanisme de chromothripsis (Figure 17).

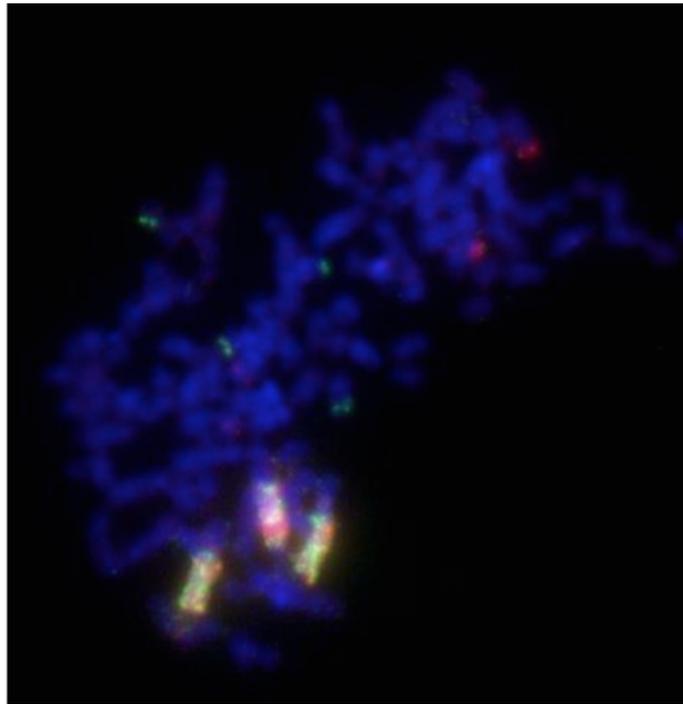


Figure 17 : Résultat de FISH sur une lignée cellulaire canine présentant des amplifications focales du CFA 10 et du CFA 30. On observe que les sondes marquant le gène *MDM2* (CFA 10, en vert) et le gène *TRPM7* (CFA 30, en rouge) sont co-localisées, ce qui témoigne de réarrangements interchromosomiques complexes, compatibles avec du chromothripsis.

En effet, notre étude a montré que les CNA présents dans les MM canins sont caractérisés par des délétions et des amplifications parfois importantes (pouvant dépasser 50 copies), focales, et des points de cassure de l'ADN regroupés sur une région chromosomique spécifique. Ces caractéristiques se rapprochent de ce que l'on observe lors de chromothripsis, évènement unique au cours duquel un ou plusieurs chromosomes se fragmentent et se ré-assemblent de façon anarchique^{263,264}. Cela contraste avec la plupart des changements génomiques qui arrivent au cours de la tumorigénèse de façon progressive (Figure 18). Lors de chromothripsis, de nombreux points de cassure de l'ADN sont rassemblés sur un ou plusieurs chromosomes, donnant lieu à des dizaines voire centaines de réarrangements chromosomiques, avec de nombreuses oscillations du nombre de copies²⁶³. Cet évènement a été découvert dans différents cancers comme le médulloblastome pédiatrique, le neuroblastome, le carcinome colorectal, le mélanome cutané et le myélome multiple^{190,263,265-268}. Dans certains cancers, le chromothripsis a une valeur pronostique péjorative, comme dans le mélanome cutané¹⁹⁰. Dans cette étude menée par Hirsch et al. sur 18 patients atteints de mélanome cutané (10 patients avec une "survie longue" et 8 patients avec une "survie courte"), une association entre le degré d'instabilité génomique et le pronostic a été

démontrée, et tous les patients du groupe à “survie courte” présentait de nombreuses amplifications focales et réarrangements chromosomiques, avec en particulier deux cas compatibles avec du chromothripsis.

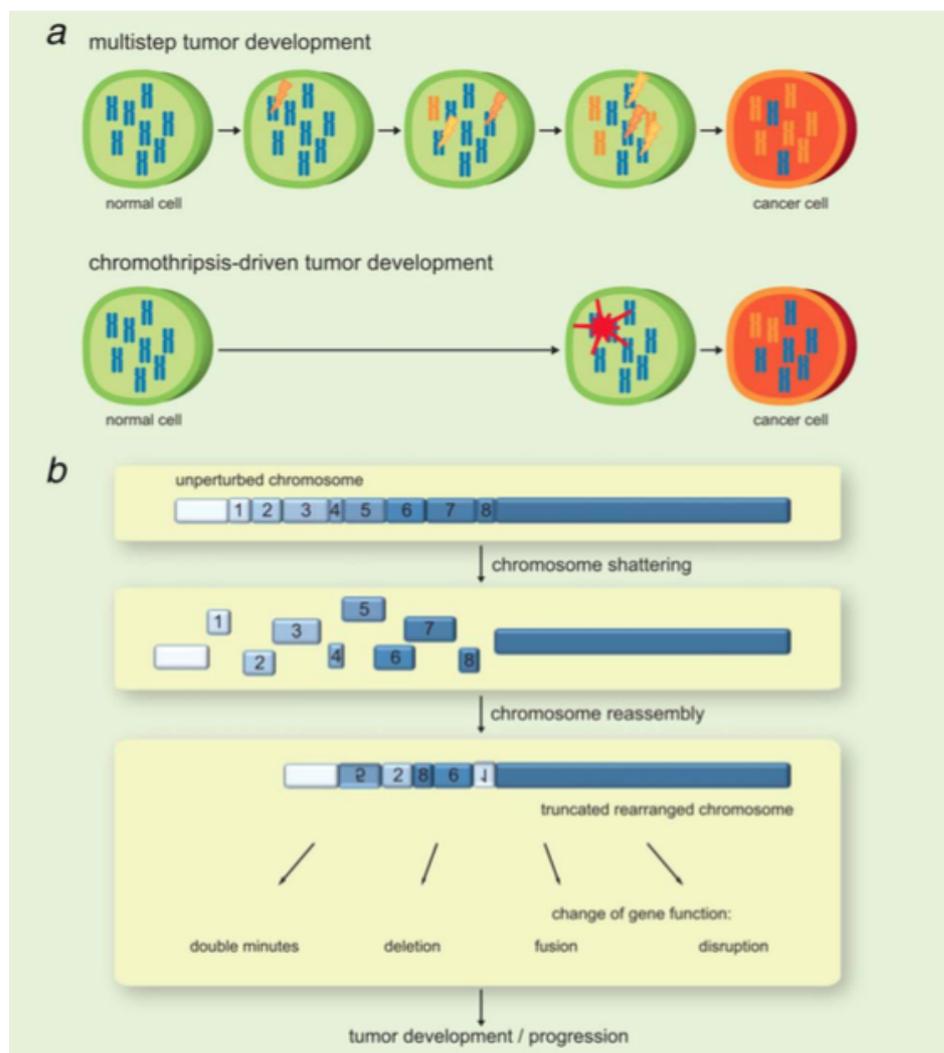


Figure 18 : a) Le chromothripsis est une forme d’instabilité génomique provoquant de très nombreux réarrangements arrivant au cours d’un évènement unique. b) Un ou plusieurs chromosomes se fragmentent et se réassemblent de façon anarchique. D’après Rode *et al.* 2016.

4. Etude des gènes ciblés par les réarrangements chromosomiques

Nous avons choisi d’étudier plus particulièrement les gènes présents dans cette région du CFA 30: *TRPM7* (Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 7), *SPPL2A* (Signal peptide peptidase-like 2A), *USP8* (Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8) et *GABPB1* (GA Binding Protein Transcription Factor Subunit Beta

1). Les évènements de type chromothripsis impliquent souvent l'amplification d'oncogènes qui induisent la progression tumorale ^{264,269}. Dans le cas des MM canins, ces amplifications ciblent des oncogènes déjà connus comme *CDK4* intervenant dans la phase G1 du cycle cellulaire, et *MDM2* qui inhibe la protéine suppresseur de tumeur p53; mais également les gènes de la région amplifiée du CFA 30 qui d'après la littérature, semblent tous pertinents à étudier et candidats potentiels pour les MM humains. *TRPM7* code pour une protéine transmembranaire ayant un domaine canal ionique et un domaine kinase, impliquée dans les voies PI3 kinase/AKT et MAP kinase, ainsi que dans la transition épithélio-mésenchymateuse dans les cancers ovariens et pulmonaires ²⁷⁰⁻²⁷³. Sur des lignées cellulaires humaines de cancer du sein et de l'ovaire, il a été montré que *TRPM7* était impliqué dans la migration et l'invasion cellulaire via les voies MAP kinase et PI3K/AKT respectivement ^{271,272}. De plus dans le cancer du sein, la surexpression de *TRPM7* est associée à des sous-types invasifs et à l'apparition de métastases (Meng et al. 2013). *GABPB1* code pour la sous-unité β d'un facteur de transcription qui a récemment été impliqué dans la prolifération cellulaire dans le carcinome à cellules rénales ²⁷⁴. De plus, GABP est capable de se fixer au promoteur muté de *TERT* pour l'activer, notamment dans les gliomes ^{275,276}, et favorise la prolifération cellulaire via l'activation du gène *TERT* muté²⁷⁶. Le gène *USP8* code pour une enzyme qui a récemment été impliquée dans la tumorigenèse du cancer du sein en interagissant avec Notch1 ²⁷⁷, et sa surexpression est de mauvais pronostic dans le cancer du col de l'utérus ²⁷⁸. Enfin, le gène *SPPL2A* code pour une protéase ayant un rôle dans l'immunité innée et acquise ²⁷⁹.

Dans un premier temps nous avons cherché à savoir si l'amplification de ces gènes induisait bien une surexpression. Pour cela, nous avons réalisé des q-PCR sur l'ADN de 47 échantillons tumoraux pour connaître le nombre de copies, et des rtQ-PCR pour quantifier les ARN correspondants. Nous avons observé une corrélation positive significative pour *CDK4* et *MDM2*, ainsi que pour l'ensemble des gènes du CFA 30 étudiés. En Western blot, les lignées cellulaires qui présentaient une amplification de *CDK4*, *MDM2* et *GABPB1* avaient également une quantité accrue de ces protéines. Cela n'a pas pu être démontré pour les autres protéines (*TRPM7*, *USP8* et *SPPL2A*) car les anticorps humains utilisés ne reconnaissaient pas la protéine correspondante canine. Des expériences avec des siRNA n'ont pas non plus permis d'identifier de bande spécifique pour ces protéines. Enfin, les tests de prolifération cellulaire réalisés sur une lignée cellulaire canine avec transfection de siRNA ciblant les gènes candidats du CFA 30 ont montré que *TRPM7*, *SPPL2A* et *GABPB1* étaient impliqués dans la prolifération des cellules tumorales, et constituent donc des cibles thérapeutiques intéressantes.

Les amplifications focales qui caractérisent les MM canins ciblent donc des gènes clés pour l'initiation et la progression tumorale comme *CDK4*, *MDM2* ou les gènes localisés sur le CFA 30. En parallèle, la fréquence et le type de SV semblent distinguer deux sous-groupes moléculaires différents, notamment en terme de microenvironnement et d'infiltrat de cellules immunitaires. Ainsi, il semble que les tumeurs avec un faible nombre de SV aient une infiltration immunitaire plus importante et seraient plus susceptibles de répondre à l'immunothérapie et notamment aux anti CTLA-4, alors que les tumeurs avec un grand nombre de SV ont un microenvironnement

moins riche et bénéficieraient plutôt de thérapies ciblées comme les anti-CDK4/6. Avec une fréquence relativement élevée de MM, le chien offre une ressource unique pour explorer les prises en charge et les réponses thérapeutiques différentes entre ces deux sous-groupes, et ces résultats pourraient être transférés à ce cancer rare chez l'homme.

Canine oral melanoma genomic and transcriptomic study defines two molecular subgroups with different therapeutic targets

Abstract

Mucosal melanoma (MM) is a rare and aggressive clinical entity in humans, occurring mostly in the head and neck and ano-genital regions. Despite recent advances in genetics and revolutionary treatment such as immunotherapy, its prognosis remains poor. Canine MM shares many clinical, histological and genetic features with its human counterpart, offering a relevant spontaneous and immunocompetent model to decipher the genetic bases and explore treatment options of human MM. The transcriptome analysis of 32 canine MM samples allowed us to identify two molecular subgroups differing in their microenvironment and their structural variant (SV) contents. Indeed, the overexpression of genes related to microenvironment and T-cell response was associated to tumors with a lower structural variant burden whereas overexpression of pigmentation related pathways and oncogenes like *TERT* was associated with high SV burden. To describe those focal amplifications, whole genome sequencing was performed on 4 canine MM cell lines. We showed that focal amplifications signed complex chromosomal rearrangements that target oncogenes such as *MDM2* or *CDK4* and a recurrent region on canine chromosome 30 comprising the genes *TRPM7*, *GABPB1*, *USP8* and *SPPL2A*, candidate oncogenes for MM. Copy number of those genes was significantly correlated with their expression levels. Finally, we demonstrated that the genes *TRPM7*, *GABPB1* and *SPPL2A* had a role in cell proliferation and thus are new candidate oncogenes in human MM. Our findings suggest the existence of two molecular subgroups that may benefit from dedicated therapies such as immune checkpoint inhibitors or targeted therapies. Altogether, these results illustrate the relevance of naturally affected dogs in deciphering genetic mechanisms and its potential to select efficient targeted therapies for such rare and aggressive cancers in humans.

Introduction

Melanoma is the deadliest skin cancer in human and has a rising incidence with 80,000 cases per year in the USA¹. Mucosal melanoma (MM) is a rare clinical entity and comprises around 1-2%^{2,3} of all melanomas but this rate can rise up to 22% in Asian countries where cutaneous melanoma (CM) is less frequent⁴. MM arises from

melanocytes that reside in the mucous membranes of the respiratory, gastrointestinal, and urogenital tracts and occur mostly in the head and neck (31-55%), anorectal (17-24%), and vulvovaginal (18-40%) locations³. Compared to CM, MM has a highly aggressive behavior and a less favorable prognosis^{2,5-7}, with a 5-year survival rate between 20-35% according to disease location and stage^{2,3,7,8}. Treatment options include surgical resection and/or radiation therapy to achieve locoregional control, but despite this, the prognosis remains poor. Some advanced cases can benefit from targeted therapy like KIT inhibitors, or immunotherapy using checkpoint inhibitors^{2,3,9-11}. However, response to immunotherapy is highly variable and MM patients have a lower response rate than CM patients^{3,9}.

In the last years, large genomic studies, involving Whole Exome sequencing (WES) and more recently Whole Genome Sequencing (WGS) have been conducted in order to better understand the mechanisms of MM tumor initiation, progression and metastasis, and to find more suitable therapies¹²⁻¹⁹. Those studies have shown that MM presents a lower mutation burden and a greater load of structural variants (SVs) and copy number alterations (CNAs) compared to CM¹²⁻¹⁶, and those alterations frequently involved known oncogenes such as *CDK4*, *MDM2* and *TERT*¹⁵⁻¹⁸. Two recent studies have pointed to two different MM subgroups according to a pattern of complex clustered SVs^{15,16}, with one showing that some of these SVs were linked to a poor outcome¹⁶. Since those MM are a rare entity in humans, the dog patients with affected popular breeds constitute an inestimable opportunity to better understand the molecular characteristics of those MM subgroups, and to reveal relevant therapeutic targets.

In the last decade, the dog has emerged as a unique spontaneous and immunocompetent model for human cancers²⁰⁻²³ and especially for MM^{14,24-28}. Indeed, canine MM, is the most frequent malignancy of the oral cavity in dogs, and shares many clinical, biological and genetic features with its human counterpart. As in humans, canine MM tends to metastasize rapidly to distant organs and have a poor response to chemotherapy. Immunotherapy has been developed in dogs with the achievement of a melanoma vaccine but results remain controversial with highly variable responses²⁹⁻³⁴. Genetically, canine MM mimics human MM with a predominance of somatic CNAs and complex SVs, and a relatively low mutation burden^{14,35-38}.

In this study, we propose to decipher the genetic basis of MM through the spontaneous canine model, combining genomic and transcriptomic sequencing experiments together with functional validations. Unsupervised transcriptomic analysis of 32 canine MM samples highlighted the existence of two molecular subgroups: one characterized by immune and microenvironment signatures, and the second by the enrichment of complex chromosomal rearrangements associated with the overexpression of oncogenes such as *MDM2*, *CDK4* and *TERT*. The effect on cell proliferation of genes frequently altered through chromosomal rearrangements were explored on a canine MM cell line. Altogether, these data suggest the existence of two canine MM molecular subgroups that could benefit from distinct therapies, and could lead to further translational studies in human and veterinary oncology.

Material and methods

Sample collection

Blood and tissue biopsy samples from oral melanoma affected dogs were collected for this study, through the Cani-DNA (<http://dog-genetics.genouest.org>) and CCOGC (Canine Comparative Oncology Genomics Consortium) BRC (61 and 18 cases respectively) (Supplementary table 1). All oral melanoma diagnoses were confirmed by histopathological analysis (JA) with adequate immunostaining. DNA and RNA were extracted as previously described^{39,40}. Blood and tissue sampling was performed by DVM veterinarians on private owned dogs, in the course of the health follow-up, with the owner consent.

Canine Cell lines

The Bear (accession number CVCL_OD14) and CML10 (accession number CVCL_IZ11) cell lines were obtained from Dr. Modiano (Colorado University). Cell lines were cultured at 37°C in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum and 0.2% primocin (Invivogen). Five other cell lines (Dog-OralMel-18249, Dog-OralMel-18395, Dog-OralMel-18333, Dog-OralMel-18848 and Dog-OralMel-18657) were developed in the lab and came from fresh canine oral melanoma samples. They were cultured in a DMEM/F-12 medium (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum and 0.2% primocin, and after ten passages RPMI 1640 was used. All cell lines were tested for mycoplasma with MycoAlert™ Plus kit (Lonza; Rockland; ME; USA) and were mycoplasma-free cells.

Fluorescence in situ hybridization (FISH)

FISH analyses were performed on chromosome preparations generated from Bear cell line using conventional techniques: colcemid arrest, hypotonic treatment and methanol/glacial acid acetic fixation, as described previously⁴¹. The following bacterial artificial chromosome (BAC) clones were used: CH82-199H02 and CH82-179B09 or CH82-1E17 and CH82-40I15 targeting *MDM2* and the region containing *GABBP1*, *USP8* and *TRPM7* amplifications respectively (<https://bacpacresources.org/>). These BAC clones were labeled with green-dUTP (Abbott Molecular) and Cy3-dCTP (Amersham Biosciences). Slides were analyzed by an experienced cytogeneticist (FC), using a fluorescence microscope (Axioskop2, Axio Imager Z2, Zeiss, Göttingen, Germany) and Isis imaging software (Metasystems, Altlußheim, Germany). Per case, at least 100 non-overlapping tumor nuclei were examined.

RNAseq clustering and signature analysis.

For the 32 canine MM samples, polyadenylated RNAs were extracted, sequenced and analyzed as described in Hitte et al.⁴². Briefly, we used the “canFam3.1-plus” annotation as the reference annotation⁴³, and the canFam3.1 assembly version as the reference genome⁴⁴. Based on the protocol described in Djebali et al.⁴⁵, FASTQ reads were aligned, both on the transcriptome and on the genome, using the STAR program (v2.5.0a)⁴⁶. Finally, gene expression levels were estimated as raw counts (unnormalized) with the RSEM program (v1.2.25)⁴⁶ for each sample individually, and then merged in order to obtain a matrix expression file (with genes in rows and samples in columns). This matrix of expression was then normalized and transformed across all samples in order to stabilize the variance using the DESeq2 (v1.22.2)⁴⁷ function *vstcounts* with the option `blind = TRUE`.

For the purpose of selecting the most informative genes for clustering analysis, we used the top 6000 most variable genes *i.e.* having the highest median absolute deviation (*mad*). Then, the Nonnegative Matrix Factorization (NMF) algorithm from the NMF R package (v0.22.0)⁴⁸ was applied for different values of *k* clusters/ranks (*k* = 2 to 6). In order to determine the best *k* cluster, the *nmfEstimateRank* function was used and the consensus matrix method (Silhouette) highlighted *k* = 2 as the optimal number of clusters. Finally, we employed the NMF function *extractFeatures* to obtain the cluster-specific gene signatures for the two clusters (Supplementary table 3). These gene lists were then given as input to the *gprofiler2* (v0.1.9) R program⁴⁹ with the *gost* function and `organism = "cfamiliaris"` allowing to perform a gene set enrichment analysis over multiples databases (Gene Ontology, KEGG, CORUM...). Finally, heatmaps were plotted with the *complexHeatmap* package (v2.3.1)⁵⁰ to integrate and visualize multiple source of informations (gene signatures, sample clustering, SV content and oncogene mutational status) (https://github.com/tderrien/Prouteau_et_al).

Whole Genome Sequencing (WGS) and exome sequencing (WES) analyses, processing and quality control

DNA from 4 canine oral melanoma cell lines and from blood samples of two affected dogs were extracted for WGS as previously described (Rault Ulvé). WGS was performed by the BGI sequencing platform (BGI, Shenzhen, China) using BGISEQ-500 short-read sequencing as previously described⁵¹. Briefly 1000 ng of genomic DNA quantified by Qubit 3.0 fluorometer (Life Technologies, Paisley, UK) had been sheared with an E220 Covaris instrument (Covaris Inc.) followed by size selection by Vahstm DNA Clean beads kit to an average size of 200-400 bp. Selected fragments were end repaired and 3' adenylated, then BGISEQ-500 platform-specific adaptors were ligated to the A-tailed fragments, and the ligated fragments were purified, and then amplified using PCR. Finally, circularization was performed to generate single stranded DNA circles. After quantitation and qualification, the libraries were loaded onto a sequencing flow cell and then processed for 100 bp paired-end sequencing on the BGISEQ-500 platform.

WGS mapping

After sequencing, the raw reads were filtered (removing of adapter sequences, contamination and low quality reads) according to manufacturer standards. Sequence data were then aligned to the dog reference genome (assembly version canFam3.1) using the BWA-MEM (version 0.7.17)⁵² and PCR duplicate reads were removed using the Picard tools (version 2.18.23) (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). Read data was processed according to the GATK best practices, specifically base quality score recalibration (BQSR) was assessed using GATK4 (version 4.0.12).

Somatic variant calling

Mutect2 from GATK4 was then used to call somatic SNVs and short INDELS against a PON (Panel of Normal) with matched normal samples and also against germline variants from 722 dog genomes (https://data.broadinstitute.org/vgb/Ostrander_VCFs/722g.990.SNP.INDEL.chrAll.vcf.gz). Variant annotation was done using the VEP program⁵³ with the Ensembl Canis familiaris annotation (v95).

Somatic CNV calling

All somatic copy-number variants (CNV) were determined according to the “R” Package DNACopy (Seshan VE, Olshen A (2020). *DNACopy: DNA copy number data analysis*. R package version 1.62.0. , v 1.6)). Canine genome was split into bins with window size of 10 Kb or with the exome target regions for WGS and WES respectively. Numbers of reads were normalized according to the sample total reads number and the log₂ ratio with the corresponding germinal DNA (or with a pool of three normal DNA for BEAR or CML10 cell lines) was estimated for window. Several windows would join

together (segmentation) to a larger segment with a significance threshold of 1×10^{-4} and the copy number of segment would be estimated.

SV calling

Based on aligned .bam files from bwa-mem, Structural Variants (SVs) of 4 types break-ends (BND), deletions (DEL), duplications (DUP) and inversion (INV) were identified with Delly⁵⁴ (version v0.8.3). Only somatic SVs having the flags PASS and PRECISE were retained. Finally, circular representations of SVs and gain/loss from dnacopy along canine chromosomes were done with the circlize R package⁵⁵ (version 0.4.10) (https://github.com/tderrien/Prouteau_et_al).

Modeling chromothripsis events

In order to assess patterns of chromothripsis, we tested for the enrichment of chromosome specific SVs by modeling the association between SV breakpoints and chromosome length using hypergeometric distributions (ou a hypermetric distribution). More precisely, we defined x as the number of SV breakpoints on a specific chromosome out of a total of k detected breakpoints, and m the chromosome size and N the size of canine genome. The computed p-value is the probability x SVs in a total number of SV given by: $dhyper(x=x, m=m, n=N-m, k=k)$. Only p-values under 10^{-3} were considered as significant. The clustering of breakpoints of SVs was tested as previously described⁵⁶. The suspected regions of chromothripsis were detected with Shatterproof software⁵⁷ using the copy-number and BND information with standard parameters.

Classification of dogs with “low” versus “high” content of structural variants (SV)

High/low SV classification was defined using the copy-number status of segments resulting from WES data. High SV samples were defined by the presence of an abundance of copy-number states oscillating on at least one chromosome (copy-number states ≥ 10 states)^{15,58} with at least one major amplification (copy number ≥ 90 percentile of whole genome amplifications). This classification was controlled by manual curation.

Targeted copy number and expression analysis

High-throughput quantitative-PCR (qPCR) was performed using SmartChip system (Takara Bio) on 47 oral melanoma samples to detect focal amplifications on tumor DNA on CFA 10 and CFA 30. We used primer pairs targeting two genes on CFA 10 (*MDM2* and *CDK4*) and 4 genes on the CFA 30 (*TRPM7*, *USP8*, *SPPL2A* and *GABPB1*) (Supplementary table 2). A primer pair targeting a region of CFA 9 was used as an internal control and each experiment was done with DNA of an unaffected dog as an external control. qPCR was performed on tumor DNA samples after pre-amplification with the SYBR green PCR master mix (Thermo Fisher Scientific) on the 7900HT Fast

Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using standard procedures. Each sample was measured in triplicate, and relative amounts of the sequence were determined using the $\Delta\Delta C_t$ method.

RNA was extracted from those 47 tumor samples and reverse transcription was performed on 1 μ g of total RNA from tumor or healthy tissue using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Then RT-qPCR was performed on the same targeted genes. *GAPDH* was used as the control gene, and a pool of data from oral non-affected tissue of 4 dogs was used as the external control. Each sample was measured in triplicate, and relative amounts of the sequence were determined using the $\Delta\Delta C_t$ method.

Western blot

Cellular protein extracts were prepared using a cell lysis buffer containing 18 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 135 mmol/L NaCl, 0.9 mmol/L EDTA, 0.9 mmol/L EGTA and 5.4 mol/L and supplemented with 1 mmol/L PMSF, 1 \times EDTA-free cocktail protease inhibitor (Roche Diagnostics), 30 mmol/L sodium fluoride, 40 mmol/L glycerol phosphate, 1 mmol/L sodium orthovanadate, and 0.5% Triton X-100. Protein concentrations were determined by the BCA protein assay (Sigma-Aldrich) using BSA as a standard.

Protein samples were denatured for 10 minute at 95°C, and equal amounts of cell proteins (50 μ g) were subjected to 10% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (Amersham - GEH Life). Membranes were probed with suitable antibodies. The primary antibodies were: anti-CDK4 (559693, BD Pharmingen), anti-MDM2 (clone 2A10, ref MABE281, Merckmillipore), anti GABPB1 (sc-271571, Santa Cruz Biotechnology) and anti-ERK (sc-94, Santa Cruz Biotechnology). Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch. Signals were detected using the LAS-4000 Imager (Fuji Photo Film).

Transfection with specific and control siRNAs and cell proliferation assays

siRNAs (80 nM) for CDK4, GABPB1, TRPM7, USP8 and SPPL2A proteins and control siRNA were transfected in Bear cell line using lipofectamine 2000 (Invitrogen) following the manufacturer's recommendations (Supplementary table 1 and 2). CDK4 siRNA was used as a positive control for the experiment. Cells were seeded at a density of 1×10^6 cells in 6-well plates in 1 ml of RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum and 0.2% primocin (Invivogen) normal and incubated at 37 °C. Medium was changed 6h post transfection to avoid toxicity.

Cell proliferation was evaluated 72h after transfection using a methylene blue colorimetric assay. Briefly, cells were fixed for 30 min in 90% ethanol. After ethanol

removal, cells were dried and stained for 30 min with 1% methylene blue dye in borate buffer. Then the fixed cells were washed 4 to 5 times with tap water, and 100 μ l of 0.1 N HCl were added to each well. Plates were next analyzed with a spectrophotometer at 620 nm.

Results

1- Transcriptome landscape of canine oral melanoma highlights two distinct subgroups

We first investigated whether the expression profiles of the 32 canine MM tumors could predict prognostic subtypes (Supplementary table 1). Using an unsupervised clustering based on the Nonnegative Matrix Factorization (NMF) algorithm (see Methods), we showed that canine tumor samples can be separated into two distinct clusters (group 1 with 12 samples and group 2 with 20 samples) based on the underlying structure of their expression data (Figure 1A). Since NMF organizes both the samples and genes, it also allowed us to define a small number of genes which represent the signatures of the two clusters (Supplementary figure 3). Using gene set enrichment analysis (GSEA) with the gprofiler tool⁴⁹, we showed that the 266 genes of group 1 signature (Supplementary table 3) are significantly associated with immune-related functional gene sets (Biological Process Term “Immune Response” $p=1.55 \times 10^{-24}$, “cytokine-mediated signaling pathway” $p=2.05 \times 10^{-15}$) (Supplementary table 4). This result suggests that the microenvironment differs between both groups, with MM of group 1 presenting a higher degree of infiltration by immune cells. This is confirmed by the overexpression in this group of genes encoding components of the T-cell receptor (TCR) complex, such as *CD3E*, *CD3D*, *CD3G*, and *CD247* (Supplementary figure 1). Moreover in this group, genes related to cytotoxic functions (such as granzyme B), to the IFN- γ pathway (such as *IRF1*), or to the presence of an ongoing immune response and a cytokine-rich microenvironment (such as *IL18*, *CCL3*, *CCL4*, *CCL13*, *CCL22*)⁵⁹ are significantly overexpressed (Supplementary figure 1). Rather than the absolute number of immune cell types, the ratio between immune cell types with a immunostimulatory or immunosuppressive function appeared important to determine the antitumorigenic versus protumorigenic role of microenvironment⁵⁹. We therefore determined in the groups 1 and 2, the expression ratio of proinflammatory cytokines (IFN- γ , *IL-1A*, *IL-1B*, and *IL-2*), which are among the most important markers of immune stimulation versus immunosuppressive molecules (*IL-10*, *IL-11*, *IL-4* and *TGFB1*). This ratio was significantly increased in group 1, suggesting a relative increase of pro immunogenic responses in this group ($p=0.03$, Student test ; Figure 1B). This profile is concordant with ‘hot immune’ tumors⁶⁰, and the overexpression of immune checkpoint genes such

as *CTLA4* (log2fold change = 2.78, adjusted p-value=1.22x10⁻⁵), *TIM3* (log2fold change 1.6, adjusted p-value=2.17x10⁻⁹), *LAG3* (log2fold change 1.3, adjusted p-value=0,0058), or immunomodulating cytokines, such as *IL2RG* suggested that this group should benefit from immune checkpoint inhibitors^{60,61}.

The second group (n=20 samples) is characterized by melanin metabolic processes and pigmentation pathways (Biological Process Term “melanin biosynthetic process” p=7.6x10⁻⁴, “melanocyte differentiation” p=9.9x10⁻³, “pigmentation” p=1.8x10⁻⁴) (Supplementary table 4). This is reflected by the overexpression of known melanocyte specific genes such as *MITF* (log2fold change =2.17, adjusted p-value=1.7x10⁻⁵, Figure 1C), which is known to control the proliferation, migration and invasion of melanoma cells (refo.amegroups.com/article/view/4293/5244). This group presents also the overexpression of well-recognized cancer driver genes such as *TERT* (log2fold change =1.5, adjusted p-value=0.028) *KIT* (log2fold change =2.1, adjusted p-value=5.7x10⁻⁵) or the oncogene *POM121* (log2fold change =0.67, adjusted p-value=0.011, Figure 1C) recently linked to poor prognosis in human oral MM¹⁶.

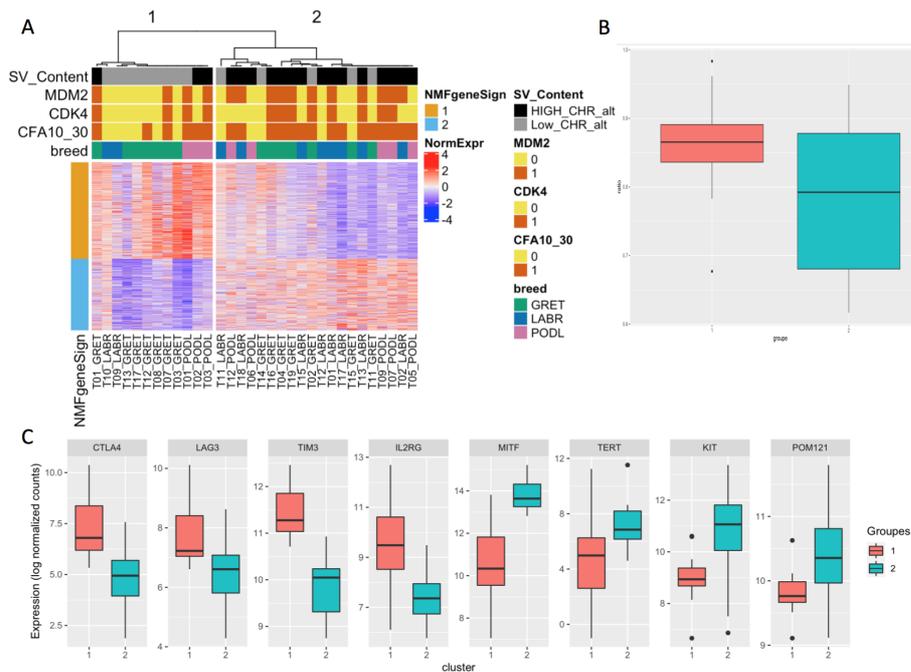
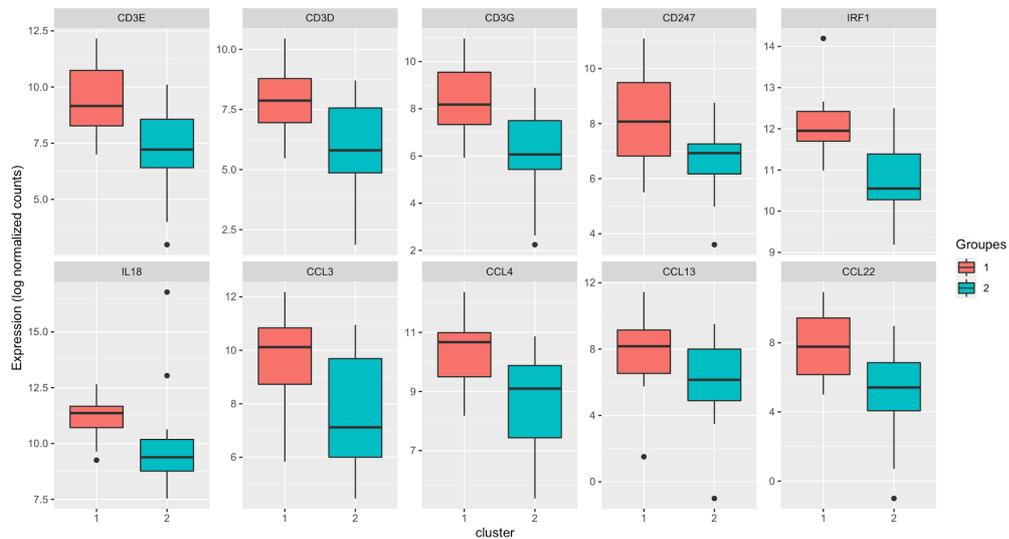


Figure 1: Transcriptomic analysis of 32 canine MM. **A.** NMF clustering of expression data identifies two subgroups. The second subgroup is enriched in SV as well as focal amplifications of *CDK4*, *MDM2* or *CFA30*:17Mb region. **B.** Expression ratio of proinflammatory cytokines (IFN-γ, IL-1A, IL-1B, and IL-2) vs immunosuppressive molecules (IL-10, IL-11, and TGFB1) significantly differs between the 2 groups (p=0.03,

Student test). **C. Expression of immune checkpoint genes or known oncogenes** according to the transcriptomic classification. The following immune checkpoint genes *CTLA4* (log2fold change = 2.78, adjusted p-value=1.22x10⁻⁵), *TIM3* (log2fold change 1.6, adjusted p-value=2.17x10⁻⁹), *LAG3* (log2fold change 1.3, adjusted p-value=0,0058) and *IL2RG* (log2fold change 2.7, adjusted p-value=5.6x10⁻⁷) are overexpressed in groupe 1 while the following oncogenes : *MITF* (log2fold change = 1.49, adjusted p-value=1.22x10⁻⁵), *TERT* (log2fold change = 1.54, adjusted p-value=0.028), *KIT* (log2fold change = 2.08, adjusted p-value=5.69x10⁻⁵) are overexpressed in groupe 2.



Supplementary Figure 1 : Expression of genes linked to infiltration of the immune cells according to the clustering groups. These genes : *CD3E* (log2fold change 1.98, adjusted p-value=0.0027), *CD3D* (log2fold change 1.69, adjusted p-value=0.013), *CD3G* (log2fold change 1.9, pcorrected=0.003), *CD247* (log2fold change 1.7, adjusted p-value=0.0028), *IRF1* (log2fold change 1.39, adjusted p-value=9.54x10⁻⁵), *IL18* (log2fold change 1.28, adjusted p-value=0.017), *CCL3* (log2fold change 1.57, adjusted p-value=0.042), *CCL4* (log2fold change 1.42, adjusted p-value=0.011), *CCL13* (log2fold change 1.85, adjusted p-value=0.028), *CCL22* (log2fold change 2.47, adjusted p-value=0.002) are overexpressed in the group 1 reflecting a more important immune cells infiltration in this group.

Since SV involving *MDM2* and *CDK4* are hallmarks of human and canine MM^{14-16,62}, and that a recent study in human pointed out two different MM subgroups according to SV profiling¹⁵, we used WES data already performed on a subset of canine MM³⁷ to analyze the structural variants (SV) profiles of this cohort. Based on the

distributions of SV features (number, intensity, clustering), canine tumors were classified as “low SV” (n=12) or “high SV” (n=20), as previously described (Figure 1A)¹⁵ (see Methods). Interestingly, subgroups defined by the transcriptomic analysis significantly overlapped the two groups defined according to the SV status (Exact Fisher test $p=9.9 \times 10^{-3}$). Indeed, the first transcriptome subgroup which was characterized by an immune signature is enriched in tumors with “low SV”, while the second transcriptome subgroup contained more “high SV” tumors. These results are concordant with previous studies in human cancers showing that chromosomal instability and copy number alterations are associated with a decrease in cytotoxic immune cell infiltration^{59,61} and with resistance to checkpoint inhibitors^{59,61,63}. Our findings suggest that canine oral tumors may evolve through two different paths that would lead to marked differences in therapeutic options: the first group containing “hot immune” tumors with “low SV” would likely benefit from immunotherapy, while the second group containing “cold immune” tumors, with “high SV” would better respond to therapies targeting amplified oncogenes, such as CDK4/6 inhibitors.

Given that structural variants have been associated with resistance to immunotherapy in human cutaneous melanoma⁶¹ and with a poor outcome in human¹⁶ and canine oral MM⁶², we thus focused on the characterization of those structural variants in canine MM to explore novel therapeutic options.

2- “High SV” MM are characterized by focal amplifications and numerous chromosomal translocations

In order to refine the annotation of SV, we performed WGS on 4 canine MM cell lines. It allowed us to catalog a total of 7 275 SV (deletions duplications, inversions, insertions and breakends) on the 4 cell lines (Supplementary table 5). Three cell lines showed strong focal amplifications of CFA 30 and/or CFA 10 as recurrently observed in canine MM (Figure 2A)^{14,35,36,38,62}. The Bear cell line showed focal amplifications of CFA 30 (up to 67 copies) targeting the region around 16-17 Mb, and of CFA 10 (up to 46 copies) targeting *MDM2* and *CDK4*. The Dog-OralMel-18333 cell line was characterized by focal amplifications targeting the same region of CFA 30 (up to 27 copies) and CFA 7 (up to 13 copies), and the Dog-OralMel-18395 cell line presented strong focal amplifications on CFA 10 (up to 41 copies) targeting *MDM2* and *CDK4*. In contrast, the last cell line CML10 did not show any of those alterations.

Interestingly, when analyzing the SV distribution in the tumor genome, we found that the region harbouring focal amplifications were significantly enriched in many types of SV, such as inversions, deletions and insertions (Supplementary table 6 and Figures 2A-G). In particular, those focal amplifications were found to sign inter or intra-chromosomal translocations with significant breakpoints clustering (Figure 2A-H), similarly to what is seen in human MM and particularly oral MM, which present inter and intra-chromosomal translocations between/within HSA 5 (*TERT*) and HSA 12

(*CDK4*)¹⁵⁻¹⁷. Interchromosomal translocations between CFA 30 and CFA 10 were explored by fluorescence in situ hybridization (Bear cell line), and showed 3 large genomic regions with repeated amplifications and fusions of CFA 30 and CFA 10 (Figure 2I). Thus, for the three canine MM cell lines harbouring strong focal amplifications, those amplified regions presented breakpoint clustering (see Methods) and were detected as potential chromothripsis regions with Shatterproof tool (Supplementary table 6). Although we could not find the presence of double-minute chromosomes to explain the highly elevated copy number (eg. until 67 copies in Bear cell line) using FISH analysis, the 3 cell lines harbouring strong focal amplifications gathered features of chromothripsis as defined by Korbel *et al*: breakpoint clustering and the irregular oscillating copy-number states.

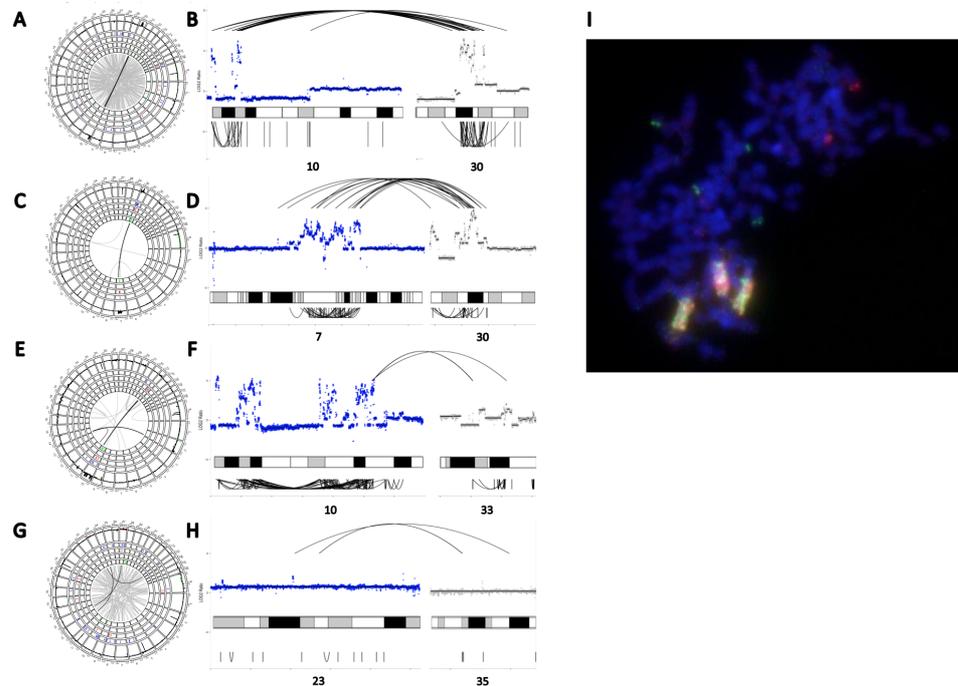


Figure 2 : Structural variants on the four cell lines. **A-B**. SVs identified through WGS in the cell line Bear. **A**. Circular plot representing the distribution of SVs along dog chromosomes with, from external to internal layers, CNA gains/losses (in dark red/green), deletions, duplications, insertions and inversions in blue, light red, orange and green respectively. Interchromosomal breakends (BND) are represented by grey lines connecting chromosomes with a color intensity corresponding to the number of reads validating the SV. **B**. Focus on CFA 10 and CFA 30 presenting the focal amplifications and clusters of SVs (BND and INV). Copy numbers in log2ratio are represented as well inter (top) and intra-chromosomal (bottom) SVs. **C-D**. SVs of the cell line Dog-OralMel-18333. **C**. Circular plot representing CNV, BND, DEL and INV across

the genome. **D.** Focus on CFA 7 and CFA 30 presenting the focal amplifications and cluster of SVs (BND, DEL, DUP and INV). **E-F.** SVs of the cell line Dog-OralMel-18395. **E.** Circos plot representing CNV, BND, DEL and INV across the genome. **F.** Focus on CFA 10 and CFA 33 presenting the focal amplifications and cluster of SVs (BND, DEL, DUP and INV). **G-H.** SVs of the cell line CML10. **G.** Circular plot representing CNV, BND, DEL and INV across the genome. **H.** Focus on CFA 23 and CFA 35 presenting interchromosomal rearrangement. **I.** FISH analysis of Bear cell line targeting CFA 10 (*MDM2* region) and CFA 30 (*TRPM7* region) in green and red respectively, showing derivative chromosomes compatible with a chromothripsis-like event.

Thus, our results suggest that focal amplifications of *CDK4*, *MDM2* and genes on the 16-17 Mb region of CFA 30 in canine MM reflect complex inter and intra-chromosomal rearrangements, and the massive clustered DNA rearrangements with high amplifications and deletions resulting in long derivative chromosomes arise from cataclysmic events compatible with chromothripsis^{56,58,64,65}. These recurrent focal amplifications are expected to drive the oncogenic process of MM.

3 - Exploring candidate oncogenes on CFA 30

Correlation between copy numbers (CNA) and expression of candidate oncogenes

Chromothripsis-like events often involve the amplification of oncogenes to promote tumor progression^{64,65}. In canine MM, those recurrent amplifications target well-recognized oncogenes such as *CDK4* involved in the early phase of the cell cycle, and *MDM2* that inhibits the p53 tumor suppressor, as well as several candidate oncogenes localized on CFA 30 amplifications, yet unknown in human MM. Based on the intersection of genomic intervals defining recurrent CFA30 amplifications in the 32 WES, the minimal recurrently amplified region contains four genes that are relevant candidate oncogenes: *TRPM7* is involved in the PI3K/AKT and MAPK pathways, as well as in epithelial to mesenchymal transition in ovarian and lung cancers⁶⁶⁻⁶⁹; *GABPB1* encodes the β subunit of a transcription factor and is linked to cell proliferation and poor outcome in renal cell carcinoma⁷⁰, *USP8* has been linked to tumorigenesis and bad prognosis in several cancers^{71,72} and *SPPL2A* has a role in innate and adaptive immunity⁷³.

We hypothesized that the tumor advantage conferred by the focal amplifications was associated with the overexpression of oncogenes targeted by these amplifications. Thus, we first wanted to check whether the expression levels of candidate oncogenes on CFA 30 (*TRPM7*, *USP8*, *GABPB1* and *SPPL2A*) were correlated with the copy number of those genes. In this aim, we analysed the copy number and gene expression of the candidate oncogenes on 47 novel canine MM samples, by performing qPCR and RT-qPCR respectively. A significant positive correlation between gene expression and copy number was found for all of the CFA 30 candidate genes, with *SPPL2A* having the strongest correlation (Spearman coefficient: 0.76, $p=6.67E-9$). Concerning oncogenes

located on CFA 10, the expression levels of *MDM2* and *CDK4* were positively correlated with DNA copy numbers (Spearman coefficient: 0.68, $p=8.03E-7$ and Spearman coefficient: 0.65, $p=1.7E-6$ respectively) (Figure 3A). Finally, western blot analysis with cross-reactive available antibodies showed that *MDM2*, *CDK4* and *GABPB1* focal amplifications were linked to a higher amount of protein (Figure 3B).

Thus, amplifications and chromosomal rearrangements of CFA 10 and CFA 30 lead to overexpression of the targeted genes.

Effect of candidate oncogenes on MM cell proliferation

To evaluate the effect of genes of CFA 30 on cancer cell proliferation, we evaluated the proliferation capability of canine MM cancer cells after silencing of *TRPM7*, *SPPL2A*, *GABPB1* and *USP8*, through colorimetric cell proliferation assays. Expression analysis showed that siRNA reduced oncogenes expression between 52 to 78% (Supplementary table 7) and the silencing of *TRPM7*, *SPPL2A* and *GABPB1* significantly decreased cell proliferation from 20 to 35% (Figure 3C). Since the decrease of cell proliferation was maximum when we silenced those 3 oncogenes, our results suggest that the collective amplification of CFA 30 candidate oncogenes has a positive and cumulative effect on MM cells proliferation.

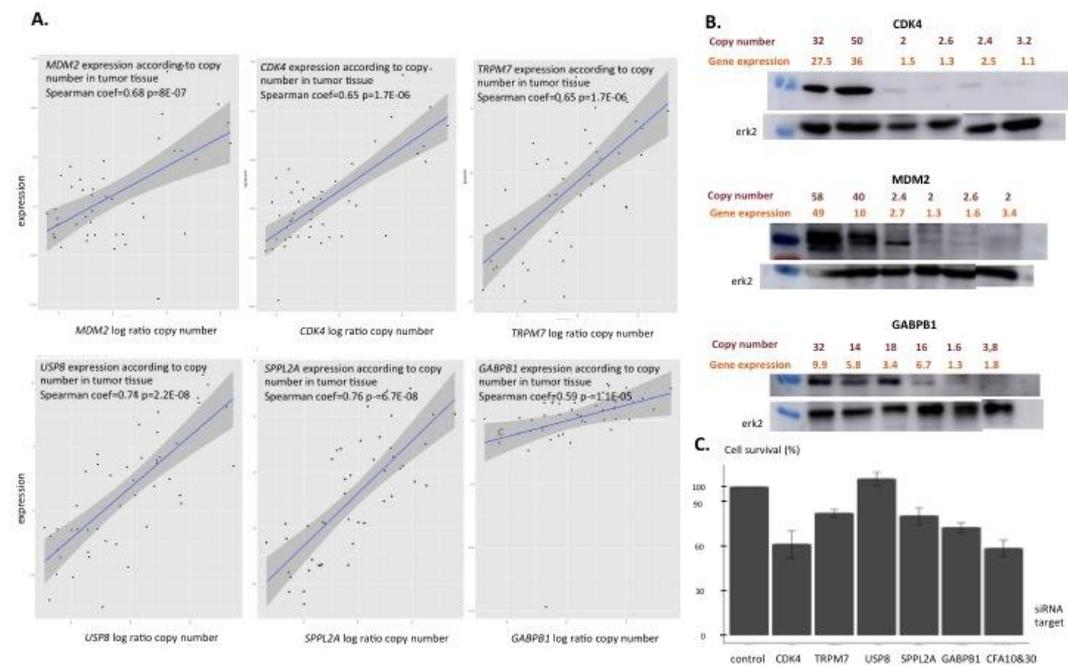


Figure 3: Expression data of candidate genes at mRNA and protein level and impact on cell proliferation. **A.** For the candidate genes of CFA 10 (*MDM2*, *CDK4*) and CFA 30 (*GABPB1*, *TRPM7*, *SPPL2A* and *USP8*), expression was defined by RT-qPCR and was significantly correlated to copy number in tumor tissue (n= 47). **B.** Western blot analysis showing a higher amount of protein in 6 canine MM cell lines having high copy number of *CDK4*, *MDM2* and *GABPB1*. **C.** Cell proliferation assay (Bear cell line) showing the effect of the knockdown (siRNA) of candidate oncogenes of CFA 30 and *CDK4* on cell survival. The knockdown of *CDK4*, *TRPM7*, *GABPB1* and *SPPL2A* had an impact on cell proliferation, and the most important decrease was obtained when allsiRNAs were pooled together.

4- Exploring the value of CFA 30 oncogenes in human melanomas

Compared to UV-induced cutaneous melanomas, human MM and acral melanomas are characterized by high SV content and low mutational burden. Since the canine model of MM allowed us to identify new oncogenes, we explored the involvement of CFA 30 oncogenes in human mucosal and acral melanomas according to published data.

In the Cancer Genome Atlas, we found one case of acral melanoma (TCGA-ER-A19T-01) harbouring a strong focal amplification on chromosome 15 (orthologous to canine chromosome 30) encompassing the candidate oncogenes *SPPL2A*, *USP8*, *TRPM7* and *GABPB1*. This amplification of 29 copies genes was associated with a high overexpression (16.8, 22.68 and 30.25 fold for *TRPM7*, *USP8* and *SPPL2A* respectively). In another cohort of 34 patients affected by acral melanomas of Liang *et al.*, we found one tumor with an intrachromosomal rearrangement on the chromosome 15 targeting the genes *TRPM7* and *MYO5A*⁷⁴.

Concerning MM, two recent studies that performed WGS on 65 and 67 tumor samples showed that the chromosome 15 had frequently a deletion in its proximal part, and more rarely amplifications targeting our candidate region^{15,16}. Moreover, in a cohort of 65 patients with oral melanoma, Zhou *et al.* found that *TRPM7* was one of the 48 significantly mutated genes¹⁶.

Altogether, those findings confirm that our candidate genes are also involved in a subset of human mucosal and acral melanomas.

Discussion

In the last decade, the dog has been established as a strong model for clinical and genetic studies of human MM^{14,24-27}. This work provides a better understanding of the genomic and transcriptomic profiles associated with canine MM by identifying two molecular subgroups of canine patients differing by the influence of their transcriptomic

profiles and structural variants content. Thus, those findings suggest different therapies for each subgroup and point new candidate oncogenes for MM, that should interest human oncological research.

The first molecular subgroup contained a majority of tumours with a relatively low SV content and was characterized by the overexpression of genes related to the microenvironment, and more precisely T-cell response and cytotoxic functions. Thus, the likely presence of an effective T-cell infiltrate in those tumours conjugated with the overexpression of immune checkpoints such as CTLA-4, TIM3 and LAG3 is in favor of a response to immunotherapy, especially checkpoint inhibitors^{59-61,75}. While several studies had linked the tumour mutational burden to a better response to immunotherapy^{63,76,77}, two recent publications showed that the CNA/SV level was also predictive of response to immunotherapy of different types of cancers. Among these cancers, melanoma harbouring a high level of CNAs had the poorest response rate^{59,61}. Ock et al. also suggested that those alterations are stronger predictors of response to immune checkpoint than tumor mutational burden (TMB)⁶¹. These works are suggesting that the first molecular subgroup with low SV identified in the present study should respond to immunotherapy. This hypothesis is further reinforced by the fact that deregulated genes between the two groups are enriched in genes associated with immunotherapy response⁶¹, with a similar expression directions (up and downregulated) when the first subgroup is compared to the second group and responders to non-responders ($p=1.7 \times 10^{-11}$) (Supplementary table 8)⁶¹.

The association of different SV profiles between the two molecular subgroups of MM should underline the involvement of different DNA repair mechanism alterations and thus different tumorigenesis pathways. The second subgroup was characterized by the presence of focal strong amplifications and numerous chromosomal rearrangements ("High SV"). This chromosomal instability has already been described in human melanomas and was associated with a poor outcome in cutaneous and oral melanomas^{16,58}. This aggressiveness was also observed in canine oral melanoma harbouring a focal amplification on CFA 30 (median survival time of 159 days vs. 317 days, $p=0.0005$)⁶². Focal amplifications in melanomas result from complex genomic catastrophes previously described as chromothripsis in human^{15,16,58} and dogs³⁶. The WGS of 3 canine MM cell lines showed that the focal amplifications signed complex rearrangements reminiscent of chromothripsis with chained or clustered breakpoints localized to a subset of chromosomes in regions that also contained copy-number oscillations. Formation of double minutes are expected in chromothripsis to explain high amplification of driver oncogenes. Our FISH analysis revealed large, homogeneously stained derivative chromosomes from CFA 10 (*MDM2*) and CFA 30 (*TRPM7*) and no double minutes chromosomes. Similar pattern of high *MDM2*/*CDK4* amplifications with large derivative chromosomes were observed in human glioblastoma and were assigned to chromothripsis with aggregation of double minutes chromosomes⁶⁵. In human acute myeloid leukemia, such catastrophic events have been linked to somatic TP53 mutation and thus p53 dysfunction⁷⁸. In dogs, around 50% of

MM harbour an amplification of the *TP53* inhibitor *MDM2*⁶², and this alteration is mutually exclusive with *TP53* mutation³⁶. Similarly, inactivating p53 mutations^{14-17,79,80} and *MDM2* amplifications^{14,15,17,66} have been found in human mucosal and acral melanoma, suggesting that p53 pathway dysregulation may be crucial in non-UV induced melanoma development³⁶.

In human oral melanomas, recurrent interchromosomal translocations between HSA 5 (*TERT*) and HSA 12 (*CDK4*) were observed in 39.6% of cases¹⁶. Similarly, over 50% of canine oral MM harbored recurrent focal amplification of the *CDK4/MDM2* oncogenes. But unlike human MM, these amplifications do not co-occurred with *TERT* DNA amplification although *TERT* RNA was significantly over-expressed in the “high SV” cases ($\log_2\text{ratio} = 2.54$, $p\text{-value} = 6.7 \times 10^{-3}$). These results suggest that these focal amplification in human and canine MM leads to the same driving oncogenic pathway activations. In human cutaneous melanoma, promoter mutations enhance *TERT* expression⁸¹, and those mutations create a *de novo* binding site for the transcription factor *GABP* heterotetramer activating *TERT* transcription^{82,83}. While in dogs *GABPB1* is overexpressed with CFA 30 amplification no promoter mutations were found on the four canine cell lines characterized by WGS, and in the analysis of Hendricks et al. on 5 canine MM to explain *TERT* overexpression³⁶. Other mechanisms could be involved such as epigenetic regulation or activation of NF κ B or JAK/STAT^{81,84,85}. Regarding the focal amplifications of CFA 30 16-17 Mb region, the corresponding amplifications of HSA 15 were observed in few human melanomas^{58,74} and associated with overexpression of the amplified genes. Nevertheless, based on the high recurrence of these amplifications in canine MM (~50%⁶²), this region should contain important oncogenes for melanoma development. The expression level of candidate oncogenes of CFA 30 was correlated to copy number and this didn't allow us to refine the list. *TRPM7* has been recently involved in several human cancers^{68,69} and was found significantly mutated in human oral melanomas¹⁶, and involved in an intrachromosomal translocation in an acral melanoma⁷⁴. Moreover, we showed that this gene was involved in canine MM cell proliferation. Thus, this gene appears as a key oncogene in canine MM and in a subset of non UV-induced melanomas. Taking into account that *GABPB1* and *SPPL2A* are also involved in canine MM cell proliferation, those results suggest that the CFA 30 (16-17 Mb region) contains several oncogenes for MM development.

Conclusion

The domestic dog is increasingly under consideration as a genetic system for the study of human cancers with underlying genetic components. In this study we identified two molecular subgroups of MM, linked to different therapeutic options thanks to the canine model. Moreover, this model allowed us to point out several oncogenes for MM development, particularly *TRPM7* involved in rare human non UV-induced melanomas.

Those results are important to permit an early sub set analysis and improve matching for clinical trials of tumors with likely differing clinical outcomes.

References

1. Williams, M. D. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Mucosal Melanomas. *Head Neck Pathol* 11, 110–117 (2017).
2. Yde, S. S., Sjoegren, P., Heje, M. & Stolle, L. B. Mucosal Melanoma: a Literature Review. *Curr Oncol Rep* 20, 28 (2018).
3. Lerner, B. A., Stewart, L. A., Horowitz, D. P. & Carvajal, R. D. Mucosal Melanoma: New Insights and Therapeutic Options for a Unique and Aggressive Disease. *Oncology (Williston Park, N.Y.)* 31, e23–e32 (2017).
4. Chi, Z. *et al.* Clinical presentation, histology, and prognoses of malignant melanoma in ethnic Chinese: a study of 522 consecutive cases. *BMC Cancer* 11, 85 (2011).
5. Altieri, L., Eguchi, M., Peng, D. H. & Cockburn, M. Predictors of mucosal melanoma survival in a population-based setting. *J. Am. Acad. Dermatol.* 81, 136-142.e2 (2019).
6. Kuk, D. *et al.* Prognosis of Mucosal, Uveal, Acral, Nonacral Cutaneous, and Unknown Primary Melanoma From the Time of First Metastasis. *Oncologist* 21, 848–854 (2016).
7. Bishop, K. D. & Olszewski, A. J. Epidemiology and survival outcomes of ocular and mucosal melanomas: a population-based analysis. *Int. J. Cancer* 134, 2961–2971 (2014).
8. Tacastacas, J. D. *et al.* Update on primary mucosal melanoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 71, 366–375 (2014).

9. D'Angelo, S. P. *et al.* Efficacy and Safety of Nivolumab Alone or in Combination With Ipilimumab in Patients With Mucosal Melanoma: A Pooled Analysis. *J Clin Oncol* 35, 226–235 (2017).
10. Schaefer, T., Satzger, I. & Gutzmer, R. Clinics, prognosis and new therapeutic options in patients with mucosal melanoma: A retrospective analysis of 75 patients. *Medicine (Baltimore)* 96, e5753 (2017).
11. Wang, X., Si, L. & Guo, J. Treatment algorithm of metastatic mucosal melanoma. *Chin Clin Oncol* 3, 38 (2014).
12. Furney, S. J. *et al.* Genome sequencing of mucosal melanomas reveals that they are driven by distinct mechanisms from cutaneous melanoma. *The Journal of Pathology* 230, 261–269 (2013).
13. Hayward, N. K. *et al.* Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature* 545, 175–180 (2017).
14. Wong, K. *et al.* Cross-species genomic landscape comparison of human mucosal melanoma with canine oral and equine melanoma. *Nat Commun* 10, 353 (2019).
15. Newell, F. *et al.* Whole-genome landscape of mucosal melanoma reveals diverse drivers and therapeutic targets. *Nat Commun* 10, (2019).
16. Zhou, R. *et al.* Analysis of Mucosal Melanoma Whole-Genome Landscapes Reveals Clinically Relevant Genomic Aberrations. *Clin. Cancer Res.* 25, 3548–3560 (2019).
17. Lyu, J. *et al.* Whole-exome sequencing of oral mucosal melanoma reveals mutational profile and therapeutic targets. *The Journal of Pathology* 244, 358–366 (2018).
18. Xu, L. *et al.* Frequent genetic aberrations in the cell cycle related genes in mucosal melanoma indicate the potential for targeted therapy. *J Transl Med* 17, 245 (2019).

19. Hintzsch, J. D. *et al.* Whole-exome sequencing identifies recurrent SF3B1 R625 mutation and comutation of NF1 and KIT in mucosal melanoma. *Melanoma Res* 27, 189–199 (2017).
20. Gardner, H. L., Fenger, J. M. & London, C. A. Dogs as a Model for Cancer. *Annu Rev Anim Biosci* 4, 199–222 (2016).
21. Gordon, I., Paoloni, M., Mazcko, C. & Khanna, C. The Comparative Oncology Trials Consortium: Using Spontaneously Occurring Cancers in Dogs to Inform the Cancer Drug Development Pathway. *PLoS Med* 6, (2009).
22. Paoloni, M. C. & Khanna, C. Comparative Oncology Today. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 37, 1023–v (2007).
23. Schiffman, J. D. & Breen, M. Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370, (2015).
24. Simpson, R. M. *et al.* Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research* 27, 37–47 (2014).
25. Gillard, M. *et al.* Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. *Pigment Cell & Melanoma Research* 27, 90–102 (2014).
26. Prouteau, A. & André, C. Canine Melanomas as Models for Human Melanomas: Clinical, Histological, and Genetic Comparison. *Genes (Basel)* 10, (2019).
27. Hernandez, B. *et al.* Naturally Occurring Canine Melanoma as a Predictive Comparative Oncology Model for Human Mucosal and Other Triple Wild-Type Melanomas. *Int J Mol Sci* 19, (2018).
28. Weyden, L. van der *et al.* Cross-species models of human melanoma. *The Journal of Pathology* 238, 152–165 (2016).

29. Atherton, M. J., Morris, J. S., McDermott, M. R. & Lichty, B. D. Cancer immunology and canine malignant melanoma: A comparative review. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 169, 15–26 (2016).
30. Ottnod, J. M. *et al.* A retrospective analysis of the efficacy of Oncept vaccine for the adjunct treatment of canine oral malignant melanoma. *Veterinary and Comparative Oncology* 11, 219–229 (2013).
31. Verganti, S. *et al.* Use of Oncept melanoma vaccine in 69 canine oral malignant melanomas in the UK. *J Small Anim Pract* 58, 10–16 (2017).
32. McLean, J. L. & Lobetti, R. G. Use of the melanoma vaccine in 38 dogs: The South African experience. *J S Afr Vet Assoc* 86, 1246 (2015).
33. Bergman, P. J. *et al.* Long-term survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogeneic human tyrosinase: a phase I trial. *Clin. Cancer Res.* 9, 1284–1290 (2003).
34. Grosenbaugh, D. A. *et al.* Safety and efficacy of a xenogeneic DNA vaccine encoding for human tyrosinase as adjunctive treatment for oral malignant melanoma in dogs following surgical excision of the primary tumor. *American Journal of Veterinary Research* 72, 1631–1638 (2011).
35. Poorman, K. *et al.* Comparative cytogenetic characterization of primary canine melanocytic lesions using array CGH and fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Res* 23, 171–186 (2015).
36. Hendricks, W. P. D. *et al.* Somatic inactivating PTPRJ mutations and dysregulated pathways identified in canine malignant melanoma by integrated comparative genomic analysis. *PLoS Genetics* 14, e1007589 (2018).
37. Hitte, C. *et al.* Integrated Genetic Analysis of Canine Mucosal Melanoma from Three Predisposed Breeds. (In prep.).

38. Brocca, G. *et al.* Array Comparative Genomic Hybridization Analysis Reveals Significantly Enriched Pathways in Canine Oral Melanoma. *Front. Oncol.* 9, (2019).
39. Le Béguec, C. *et al.* Characterisation and functional predictions of canine long non-coding RNAs. *Sci Rep* 8, (2018).
40. Ulvé, R. *et al.* Discovery of Human-Similar Gene Fusions in Canine Cancers. *Cancer Res.* 77, 5721–5727 (2017).
41. Hedan, B. *et al.* Molecular cytogenetic characterization of canine histiocytic sarcoma: A spontaneous model for human histiocytic cancer identifies deletion of tumor suppressor genes and highlights influence of genetic background on tumor behavior. *BMC Cancer* 11, 201 (2011).
42. Hitte, C. *et al.* Genome-Wide Analysis of Long Non-Coding RNA Profiles in Canine Oral Melanomas. *Genes (Basel)* 10, (2019).
43. Wucher, V. *et al.* FEELnc: a tool for long non-coding RNA annotation and its application to the dog transcriptome. *Nucleic Acids Res* 45, e57 (2017).
44. Lindblad-Toh, K. *et al.* Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438, 803–819 (2005).
45. Djebali, S. *et al.* Bioinformatics Pipeline for Transcriptome Sequencing Analysis. *Methods Mol. Biol.* 1468, 201–219 (2017).
46. Dobin, A. *et al.* STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21 (2013).
47. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550 (2014).
48. Gaujoux, R. & Seoighe, C. A flexible R package for nonnegative matrix factorization. *BMC Bioinformatics* 11, 367 (2010).

49. Raudvere, U. *et al.* g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res.* 47, W191–W198 (2019).
50. Gu, Z., Eils, R. & Schlesner, M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* 32, 2847–2849 (2016).
51. Patch, A.-M. *et al.* Germline and somatic variant identification using BGISEQ-500 and HiSeq X Ten whole genome sequencing. *PLOS ONE* 13, e0190264 (2018).
52. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754–1760 (2009).
53. McLaren, W. *et al.* The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol.* 17, 122 (2016).
54. Rausch, T. *et al.* DELLY: structural variant discovery by integrated paired-end and split-read analysis. *Bioinformatics* 28, i333–i339 (2012).
55. Gu, Z., Gu, L., Eils, R., Schlesner, M. & Brors, B. circlize Implements and enhances circular visualization in R. *Bioinformatics* 30, 2811–2812 (2014).
56. Korbelt, J. O. & Campbell, P. J. Criteria for inference of chromothripsis in cancer genomes. *Cell* 152, 1226–1236 (2013).
57. Govind, S. K. *et al.* ShatterProof: operational detection and quantification of chromothripsis. *BMC Bioinformatics* 15, 78 (2014).
58. Hirsch, D. *et al.* Chromothripsis and focal copy number alterations determine poor outcome in malignant melanoma. *Cancer Res.* 73, 1454–1460 (2013).
59. Davoli, T., Uno, H., Wooten, E. C. & Elledge, S. J. Tumor aneuploidy correlates with markers of immune evasion and with reduced response to immunotherapy. *Science* 355, (2017).
60. Galon, J. & Bruni, D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat Rev Drug Discov* 18, 197–218 (2019).

61. Ock, C.-Y. *et al.* Genomic landscape associated with potential response to anti-CTLA-4 treatment in cancers. *Nat Commun* 8, (2017).
62. Prouteau, A. *et al.* Prognostic value of somatic focal amplifications on chromosome 30 in canine oral melanoma. *Vet Comp Oncol* (2019) doi:10.1111/vco.12536.
63. Keenan, T. E., Burke, K. P. & Van Allen, E. M. Genomic correlates of response to immune checkpoint blockade. *Nat. Med.* 25, 389–402 (2019).
64. Rode, A., Maass, K. K., Willmund, K. V., Lichter, P. & Ernst, A. Chromothripsis in cancer cells: An update. *Int. J. Cancer* 138, 2322–2333 (2016).
65. Furgason, J. M. *et al.* Whole genome sequence analysis links chromothripsis to EGFR, MDM2, MDM4, and CDK4 amplification in glioblastoma. *Oncoscience* 2, 618–628 (2015).
66. Liu, K. *et al.* TRPM7 overexpression enhances the cancer stem cell-like and metastatic phenotypes of lung cancer through modulation of the Hsp90 α /uPA/MMP2 signaling pathway. *BMC Cancer* 18, (2018).
67. Liu, L. *et al.* TRPM7 promotes the epithelial–mesenchymal transition in ovarian cancer through the calcium-related PI3K / AKT oncogenic signaling. *J Exp Clin Cancer Res* 38, (2019).
68. Meng, X. *et al.* TRPM7 mediates breast cancer cell migration and invasion through the MAPK pathway. *Cancer Letters* 333, 96–102 (2013).
69. Yee, N. S. Role of TRPM7 in Cancer: Potential as Molecular Biomarker and Therapeutic Target. *Pharmaceuticals (Basel)* 10, (2017).
70. Chen, S.-C. *et al.* Knockdown of GA-binding protein subunit β 1 inhibits cell proliferation via p21 induction in renal cell carcinoma. *International Journal of Oncology* 53, 886–894 (2018).

71. Shin, S. *et al.* Deubiquitylation and stabilization of Notch1 intracellular domain by ubiquitin-specific protease 8 enhance tumorigenesis in breast cancer. *Cell Death Differ* 27, 1341–1354 (2020).
72. Yan, M. *et al.* High Expression of Ubiquitin-Specific Protease 8 (USP8) Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Cervical Squamous Cell Carcinoma. *Med Sci Monit* 24, 4934–4943 (2018).
73. Kong, X.-F. *et al.* Disruption of an anti-mycobacterial circuit between dendritic and Th cells in human SPPL2a deficiency. *Nat Immunol* 19, 973–985 (2018).
74. Liang, W. S. *et al.* Integrated genomic analyses reveal frequent TERT aberrations in acral melanoma. *Genome Res* 27, 524–532 (2017).
75. Sweis, R. F. *et al.* Molecular Drivers of the Non-T-cell-Inflamed Tumor Microenvironment in Urothelial Bladder Cancer. *Cancer Immunol Res* 4, 563–568 (2016).
76. Chan, T. A. *et al.* Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic. *Ann. Oncol.* 30, 44–56 (2019).
77. Goodman, A. M. *et al.* Tumor Mutational Burden as an Independent Predictor of Response to Immunotherapy in Diverse Cancers. *Mol. Cancer Ther.* 16, 2598–2608 (2017).
78. Rausch, T. *et al.* Genome sequencing of pediatric medulloblastoma links catastrophic DNA rearrangements with TP53 mutations. *Cell* 148, 59–71 (2012).
79. Yeh, I. *et al.* Targeted Genomic Profiling of Acral Melanoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 111, 1068–1077 (2019).
80. Forschner, A. *et al.* MDM2, MDM4 and EGFR Amplifications and Hyperprogression in Metastatic Acral and Mucosal Melanoma. *Cancers (Basel)* 12, (2020).

81. Akincilar, S. C., Unal, B. & Tergaonkar, V. Reactivation of telomerase in cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 1659–1670 (2016).
82. Bell, R. J. A. *et al.* The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer. *Science* 348, 1036–1039 (2015).
83. Mancini, A. *et al.* Disruption of the β 1L isoform of GABP reverses glioblastoma replicative immortality in a TERT promoter mutation-dependent manner. *Cancer Cell* 34, 513-528.e8 (2018).
84. Barthel, F. P. *et al.* Systematic analysis of telomere length and somatic alterations in 31 cancer types. *Nat. Genet.* 49, 349–357 (2017).
85. Yuan, X., Larsson, C. & Xu, D. Mechanisms underlying the activation of TERT transcription and telomerase activity in human cancer: old actors and new players. *Oncogene* 38, 6172–6183 (2019).

V. L'ADN tumoral circulant, biomarqueur de cancers chez le chien

ARTICLE 4

Interest of circulating tumor DNA as a biomarker for canine cancers: illustration in histiocytic sarcoma, oral malignant melanoma and multicentric lymphoma.

Prouteau et al., submitted to Scientific Report

Parallèlement au projet sur les mélanomes canins, je me suis investie dans un projet plus appliqué à la médecine vétérinaire concernant l'étude de l'ADN tumoral circulant (ADNct) dans des cancers canins. En plus de son potentiel intérêt en oncologie vétérinaire, ce biomarqueur pourrait être intéressant à étudier au cours d'essais cliniques réalisés chez le chien, en vue d'un transfert chez l'homme.

Comme mentionné dans la partie d'introduction, les cellules tumorales libèrent de l'ADN tumoral libre dans différents liquides physiologiques, et particulièrement le sang. Cet ADN tumoral circulant (ADNct) sert à présent de biomarqueur de cancer chez l'homme, et s'inscrit parfaitement dans le concept de « biopsie liquide », pour un diagnostic rapide et non invasif²⁸⁰.

Les applications cliniques de l'ADN tumoral circulant chez l'homme sont multiples, que ce soit pour le diagnostic moléculaire dans le but de définir le traitement adapté, l'évaluation du pronostic, le suivi après chirurgie à visée curative, l'évaluation précoce de l'efficacité thérapeutique ou de la progression de la maladie²⁸¹. De nombreuses études ont été publiées ces dernières années dans ces différentes indications et ont abouti à la commercialisation de deux tests en Europe:

- La recherche des mutations du gène *EGFR* chez les patients atteints de cancer pulmonaire non à petites cellules, qui permet le diagnostic dans des cas où la biopsie tissulaire est impossible, mais aussi qui prédit une réponse aux inhibiteurs de tyrosines kinase EGFR. Ce test est le premier et le seul actuellement approuvé par la Food and Drug Administration (FDA)^{282,283}.
- La recherche des mutations du gène *KRAS* chez les patients atteints de carcinome colorectal, qui traduit une résistance aux anticorps anti-EGFR^{281,282}.

En médecine vétérinaire, l'ADN libre circulant dans le plasma a été de plus en plus étudié ces dernières années²⁸⁴⁻²⁸⁸, de façon non spécifique dans différentes pathologies. A ce jour, seules 3 études se sont intéressées à l'ADN tumoral circulant (ADNct), marqueur spécifique de cancers, et à ses potentielles applications cliniques chez le chien^{95,289,290}. Compte tenu des travaux menés au laboratoire sur la génétique de cancers homologues entre l'homme et le chien et de mon intérêt pour l'oncologie vétérinaire, j'ai exploré le potentiel de l'ADN tumoral circulant dans 3 cancers chez le chien : sarcome histiocytaire (SH), lymphome et mélanome buccal.

Notre étude comportait deux objectifs:

- Démontrer que différents types d'altérations génétiques somatiques (mutations ponctuelles, réarrangements chromosomiques et amplifications) étaient présents dans le plasma de chiens atteints de SH, lymphome et mélanome buccal.
- Illustrer l'intérêt de ce biomarqueur pour le diagnostic avec l'exemple du SH, et pour le suivi de la maladie résiduelle avec l'exemple du lymphome.

Pour répondre au premier objectif, nous avons collecté le tissu tumoral et le plasma de chiens atteints de SH (n=45), lymphome B multicentrique de haut-grade

(n=14) et de mélanome buccal (n=10). Après en avoir extrait l'ADN, nous avons utilisé la technique de digital droplet PCR (ddPCR), (Technologie Biorad, en collaboration avec le Dr. J. Denis de la Pitié Salpêtrière à Paris) pour rechercher les mutations de *PTPN11* (E76K et G503V) récurrentes dans les cas de SH (Hédan et al. 2020) et les CNA de *MDM2* et *TRPM7* dans les cas de mélanome. Nous avons utilisé la technique PARR dans les cas de lymphome pour détecter le réarrangement VDJ spécifique du clone tumoral de chaque chien atteint.

La détection des mutations de *PTPN11* par ddPCR dans le plasma des 45 cas de SH avait une sensibilité de 91,3% et une spécificité de 100%. Concernant les lymphomes, la PARR a détecté de l'ADNct dans le plasma, dans 92,3% des 14 cas analysés. Enfin, des CNA de *MDM2* et *TRPM7* ont été retrouvés dans le plasma de 25% des 8 cas de mélanomes buccaux ayant ces altérations dans la tumeur.

Nous avons ensuite illustré deux applications potentielles de ces tests en médecine vétérinaire. Sur une cohorte de 133 chiens dont 49 atteints de SH, nous avons montré que la détection des mutations de *PTPN11* avait une sensibilité de 42,8% et une spécificité de 98,8% pour le diagnostic de SH. La sensibilité du test dépend de la forme clinique car la mutation est associée à la forme interne et disséminée (Hédan et al. 2020), et elle était maximale à 77%, dans les formes pulmonaires ou médiastinales. Ce test pourrait être intéressant en médecine vétérinaire pour confirmer une suspicion de SH, en cas de masse difficile à biopsier, pour effectuer un suivi thérapeutique ou en dépistage précoce des races à risque. L'ADNct chez le chien est aussi un biomarqueur de suivi intéressant. Sur 4 chiens atteints de lymphome multicentrique, nous avons choisi des amorces spécifiques du réarrangement du récepteur à l'antigène du lymphome. Avec la technique de ddPCR, nous avons ensuite suivi la cinétique de ce biomarqueur dans le temps, au cours du traitement de chimiothérapie des 4 chiens. Avant l'initiation de la chimiothérapie, 4/4 chiens présentaient de l'ADNct dans leur plasma à une quantité moyenne de 15,5% par rapport à l'ADN total libre. La cinétique de ce biomarqueur était corrélée à l'évaluation clinique (non détection lors de réponse complète, persistance lors de réponse partielle), et dans un cas, l'ADNct a été détecté 42 jours avant la date de rechute clinique. Ces résultats montrent que ce biomarqueur est performant pour évaluer la réponse au traitement chez les chiens atteints de lymphome, et potentiellement pour anticiper une rechute, même si cela doit être démontré sur un plus grand nombre de cas.

Chez le chien, en médecine vétérinaire, ce type de test n'est pas utilisé en routine et aucun test n'a été développé à ce jour sur le plasma. En recherche, différents biomarqueurs sanguins ont été étudiés chez des chiens sains et atteints de cancer, avec des résultats prometteurs, comme les cellules tumorales circulantes²⁹¹, la thymidine kinase I sérique²⁹² ou le rapport sanguin ⁶⁵Cu and ⁶³Cu²⁹³. Quelques études ont montré que l'ADNct était retrouvé dans le plasma de chiens atteints de carcinome pulmonaire⁹⁵, de carcinome mammaire²⁹⁰ et de carcinomes urothéliaux²⁸⁹. Sur les carcinomes mammaires, Beck *et al.* ont montré dans un cas que l'ADNct était détecté 1 an après la chirurgie d'exérèse, signant en fait la présence de métastases. L'étude de Tagawa *et al.* sur 15 chiens atteints de carcinomes urothéliaux a montré que la quantité d'ADNct était corrélée à l'évolution clinique. Ces résultats montrent que, comme chez l'homme,

l'ADNct est un biomarqueur prometteur en oncologie vétérinaire avec de nombreuses applications cliniques à développer.

Interest of circulating tumor DNA as a biomarker for canine cancers: illustration in histiocytic sarcoma, oral malignant melanoma and multicentric lymphoma

Short title: Tumor DNA in plasma of dogs with cancers

Anaïs Prouteau¹, Jérôme Alexandre Denis², Pauline De Fornel³, Edouard Cadieu¹, Thomas Derrien¹, Camille Kergal¹, Nadine Botherel¹, Ronan Ulvé¹, Mélanie Rault¹, Amira Bouzidi², Romain François³, Laetitia Dorso⁴, Alexandra Lespagnol⁵, Patrick Devauchelle², Jérôme Abadie⁴, Catherine André¹ and Benoît Hédan*¹

¹CNRS-University of Rennes 1, UMR6290, Institute of Genetics and Development of Rennes, Faculty of Medicine, SFR Biosit, Rennes, France

²Sorbonne University, INSERM UMR_S938, APHP Pitié-Salpêtrière Hospital, Endocrinology and oncology Biochemistry department, Paris, France

³Micen Vet, Créteil, France

⁴Oniris, Laboniris - Department of Biology, Pathology and Food Sciences, Nantes, France

⁵Laboratory of somatic genetic of cancers, Hospital of Rennes, France

*Corresponding authors:

Benoît Hédan, CNRS-University of Rennes 1, UMR6290, Institute of Genetics and Development of Rennes, Faculty of Medicine, SFR Biosit, Rennes, France.

Email: benoit.hedan@univ-rennes1.fr

Abstract

Circulating tumor DNA (ctDNA) has become an attractive biomarker in human oncology and may be informative in cancer-affected dogs. By performing ddPCR or PARR methods, we detected tumor-specific point mutations, copy number alterations and chromosomal rearrangements in the plasma of cancer-affected dogs. It allowed the detection of ctDNA in 2/8 (25%) oral malignant melanoma cases, 12/13 (92.3%) lymphoma cases and 21/23 (91.3%) histiocytic sarcoma (HS) cases. The value of ctDNA to diagnose HS was explored in 133 dogs including 49 with HS. In this cohort, screening recurrent *PTPN11* mutations in plasma had a specificity of 98.8%, and a sensitivity between 42.8-77% according to HS clinical presentation, being higher in internal forms, especially with pulmonary location. Regarding lymphoma, the follow-up of four dogs showed that the minimal residual disease detection by targeting lymphoma-specific antigen receptor rearrangement in the plasma was concordant with the clinical evaluation. Moreover, ctDNA analysis appeared interesting to assess treatment response and to predict relapse.

This study shows that ctDNA is detectable in the plasma of cancer-affected dogs and is a relevant biomarker for diagnosis and clinical follow-up. With a growing interest in

integrating natural canine tumors to explore new therapies, this biomarker appears promising in comparative oncology research.

Key words: cancer, dog, circulating tumor DNA, histiocytic sarcoma, liquid biopsy, minimal residual disease, lymphoma

Introduction

Cell-free DNA (cfDNA) circulates in plasma and other body fluids such as urine, cerebrospinal fluid, pleural fluid and saliva as short double-stranded DNA fragments of about 160 base pairs. In healthy patients, cfDNA is released during cell deaths like apoptosis or necrosis, or by active secretion, and comes mainly from the hematopoietic lineage with minimal contributions from other tissues¹⁻⁴. Since its first discovery in human in 1948⁵, it was shown that cfDNA in the blood reflects various pathological processes such as inflammatory disease, sepsis, trauma, stroke and cancer, and its concentration is correlated with disease severity and prognosis^{2,6-8}. In cancer patients, a part of cfDNA is derived from tumor cells, and is referred to circulating tumor DNA (ctDNA). ctDNA carries tumor-related genetic and epigenetic alterations that are relevant to cancer development, progression and resistance to therapy⁸.

In human medicine, next-generation sequencing (NGS) improved the knowledge of these genetic alterations and thus their identification in ctDNA. These alterations include for example mutations of tumor suppressor genes such as *TP53* in head and neck cancers⁹, mutations in oncogenes such as *EGFR* or *KRAS* in non small cell lung cancer^{10,11}, copy number alterations (CNA), and chromosomal rearrangement like the one affecting the variable-diversity-joining (VDJ) receptor gene sequences in lymphoma¹². In the last decades, different strategies, including the study of loss of heterozygosity (LOH), DNA methylation, DNA integrity, NGS, or digital PCR were successfully developed to detect somatic alterations in patient's plasma, making ctDNA a new powerful cancer biomarker^{8,13}. In addition to being a minimally invasive and robust approach, analysis of ctDNA has many clinical applications such as early cancer detection, prognosis, real-time monitoring of treatment response and identification of appropriate therapeutic targets and resistance mechanisms^{2,8,10,11,14}.

In veterinary medicine, cfDNA has recently gained attention and more particularly in dogs. As in human medicine, it has been found that cfDNA has a short half-life in canine plasma (around 5 hours)¹⁵ and its concentration is increased in various diseases such as immune-mediated hemolytic anemia¹⁶, sepsis, severe trauma or inflammation¹⁷⁻¹⁹. In dogs, cfDNA concentration is also correlated with the severity of the disease and prognosis¹⁸. It is also of high interest in canine cancers. It has been shown that dogs with lymphoid neoplasia and mammary carcinoma had a higher amount of cfDNA in plasma than controls^{19,20}, although this increase is not specific to cancer. Over the last 10 years, recurrent somatic alterations have been described in several canine cancers such as multicentric lymphoma^{21,22}, histiocytic sarcoma (HS)²³⁻²⁷ and oral malignant melanoma (OMM)²⁸⁻³². Detection of such cancer-specific recurrent somatic alterations in ctDNA may allow to develop new minimally invasive biomarkers for diagnosis, prognosis and to assess treatment-response in veterinary medicine. In addition to those clinical considerations, tests based on ctDNA detection will be useful in

the comparative oncology research field. Indeed, naturally occurring canine cancers have become relevant models for the study of rare human cancers, from the discovery of mutations to the development and the screening of targeted therapies ²⁷.

The first objective of this study is to look for the presence of ctDNA and to confirm that several types of recurrent somatic alterations are detectable in the plasma of dogs with the example of three malignancies representing exceptional models for human counterpart: histiocytic sarcoma ³³, multicentric lymphoma ³⁴ and oral malignant melanoma ³⁵. The second aim is to evaluate whether ctDNA can be used in veterinary medicine for diagnosis and response to treatment evaluation, using for proof of concept the diagnosis of histiocytic sarcoma and the monitoring of minimal residual disease in lymphoma-affected dogs treated by chemotherapy.

Material and methods

Sample collection

Blood and tissue biopsy samples from dogs were collected by veterinarians through the Cani-DNA BRC (<http://dog-genetics.genouest.org>) which is part of the CRB-Anim infrastructure (PIA1 2012-2022).

For each dog, between 2 to 5 ml of blood was taken during a routine examination or during the standard care pathway of the dog and was collected in ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) or Streck tubes (Streck cell-free DNA BCT genomax). The plasma was separated from blood cells and cell debris by centrifugations at 1500 g for 10 minutes and then 16 000 g for 10 minutes, and was stored at -20°C before DNA purification. This study working with canine samples was approved by the CNRS ethical board, France (35-238-13).

All the diagnoses of cancer were confirmed by histopathology or cytology by a board-certified pathologist (JA, LD).

Case selection for monitoring of minimal residual disease (MRD)

The inclusion of dogs with a clinical follow-up to study minimal residual disease was done from October 2017 to October 2018. Dogs were prospectively enrolled in the study if they had a diagnosis of high-grade B-cell multicentric lymphoma confirmed by histopathology and if they started a chemotherapy protocol. Clinical staging was done on the basis of clinical examination, tomodensitometry and fine needle aspiration for detecting liver, spleen and thorax involvement, and myelogram for evaluating bone marrow infiltration. Evaluation of response to treatment and relapse was performed at each visit according to the criteria described for multicentric lymphoma by VCOG (Veterinary cooperative oncology group) ³⁶, based on physical examination (lymph nodes measurement and appreciation of the clinician) and additional tests at the discretion of the clinician. Plasma was sampled before chemotherapy administration every week during the first month and then every 2-4 weeks until relapse or death.

DNA extraction

Tumor DNA was extracted with DNA Nucleospin Tissue or FFPE Tissue DNA kits (Macherey Nagel, Düren, Germany), according to the manufacturer protocol, when

RNAlater or FFPE tumor samples were available. Cell-free circulating DNA was extracted from 2 ml of plasma with NucleoSnap® DNA Plasma (Macherey Nagel, Düren, Germany), and eluted in 50µL of elution buffer according to the manufacturer's protocol. When less than 2 ml of plasma was available, the volume was completed with PBS (Life Gibco).

PCR for Antigen Receptor Rearrangements (PARR analysis)

For dogs with a diagnosis of high-grade multicentric lymphoma, paired samples (tumor DNA and plasma DNA) were analyzed by PCR for Antigen Receptor Rearrangement (PARR). M13-tailed primers were used to target immunoglobulin heavy chain genes for B lymphocytes and the T-cell receptor γ for T lymphocytes (Table1)^{18,37,38}. Amplification was achieved with the Type-it Multiplex PCR Master Mix (Qiagen), as previously described³⁹, and with the following conditions: denaturation at 92°C for 5 min, 35 cycles of 95 °C for 8 sec, 49 °C for 10 sec, and 72 °C for 15 sec (for IgH major, IgH minor and TCR Burnett), or with 30 cycles of 95°C for 45 sec, 48°C for 30 sec and 72 °C for 15 sec (for IgH Tamura, T Yagihara VA and Vb)³⁹. The PCR amplicons were separated on a 370 ABI sequencer (Applied Biosystems) and Clonal profiles were determined with the Genemapper Software.

Design of primers for digital droplet PCR (ddPCR)

ddPCR assays were designed using Biorad Droplet Digital PCR Assays and tools available online (<https://www.bio-rad.com/digital-assays/#/assays-create/mutation>) or copy number determination Biorad Droplet Digital PCR Assays (<https://www.bio-rad.com/digital-assays/#/assays-create/cnd>), for the detection of *PTPN11* mutations (E76K and G503V) or *MDM2*, *TRPM7*, CFA 9 copy number respectively. The region of CFA 9 was used as internal control as it was previously shown to have the higher stability of copy number in OMM.^{28,40} The Biorad **MIQE Context** locations of primers and probes are shown in Table 1.

For each dog with multicentric lymphoma examined for MRD, a PARR assay was performed on the tumor as described above, to isolate the clonal antigen receptor rearrangement. Then, the PCR product was sequenced with a 370 ABI sequencer using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). The sequences overlapping the CDR3 (Complementarity-determining region 3) were used to design clone specific primers and FAM fluorescent probes for ddPCR analysis, thanks to PrimerQuest Tool (IDT). A region on the CFA 26 was used as a control gene because it was previously found to be relatively stable in canine lymphomas⁴¹ (Table1).

ddPCR protocol and analysis

The ddPCRs assay comprised a total volume of 20 µL containing on the one hand the droplet Supermix (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) at final concentration of 500 nM of forward and reverse primers and 250 nM of VIC- and FAM-labeled probes and in the other hand the DNA input containing 8 µL of eluted cfDNA (mean: 15.2 ng) or 80 ng of tumor tissue DNA isolated from each patient sample. Next, the PCR reaction mixtures were partitioned into an emulsion of ~20,000 droplets using a QX200™ ddPCR droplet generation system. PCR was conducted using the GeneAmp PCR system 9700 thermocycler (Applied biosystems Foster City, CA, USA) using the following program:

95°C for 10 min; 40 cycles of 94°C for 30 sec and elongation temperature for 60 sec; 98°C for 10 min. Post PCR, droplets were analyzed on QX200™ Droplet Reader (Bio-Rad). The concentrations of targeted sequences were calculated on the Poisson distribution using QuantaSoft™ software Version 1.7.4 (Bio-Rad). Wild-type (wt) control DNA and non-template control reactions were included in each experiment. To ensure experiment quality, wells with total droplet counts of less than 8,000 were considered invalid and experiment was performed a second time to obtain a sufficient number of droplets.

PTPN11 mutations frequency in cfDNA was determined by calculating the fraction of the *PTPN11* mutated molecule concentration A (copies/μl) to the *PTPN11*wt reference molecule concentration B (copies/μl) (fraction= $A/(A+B)$). False positive rate estimation was determined by performing three experiments for each assay using the wild-type only samples, where total amounts of detected mutated positive droplets determined thresholds above which positive droplets in patient samples were to be considered as true positive. According to input quantity, only reactions containing at least one, two, three and four positive droplets for [0-7ng], [7-15ng], [15-100ng] and >100 ng input quantity respectively were classified as positive in the ddPCR analysis.

Concerning *MDM2* and *TRPM7* in canine OMM, copy number was determined using QuantaSoft analysis software (version 1.7.4, Bio-Rad) that calculated the ratio of the target molecule concentration A (copies/μl) to the reference molecule concentration B (copies/μl) multiplied by the number of reference copies in the canine genome (copy number = $(A/B)*2$). Those genes were considered amplified when the copy number was ≥ 3 and ratio's confidence interval was > 2 . The same method was used to quantify MRD in the plasma of lymphoma-affected dogs (A: lymphoma-specific antigen receptor rearrangement and B: CFA 26 region, control, and $ctDNA\% = (A/B)*100$).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R studio software Version 1.1.463 (Vienna, Austria) ^{42,43}.

Results

1. Characteristics of the cohort

Dog characteristics

A total of 133 dogs was included in the study, comprising 19 healthy dogs (mean age at sampling: 7.4 years old), 14 dogs with non-cancerous diseases (mean age at sampling: 7.3 years old) and 100 cancer-bearing dogs (mean age at sampling: 8.2 years old) (Supplementary Table 1). Among healthy dogs and dogs with cancers, the most frequent breeds were Bernese mountain dog (9/19 and 45/100 respectively), and flat-coated retriever (n=8/19 and 7/100 respectively). The most represented cancer in our study was histiocytic sarcoma (n=49), with 17 disseminated forms, 30 localized forms and 2 unknown (Supplementary Table 1). There were 16 oral malignant melanomas, 25 multicentric lymphomas (21 high-grade and 3 low-grade lymphomas), and 10 other cancers including ocular melanoma (n=2), soft tissue sarcoma (n=2), nephroblastoma

(n=1), hemangiosarcoma (n=2) hepatocellular carcinoma (n=1), Langerhans cell sarcoma (n=1) and glioma (n=1).

Quantification of cell-free DNA (cfDNA) in plasma

cfDNA in the plasma of all dogs was accurately quantified in the 133 dogs by the ddPCR method using the *PTPN11*wt gene as a reference. The median cfDNA concentration in healthy, HS, multicentric lymphoma, OMM, other cancers and non-cancerous diseased dogs were 339ng/ml (mean 678ng/ml; range 6.7-3895), 240ng/ml (mean 827ng/ml; range 8.1-6320), 1168ng/ml (mean 4764ng/ml; range 25.4-35079), 106ng/ml (mean 3833ng/ml; range 8.2-49910), 185ng/ml (mean 1282ng/ml; range 19.6-10746) and 259ng/ml (mean 454ng/ml; range 0.7-3030) respectively (Figure 1). Dogs with multicentric lymphoma had a significantly higher cfDNA concentration in plasma than healthy dogs (Wilcoxon test, p=0.034), dogs with HS (Wilcoxon test, p=0.005), dogs with OMM (Wilcoxon test, p=0.009), dogs with other cancers (Wilcoxon test, p=0.025) and dogs with non-cancerous diseases (Wilcoxon test, p=0.006). There was no significant difference in cfDNA concentration between the other groups of dogs, particularly between healthy dogs and dogs with other cancers than multicentric lymphoma. Thus, this illustrates that cfDNA is not a sensitive marker for tumor diagnosis and that the detection of tumor specific genetic alterations is required to confirm the existence of a malignancy.

2. Detection of ctDNA in plasma of dogs bearing cancer

Detection of tumor specific mutation in the plasma of dogs with HS

The knowledge of tumor-specific and recurrent hotspot of mutation is required to use a point mutation in the screening of ctDNA. *PTPN11* is an oncogene involved in the MAPKinase pathway and is mutated in 23 to 56.7% of HS cases, mainly in two hotspot (E76K or G503V), depending on clinical presentation²⁵⁻²⁷.

In this study, *PTPN11* mutation was found in 23/45 HS tumor samples. The same mutation was detected in the plasma of 21/23 (91.3%) corresponding dogs, and the fraction of ctDNA in overall cfDNA varied from 0.056 to 36% (Supplementary Table 1). Moreover the mutations were not detected in any plasma from dogs with *PTPN11*wt tumors (Figure 2).

Detection of chromosomal rearrangement in the plasma of dogs with lymphoma

ctDNA can be detected also by the identification of tumor-specific chromosomal rearrangements, as performed in human affected by multicentric lymphomas.¹² VDJ recombination of immunoglobulin and T-cell receptor occurs in early stage of lymphocyte maturation and is specific to the lymphocyte clone. Thus, in lymphomas, the VDJ sequence is unique and constitutes a marker of the tumor clone¹². In order to detect lymphoma-specific VDJ rearrangement, we performed PCR for antigen receptor rearrangement (PARR) in 14 dogs with high-grade multicentric lymphoma. Immunophenotype was available for 10/14 dogs and all of them were B-cell lymphomas. PARR was positive and detected a clonal rearrangement in the tumor of 13/14 dogs. To detect ctDNA, PARR was performed on cfDNA extracted from plasma at

the time of diagnosis. All but one sample were positive and presented the same clone in tumor and plasma samples (Figure 3).

These results illustrate that tumor-specific chromosomal rearrangement are detectable in the plasma of dogs with multicentric lymphomas and that a majority of canine lymphoma patients (92.3% in our cohort) present ctDNA at the time of diagnosis.

Detection of copy number alterations (CNAs) in the plasma of dogs with OMM

As a proof of concept that CNAs are detectable in the plasma of dogs bearing cancer, we focused on OMM. In order to detect ctDNA in OMM patients, we targeted *MDM2* and *TRPM7* amplifications –present in around 50% of canine OMM-^{28,30-32}. Copy number was determined in tumor and plasma by ddPCR. On the 10 OMM cases with available tumor samples, amplification of *MDM2* was found in 3/10 tumors, and was detected in the plasma of 1/3 corresponding dog (Table 2). On the other hand, amplification of *TRPM7* was found in 8/10 tumors, and was detected in the plasma in only one case (Table 2).

Altogether, those results show that specific tumor CNAs were detectable in the plasma of 2/8 (25%) dogs affected by OMM, proving that part of circulating DNA is derived from tumor cells in at least a proportion of this cancer.

3. Illustration of potential clinical application for veterinary medicine and oncology research

ctDNA has become an attractive biomarker to monitor human cancer patients, with many clinical applications such as early cancer detection, prognosis, real-time monitoring of treatment response and identification of appropriate therapeutic targets and resistance mechanisms. In the same time, dog is recognized as underutilized model to develop new therapies for high-grade B-cell lymphoma^{34,44} or rare cancers such as HS³³. Here we illustrate two potential applications for veterinary medicine and comparative oncology: the diagnosis and the monitoring of minimal residual disease.

Interest of ctDNA for diagnosis: example of *PTPN11* mutation in canine HS

The knowledge of a recurrent tumor-specific mutation can be also useful to develop a non-invasive molecular diagnostic tool^{45,46}.

In order to assess the sensitivity and specificity of *PTPN11* mutation screening in plasma to diagnose HS, we tested the plasma of 49 dogs with HS, 19 healthy dogs, 14 dogs with non-cancerous diseases and 51 dogs with various cancers (multicentric lymphoma, OMM, soft tissue sarcoma, Langerhans cell sarcoma, nephroblastoma, hemangiosarcoma and ocular melanoma) (Supplementary Table 1). The *PTPN11* mutation was detected in the plasma of 21/49 dogs with HS, and 1 dog with a non-cancerous disease. It was not found in the plasma of healthy dogs and dogs suffering from other cancers. Considering those results, the screening of *PTPN11* mutation in the plasma had a specificity of 98.8% and a sensitivity of 42.8% for the diagnosis of canine HS. However, the sensitivity varied according to HS characteristics and clinical presentations, and was higher among Bernese mountain dogs (53.8%), in cases of disseminated forms (58.8%), internal organs involvement (59.4%) and especially with thoracic location (77%)

(Supplementary Table 2). This is due to the higher frequency of *PTPN11* mutations in Bernese mountain dogs (Fisher exact test, $p=0.0015$), internal clinical presentations (Fisher exact test, $p=0.008$) and when there is a pulmonary involvement (Fisher exact test, $p=0.002$) in this cohort.

Interest of ctDNA for monitoring minimal residual disease (MRD): example of high-grade B-cell multicentric lymphoma

In lymphoma, the unique VDJ rearrangement of the tumor clone constitutes a “barcode” that is used for the follow-up of human lymphoma patients in clinical trials ¹².

Four dogs presenting a high-grade B-cell multicentric lymphoma were prospectively included and their lymphoma-specific VDJ rearrangements were sequenced to further perform ctDNA analysis during follow-up. Three dogs received a cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, plus prednisolone (CHOP)-⁴⁷⁻⁴⁹ based chemotherapy and one dog (dog 3) received only vincristine injections. L-asparaginase was used in two cases at induction. In the case of absence of response or relapse, L-asparaginase and lomustine were used as rescue treatments. Before initiation of chemotherapy, ctDNA was detected in all cases and was determined as a ratio (%) of cfDNA (mean proportion: 15.5% of total cfDNA before initiation of chemotherapy). The monitoring details of each case are summarized below and represented in Figure 4.

Dog 1: This dog had a stage IV multicentric lymphoma and presented 17% of ctDNA in plasma before initiation of chemotherapy. A complete response (CR) was achieved 14 days after initiation of chemotherapy while molecular remission measured by ddPCR (ie. no ctDNA detected) occurred at day 33. At day 117 ctDNA was detected again in the plasma in a very small proportion (0.77%). The clinical relapse was objectified at day 159, ie 42 days after ctDNA detection. After reinduction, a second complete response was attained with a matched molecular remission. At day 274, the owner decided to stop chemotherapy. During disease course, ctDNA quantity and lymph node size were significantly positively correlated (Spearman correlation test, coefficient= 0.53, $p=0.028$).

Dog 2: This dog had a stage V multicentric lymphoma and we quantified 22% of ctDNA in its plasma before initiation of chemotherapy. The dog had only a partial response (PR) to therapy and was euthanized at day 50 after initiation because of disease progression (PD). Molecular monitoring fitted clinical observation as ctDNA was detected all the time during disease course. Lymph node size and ctDNA quantity were positively and significantly correlated (Spearman correlation test, coefficient= 0.88, $p=0.03$).

Dog 3: This dog had a stage IV multicentric lymphoma and presented only 6.25% of ctDNA in plasma before chemotherapy initiation. This lower ctDNA fraction may be due to a prednisolone treatment that was started 7 days before the beginning of the CHOP chemotherapy protocol. The dog experienced a CR at day 7 that matched with molecular remission. ctDNA was detected again at day 43 whereas the dog was still in CR, but was not detected at the next sampling (day 63). The owner decided to stop chemotherapy at day 63 while the dog was in CR and molecular remission. One month after, the tumor recurred and a second chemotherapy was initiated but without significant response (stable disease –SD- followed by PD). This clinical evolution matched with the detection

of high amount of ctDNA. The dog died one month after initiation of the second chemotherapy. Tumor burden and ctDNA quantity were significantly and positively correlated (Spearman correlation test, coefficient= 0.77, p=0.04).

Dog 4: This dog attained a CR at day 50 after chemotherapy initiation and the owner decided to stop the treatment at day 165 while the dog was still in CR. The complete clinical response was matched with a molecular remission that lasted until the dog was lost to follow-up. In that case the correlation between lymph node size and ctDNA quantity was positive but not significant (Spearman correlation test, coefficient= 0.48, p=0.18).

Altogether, those results suggest that the ctDNA kinetic during a chemotherapy treatment in dogs affected by multicentric lymphoma is correlated with lymph node size and is reflective of treatment response. Moreover, ctDNA could be more accurate than lymph node measurement as we were able to detect a molecular relapse 42 days before the clinical relapse.

Discussion

cfDNA is an attractive biomarker in human medicine and particularly in oncology. Thus, it has also been evaluated in different canine diseases^{16,17,19,20,50-53}. As in human, cfDNA concentration in dogs is correlated with the severity of the disease and prognosis^{16,17,20,53}. Consistently with previous studies, we found that dogs with multicentric lymphoma had significantly higher concentration of total cfDNA than healthy dogs, dogs with non-cancerous diseases and dogs with other cancers^{20,51}. Our cfDNA concentrations were in agreement with those of previous studies, although results were highly variable in terms of median cfDNA concentrations, ranging from 4 to 583ng/ml in healthy dogs for example. In those studies, authors used different extraction kits and quantification methods,^{16,20,51,53} that could in part explain this inter-study variability. Thus, this high variability of cfDNA concentration in healthy dogs limits its interest as a global biomarker for cancer diagnosis.

In human oncology, current studies focus on the analysis of DNA released from tumor cells in plasma (ctDNA), which is much more cancer-specific. Today one ctDNA assay for the detection of *EGFR* mutation in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) has been approved by the Food and Drug Administration, and ctDNA assays for *EGFR* in NSCLC and *KRAS* in colorectal cancer are available for commercial use in Europe^{3,4,54}. As in human, ctDNA has also been found in some canine cancers such as lymphoma²⁰, mammary carcinoma⁵⁰ and more recently in pulmonary adenocarcinoma⁵². While ctDNA can be released in many biological fluids, as it was demonstrated with *BRAF* mutation detection in urine for the diagnosis of canine urothelial and prostatic carcinomas⁵⁵, we focused on the interest of plasma as liquid biopsy in the present study. We showed that ctDNA can be detected in canine histiocytic sarcoma, oral malignant melanoma and multicentric lymphoma. Further studies are needed to confirm those findings in larger cohorts, and to explore the potential association between ctDNA and clinical parameters. However, the high frequency of ctDNA detection among HS and lymphoma cases suggests that ctDNA is a promising biomarker in those hematopoietic malignancies.

We identified ctDNA thanks to several tumor-associated alterations and showed that point mutations, chromosomal rearrangements and CNAs were detectable in the plasma of dogs with cancer. According to the targeted alterations, we used different methods, with their advantages and drawbacks. It is important to highlight that the performance of ctDNA detection largely depends on the level of ctDNA in the patient's plasma and the sensitivity of the method used. Since the release of a lot of cfDNA occurs in case of lymphoma (median cfDNA: 1168 ng/ml in the present study), it is not surprising that the PARR assay was able to detect ctDNA in 92.3% (12/13) of lymphoma affected dogs at the time of diagnosis, confirming a previous study that found ctDNA in 78% (7/9) of dogs with multicentric lymphoma²⁰ using the same method. In dogs with HS, the cfDNA concentration was much lower (median 240 ng/ml), but as we used a highly sensitive method (ddPCR), we were able to detect *PTPN11* mutation in the plasma of 91.3% (21/23) of dogs with *PTPN11* mutated tumor. This assay had positive and negative predictive values of 100% and 91.6% respectively to detect *PTPN11* mutation. Recently, Lorch et al. used the same method to search *HER2* mutation in matched tumor and plasma samples of dogs with pulmonary adenocarcinoma⁵². They found the mutation in only 33% of dogs with *HER2* mutated tumor. This low detection rate compared to our results in dogs with HS is probably due to the lower fraction of ctDNA released in pulmonary adenocarcinoma compared to HS, and thus the lower DNA amount available for mutation detection (median cfDNA of 3.7 ng/ml of plasma in dogs with pulmonary adenocarcinoma versus 240 ng/ml in dogs with HS). Low cfDNA amount was also an issue when we studied ctDNA in OMM. The most recurrent genetic alterations in that cancer are CNAs targeting oncogenes like *MDM2* and *TRPM7*^{28,30-32}, and we detected those tumor-associated amplifications in cfDNA with ddPCR in only 1/3 and 1/8 cases respectively. Detecting CNAs in cfDNA is challenging, and depends also on the level of amplification of the gene in the tumor which in turns, involves deeper sequencing⁵⁶. In humans, more reliable methods are used to detect CNA in cfDNA like low-pass whole genome sequencing⁵⁷. Beck et al. used whole genome sequencing on tumor and plasma samples of 2 dogs with mammary carcinoma and found a good concordance of tumor and cfDNA copy number profiles for the regions with high-level amplifications⁵⁰. However, this method requires high sequencing coverage and would not yet be cost-effective for veterinary medicine.

Another objective of this study was to evaluate the potential clinical application of ctDNA analysis in veterinary oncology. Two aspects were investigated: the value of ctDNA analysis as a tool for HS diagnosis, and for MRD follow-up in lymphoma-affected dogs. Diagnosis of canine histiocytic sarcoma is sometimes challenging because of hidden tumor locations (e.g. lungs, mediastinum, central nervous system...) and the potential difficulty to differentiate it from reactive inflammatory disease or other malignancies⁵⁸. We thus assessed the value of a ctDNA test in order to diagnose HS using a non-invasive method. In our study population of 133 dogs, screening *PTPN11* in plasma for HS diagnosis had a specificity, sensitivity, positive and negative predictive values of 98.8%, 42.8%, 95.5% and 74.8% respectively. We found that *PTPN11* mutation was highly specific of HS, as it was never detected in the plasma of dogs with other cancers. Only one dog was classified as false positive and concerned a 12 years-old Bernese mountain dog sampled at the time of euthanasia because of old-age, and who was classified in the "non-cancerous diseases" group. Two hypotheses can explain this false positive result. First, this old dog could suffer from an undiagnosed or early stage HS, and unfortunately, necropsy was not performed to confirm this hypothesis. Second, somatic variants associated to hematologic cancers have been found in the plasma of

oncology would be an objective parameter of treatment efficacy, and would be useful in earlier recognition of relapse leading to earlier re-induction or molecule switch.

In conclusion, this study shows that several somatic alterations can be found in the plasma of dogs with histiocytic sarcoma, oral malignant melanoma and multicentric lymphoma, confirming the presence of ctDNA in those canine cancers, especially in hematopoietic malignancies. Among others, two potential applications of this minimally invasive assay were explored. First the HS signature of *PTPN11* mutations and their finding in plasma could be used as a ctDNA diagnostic test to confirm a clinical suspicion of HS, especially in case of internal/disseminated forms. Second, the search of lymphoma-specific rearrangement in plasma of affected dogs is a highly accurate and personalized method to assess treatment efficacy and to anticipate a relapse. ctDNA has numerous applications in human medicine and appears to be also a promising tool in veterinary medicine with interest for future comparative oncology studies.

References

1. Stewart, C. M. & Tsui, D. W. Y. Circulating cell-free DNA for non-invasive cancer management. *Cancer Genet* **228–229**, 169–179 (2018).
2. Butler, T. M., Spellman, P. T. & Gray, J. Circulating-tumor DNA as an early detection and diagnostic tool. *Current Opinion in Genetics & Development* **42**, 14–21 (2017).
3. De Rubis, G., Krishnan, S. R. & Bebawy, M. Circulating tumor DNA - Current state of play and future perspectives. *Pharmacol. Res.* **136**, 35–44 (2018).
4. Merker, J. D. *et al.* Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *J. Clin. Oncol.* **36**, 1631–1641 (2018).
5. MANDEL, P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez 1 homme. *C R Seances Soc Biol Fil* **142**, 241–243 (1948).
6. Saukkonen, K. *et al.* Cell-Free Plasma DNA as a Predictor of Outcome in Severe Sepsis and Septic Shock. *Clinical Chemistry* **54**, 1000–1007 (2008).
7. Saukkonen, K. *et al.* Association of cell-free plasma DNA with hospital mortality and organ dysfunction in intensive care unit patients. *Intensive Care Med* **33**, 1624–1627 (2007).

8. Schwarzenbach, H., Hoon, D. S. B. & Pantel, K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* **11**, 426–437 (2011).
9. van Ginkel, J. H., Huibers, M. M. H., van Es, R. J. J., de Bree, R. & Willems, S. M. Droplet digital PCR for detection and quantification of circulating tumor DNA in plasma of head and neck cancer patients. *BMC Cancer* **17**, (2017).
10. Yeung, K. T., More, S., Woodward, B., Velculescu, V. & Husain, H. Circulating Tumor DNA for Mutation Detection and Identification of Mechanisms of Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *Mol Diagn Ther* **21**, 375–384 (2017).
11. Wu, T.-H., Hsiue, E. H.-C. & Yang, J. C.-H. Opportunities of circulating tumor DNA in lung cancer. *Cancer Treatment Reviews* **78**, 31–41 (2019).
12. Kwok, M., Wu, S. P., Mo, C., Summers, T. & Roschewski, M. Circulating Tumor DNA to Monitor Therapy for Aggressive B-Cell Lymphomas. *Curr. Treat. Options in Oncol.* **17**, 47 (2016).
13. Alcaide, M. *et al.* Multiplex Droplet Digital PCR Quantification of Recurrent Somatic Mutations in Diffuse Large B-Cell and Follicular Lymphoma. *Clin Chem* (2016) doi:10.1373/clinchem.2016.255315.
14. Alix-Panabières, C. & Pantel, K. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discov* **6**, 479–491 (2016).
15. Wilson, I. J. *et al.* Kinetics of Plasma Cell-Free DNA and Creatine Kinase in a Canine Model of Tissue Injury. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **32**, 157–164 (2018).
16. Jeffery, U., Ruterbories, L., Hanel, R. & LeVine, D. N. Cell-Free DNA and DNase Activity in Dogs with Immune-Mediated Hemolytic Anemia. *J Vet Intern Med* **31**, 1441–1450 (2017).

17. Letendre, J.-A. & Goggs, R. Measurement of plasma cell-free DNA concentrations in dogs with sepsis, trauma, and neoplasia. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* **27**, 307–314 (2017).
18. Burnett, R. C. *et al.* Diagnosis of Canine Lymphoid Neoplasia Using Clonal Rearrangements of Antigen Receptor Genes. *Veterinary Pathology* **40**, 32–41 (2003).
19. Beffagna, G. *et al.* Circulating Cell-Free DNA in Dogs with Mammary Tumors: Short and Long Fragments and Integrity Index. *PLoS One* **12**, (2017).
20. Schaefer, T., Satzger, I. & Gutzmer, R. Clinics, prognosis and new therapeutic options in patients with mucosal melanoma: A retrospective analysis of 75 patients. *Medicine (Baltimore)* **96**, e5753 (2017).
21. Elvers, I. *et al.* Exome sequencing of lymphomas from three dog breeds reveals somatic mutation patterns reflecting genetic background. *Genome Res.* **25**, 1634–1645 (2015).
22. Thomas, R. *et al.* Refining tumor-associated aneuploidy through ‘genomic recoding’ of recurrent DNA copy number aberrations in 150 canine non-Hodgkin lymphomas. *Leuk. Lymphoma* **52**, 1321–1335 (2011).
23. Hedan, B. *et al.* Molecular cytogenetic characterization of canine histiocytic sarcoma: A spontaneous model for human histiocytic cancer identifies deletion of tumor suppressor genes and highlights influence of genetic background on tumor behavior. *BMC Cancer* **11**, 201 (2011).
24. Kennedy, K. *et al.* Genome-wide DNA copy number analysis and targeted transcriptional analysis of canine histiocytic malignancies identifies diagnostic signatures and highlights disruption of spindle assembly complex. *Chromosome Res.* **27**, 179–202 (2019).

25. Takada, M. *et al.* Activating Mutations in PTPN11 and KRAS in Canine Histiocytic Sarcomas. *Genes (Basel)* **10**, (2019).
26. Thaiwong, T., Sirivisoot, S., Takada, M., Yuzbasiyan-Gurkan, V. & Kiupel, M. Gain-of-function mutation in PTPN11 in histiocytic sarcomas of Bernese Mountain Dogs. *Vet Comp Oncol* **16**, 220–228 (2018).
27. Hédan, B. *et al.* PTPN11 mutations in canine and human disseminated histiocytic sarcoma. *International Journal of Cancer* (2020).
28. Wong, K. *et al.* Cross-species genomic landscape comparison of human mucosal melanoma with canine oral and equine melanoma. *Nat Commun* **10**, 353 (2019).
29. Gillard, M. *et al.* Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. *Pigment Cell Melanoma Res* **27**, 90–102 (2014).
30. Poorman, K. *et al.* Comparative cytogenetic characterization of primary canine melanocytic lesions using array CGH and fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Res.* **23**, 171–186 (2015).
31. Hendricks, W. P. D. *et al.* Somatic inactivating PTPRJ mutations and dysregulated pathways identified in canine malignant melanoma by integrated comparative genomic analysis. *PLoS Genet.* **14**, e1007589 (2018).
32. Prouteau, A. *et al.* Prognostic value of somatic focal amplifications on chromosome 30 in canine oral melanoma. *Vet Comp Oncol* (2019) doi:10.1111/vco.12536.
33. Hédan, B. *et al.* PTPN11 mutations in canine and human disseminated histiocytic sarcoma. *Int. J. Cancer* (2020) doi:10.1002/ijc.32991.
34. Ito, D., Frantz, A. M. & Modiano, J. F. Canine lymphoma as a comparative model for human non-Hodgkin lymphoma: recent progress and applications. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **159**, 192–201 (2014).

35. Prouteau, A. & André, C. Canine Melanomas as Models for Human Melanomas: Clinical, Histological, and Genetic Comparison. *Genes (Basel)* **10**, (2019).
36. Vail, D. M., Michels, G. M., Khanna, C., Selting, K. A. & London, C. A. Response evaluation criteria for peripheral nodal lymphoma in dogs (v1.0)–a veterinary cooperative oncology group (VCOG) consensus document. *Veterinary and Comparative Oncology* **8**, 28–37 (2010).
37. Tamura, K. *et al.* Development of the polymerase chain reaction assay based on the canine genome database for detection of monoclonality in B cell lymphoma. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **110**, 163–167 (2006).
38. Yagihara, H. *et al.* Genomic organization of the T-cell receptor gamma gene and PCR detection of its clonal rearrangement in canine T-cell lymphoma/leukemia. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **115**, 375–382 (2007).
39. Gautier, A. Validation d'un test de clonalité pour le diagnostic des lymphomes canins par analyse moléculaire des réarrangements du récepteur à l'antigène (PARR). (2014).
40. Hitte C. & André C. Integrated genetic analysis of canine mucosal melanoma from three predisposed breeds. (2019).
41. Tsai, P.-C. & Breen, M. Array-based comparative genomic hybridization-guided identification of reference genes for normalization of real-time quantitative polymerase chain reaction assay data for lymphomas, histiocytic sarcomas, and osteosarcomas of dogs. *American journal of veterinary research* **73**, 1335–43 (2012).
42. Gómez-Rubio, V. **ggplot2** - Elegant Graphics for Data Analysis (2nd Edition). *Journal of Statistical Software* **77**, (2017).
43. Bunn, A. & Korpela, M. An Introduction to dplyr. 16.

44. LeBlanc, A. K. *et al.* Perspectives from man's best friend: National Academy of Medicine's Workshop on Comparative Oncology. *Sci Transl Med* **8**, 324ps5 (2016).
45. Mochizuki, H., Kennedy, K., Shapiro, S. G. & Breen, M. BRAF Mutations in Canine Cancers. *PLoS ONE* **10**, e0129534 (2015).
46. Wiley, C., Wise, C. F. & Breen, M. Novel Noninvasive Diagnostics. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice* **49**, 781–791 (2019).
47. Garrett, L. D., Thamm, D. H., Chun, R., Dudley, R. & Vail, D. M. Evaluation of a 6-month chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. *J. Vet. Intern. Med.* **16**, 704–709 (2002).
48. Moore, A. S. *et al.* Evaluation of a discontinuous treatment protocol (VELCAP-S) for canine lymphoma. *J. Vet. Intern. Med.* **15**, 348–354 (2001).
49. Sorenmo, K. *et al.* Outcome and toxicity associated with a dose-intensified, maintenance-free CHOP-based chemotherapy protocol in canine lymphoma: 130 cases. *Vet Comp Oncol* **8**, 196–208 (2010).
50. Beck, J. *et al.* Genome aberrations in canine mammary carcinomas and their detection in cell-free plasma DNA. *PLoS ONE* **8**, e75485 (2013).
51. Tagawa, M., Shimbo, G., Inokuma, H. & Miyahara, K. Quantification of plasma cell-free DNA levels in dogs with various tumors. *J. Vet. Diagn. Invest.* **31**, 836–843 (2019).
52. Lorch, G. *et al.* Identification of Recurrent Activating HER2 Mutations in Primary Canine Pulmonary Adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* (2019) doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-1145.
53. Burnett, D. L., Cave, N. J., Gedye, K. R. & Bridges, J. P. Investigation of cell-free DNA in canine plasma and its relation to disease. *Veterinary Quarterly* **36**, 122–129 (2016).
54. Kwapisz, D. The first liquid biopsy test approved. Is it a new era of mutation testing for non-small cell lung cancer? *Ann Transl Med* **5**, (2017).

55. Mochizuki, H., Shapiro, S. G. & Breen, M. Detection of BRAF Mutation in Urine DNA as a Molecular Diagnostic for Canine Urothelial and Prostatic Carcinoma. *PLoS ONE* **10**, e0144170 (2015).
56. Chan, K. C. A. *et al.* Cancer Genome Scanning in Plasma: Detection of Tumor-Associated Copy Number Aberrations, Single-Nucleotide Variants, and Tumoral Heterogeneity by Massively Parallel Sequencing. *Clinical Chemistry* **59**, 211–224 (2013).
57. Chen, X. *et al.* Low-pass Whole-genome Sequencing of Circulating Cell-free DNA Demonstrates Dynamic Changes in Genomic Copy Number in a Squamous Lung Cancer Clinical Cohort. *Clin Cancer Res* **25**, 2254–2263 (2019).
58. *Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology*. (Elsevier, 2013).
59. Tani, H. *et al.* Canine histiocytic sarcoma cell lines with SHP2 p.Glu76Gln or p.Glu76Ala mutations are sensitive to allosteric SHP2 inhibitor SHP099. *Veterinary and Comparative Oncology* **n/a**.
60. Takada, M. *et al.* Targeting MEK in a Translational Model of Histiocytic Sarcoma. *Mol. Cancer Ther.* **17**, 2439–2450 (2018).
61. Lana, S. E., Jackson, T. L., Burnett, R. C., Morley, P. S. & Avery, A. C. Utility of polymerase chain reaction for analysis of antigen receptor rearrangement in staging and predicting prognosis in dogs with lymphoma. *J. Vet. Intern. Med.* **20**, 329–334 (2006).
62. Yamazaki, J. *et al.* Quantitative assessment of minimal residual disease (MRD) in canine lymphoma by using real-time polymerase chain reaction. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **126**, 321–331 (2008).

63. Gentilini, F., Turba, M. E. & Forni, M. Retrospective monitoring of minimal residual disease using hairpin-shaped clone specific primers in B-cell lymphoma affected dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **153**, 279–288 (2013).
64. Sato, M. *et al.* The prognostic significance of minimal residual disease in the early phases of chemotherapy in dogs with high-grade B-cell lymphoma. *Vet. J.* **195**, 319–324 (2013).
65. Yamazaki, J. *et al.* Monitoring of minimal residual disease (MRD) after multidrug chemotherapy and its correlation to outcome in dogs with lymphoma: a proof-of-concept pilot study. *J. Vet. Intern. Med.* **24**, 897–903 (2010).

Author contributions statement

Conception and design: A. Prouteau and B. Hedan. Development of methodology : A. Prouteau, J.A. Denis, E. Cadieu,, A. Lespagnol and B. Hedan. Acquisition of data: A. Prouteau, J.A. Denis, P. De Fornel, E. Cadieu,, N. Botherel, R. Ulvé, M. Rault, A. Bouzidi, R. Francois, L. Dorso, P. Devauchelle, J. Abadie, A. Lespagnol and B. Hedan. Analysis and interpretation of data: A. Prouteau, J.A. Denis, T. Derrien, C. Kergal, P. De Fornel, and B. Hedan. Writing, review, and/or revision of the manuscript: A. Prouteau, J.A. Denis, P. De Fornel, T. Derrien, J. Abadie, C. André and B. Hedan.

Acknowledgments

The authors acknowledge all the technicians, pathologists, veterinarians and nurses that contributed to the project (particularly Drs A. Garand, F. Allais and A-S Guillory, IGDR, Rennes), the Cani-DNA Biological Resource Center (Biosit, Rennes: <http://dog-genetics.genouest.org>) that provided the samples, Stéphane Dréano for sequencing facilities, Yann Le Cunff for its help in statistics. The authors acknowledge Laurent Griscom (IGDR, Rennes) who assisted them for proofreading of the manuscript.

Source of support:

AP is funded by a PhD fellowship from the FHU CAMIn University-Hospital Federation Cancer, Microenvironment & Innovation (2018-2020) of the University of Rennes 1, France. This study is partly funded by the American Kennel Club Health foundation CHF grant 2446. The Cani-DNA BRC (<http://dog-genetics.genouest.org>), is funded through a PIA1 funding (2012-2022): the CRB-Anim infrastructure, ANR-11-INBS-0003.

Conflict of interest:

The authors declare no conflict of interest.

Data availability statement: data available in article supplementary material

Figure legends

Figure 1: Quantification of cfDNA (ng/ml) in the plasma of dogs under different conditions: healthy, non-cancerous disease, various cancers, histiocytic sarcoma (HS), oral malignant melanoma (OMM) and multicentric lymphoma. The amount of DNA was determined by Poisson's law.

Figure 2: **A:** Example of data output from our ddPCR multiplex assay for absolute quantification of *PTPN11* mutations (PTPN11-1 for E76K and PTPN11-2 for G503V) in canine HS. Exemplary two-dimensional cluster plots in which PTPN11-1mut (left) or PTPN11-2mut (right) are plotted against PTPN11-1 wild-type (wt) and PTPN11-2wt respectively. Droplets form clusters that should arrange orthogonally to each other and represent PTPmut/PTPwt negative (double-negative droplets, grey), PTPmut positive (blue), PTPwt positive (green), and PTPmut/PTPwt positive (double-positive droplets, orange). **B:** Flowchart summarizing results of the ddPCR assay targeting *PTPN11* mutations (E76K and G503V) on tumor and plasma samples of 49 dogs with HS. cfDNA: cell-free DNA. **C:** Parameters of the test for *PTPN11* mutation detection in plasma of dogs with HS. PPV: positive predictive value, NPV: negative predictive value.

Figure 3: **A:** Results of a PARR genotyping on DNA extracted from a tumor sample (above) and from plasma (below) of a dog with high-grade multicentric lymphoma (Id 18175). The same clonal antigen receptor rearrangement (IgH major) was found with a high intensity in the tumor and in plasma. **B:** Results of our PARR assay on canine lymphoma. We report the results on DNA from tumor and DNA extracted from plasma. PARR was positive (clonal band) in tumor and cfDNA for 12/13 dogs.

Figure 4: Course of the disease of four lymphoma-affected dogs treated by chemotherapy (dog 1: 18182, dog 2: 18710, dog 3: 18680, dog 4: 18744). For each dog, the figures above represent tumor burden with lymph node size (sum of longest diameter of at least 2 lymph nodes, in mm) and appreciation of the clinician. The figures below represent ctDNA measurement (% of total cfDNA in plasma) during disease course. For each case, a Spearman correlation was done to assess correlation between tumor burden and ctDNA quantity (coefficient and p-value). CR: complete response, PR: partial response, SD: stable disease, PD: progressive disease

Supplementary Table 1: Main characteristics of the 133 dogs included in the study and tested for *PTPN11* mutations (PTPN11-1 for E76K and PTPN11-2 for G503V). The mutations were searched in cfDNA extracted from plasma of all dogs by ddPCR, and in the tumors of dogs with histiocytic sarcoma (HS).

Supplementary Table 2: Sensitivity of the ctDNA test to diagnose HS in dogs. This sensitivity depends directly on the presence of the *PTPN11* mutation in the tumor. It seems that *PTPN11* mut is more frequent in disseminated and internal forms, and when there is an involvement of lungs/mediastinum (thoracic location). Thoracic masses were confirmed by histological examination and could be associated or not with other organs involvement. This mutation is also more frequent in bernese mountain dogs.

Figures

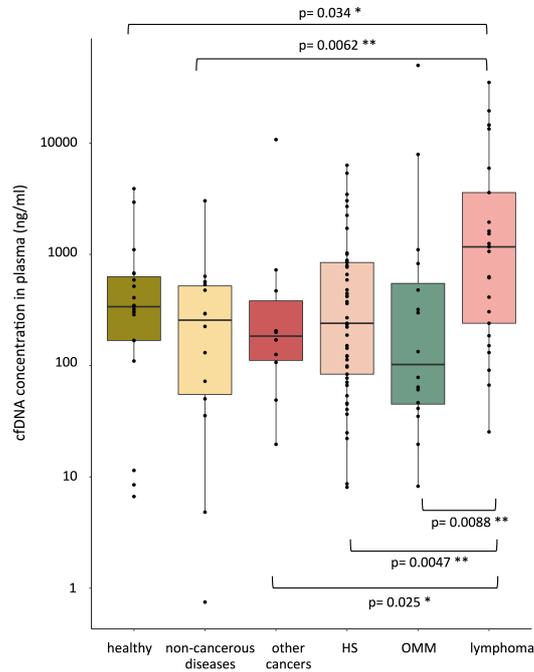


Figure 1: Quantification of cfDNA (ng/ml) in the plasma of dogs under different conditions: healthy, non-cancerous disease, various cancers, histiocytic sarcoma (HS), oral malignant melanoma (OMM) and multicentric lymphoma. The amount of DNA was determined by Poisson's law.

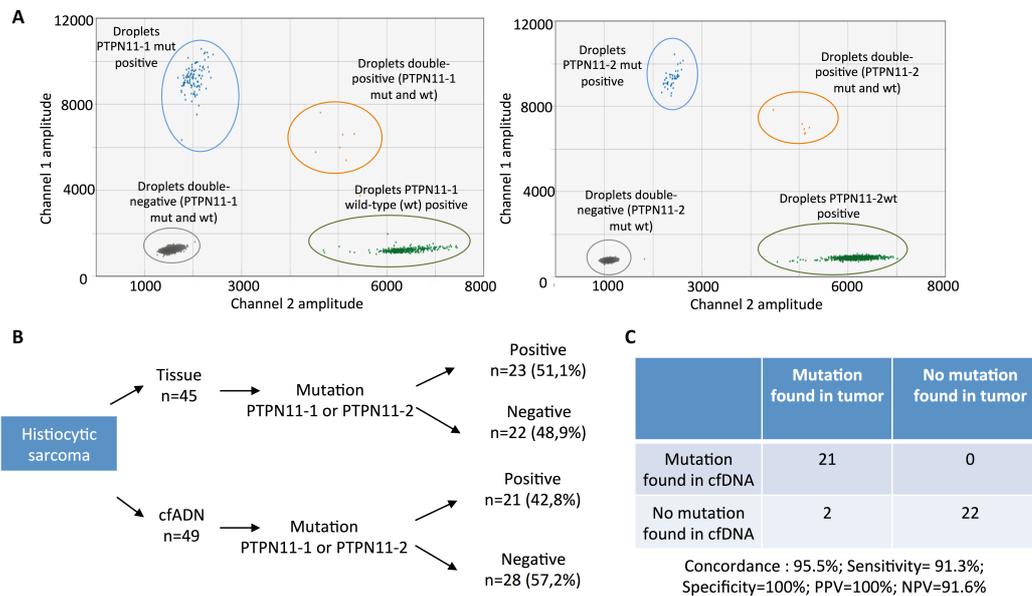


Figure 2: **A:** Example of data output from our ddPCR multiplex assay for absolute quantification of *PTPN11* mutations (PTPN11-1 for E76K and PTPN11-2 for G503V) in canine HS. Exemplary two-dimensional cluster plots in which PTPN11-1mut (left) or PTPN11-2mut (right) are plotted against PTPN11-1 wild-type (wt) and PTPN11-2wt respectively. Droplets form clusters that should arrange orthogonally to each other and represent PTPmut/PTPwt negative (double-negative droplets, grey), PTPmut positive (blue), PTPwt positive (green), and PTPmut/PTPwt positive (double-positive droplets, orange). **B:** Flowchart summarizing results of the ddPCR assay targeting *PTPN11* mutations (E76K and G503V) on tumor and plasma samples of 49 dogs with HS. cfDNA: cell-free DNA. **C:** Parameters of the test for *PTPN11* mutation detection in plasma of dogs with HS. PPV: positive predictive value, NPV: negative predictive value.

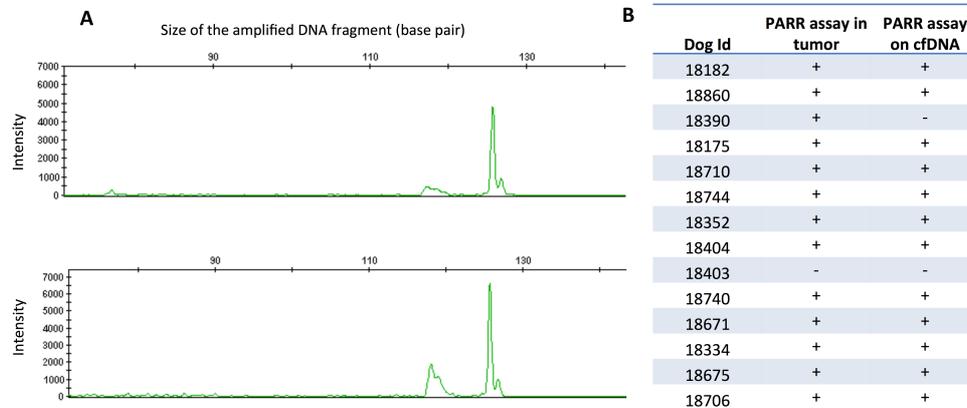


Figure 3: **A:** Results of a PARR genotyping on DNA extracted from a tumor sample (above) and from plasma (below) of a dog with high-grade multicentric lymphoma (Id 18175). The same clonal antigen receptor rearrangement (IgH major) was found with a high intensity in the tumor and in plasma. **B:** Results of our PARR assay on canine lymphoma. We report the results on DNA from tumor and DNA extracted from plasma. PARR was positive (clonal band) in tumor and cfDNA for 12/13 dogs.

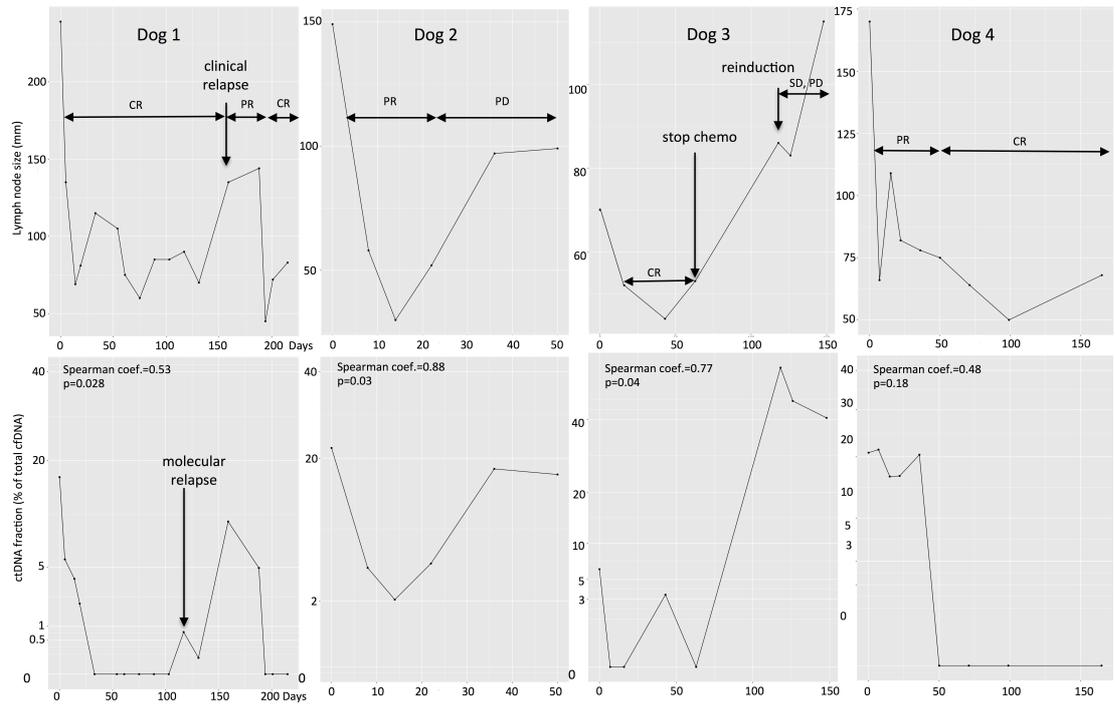


Figure 4: Course of the disease of four lymphoma-affected dogs treated by chemotherapy (dog 1: 18182, dog 2: 18710, dog 3: 18680, dog 4: 18744). For each dog, the figures above represent tumor burden with lymph node size (sum of longest diameter of at least 2 lymph nodes, in mm) and appreciation of the clinician. The figures below represent ctDNA measurement (% of total cfDNA in plasma) during disease course. For each case, a Spearman correlation was done to assess correlation between tumor burden and ctDNA quantity (coefficient and p-value). CR: complete response, PR: partial response, SD: stable disease, PD: progressive disease

Tables

Primer targeted region	Primer sequence	Purpose
IgH major	cacgacgttgtaaacgcacCAGCCTGAGAGCCGAGGACAC	PARR
	TGAGGAGACGGTGACCAGGGT	
IgH minor	cacgacgttgtaaacgcacCAGCCTGAGAGCCGAGGACAC	PARR
	TGAGGACACAAAGAGTGAGG	

TCR	cacgacgttgtaaacgacCGTGTA TACTACTGCGCTGCCTGG TGTGCCAGGACCAAGCACTTTGTT	PARR	
Primer targeted region	MIQE context	Purpose	Elongation temperature (°C)
PTPN11 hot spot 1 (E76K)	GATTCAGAACACTGGTGATTACTATGACTTGTATGG AGGGGAAAAGTTTGCCACGTTGGCT[G/A]AGTTGGT CCAGTATTATATGGAACATCACGGACAATTA AAAAGA GAAGAATGGAGATGTTAT	ddPCR: mutation detection of PTPN11 E76K	58
PTPN11 hot spot 2 (G503V)	GGTGTGACTGCGACATTGATGTTCCAAAACCATTC AGATGGTGC GGTCCTCAGAGGT CAG[G/T]GATGGTCC AGACAGAAGCACAGTACCGATT CATT TATATGGCTG TCCAGCATTACATTGAA	ddPCR: mutation detection of PTPN11 G503V	58
TRPM7	CATTACCTGTGTTTACTCCTCCAGTTAAAATCCAGGC TCCGGTTGTA ACTGCAGCTTTAATAAGACCCTTTCCA AGCAGCTGCTTGATTCTGTTGGGTGAAGCTCAAATTC TGCATGCCTCCAT	ddPCR: Copy Number Determination	58
MdM2	TGATCTTCTAGGAGATTTGTTTGGAGTGCCAAGCTT CTCTGTGAAAGAGCACAGGTA AATTCTTCAGTTTAG TCCGTTGTA AAAAGCCAGCTGGGCAAACATTT CAGT TTACCTCCTCCTTTT	ddPCR: Copy Number Determination	58
chr9 controle	GCAGTACCCCATCATCGTCCCGCAAGGAAGCTTGT GCACAAACGCCAGCATCTGGTACTTGGCCCTGATGAA TTCTGACTTGATGGGGCTGGGCAGGGCGCATAGGAT GCGACGGTGAGCA	ddPCR: Copy Number Determination	58
specific probe for dog 1	F: CGGCTgTcTATTACTGTGCg R: CTGCACCAGGACAAACAGAA 56-FAM/TGT CAC CCA / ZEN/ATT GGA GCT GAT CCC	ddPCR MRD follow-up	60
specific probe for dog 2	F: ACTACCTCCGTGCTTTTGGT R:CGTGTCTCCGGCTCTCAG 56-FAM/CGG CCG TAT /ZEN/ATT ATT GTG TGA AGG C	ddPCR MRD follow-up	60
specific probe for dog 3	F: ACACGGCCGTCTATTACTGT R: GTTCCTGGCCCAATAGTCA 56-FAM/ACG GCC GTC /ZEN/TAT TAC TGT TTC GGG	ddPCR MRD follow-up	60
specific probe for dog 4	F: CGACGGTAGCTACGGTAACAAT R: GGTCTCACCCGCACAGTAAT 56-FAM/AGA CCG ACG /ZEN/GTA GCT ACG GTA ACA	ddPCR MRD follow-up	60
chr26 controle	F: TGA GAC AAC CCT CCC R: CTT CTC TCG CTG AGA AAG 5HEX/CTG CCC GCT /ZEN/CTT TGA TCC TGA GTC	ddPCR MRD follow-up	60

Table 1: Primers used in the study.

Dog Id	Tumor	cfDNA
	Gain detected: copy number (95% confidence interval)	Gain detected: copy number (95% confidence interval)
19006	<i>TRPM7</i> : 37,90 (28,41-47,39)	<i>TRPM7</i> : 2,80 (2,58-3,03)
18394	<i>TRPM7</i> : 7,98 (7,71-8,25)	No
18657	<i>TRPM7</i> : 3,01 (2,89-3,14)	No
18718	<i>MDM2</i> : 21,26 (19,37-23,15)	<i>MDM2</i> : 3,02 (2,19-3,85)
	<i>TRPM7</i> : 7,46 (7,17-7,75)	No
18395	<i>MDM2</i> : 52,96 (45,74-60,17)	No
	<i>TRPM7</i> : 8,78 (8,37-9,19)	No
18303	<i>TRPM7</i> : 8,88 (8,55-9,20)	No
18333	<i>MDM2</i> : 4,30 (3,91-4,68)	No
	<i>TRPM7</i> : 27,24 (25,94-28,54)	No
18848	<i>TRPM7</i> : 9,12 (8,78-9,46)	No

Table 2: Results of the ddPCR assay to detect copy number alterations (CNA) of *TRPM7* and *MDM2* on tumor and plasma of dogs with oral melanoma. Eight dogs had at least one gene amplified in the tumor, and in two cases, a copy number imbalance was found in the plasma.

DISCUSSION

I. Apport de ces résultats pour la médecine vétérinaire

Au cours de ce projet de thèse et en tant que vétérinaire, j'étais particulièrement intéressée à mettre en application la génétique moléculaire pour l'oncologie vétérinaire. Le travail mené sur l'ADNct chez le chien est un bon exemple de biomarqueur prometteur et aux applications cliniques potentielles multiples comme le diagnostic, le suivi thérapeutique ou l'orientation du choix des thérapies grâce à une méthode non-invasive (Article 4 soumis à Scientific report).

De la même façon pour l'étude du mélanome canin, j'ai travaillé à partir de 111 cas pour n'en sélectionner que 73 ayant un ADN tumoral de bonne qualité et des données épidémiologiques et de survie complètes. Sur cette cohorte, la recherche de remaniements chromosomiques m'a permis de mettre en évidence la valeur pronostique péjorative de l'amplification focale du CFA 30 dans le MM canin. Ce marqueur pourrait éventuellement être intégré avec d'autres facteurs (index mitotique, atypies cellulaires...) dans un système de score pour mieux prédire le comportement biologique de ce cancer chez le chien. En plus de son intérêt pour l'oncologie vétérinaire, ce travail a confirmé la récurrence des amplifications du CFA 10 et du CFA 30 (chacune présente dans environ 50% des cas) et initié le travail de caractérisation des réarrangements chromosomiques présents dans le MM canin. En parallèle, plusieurs articles sur la génomique des MM humains ont été publiés ces 3 dernières années, mettant en avant le taux important de SV dans ces cancers, de façon identique à ce que nous observons chez le chien. De fait, grâce aux données de génomique et transcriptomique générées par l'équipe (RNAseq, exomes, séquençage génome entier), nous avons cherché à définir des sous-groupes moléculaires et des cibles thérapeutiques, dans le but de pouvoir transférer ces données à l'homme. Ceci est l'objet de l'article principal de ma thèse, en cours de rédaction et présenté en partie IV. des résultats (Article 3).

II. Apport de ces résultats pour la médecine humaine

D'après les données de la littérature, il y a encore très peu de résultats d'expression générés pour le MM humain. Ce travail est le premier chez le chien impliquant des données transcriptomiques sur un si grand nombre d'individus. Nos résultats suggèrent l'existence de deux sous-groupes moléculaires de MM se distinguant par leur micro-environnement, leurs cibles thérapeutiques et leur profil de CNA. Dans

un contexte où cette tumeur rare chez l'homme manque de traitements systémiques et d'outils de prédiction de la réponse à l'immunothérapie, ces résultats chez le chien sont intéressants et prometteurs pour la médecine humaine.

1. Un sous-groupe moléculaire candidat à l'immunothérapie

Une partie des 32 échantillons de MM canins, pour la plupart à faible taux de remaniements ("SV low") présente une expression accrue de certains checkpoint immunitaires comme *CTLA-4*, *LAG3* et *TIM3*, indiquant un micro-environnement plus riche notamment en cellules immunitaires, et potentiellement une plus grande sensibilité à l'immunothérapie ²⁹⁴. L'importance des gènes du micro-environnement dans le MM canin a également été démontrée dans une étude très récente incluant des données de RNA-seq sur 8 échantillons tumoraux comparés à 3 tissus sains ²⁵¹. Chez l'homme, les études disponibles ont montré que seul un faible pourcentage des patients atteints de MM présentaient une réponse objective aux anti-CTLA-4 et aux anti PD-1, et cela pourrait être amélioré par une meilleure sélection des patients, notamment sur la base du profil en CNA de la tumeur. Dans plusieurs études, la charge mutationnelle de la tumeur a été associée à une bonne réponse à l'immunothérapie ^{295,296} et à une survie plus longue avec ce traitement ¹³², et quelques publications récentes suggèrent qu'un taux important de CNA serait à l'inverse corrélé à une résistance à l'immunothérapie ^{133,261,262}. Nos résultats sur le MM canin vont également dans ce sens. Cependant, l'interprétation des signaux activateurs et inhibiteurs de l'immunité est complexe et il aurait été très intéressant d'effectuer une analyse du transcriptome de cellules uniques (single cell) afin de mieux caractériser le micro-environnement tumoral dans chaque sous-groupe moléculaire.

Chez l'homme, l'étude de D'Angelo *et al.* a montré que l'association de deux inhibiteurs de checkpoint (anti CTLA-4 et anti PD-1) était plus efficace que la monothérapie ²¹⁸, et nos résultats montrent que plusieurs checkpoints sont surexprimés dans le sous-groupe plus immunogène, suggérant que l'association de différents inhibiteurs de checkpoint serait plus efficace pour ré-activer une immunité anti-tumorale ²⁹⁴. Cependant, alors que chez les patients humains atteints de MM les anti PD-1 semblent plus efficaces que les anti CTLA-4, nous n'avons pas trouvé de différentiel d'expression entre nos deux groupes concernant PD-1 et PD-L1. Comme nous l'avons mentionné dans la partie d'introduction, une étude a montré que 90% des tumeurs de MM canins exprimaient PD-L1 et que les lymphocytes infiltrant la tumeur surexprimaient PD-1 ²⁵⁶, et il est possible que ces cibles soient exprimées de façon similaire dans nos deux sous-groupes.

2. Un sous-groupe moléculaire riche en CNA et en cibles thérapeutiques

Dans le second groupe plus riche en tumeurs présentant de nombreux CNA, les amplifications focales signent des réarrangements intra ou inter-chromosomiques

complexes ressemblant à du chromothripsis. Ces remaniements ciblent des gènes clés comme *CDK4* et *MDM2*, mais aussi d'autres gènes altérés de façon très fréquente et non connus à ce jour comme impliqués dans le MM humain, représentant de bon candidats. Dans ce travail de thèse, nous avons choisi de focaliser notre étude fonctionnelle sur les gènes de la région 16-17 Mb du CFA 30 (*TRPM7*, *USP8*, *GABPB1* et *SPPL2A*), car la fréquence importante de ces amplifications focales et leur association avec un mauvais pronostic suggèrent un rôle important dans l'oncogenèse du MM canin. Nous avons démontré que ces amplifications menaient à la surexpression importante de ces gènes, et que les gènes *TRPM7*, *GABPB1* et *SPPL2A* avaient un rôle dans la prolifération cellulaire, potentialisé par l'amplification "en bloc" de ces gènes. Comme mentionné dans la partie IV des résultats, ces gènes ont été récemment mis en évidence dans d'autres cancers humains et nous suspectons qu'ils aient un rôle clé dans le développement des MM canins et dans le processus métastatique. En effet, le gène *TRPM7* notamment, est impliqué dans la transition épithélio-mésenchymateuse et a un rôle dans la migration cellulaire et l'invasion dans plusieurs cancers²⁷⁰⁻²⁷³. Ces 4 gènes candidats n'ont à ce jour pas été mis en évidence dans les MM humains, cependant, la publication de Hirsch *et al.* sur le chromothripsis et les amplifications focales du mélanome cutané mentionne un cas avec chromothripsis du chromosome 15 (orthologue du CFA 30), avec une amplification de ces mêmes gènes¹⁹⁰. Une autre étude récente sur les mélanomes acro-lentigineux fait état d'un cas présentant un réarrangement intrachromosomique du chromosome 15, intéressant les gènes *MYO5A* et *TRPM7*²⁹⁷, et un second cas de mélanome acro-lentigineux dans le TCGA (The Cancer Genome Atlas) présente aussi une amplification focale et une surexpression des gènes *TRPM7*, *USP8*, *GABPB1* et *SPPL2A*. Ces cas illustrent le fait que les altérations du CFA 30 dans le MM canin existent également dans un sous-groupe de mélanomes humains, plutôt non UV-induits. De plus, dans l'étude très récente de Zhou *et al.* sur une cohorte de 65 MM oraux, le gène *TRPM7* ressort parmi les gènes les plus significativement mutés (Zhou *et al.* 2019). Enfin, sur les profils de CNA présents dans les études de Newell *et al.* et Zhou *et al.*, on observe que le chromosome 15 humain présente fréquemment des délétions sur sa partie proximale et plus rarement des amplifications qui pourraient intéresser la région orthologue du CFA 30 canin autour de 16-17 Mb)^{168,181}. Il serait très intéressant de pouvoir générer et analyser des données d'expression de MM humains, particulièrement oraux, afin de voir si nos gènes d'intérêts sont également dérégulés chez l'homme. Ces travaux nous font émettre l'hypothèse que les MM canins avec amplification focale du CFA 30 pourraient se rapprocher d'un sous-ensemble de mélanomes non UV-induits humains avec altérations du chromosome 15. De plus d'après les données du TCGA, le gène *TRPM7* est globalement surexprimé pan-cancer, et est associé à un mauvais pronostic dans le mélanome cutané. Cependant, il faut rester critique quant aux analyses du TCGA, car elles ont des limites comme l'hétérogénéité des patients en terme de stade clinique ou de type de traitement entrepris. Néanmoins ces données humaines semblent confirmer les résultats du second article présenté²⁶⁰ où l'amplification focale du CFA 30 (dont *TRPM7*) était associée à une durée de survie plus courte chez les chiens atteints de MM. .

3. Cas particulier de l'expression de l'oncogène *TERT* dans ces sous-groupes

Nous avons mis en évidence chez le chien la surexpression du gène *TERT* dans le sous-groupe ayant de nombreux SV. Ce gène code pour la sous-unité catalytique de la télomérase, qui permet de conserver la longueur du chromosome en ajoutant une structure spécifique protectrice à chaque extrémité appelée télomère. *TERT* est surexprimé dans les cellules germinales et les cellules souches pour lutter contre le vieillissement et la sénescence, mais n'est généralement pas exprimé dans les cellules somatiques de l'organisme. Chez l'homme, il a été montré sur 6 835 cancers que 73% exprimaient *TERT* et que cette expression était associée à des réarrangements et des amplifications du gène, ou à des mutations ponctuelles dans la région promotrice notamment²⁹⁸. L'année dernière, Zhou *et al.* ont montré qu'environ 50% des MM de la cavité buccale présentait une amplification de *TERT* souvent réarrangé avec *CDK4*¹⁸¹, et les MM d'autres localisations peuvent également présenter cette altération¹⁶⁸. De plus, les anomalies de ce gène (mutation du promoteur, mutation germinale, réarrangement, amplification) touchent environ 40% des cas de mélanomes acro-lentigineux²⁹⁷. Les mutations C250T et C228T du promoteur de *TERT* sont les altérations les plus connues et ont été mises en évidence dans de nombreux cancers parmi lesquels le glioblastome et le mélanome cutané, conduisant à une surexpression de ce gène²⁹⁹. En effet, ces mutations créent de nouveaux sites de fixation reconnus par certains facteurs de transcription comme GABPB qui induisent la surexpression du gène^{276,299,300}. Dans les gliomes de grade III, la surexpression de *TERT* est corrélée à la surexpression des sous-unités de GABPB dont GABPB1³⁰⁰. Dans les MM canins, la surexpression de *TERT* n'était pas corrélée à la surexpression de *GABPB1* bien que ce dernier soit très souvent amplifié (CFA 30) et surexprimé. Chez le chien nous n'avons pas observé d'amplification ni de réarrangement de *TERT*, et aucune mutation du promoteur n'a été retrouvée dans les 4 lignées séquencées dans notre étude. Cela a été confirmé par l'étude d'Hendricks *et al.* où le séquençage de génome complet réalisé sur 7 échantillons tumoraux canins (5 MM, 1MC et 1 ALM) n'a pas montré de mutations du promoteur de *TERT*¹⁶⁰. Cependant les mutations du promoteur ont été cherchées sur un petit nombre d'échantillons et il serait intéressant d'inclure plus d'individus. D'autres éléments peuvent induire la surexpression de *TERT* comme l'activation des voies NFκB ou JAK/STAT (notamment via *STAT3* et *IL2*), de l'oncogène *MYC* ou des isoformes VEGF165 et VEGF189, mais aussi des altérations épigénétiques comme la méthylation /déméthylation de certaines zones du promoteur²⁹⁹. L'étude très récente de Rahman *et al.* sur des données d'expression de 8 cas de MM canins a montré que la voie NFκB était significativement surexprimée²⁵¹, ce qui pourrait être une explication à la surexpression de *TERT* que nous observons. Il est intéressant de noter qu'en plus de sa fonction dans l'immortalité des cellules cancéreuses, *TERT* a également un rôle dans la tumorigenèse, la prolifération cellulaire et l'inflammation^{299,301} via son action sur les promoteurs de gènes cibles des voies NFκB et Wnt/β-caténine mais aussi des interleukines. Nous n'avons pas encore exploré ce rôle potentiel de *TERT* dans le MM canin mais cela est une perspective intéressante.

En perspective de ce travail, afin de valider ces résultats d'association entre expression d'oncogène/gènes de l'immunité et altérations génomiques chez le chien, nous envisageons de répliquer ces résultats sur la cohorte de 73 cas de MM canins précédemment publiée²⁶⁰ et de réaliser des immunomarquages. Dans un second temps, nous aimerions réaliser cette recherche chez l'homme dès qu'il sera possible d'accéder aux échantillons humains via la base de données MelBase et RicMel auprès desquelles nous avons déposé une demande d'échantillons.

III. Thérapies ciblées pour le MM

1. La voie CDK4/6

Les études récentes menées chez l'homme ont mis en évidence l'importance de la voie CDK4 dans les MM. Sur 213 échantillons de MM, Xu *et al.* ont montré que 81,7% présentaient des CNA sur les gènes *CDK4*, *CDKN2A* ou *CCND1*¹⁹³. Cette voie est représentée sur la Figure 19³⁰². En particulier, 57% des tumeurs présentaient une perte de *CDKN2A*, et 47% une amplification de *CDK4*. Leur expérience sur 10 souris PDX (patient derived xenograft) avec et sans altérations de la voie CDK4, traitées avec deux inhibiteurs de CDK4 (l'inhibiteur AT7519 pan-CDK et l'inhibiteur palbociclib ciblant CDK4/6) a montré que la réponse était corrélée à la présence d'une altération de la voie. Cela a été confirmé dans l'étude de Zhou *et al.* où les souris PDX présentant une amplification de *CDK4* (n=14) avaient un taux de réponse au palbociclib (90 mg/kg sur 8 semaines) significativement supérieur à celles n'ayant pas cette altération (n=10)¹⁸¹.

Nos résultats préliminaires ont montré que toutes nos lignées cellulaires canines (n=4) étaient sensibles au palbociclib (inhibiteur CDK4/6) et présentaient des concentrations inhibitrices médianes (IC50) < 300nM (cf publi Bollard) (expérience réalisée sur la plateforme Impacell, Biosit, Rennes) (Tableau 1).

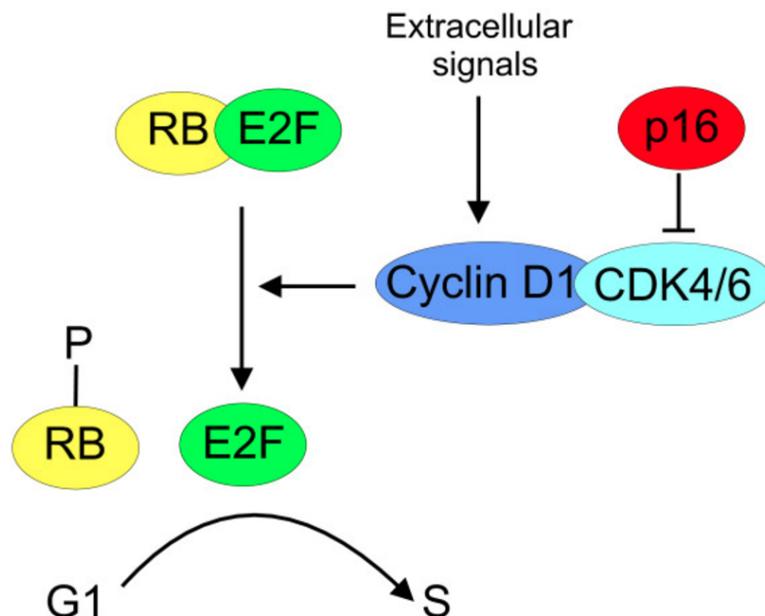


Figure 19 : Régulation de la transition G1/S du cycle cellulaire et rôle de CCND1 (Cyclin D1), CDK4/6 et CDKN2A (p16). La liaison avec la cycline D1 active la kinase CDK4 qui phosphoryle Rb, libérant ainsi le facteur de transcription E2F qui permet la progression du cycle cellulaire. D'après Akin *et al.* 2014.

Les 4 lignées cellulaires canines de MM testées présentait une altération de la voie CDK4 (mutation ou délétion de *CDKN2A* ou amplification importante de *CDK4*). Ces résultats sont donc en accord avec ceux de Xu *et al.* qui ont montré sur deux lignées cellulaires de MM humains et 10 souris PDX que la sensibilité aux inhibiteurs de CDK4 était corrélée à la présence d'altération de la voie CDK4¹⁹³. Cependant, nous avons trouvé que nos deux lignées présentant l'amplification de *CDK4* (32 et 50 copies) étaient 5 à 10 fois moins sensibles que les deux autres qui présentaient une délétion ou une mutation de *CDKN2A*. Une de nos hypothèses est que la sensibilité des lignées au palbociclib est corrélée négativement au nombre de copies de *CDK4* dans les MM canins. En effet, deux de nos lignées présentaient un nombre élevé de copies de *CDK4* (32 et 50 copies qPCR) et une surexpression très importante de cette cible, et nous pouvons donc imaginer qu'il faut plus de drogue pour l'inhiber (cf Western blot présenté dans l'Article 3). Cette expérience doit être répliquée et d'autres sont en cours pour confirmer cette hypothèse.

Lignée cellulaire	Nombre de copies de <i>CDK4</i> (qPCR)	Autres altérations de la voie CDK4/6 (WGS ou WES)	IC50 du palbociclib (μmol/L)
Dog-Oral-Mel-18333	2,4	Délétion de <i>CDKN2A</i>	0,015
Dog-Oral-Mel-18249	3	Mutation de <i>CDKN2A</i>	0,06
Bear	32	Aucune	0,14
Dog-Oral-Mel-18395	50	Délétion de <i>CDKN2A</i> Amplification de <i>CCND1</i>	0,27

Tableau 1 : Sensibilité de 4 lignées cellulaires de MM canin au palbociclib en fonction des altérations de la voie CDK4 détectées en PCR quantitative (qPCR) ou séquençage d'exome (WES) ou génome entier (WGS).

Ces altérations de la voie CDK4 sont également très fréquentes dans les mélanomes acro-lentigineux humains. Selon une étude récente sur 514 échantillons tumoraux, 83% des cas présentait des CNA sur les gènes *CDK4*, *CCND1* et *CDKN2A* ¹³⁷. Dans cette étude, des tests avec différents inhibiteurs de CDK4 ont été effectués sur des souris PDX et ont également montré une efficacité de l'inhibiteur AT7519 et du palbociclib sur les tumeurs ayant la voie CDK4 altérée. Cela indique donc que dans ce type de mélanome cutané non UV-induit, les inhibiteurs pan-CDK et de CDK4/6 seraient également des thérapies intéressantes.

2. La protéine TRPM7

Nous avons également testé un inhibiteur de TRPM7, le NSB593 sur 6 lignées cellulaires canines (expérience réalisée sur la plateforme Impacell, Biosit). Les résultats ont montré que l'IC50 de NSB593 était corrélée au nombre de copies du gène *TRPM7* dans la lignée cellulaire (Figure 20). Là encore, il semble que la sensibilité à l'inhibiteur dépende de la quantité de cible, et que lorsque celle-ci est plus importante, une concentration d'inhibiteur plus forte est nécessaire. Des expériences sont en cours afin de confirmer cette hypothèse.

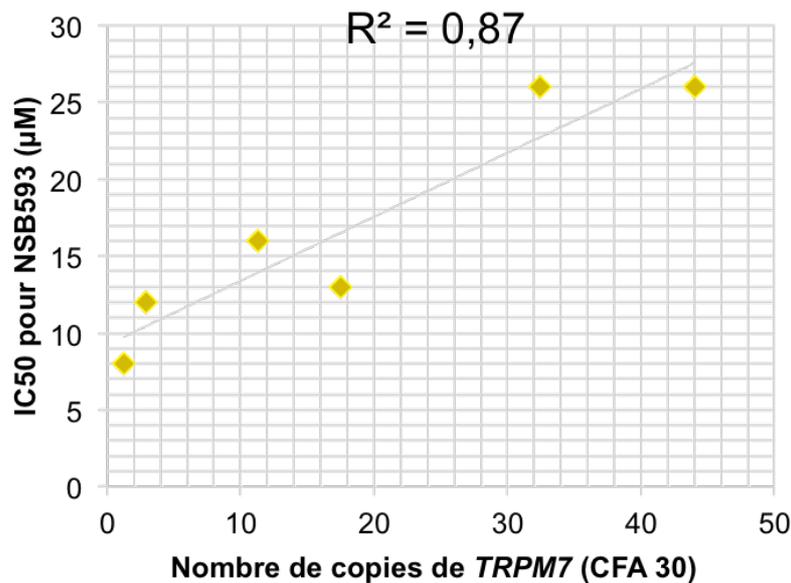


Figure 20 : Concentration inhibitrice médiane de l'inhibiteur de TRPM7, NSB593, sur 6 lignées cellulaires de MM canins en fonction du nombre de copies du gène *TRPM7* (qPCR). On observe que plus le nombre de copie du gène *TRPM7* est élevé, moins la lignée est sensible à l'inhibiteur.

Ces résultats préliminaires doivent être confirmés, mais laissent penser que l'altération du gène cible (amplification) confère une sensibilité moindre à l'inhibiteur que des activations de la voie en amont de la cible (pour la voie CDK4 par exemple), et que la sensibilité à l'inhibiteur dépend de la quantité de cible (pour CDK4 et *TRPM7*). Dans le cas du MM canin où les amplifications sont très importantes avec une surexpression marquée des gènes cibles, il pourrait être judicieux d'utiliser une thérapie qui cible un gène de la voie en aval, comme par exemple un anti-Rb en ce qui concerne la voie CDK4.

IV. Apport du modèle chien pour les essais cliniques

Comme nous l'avons mentionné dans la partie d'introduction, le chien est l'animal le plus médicalisé et les essais cliniques chez des animaux atteints de cancers représentent une opportunité unique de faire avancer la recherche en oncologie humaine et vétérinaire, dans l'esprit de "One health". La rareté du MM chez l'homme rend difficile la mise en place d'essais cliniques, et sa fréquence et sa spécificité raciale chez le chien en fait un excellent modèle d'étude pour ce cancer. Les connaissances acquises sur la génétique des MM canins permettraient de réaliser des essais cliniques en stratifiant les individus, pour évaluer l'efficacité d'une drogue en fonction de la génomique de la tumeur.

Concernant les thérapies ciblées et notamment le palbociclib (inhibiteur de CDK4/6), les résultats sur les souris PDX sont très encourageants^{181,193} et une étude de

cas a mentionné un cas de MM métastatique chez une femme traitée au palbociclib, avec un contrôle de la maladie pendant au moins 6 mois ³⁰³. Il pourrait être intéressant d'effectuer un essai clinique chez des chiens atteints de MM et d'évaluer la réponse clinique en fonction des différentes altérations de la voie CDK4 présentes dans la tumeur. De plus, comme les essais de toxicité sont généralement effectués chez le chien, les doses toxiques sont déjà connues dans cette espèce pour cette molécule. Nous pourrions également évaluer l'efficacité d'inhibiteurs de TRPM7 chez les chiens présentant une amplification focale du CFA 30, et ces résultats pourraient être intéressants pour l'oncologie humaine, notamment pour le traitement des cancers du sein métastatiques qui sur-expriment cette cible ²⁷². Enfin, la molécule 6-thio-dG (6-thio-2'deoxyguanosine) a récemment été développée et pourrait grandement impacter la prise en charge des cancers, notamment en cas de résistance acquise aux thérapies. Cette molécule agit sur les cellules exprimant *TERT* et est incorporée dans les télomères par les télomérases ce qui induit la sénescence et /ou l'apoptose de la cellule ³⁰⁴. Les essais sur des modèles pré-cliniques de différents cancers résistants aux thérapies (mélanome, tumeurs du cerveau pédiatriques et cancer du poumon non à petites cellules) ont montré que le 6-thio-2'deoxyguanosine était une nouvelle approche efficace pour traiter ces cancers résistants ³⁰⁵⁻³⁰⁷. Les chiens atteints de MM spontanés répondant peu ou pas à la chimiothérapie, avec des tumeurs surexprimant *TERT* seraient un bon modèle d'étude de l'efficacité de cette nouvelle molécule avant de la tester chez l'homme. Etant donné que la capacité à allonger les télomères est une caractéristique des cellules cancéreuses, et que 95% des cancers l'acquièrent en réactivant les télomérases ³⁰¹, de telles données cliniques pourraient intéresser l'oncologie humaine pour le traitement de nombreux cancers.

Bien que les outils d'immunomarquage et la recherche sur le micro-environnement et l'immunité anti-tumorale soient moins avancés que chez l'homme, (les mécanismes de l'immunité sont moins bien connus chez le chien) les immunothérapies se développent chez le chien. En 2007, le laboratoire Merial a commercialisé le vaccin anti-mélanome canin Oncept ND, utilisable pour les chiens atteints de MM de stade II et III après l'exérèse chirurgicale et /ou la radiothérapie. Très récemment l'équipe de Maekawa *et al.* a développé des anticorps monoclonaux canins anti PD-L1 qui ont montré une efficacité clinique sur 1/7 chiens atteints de MM ²⁵⁸. Nos résultats suggèrent la présence de MM avec un micro-environnement tumoral plus ou moins riche en cellules immunitaires, et donc une probabilité de réponse à l'immunothérapie différente ²⁹⁴. En effet l'efficacité des inhibiteurs de checkpoint dont l'anti PD-L1 serait meilleure pour des cancers ayant un micro-environnement riche en lymphocytes T, ce qui correspond à notre sous-groupe ayant une majorité de tumeurs à faible remaniement "SV low". Le vaccin anti-mélanome en revanche, aurait plutôt un rôle de "priming" dans les tumeurs ayant un micro-environnement très pauvre en cellules immunitaires et inflammatoires²⁹⁴, ce qui correspond à notre sous-groupe ayant une majorité de tumeurs avec de nombreux remaniements "SV high". Ce priming permet d'attirer des lymphocytes T au sein de la tumeur, et le couplage avec un inhibiteur de checkpoint enclenche une immunité anti-tumorale²⁹⁴. Le priming peut également être provoqué par la radiothérapie ou la chimiothérapie²⁹⁴. Il pourrait être intéressant

d'évaluer l'efficacité de ces traitements seuls et combinés (priming + inhibiteurs de checkpoint) dans une cohorte de chiens atteints de MM, en fonction des altérations génétiques de la tumeur, notamment les profils de CNA. Ces données chez le chien pourraient permettre d'orienter les décisions thérapeutiques en oncologie humaine pour le traitement du MM.

CONCLUSION

Chez l'homme et le chien, le mélanome muqueux (MM) est un cancer très agressif, de mauvais pronostic présentant un grand nombre d'échecs thérapeutiques. Ce cancer étant rare chez l'homme, ses caractéristiques génétiques sont longtemps restées méconnues et les essais cliniques rares compte tenu de la faible incidence. L'objectif de ma thèse était de caractériser les MM canins sur le plan génomique et transcriptomique, de les comparer aux données humaines disponibles pour mieux comprendre le développement tumoral et proposer de nouvelles pistes thérapeutiques pertinentes pour l'oncologie humaine.

En plus de l'homologie sur les plans épidémiologique, clinique, histologique et biologique, nous avons trouvé que les MM canins et humains se ressemblaient également sur le plan génétique et étaient caractérisés principalement par un taux important de variants structuraux, essentiellement des variations de nombre de copies (CNA), et des réarrangements complexes de type chromothripsis. Comme dans le MM buccal humain où les translocations chromosomiques et les réarrangements de type breakage-fusion-bridge sont de mauvais pronostic, nous avons trouvé que les réarrangements touchant le chromosome canin (CFA) 30 avaient aussi une valeur pronostique péjorative.

Sur le plan transcriptomique, nous avons mis en évidence deux sous-groupes de MM canins différents par leur micro-environnement et leur taux de variants structuraux. Certaines cibles thérapeutiques comme les checkpoint immunitaires *CTLA-4*, *TIM3* et *LAG3* sont surexprimées dans le sous-groupe plus immunogène, alors que l'autre sous-groupe présente plutôt une surexpression de *TERT* et d'autres oncogènes comme *CDK4*, *MDM2* et *MITF*. En mettant en regard les données de génomiques et de transcriptomique, nous avons trouvé que comme dans les cancers humains, les MM canins présentant de nombreux remaniements chromosomiques possèdent un micro-environnement plus pauvre notamment en cellules immunitaires comme les lymphocytes T.

Concernant l'aspect fonctionnel, nous sommes partis de l'hypothèse que des altérations fréquentes ciblaient très probablement des gènes clés pour le développement de la tumeur. Ainsi, nous avons mis en évidence le rôle cumulatif des gènes localisés sur le CFA 30 *TRPM7*, *GABPB1* et *SPPL2A* dans la prolifération cellulaire. Ces gènes sont également altérés dans quelques cas de mélanomes humains non UV-induits, et *TRPM7* et *GABPB1* ont été récemment impliqués dans le développement des carcinomes mammaires et ovariens, et des gliomes respectivement ^{270-273,276}.

Les mélanomes muqueux du chien sont donc de bons modèles pour les mélanomes muqueux humains et plus généralement pour les mélanomes non induits par les UV comme les mélanomes acro-lentigineux. Les mélanomes muqueux humains et canins présentent des altérations génétiques communes, et la mise en place d'essais

cliniques chez des chiens “patients” permettrait d’identifier plus rapidement des traitements ou des associations de traitements plus efficaces, en fonction de la génétique de la tumeur. Ainsi, le concept “One Health” prend tout son sens, et les médecines humaine et vétérinaire bénéficieraient chacune des avancées en génétique et thérapeutique de l’autre.

REFERENCES

1. Fan, Z. *et al.* Worldwide patterns of genomic variation and admixture in gray wolves. *Genome Res.* **26**, 163–173 (2016).
2. Thalmann, O. *et al.* Complete Mitochondrial Genomes of Ancient Canids Suggest a European Origin of Domestic Dogs. *Science* **342**, 871–874 (2013).
3. vonHoldt, B. M. *et al.* Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature* **464**, 898–902 (2010).
4. Skoglund, P., Ersmark, E., Palkopoulou, E. & Dalén, L. Ancient wolf genome reveals an early divergence of domestic dog ancestors and admixture into high-latitude breeds. *Curr. Biol.* **25**, 1515–1519 (2015).
5. Freedman, A. H., Lohmueller, K. E. & Wayne, R. K. Evolutionary History, Selective Sweeps, and Deleterious Variation in the Dog. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **47**, 73–96 (2016).
6. Shannon, L. M. *et al.* Genetic structure in village dogs reveals a Central Asian domestication origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, 13639–13644 (2015).
7. Wang, G.-D. *et al.* Out of southern East Asia: the natural history of domestic dogs across the world. *Cell Res* **26**, 21–33 (2016).
8. Frantz, L. A. F. *et al.* Genomic and archaeological evidence suggest a dual origin of domestic dogs. *Science* **352**, 1228–1231 (2016).
9. Botigué, L. R. *et al.* Ancient European dog genomes reveal continuity since the Early Neolithic. *Nat Commun* **8**, (2017).
10. Schubert, M. *et al.* Prehistoric genomes reveal the genetic foundation and cost of horse domestication. *PNAS* **111**, E5661–E5669 (2014).
11. Freedman, A. H. *et al.* Genome sequencing highlights the dynamic early history of dogs. *PLoS Genet.* **10**, e1004016 (2014).
12. Axelsson, E. *et al.* The genomic signature of dog domestication reveals adaptation to a starch-rich diet. *Nature* **495**, 360–364 (2013).
13. Ollivier, M. *et al.* Amy2B copy number variation reveals starch diet adaptations in ancient European dogs. *R Soc Open Sci* **3**, 160449 (2016).
14. Lindblad-Toh, K. *et al.* Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* **438**, 803–819 (2005).
15. Rimbault, M. & Ostrander, E. A. So many doggone traits: mapping genetics of multiple phenotypes in the domestic dog. *Hum. Mol. Genet.* **21**, R52–57 (2012).
16. Plassais, J. *et al.* Whole genome sequencing of canids reveals genomic regions under selection and variants influencing morphology. *Nat Commun* **10**, 1489 (2019).
17. Karlsson, E. K. *et al.* Genome-wide analyses implicate 33 loci in heritable dog osteosarcoma, including regulatory variants near CDKN2A/B. *Genome Biol.* **14**, R132 (2013).
18. Dreger, D. L., Parker, H. G., Ostrander, E. A. & Schmutz, S. M. Identification of a mutation that is associated with the saddle tan and black-and-tan phenotypes in Basset Hounds and Pembroke Welsh Corgis. *J. Hered.* **104**, 399–406 (2013).
19. Hédan, B. *et al.* Identification of a Missense Variant in MFSD12 Involved in

- Dilution of Phaeomelanin Leading to White or Cream Coat Color in Dogs. *Genes (Basel)* **10**, (2019).
20. Cadieu, E. *et al.* Coat variation in the domestic dog is governed by variants in three genes. *Science* **326**, 150–153 (2009).
 21. Shearin, A. L. & Ostrander, E. A. Leading the way: canine models of genomics and disease. *Dis Model Mech* **3**, 27–34 (2010).
 22. Starkey, M. P., Scase, T. J., Mellersh, C. S. & Murphy, S. Dogs really are man's best friend—Canine genomics has applications in veterinary and human medicine! *Brief Funct Genomics* **4**, 112–128 (2005).
 23. Kirkness, E. F. *et al.* The dog genome: survey sequencing and comparative analysis. *Science* **301**, 1898–1903 (2003).
 24. Goodstadt, L. & Ponting, C. P. Phylogenetic reconstruction of orthology, paralogy, and conserved synteny for dog and human. *PLoS Comput. Biol.* **2**, e133 (2006).
 25. Derrien, T., André, C., Galibert, F. & Hitte, C. Analysis of the unassembled part of the dog genome sequence: chromosomal localization of 115 genes inferred from multispecies comparative genomics. *J. Hered.* **98**, 461–467 (2007).
 26. Derrien, T. *et al.* Revisiting the missing protein-coding gene catalog of the domestic dog. *BMC Genomics* **10**, 62 (2009).
 27. Derrien, T., Vaysse, A., André, C. & Hitte, C. Annotation of the domestic dog genome sequence: finding the missing genes. *Mamm. Genome* **23**, 124–131 (2012).
 28. Grall, A. *et al.* PNPLA1 mutations cause autosomal recessive congenital ichthyosis in golden retriever dogs and humans. *Nat. Genet.* **44**, 140–147 (2012).
 29. Wucher, V. *et al.* FEELnc: a tool for long non-coding RNA annotation and its application to the dog transcriptome. *Nucleic Acids Res* **45**, e57 (2017).
 30. Le Béguec, C. *et al.* Characterisation and functional predictions of canine long non-coding RNAs. *Sci Rep* **8**, (2018).
 31. Megquier, K. *et al.* BarkBase: Epigenomic Annotation of Canine Genomes. *Genes (Basel)* **10**, (2019).
 32. Wang, G.-D. *et al.* Dog10K: the International Consortium of Canine Genome Sequencing. *Natl Sci Rev* **6**, 611–613 (2019).
 33. Field, M. A. *et al.* Canfam_GSD: De novo chromosome-length genome assembly of the German Shepherd Dog (*Canis lupus familiaris*) using a combination of long reads, optical mapping, and Hi-C. *Gigascience* **9**, (2020).
 34. Ahonen, S. *et al.* Nationwide genetic testing towards eliminating Lafora disease from Miniature Wirehaired Dachshunds in the United Kingdom. *Canine Genet Epidemiol* **5**, (2018).
 35. Ohmura, S. *et al.* Detection of monoclonality in intestinal lymphoma with polymerase chain reaction for antigen receptor gene rearrangement analysis to differentiate from enteritis in dogs. *Vet Comp Oncol* **15**, 194–207 (2017).
 36. Decker, B. *et al.* Homologous Mutation to Human BRAF V600E Is Common in Naturally Occurring Canine Bladder Cancer--Evidence for a Relevant Model System and Urine-Based Diagnostic Test. *Mol. Cancer Res.* **13**, 993–1002 (2015).
 37. Mochizuki, H., Shapiro, S. G. & Breen, M. Detection of BRAF Mutation in Urine DNA as a Molecular Diagnostic for Canine Urothelial and Prostatic Carcinoma. *PLoS One* **10**, (2015).

38. Schwarzenbach, H., Hoon, D. S. B. & Pantel, K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* **11**, 426–437 (2011).
39. London, C. A. Small Molecule Inhibitors in Veterinary Oncology Practice. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice* **44**, 893–908 (2014).
40. Downing, S., Chien, M. B., Kass, P. H., Moore, P. F. & London, C. A. Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs. *American Journal of Veterinary Research* **63**, 1718–1723 (2002).
41. Gil da Costa, R. M. C-kit as a prognostic and therapeutic marker in canine cutaneous mast cell tumours: From laboratory to clinic. *The Veterinary Journal* **205**, 5–10 (2015).
42. Takeuchi, Y. *et al.* Validation of the prognostic value of histopathological grading or c-kit mutation in canine cutaneous mast cell tumours: A retrospective cohort study. *The Veterinary Journal* **196**, 492–498 (2013).
43. Tamlin, V. S. *et al.* Prevalence of exon 11 internal tandem duplications in the C-KIT proto-oncogene in Australian canine mast cell tumours. *Australian Veterinary Journal* **95**, 386–391 (2017).
44. Zemke, D., Yamini, B. & Yuzbasiyan-Gurkan, V. Mutations in the Juxtamembrane Domain of c-KIT Are Associated with Higher Grade Mast Cell Tumors in Dogs. *Vet Pathol* **39**, 529–535 (2002).
45. Webster, J. D. *et al.* The Role of c-KIT in Tumorigenesis: Evaluation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Neoplasia* **8**, 104–111 (2006).
46. Kiupel, M., Webster, J. D., Kaneene, J. B., Miller, R. & Yuzbasiyan-Gurkan, V. The Use of KIT and Tryptase Expression Patterns as Prognostic Tools for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Vet Pathol* **41**, 371–377 (2004).
47. Blackwood, L. *et al.* European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. *Veterinary and Comparative Oncology* **10**, e1–e29 (2012).
48. Marconato, L. *et al.* Concordance of c-kit Mutational Status in Matched Primary and Metastatic Cutaneous Canine Mast Cell Tumors at Baseline. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **28**, 547–553 (2014).
49. Berger, E. P. *et al.* Retrospective evaluation of toceranib phosphate (Palladia®) use in the treatment of gastrointestinal stromal tumors of dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **32**, 2045–2053 (2018).
50. London, C. *et al.* Preliminary evidence for biologic activity of toceranib phosphate (Palladia®) in solid tumours. *Veterinary and Comparative Oncology* **10**, 194–205 (2012).
51. Daly, M. *et al.* Safety of masitinib mesylate in healthy cats. *J. Vet. Intern. Med.* **25**, 297–302 (2011).
52. Olmsted, G. A., Farrelly, J., Post, G. S. & Smith, J. Tolerability of toceranib phosphate (Palladia) when used in conjunction with other therapies in 35 cats with feline oral squamous cell carcinoma: 2009-2013. *J. Feline Med. Surg.* **19**, 568–575 (2017).
53. Berger, E. P. *et al.* Retrospective evaluation of toceranib phosphate (Palladia) use in cats with mast cell neoplasia. *J. Feline Med. Surg.* **20**, 95–102 (2018).
54. Harper, A. & Blackwood, L. Toxicity and response in cats with neoplasia treated with toceranib phosphate. *J. Feline Med. Surg.* **19**, 619–623 (2017).
55. Wiles, V. *et al.* Retrospective evaluation of toceranib phosphate (Palladia) in cats

- with oral squamous cell carcinoma. *J. Feline Med. Surg.* **19**, 185–193 (2017).
56. Prouteau, A. & Hédan, B. Intérêts de la génétique en oncologie vétérinaire. *Le Point vétérinaire (Éd. Expert canin)* **50**, 48–58 (2019).
57. Gardner, H. L., Fenger, J. M. & London, C. A. Dogs as a Model for Cancer. *Annu Rev Anim Biosci* **4**, 199–222 (2016).
58. Alvarez, C. E. Naturally Occurring Cancers in Dogs: Insights for Translational Genetics and Medicine. *ILAR J* **55**, 16–45 (2014).
59. Fleming, J. M., Creevy, K. E. & Promislow, D. E. L. Mortality in North American Dogs from 1984 to 2004: An Investigation into Age-, Size-, and Breed-Related Causes of Death. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **25**, 187–198 (2011).
60. Adams, V. J., Evans, K. M., Sampson, J. & Wood, J. L. N. Methods and mortality results of a health survey of purebred dogs in the UK. *J Small Anim Pract* **51**, 512–524 (2010).
61. Grüntzig, K. *et al.* Swiss Canine Cancer Registry 1955-2008: Occurrence of the Most Common Tumour Diagnoses and Influence of Age, Breed, Body Size, Sex and Neutering Status on Tumour Development. *J. Comp. Pathol.* **155**, 156–170 (2016).
62. Paoloni, M. C. & Khanna, C. Comparative Oncology Today. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **37**, 1023–v (2007).
63. Richards, K. L. & Suter, S. E. Man's best friend: what can pet dogs teach us about non-Hodgkin lymphoma? *Immunol Rev* **263**, 173–191 (2015).
64. Ponce, F. *et al.* A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. *Vet. Pathol.* **47**, 414–433 (2010).
65. Simpson, S. *et al.* Comparative review of human and canine osteosarcoma: morphology, epidemiology, prognosis, treatment and genetics. *Acta Vet. Scand.* **59**, 71 (2017).
66. Willmann, M. *et al.* Comparative oncology: The paradigmatic example of canine and human mast cell neoplasms. *Vet Comp Oncol* **17**, 1–10 (2019).
67. Hédan, B. *et al.* PTPN11 mutations in canine and human disseminated histiocytic sarcoma. *Int. J. Cancer* (2020) doi:10.1002/ijc.32991.
68. Sommer, B. C., Dhawan, D., Ratliff, T. L. & Knapp, D. W. Naturally-Occurring Canine Invasive Urothelial Carcinoma: A Model for Emerging Therapies. *Bladder Cancer* **4**, 149–159.
69. Knapp, D. W. *et al.* Naturally-Occurring Invasive Urothelial Carcinoma in Dogs, a Unique Model to Drive Advances in Managing Muscle Invasive Bladder Cancer in Humans. *Front Oncol* **9**, 1493 (2019).
70. LeBlanc, A., Mazcko, C. & Khanna, C. Defining the value of a comparative approach to cancer drug development. *Clin Cancer Res* **22**, 2133–2138 (2016).
71. Miller, A. D., Miller, C. R. & Rossmeisl, J. H. Canine Primary Intracranial Cancer: A Clinicopathologic and Comparative Review of Glioma, Meningioma, and Choroid Plexus Tumors. *Front Oncol* **9**, (2019).
72. Amin, S. B. *et al.* Comparative Molecular Life History of Spontaneous Canine and Human Gliomas. *Cancer Cell* **37**, 243-257.e7 (2020).
73. Prouteau, A. & André, C. Canine Melanomas as Models for Human Melanomas: Clinical, Histological, and Genetic Comparison. *Genes (Basel)* **10**, (2019).

74. Nishiya, A. T. *et al.* Comparative Aspects of Canine Melanoma. *Vet Sci* **3**, (2016).
75. Hernandez, B. *et al.* Naturally Occurring Canine Melanoma as a Predictive Comparative Oncology Model for Human Mucosal and Other Triple Wild-Type Melanomas. *Int J Mol Sci* **19**, (2018).
76. Khanna, C., London, C., Vail, D., Mazcko, C. & Hirschfeld, S. Guiding the Optimal Translation of New Cancer Treatments From Canine to Human Cancer Patients. *Clin Cancer Res* **15**, 5671–5677 (2009).
77. Dobson, J. M. Breed-Predispositions to Cancer in Pedigree Dogs. *ISRN Vet Sci* **2013**, (2013).
78. Comazzi, S. *et al.* Breed-associated risks for developing canine lymphoma differ among countries: an European canine lymphoma network study. *BMC Vet Res* **14**, (2018).
79. Seelig, D. M. *et al.* Canine T-Zone Lymphoma: Unique Immunophenotypic Features, Outcome, and Population Characteristics. *J Vet Intern Med* **28**, 878–886 (2014).
80. Pastor, M. *et al.* Genetic and Environmental Risk Indicators in Canine Non-Hodgkin's Lymphomas: Breed Associations and Geographic Distribution of 608 Cases Diagnosed throughout France over 1 Year. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **23**, 301–310 (2009).
81. Cadieu, E. & Ostrander, E. A. Canine Genetics Offers New Mechanisms for the Study of Human Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **16**, 2181–2183 (2007).
82. Breen, M. Update on Genomics in Veterinary Oncology. *Top Companion Anim Med* **24**, 113–121 (2009).
83. Schiffman, J. D. & Breen, M. Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **370**, (2015).
84. Abadie, J. *et al.* Epidemiology, pathology, and genetics of histiocytic sarcoma in the Bernese mountain dog breed. *J. Hered.* **100 Suppl 1**, S19-27 (2009).
85. Shearin, A. L. *et al.* The MTAP-CDKN2A locus confers susceptibility to a naturally occurring canine cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **21**, 1019–1027 (2012).
86. Melin, M. *et al.* Genome-Wide Analysis Identifies Germ-Line Risk Factors Associated with Canine Mammary Tumours. *PLoS Genet.* **12**, e1006029 (2016).
87. Makielski, K. M. *et al.* Risk Factors for Development of Canine and Human Osteosarcoma: A Comparative Review. *Vet Sci* **6**, (2019).
88. Karyadi, D. M. *et al.* A copy number variant at the KITLG locus likely confers risk for canine squamous cell carcinoma of the digit. *PLoS Genet.* **9**, e1003409 (2013).
89. Tonomura, N. *et al.* Genome-wide association study identifies shared risk loci common to two malignancies in golden retrievers. *PLoS Genet.* **11**, e1004922 (2015).
90. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
91. Paoloni, M. *et al.* Canine tumor cross-species genomics uncovers targets linked to osteosarcoma progression. *BMC Genomics* **10**, 625 (2009).
92. Gardner, H. L. *et al.* Canine osteosarcoma genome sequencing identifies recurrent mutations in DMD and the histone methyltransferase gene SETD2. *Commun Biol* **2**, 266 (2019).
93. Sakthikumar, S. *et al.* SETD2 Is Recurrently Mutated in Whole-Exome Sequenced

- Canine Osteosarcoma. *Cancer Res.* **78**, 3421–3431 (2018).
94. Abadie, J. *et al.* Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 2: immunophenotypes and prognostic significance. *Breast Cancer Res Treat* **167**, 459–468 (2018).
 95. Lorch, G. *et al.* Identification of Recurrent Activating HER2 Mutations in Primary Canine Pulmonary Adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* **25**, 5866–5877 (2019).
 96. Ulvé, R. *et al.* Discovery of Human-Similar Gene Fusions in Canine Cancers. *Cancer Res.* **77**, 5721–5727 (2017).
 97. Mochizuki, H. & Breen, M. Sequence analysis of RAS and RAF mutation hot spots in canine carcinoma. *Vet Comp Oncol* **15**, 1598–1605 (2017).
 98. Mochizuki, H., Kennedy, K., Shapiro, S. G. & Breen, M. BRAF Mutations in Canine Cancers. *PLoS ONE* **10**, e0129534 (2015).
 99. Paoloni, M. *et al.* Prospective Molecular Profiling of Canine Cancers Provides a Clinically Relevant Comparative Model for Evaluating Personalized Medicine (PMed) Trials. *PLoS One* **9**, (2014).
 100. Regan, D., Garcia, K. & Thamm, D. Clinical, Pathological, and Ethical Considerations for the Conduct of Clinical Trials in Dogs with Naturally Occurring Cancer: A Comparative Approach to Accelerate Translational Drug Development. *ILAR J* **59**, 99–110 (2018).
 101. Paoloni, M. & Khanna, C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nature Reviews Cancer* **8**, 147–156 (2008).
 102. Gordon, I., Paoloni, M., Mazcko, C. & Khanna, C. The Comparative Oncology Trials Consortium: Using Spontaneously Occurring Cancers in Dogs to Inform the Cancer Drug Development Pathway. *PLoS Med* **6**, (2009).
 103. Hahn, K. A. *et al.* Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. *J. Vet. Intern. Med.* **22**, 1301–1309 (2008).
 104. Hahn, K. A. *et al.* Evaluation of 12- and 24-month survival rates after treatment with masitinib in dogs with nonresectable mast cell tumors. *Am. J. Vet. Res.* **71**, 1354–1361 (2010).
 105. Smrkovski, O. A., Essick, L., Rohrbach, B. W. & Legendre, A. M. Masitinib mesylate for metastatic and non-resectable canine cutaneous mast cell tumours. *Vet Comp Oncol* **13**, 314–321 (2015).
 106. Marech, I. *et al.* Masitinib (AB1010), from canine tumor model to human clinical development: where we are? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **91**, 98–111 (2014).
 107. Le Cesne, A. *et al.* Phase II study of oral masitinib mesilate in imatinib-naïve patients with locally advanced or metastatic gastro-intestinal stromal tumour (GIST). *Eur. J. Cancer* **46**, 1344–1351 (2010).
 108. Adenis, A. *et al.* Masitinib in advanced gastrointestinal stromal tumor (GIST) after failure of imatinib: a randomized controlled open-label trial. *Ann. Oncol.* **25**, 1762–1769 (2014).
 109. Deplanque, G. *et al.* A randomized, placebo-controlled phase III trial of masitinib plus gemcitabine in the treatment of advanced pancreatic cancer. *Ann. Oncol.* **26**, 1194–1200 (2015).
 110. Lortholary, O. *et al.* Masitinib for treatment of severely symptomatic indolent systemic mastocytosis: a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet* **389**,

612–620 (2017).

111. London, C. A. *et al.* Phase I dose-escalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with spontaneous malignancies. *Clin. Cancer Res.* **9**, 2755–2768 (2003).
112. Pryer, N. K. *et al.* Proof of target for SU11654: inhibition of KIT phosphorylation in canine mast cell tumors. *Clin. Cancer Res.* **9**, 5729–5734 (2003).
113. Demetri, G. D. *et al.* Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet* **368**, 1329–1338 (2006).
114. Bastian, B. C. THE MOLECULAR PATHOLOGY OF MELANOMA: AN INTEGRATED TAXONOMY OF MELANOCYTIC NEOPLASIA. *Annu Rev Pathol* **9**, 239–271 (2014).
115. Weiss, S. A., Hanniford, D., Hernando, E. & Osman, I. Revisiting determinants of prognosis in cutaneous melanoma. *Cancer* **121**, 4108–4123 (2015).
116. Williams, M. D. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Mucosal Melanomas. *Head Neck Pathol* **11**, 110–117 (2017).
117. Greenwald, H. S., Friedman, E. B. & Osman, I. Superficial spreading and nodular melanoma are distinct biological entities: a challenge to the linear progression model. *Melanoma Res.* **22**, 1–8 (2012).
118. Gershenwald, J. E. *et al.* Melanoma Staging: Evidence-Based Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin* **67**, 472–492 (2017).
119. Leonardi, G. C. *et al.* Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). *Int. J. Oncol.* **52**, 1071–1080 (2018).
120. Luke, J. J., Flaherty, K. T., Ribas, A. & Long, G. V. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nat Rev Clin Oncol* **14**, 463–482 (2017).
121. Kaufman, H. L., Margolin, K. & Sullivan, R. Management of Metastatic Melanoma in 2018. *JAMA Oncol* **4**, 857–858 (2018).
122. Maldonado, J. L. *et al.* Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J. Natl. Cancer Inst.* **95**, 1878–1890 (2003).
123. Davies, H. *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**, 949–954 (2002).
124. Cancer Genome Atlas Network. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* **161**, 1681–1696 (2015).
125. Hayward, J. J. *et al.* Complex disease and phenotype mapping in the domestic dog. *Nat Commun* **7**, 10460 (2016).
126. Zhang, T., Dutton-Regester, K., Brown, K. M. & Hayward, N. K. The genomic landscape of cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* **29**, 266–283 (2016).
127. Kulkarni, A. *et al.* BRAF Fusion as a Novel Mechanism of Acquired Resistance to Vemurafenib in BRAFV600E Mutant Melanoma. *Clin. Cancer Res.* **23**, 5631–5638 (2017).
128. Girard, C. A. *et al.* A Feed-Forward Mechanosignaling Loop Confers Resistance to Therapies Targeting the MAPK Pathway in BRAF-Mutant Melanoma. *Cancer Res.* **80**, 1927–1941 (2020).
129. Hayward, N. K. *et al.* Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes.

Nature **545**, 175–180 (2017).

130. Krauthammer, M. *et al.* Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat. Genet.* **44**, 1006–1014 (2012).
131. Olvedy, M. *et al.* Comparative oncogenomics identifies tyrosine kinase FES as a tumor suppressor in melanoma. *J Clin Invest* **127**, 2310–2325.
132. Hugo, W. *et al.* Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell* **165**, 35–44 (2016).
133. Ock, C.-Y. *et al.* Genomic landscape associated with potential response to anti-CTLA-4 treatment in cancers. *Nat Commun* **8**, (2017).
134. Van Allen, E. M. *et al.* Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science* **350**, 207–211 (2015).
135. Bradford, P. T., Goldstein, A. M., McMaster, M. L. & Tucker, M. A. Acral lentiginous melanoma: incidence and survival patterns in the United States, 1986-2005. *Arch Dermatol* **145**, 427–434 (2009).
136. Criscito, M. C. & Stein, J. A. Improving the diagnosis and treatment of acral melanocytic lesions. *Melanoma Manag* **4**, 113–123 (2017).
137. Kong, Y. *et al.* Frequent Genetic Aberrations in the CDK4 Pathway in Acral Melanoma Indicate the Potential for CDK4/6 Inhibitors in Targeted Therapy. *Clin. Cancer Res.* **23**, 6946–6957 (2017).
138. Yeh, I. *et al.* Targeted Genomic Profiling of Acral Melanoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **111**, 1068–1077 (2019).
139. Chattopadhyay, C. *et al.* Uveal Melanoma: From Diagnosis to Treatment and the Science in Between. *Cancer* **122**, 2299–2312 (2016).
140. Chen, X. *et al.* RasGRP3 Mediates MAPK Pathway Activation in GNAQ Mutant Uveal Melanoma. *Cancer Cell* **31**, 685-696.e6 (2017).
141. Robertson, A. G. *et al.* Integrative Analysis Identifies Four Molecular and Clinical Subsets in Uveal Melanoma. *Cancer Cell* **32**, 204-220.e15 (2017).
142. Harbour, J. W. *et al.* Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. *Science* **330**, 1410–1413 (2010).
143. Prescher, G. *et al.* Prognostic implications of monosomy 3 in uveal melanoma. *Lancet* **347**, 1222–1225 (1996).
144. Onken, M. D. *et al.* Functional gene expression analysis uncovers phenotypic switch in aggressive uveal melanomas. *Cancer Res.* **66**, 4602–4609 (2006).
145. Furney, S. J. *et al.* Genome sequencing of mucosal melanomas reveals that they are driven by distinct mechanisms from cutaneous melanoma. *The Journal of Pathology* **230**, 261–269 (2013).
146. Hintzsche, J. D. *et al.* Whole-exome sequencing identifies recurrent SF3B1 R625 mutation and comutation of NF1 and KIT in mucosal melanoma. *Melanoma Res* **27**, 189–199 (2017).
147. Lyu, J. *et al.* Whole-exome sequencing of oral mucosal melanoma reveals mutational profile and therapeutic targets. *The Journal of Pathology* **244**, 358–366 (2018).
148. Hodis, E. *et al.* A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* **150**, 251–263 (2012).
149. Yde, S. S., Sjoegren, P., Heje, M. & Stolle, L. B. Mucosal Melanoma: a Literature

Review. *Curr Oncol Rep* **20**, 28 (2018).

150. Lerner, B. A., Stewart, L. A., Horowitz, D. P. & Carvajal, R. D. Mucosal Melanoma: New Insights and Therapeutic Options for a Unique and Aggressive Disease. *Oncology (Williston Park, N.Y.)* **31**, e23–e32 (2017).

151. Altieri, L., Eguchi, M., Peng, D. H. & Cockburn, M. Predictors of mucosal melanoma survival in a population-based setting. *J. Am. Acad. Dermatol.* **81**, 136–142.e2 (2019).

152. Gillard, M. *et al.* Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. *Pigment Cell & Melanoma Research* **27**, 90–102 (2014).

153. Spangler, W. L. & Kass, P. H. The Histologic and Epidemiologic Bases for Prognostic Considerations in Canine Melanocytic Neoplasia. *Vet Pathol* **43**, 136–149 (2006).

154. Smith, S. H., Goldschmidt, M. H. & McManus, P. M. A Comparative Review of Melanocytic Neoplasms. *Vet Pathol* **39**, 651–678 (2002).

155. Withrow, S. J. *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. (Elsevier Health Sciences, 2012).

156. Ramos-Vara, J. A. *et al.* Retrospective Study of 338 Canine Oral Melanomas with Clinical, Histologic, and Immunohistochemical Review of 129 Cases. *Vet Pathol* **37**, 597–608 (2000).

157. Bergman, P. J. Canine Oral Melanoma. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* **22**, 55–60 (2007).

158. Wobeser, B. K. *et al.* Diagnoses and Clinical Outcomes Associated with Surgically Amputated Canine Digits Submitted to Multiple Veterinary Diagnostic Laboratories. *Vet Pathol* **44**, 355–361 (2007).

159. Poorman, K. *et al.* Comparative cytogenetic characterization of primary canine melanocytic lesions using array CGH and fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Res* **23**, 171–186 (2015).

160. Hendricks, W. P. D. *et al.* Somatic inactivating PTPRJ mutations and dysregulated pathways identified in canine malignant melanoma by integrated comparative genomic analysis. *PLoS Genetics* **14**, e1007589 (2018).

161. Simpson, R. M. *et al.* Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research* **27**, 37–47 (2014).

162. Barutello, G. *et al.* Strengths and Weaknesses of Pre-Clinical Models for Human Melanoma Treatment: Dawn of Dogs' Revolution for Immunotherapy. *Int J Mol Sci* **19**, (2018).

163. Weyden, L. van der *et al.* Cross-species models of human melanoma. *The Journal of Pathology* **238**, 152–165 (2016).

164. Hicks, M. J. & Flaitz, C. M. Oral mucosal melanoma: epidemiology and pathobiology. *Oral Oncology* **36**, 152–169 (2000).

165. Tyrrell, H. & Payne, M. Combatting mucosal melanoma: recent advances and future perspectives. *Melanoma Manag* **5**, MMT11 (2018).

166. Callahan, A. *et al.* Epidemiology of Anorectal Melanoma in the United States: 1992 to 2011. *Dermatologic Surgery* **42**, 94–99 (2016).

167. Rapini, R. P., Golitz, L. E., Greer, R. O., Krekorian, E. A. & Poulson, T. Primary malignant melanoma of the oral cavity. A review of 177 cases. *Cancer* **55**, 1543–1551

(1985).

168. Newell, F. *et al.* Whole-genome landscape of mucosal melanoma reveals diverse drivers and therapeutic targets. *Nat Commun* **10**, (2019).
169. McLaughlin, C. C. *et al.* Incidence of noncutaneous melanomas in the U.S. *Cancer* **103**, 1000–1007 (2005).
170. Thompson, L. D. R., Wieneke, J. A. & Miettinen, M. Sinonasal tract and nasopharyngeal melanomas: a clinicopathologic study of 115 cases with a proposed staging system. *Am. J. Surg. Pathol.* **27**, 594–611 (2003).
171. Patel, S. G. *et al.* Primary mucosal malignant melanoma of the head and neck. *Head & Neck* **24**, 247–257 (2002).
172. Mikkelsen, L. H. *et al.* Mucosal malignant melanoma - a clinical, oncological, pathological and genetic survey. *APMIS* **124**, 475–486 (2016).
173. Keller, D. S. *et al.* Outcomes in patients with mucosal melanomas. *Journal of Surgical Oncology* **108**, 516–520 (2013).
174. Schaefer, T., Satzger, I. & Gutzmer, R. Clinics, prognosis and new therapeutic options in patients with mucosal melanoma: A retrospective analysis of 75 patients. *Medicine (Baltimore)* **96**, e5753 (2017).
175. Jethanamest, D., Vila, P. M., Sikora, A. G. & Morris, L. G. T. Predictors of Survival in Mucosal Melanoma of the Head and Neck. *Ann Surg Oncol* **18**, 2748–2756 (2011).
176. Koivunen, P. *et al.* Accuracy of the current TNM classification in predicting survival in patients with sinonasal mucosal melanoma. *Laryngoscope* **122**, 1734–1738 (2012).
177. Zhang, S., Gao, F. & Wan, D. Effect of misdiagnosis on the prognosis of anorectal malignant melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol* **136**, 1401–1405 (2010).
178. Amit, M., Na'ara, S. & Hanna, E. Y. Contemporary Treatment Approaches to Sinonasal Mucosal Melanoma. *Curr Oncol Rep* **20**, 10 (2018).
179. Curtin, J. A. *et al.* Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N. Engl. J. Med.* **353**, 2135–2147 (2005).
180. Ablain, J. *et al.* Human tumor genomics and zebrafish modeling identify SPRED1 loss as a driver of mucosal melanoma. *Science* **362**, 1055–1060 (2018).
181. Zhou, R. *et al.* Analysis of Mucosal Melanoma Whole-Genome Landscapes Reveals Clinically Relevant Genomic Aberrations. *Clin. Cancer Res.* **25**, 3548–3560 (2019).
182. Wong, K. *et al.* Cross-species genomic landscape comparison of human mucosal melanoma with canine oral and equine melanoma. *Nat Commun* **10**, 353 (2019).
183. Hou, J. Y. *et al.* Vulvar and vaginal melanoma: A unique subclass of mucosal melanoma based on a comprehensive molecular analysis of 51 cases compared with 2253 cases of nongynecologic melanoma. *Cancer* **123**, 1333–1344 (2017).
184. Öztürk Sari, Ş. *et al.* BRAF, NRAS, KIT, TERT, GNAQ/GNA11 mutation profile analysis of head and neck mucosal melanomas: a study of 42 cases. *Pathology* **49**, 55–61 (2017).
185. Santi, R. *et al.* KIT genetic alterations in anorectal melanomas. *J. Clin. Pathol.* **68**, 130–134 (2015).
186. Zebary, A., Jangard, M., Omholt, K., Ragnarsson-Olding, B. & Hansson, J. KIT, NRAS and BRAF mutations in sinonasal mucosal melanoma: a study of 56 cases. *Br J Cancer* **109**, 559–564 (2013).

187. Satzger, I. *et al.* Analysis of c-KIT expression and KIT gene mutation in human mucosal melanomas. *Br. J. Cancer* **99**, 2065–2069 (2008).
188. Schoenewolf, N. L. *et al.* Sinonasal, genital and acrolentiginous melanomas show distinct characteristics of KIT expression and mutations. *European Journal of Cancer* **48**, 1842–1852 (2012).
189. Sheng, X. *et al.* GNAQ and GNA11 mutations occur in 9.5% of mucosal melanoma and are associated with poor prognosis. *Eur. J. Cancer* **65**, 156–163 (2016).
190. Hirsch, D. *et al.* Chromothripsis and focal copy number alterations determine poor outcome in malignant melanoma. *Cancer Res.* **73**, 1454–1460 (2013).
191. Yang, H. M. *et al.* Identification of recurrent mutational events in anorectal melanoma. *Mod Pathol* **30**, 286–296 (2017).
192. Turri-Zanoni, M. *et al.* Sinonasal mucosal melanoma: Molecular profile and therapeutic implications from a series of 32 cases. *Head Neck* **35**, 1066–1077 (2013).
193. Xu, L. *et al.* Frequent genetic aberrations in the cell cycle related genes in mucosal melanoma indicate the potential for targeted therapy. *J Transl Med* **17**, 245 (2019).
194. Law, M. H. *et al.* Genome-wide meta-analysis identifies five new susceptibility loci for cutaneous malignant melanoma. *Nat. Genet.* **47**, 987–995 (2015).
195. Carvajal, R. D., Spencer, S. A. & Lydiatt, W. Mucosal Melanoma: A Clinically and Biologically Unique Disease Entity. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* **10**, 345–356 (2012).
196. Lee, S. P., Shimizu, K. T., Tran, L. M., Juillard, G. & Calcaterra, T. C. Mucosal melanoma of the head and neck: The impact of local control on survival. *The Laryngoscope* **104**, 121–126 (1994).
197. Wada, H. *et al.* A multi-institutional retrospective analysis of external radiotherapy for mucosal melanoma of the head and neck in Northern Japan. *International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics* **59**, 495–500 (2004).
198. Christopherson, K. *et al.* Radiation Therapy for Mucosal Melanoma of the Head and Neck. *American Journal of Clinical Oncology* **38**, 87–89 (2015).
199. Zenda, S. *et al.* Proton Beam Therapy as a Nonsurgical Approach to Mucosal Melanoma of the Head and Neck: A Pilot Study. *International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics* **81**, 135–139 (2011).
200. Li, W., Yu, Y., Wang, H., Yan, A. & Jiang, X. Evaluation of the prognostic impact of postoperative adjuvant radiotherapy on head and neck mucosal melanoma: a meta-analysis. *BMC Cancer* **15**, 758 (2015).
201. Konuthula, N. *et al.* The presentation and outcomes of mucosal melanoma in 695 patients. *International Forum of Allergy & Rhinology* **7**, 99–105 (2017).
202. Wushou, A., Hou, J., Zhao, Y.-J. & Miao, X. Postoperative adjuvant radiotherapy improves loco-regional recurrence of head and neck mucosal melanoma. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* **43**, 553–558 (2015).
203. Ballo, M. T. *et al.* Sphincter-sparing local excision and adjuvant radiation for anal-rectal melanoma. *J. Clin. Oncol.* **20**, 4555–4558 (2002).
204. Kelly, P., Zagars, G. K., Cormier, J. N., Ross, M. I. & Guadagnolo, B. A. Sphincter-sparing local excision and hypofractionated radiation therapy for anorectal melanoma. *Cancer* **117**, 4747–4755 (2011).

205. Yi, J. H. *et al.* Dacarbazine-based chemotherapy as first-line treatment in noncutaneous metastatic melanoma: multicenter, retrospective analysis in Asia. *Melanoma Research* **21**, 223–227 (2011).
206. Chang, W. *et al.* Effect of paclitaxel/carboplatin salvage chemotherapy in noncutaneous versus cutaneous metastatic melanoma. *Melanoma Research* **23**, 147–151 (2013).
207. Wang, X., Si, L. & Guo, J. Treatment algorithm of metastatic mucosal melanoma. *Chin Clin Oncol* **3**, 38 (2014).
208. Bartell, H. L. *et al.* Biochemotherapy in patients with advanced head and neck mucosal melanoma. *Head & Neck* **30**, 1592–1598 (2008).
209. Harting, M. S. & Kim, K. B. Biochemotherapy in patients with advanced vulvovaginal mucosal melanoma. *Melanoma Research* **14**, 517–520 (2004).
210. Hodi, F. S. *et al.* Imatinib for Melanomas Harboring Mutationally Activated or Amplified KIT Arising on Mucosal, Acral, and Chronically Sun-Damaged Skin. *J Clin Oncol* **31**, 3182–3190 (2013).
211. Guo, J. *et al.* Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification. *J. Clin. Oncol.* **29**, 2904–2909 (2011).
212. Minor, D. R. *et al.* Sunitinib Therapy for Melanoma Patients with KIT Mutations. *Clin Cancer Res* **18**, 1457–1463 (2012).
213. Quintás-Cardama, A. *et al.* Complete response of stage IV anal mucosal melanoma expressing KIT Val560Asp to the multikinase inhibitor sorafenib. *Nat Rev Clin Oncol* **5**, 737–740 (2008).
214. Postow, M. A. *et al.* Ipilimumab for Patients With Advanced Mucosal Melanoma. *Oncologist* **18**, 726–732 (2013).
215. Del Vecchio, M. *et al.* Efficacy and safety of ipilimumab 3mg/kg in patients with pretreated, metastatic, mucosal melanoma. *European Journal of Cancer* **50**, 121–127 (2014).
216. Moya-Plana, A. *et al.* Evaluation of the efficacy of immunotherapy for non-resectable mucosal melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.* **68**, 1171–1178 (2019).
217. Shoushtari, A. N. *et al.* The efficacy of anti-PD-1 agents in acral and mucosal melanoma. *Cancer* **122**, 3354–3362 (2016).
218. D'Angelo, S. P. *et al.* Efficacy and Safety of Nivolumab Alone or in Combination With Ipilimumab in Patients With Mucosal Melanoma: A Pooled Analysis. *J Clin Oncol* **35**, 226–235 (2017).
219. Schultheiss, P. C. Histologic Features and Clinical Outcomes of Melanomas of Lip, Haired Skin, and Nail Bed Locations of Dogs. *J VET Diagn Invest* **18**, 422–425 (2006).
220. Vinayak, A., Frank, C. B., Gardiner, D. W., Thieman-Mankin, K. M. & Worley, D. R. Malignant anal sac melanoma in dogs: eleven cases (2000 to 2015). *Journal of Small Animal Practice* **58**, 231–237 (2017).
221. Spugnini, E. P. *et al.* Spontaneous Intestinal Melanoma in Dogs. *In Vivo* **19**, 1051–1054 (2005).
222. Davies, O. *et al.* Intranasal melanoma treated with radiation therapy in three dogs. *Veterinary Quarterly* **37**, 274–281 (2017).
223. Lemetayer, J., Al-Dissi, A., Tryon, K. & MacDonald-Dickinson, V. Primary

- intranasal melanoma with brain invasion in a dog. *Can Vet J* **58**, 391–396 (2017).
224. Brockley, L. K., Cooper, M. A. & Bennett, P. F. Malignant melanoma in 63 dogs (2001–2011): the effect of carboplatin chemotherapy on survival. *New Zealand Veterinary Journal* **61**, 25–31 (2013).
225. Proulx, D. R. *et al.* A Retrospective Analysis of 140 Dogs with Oral Melanoma Treated with External Beam Radiation. *Veterinary Radiology & Ultrasound* **44**, 352–359 (2003).
226. Sarowitz, B. N., Davis, G. J. & Kim, S. Outcome and prognostic factors following curative-intent surgery for oral tumours in dogs: 234 cases (2004 to 2014). *Journal of Small Animal Practice* **58**, 146–153 (2017).
227. Tuohy, J. L., Selmic, L. E., Worley, D. R., Ehrhart, N. P. & Withrow, S. J. Outcome following curative-intent surgery for oral melanoma in dogs: 70 cases (1998–2011). *Journal of the American Veterinary Medical Association* **245**, 1266–1273 (2014).
228. Smedley, R. C. *et al.* Prognostic Markers for Canine Melanocytic Neoplasms: A Comparative Review of the Literature and Goals for Future Investigation. *Vet Pathol* **48**, 54–72 (2011).
229. Esplin, D. G. Survival of Dogs Following Surgical Excision of Histologically Well-differentiated Melanocytic Neoplasms of the Mucous Membranes of the Lips and Oral Cavity. *Vet Pathol* **45**, 889–896 (2008).
230. Wallace, J., Matthiesen, D. T. & Patnaik, A. K. Hemimaxillectomy for the Treatment of Oral Tumors in 69 Dogs. *Veterinary Surgery* **21**, 337–341 (1992).
231. Kosovsky, J. K., Matthiesen, D. T., Marretta, S. M. & Patnaik, A. K. Results of Partial Mandibulectomy for the Treatment of Oral Tumors in 142 Dogs. *Veterinary Surgery* **20**, 397–401 (1991).
232. Murphy, S. *et al.* Oral malignant melanoma – the effect of coarse fractionation radiotherapy alone or with adjuvant carboplatin therapy. *Veterinary and Comparative Oncology* **3**, 222–229 (2005).
233. Kawabe, M. *et al.* Outcomes of dogs undergoing radiotherapy for treatment of oral malignant melanoma: 111 cases (2006–2012). *Journal of the American Veterinary Medical Association* **247**, 1146–1153 (2015).
234. Cancedda, S. *et al.* Efficacy and side effects of radiation therapy in comparison with radiation therapy and temozolomide in the treatment of measurable canine malignant melanoma. *Veterinary and Comparative Oncology* **14**, e146–e157 (2016).
235. Bateman, K. E., Catton, P. A., Pennock, P. W. & Kruth, S. A. 0–7–21 Radiation Therapy for the Treatment of Canine Oral Melanoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **8**, 267–272 (1994).
236. Freeman, K. P., Hahn, K. A., Harris, F. D. & King, G. K. Treatment of Dogs with Oral Melanoma by Hypofractionated Radiation Therapy and Platinum-Based Chemotherapy (1987–1997). *Journal of Veterinary Internal Medicine* **17**, 96–101 (2003).
237. Dank, G. *et al.* Use of adjuvant carboplatin for treatment of dogs with oral malignant melanoma following surgical excision. *Veterinary and Comparative Oncology* **12**, 78–84 (2014).
238. Bergman, P. J. *et al.* Development of a xenogeneic DNA vaccine program for canine malignant melanoma at the Animal Medical Center. *Vaccine* **24**, 4582–4585 (2006).

239. Bergman, P. J. *et al.* Long-term survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogeneic human tyrosinase: a phase I trial. *Clin. Cancer Res.* **9**, 1284–1290 (2003).
240. Liao, J. C. F. *et al.* Vaccination with human tyrosinase DNA induces antibody responses in dogs with advanced melanoma. *Cancer Immun* **6**, (2006).
241. Atherton, M. J., Morris, J. S., McDermott, M. R. & Lichty, B. D. Cancer immunology and canine malignant melanoma: A comparative review. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **169**, 15–26 (2016).
242. Ottnod, J. M. *et al.* A retrospective analysis of the efficacy of Oncept vaccine for the adjunct treatment of canine oral malignant melanoma. *Veterinary and Comparative Oncology* **11**, 219–229 (2013).
243. Treggiari, E., Grant, J. P. & North, S. M. A retrospective review of outcome and survival following surgery and adjuvant xenogeneic DNA vaccination in 32 dogs with oral malignant melanoma. *J. Vet. Med. Sci.* **78**, 845–850 (2016).
244. McLean, J. L. & Lobetti, R. G. Use of the melanoma vaccine in 38 dogs: The South African experience. *J S Afr Vet Assoc* **86**, 1246 (2015).
245. Verganti, S. *et al.* Use of Oncept melanoma vaccine in 69 canine oral malignant melanomas in the UK. *J Small Anim Pract* **58**, 10–16 (2017).
246. Murakami, A. *et al.* Analysis of KIT expression and KIT exon 11 mutations in canine oral malignant melanomas. *Veterinary and Comparative Oncology* **9**, 219–224 (2011).
247. Shelly, S. *et al.* Exon 15 BRAF mutations are uncommon in canine oral malignant melanomas. *Mamm Genome* **16**, 211–217 (2005).
248. Giannuzzi, D. *et al.* Longitudinal transcriptomic and genetic landscape of radiotherapy response in canine melanoma. *Veterinary and Comparative Oncology* **17**, 308–316 (2019).
249. Brocca, G. *et al.* Array Comparative Genomic Hybridization Analysis Reveals Significantly Enriched Pathways in Canine Oral Melanoma. *Front. Oncol.* **9**, (2019).
250. Hitte, C. *et al.* Integrated Genetic Analysis of Canine Mucosal Melanoma from Three Predisposed Breeds. (In prep.).
251. Rahman, M. M. *et al.* Transcriptome analysis of dog oral melanoma and its oncogenic analogy with human melanoma. *Oncol. Rep.* **43**, 16–30 (2020).
252. Kl, B. B. *et al.* Genome-wide Analysis of Canine Oral Malignant Melanoma Metastasis-Associated Gene Expression. *Scientific reports* vol. 9 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31019223/> (2019).
253. Hartley, G. *et al.* Immune regulation of canine tumour and macrophage PD-L1 expression. *Veterinary and Comparative Oncology* **15**, 534–549 (2017).
254. Shosu, K. *et al.* Programmed Cell Death Ligand 1 Expression in Canine Cancer. *In Vivo* **30**, 195–204 (2016).
255. Maekawa, N. *et al.* Expression of PD-L1 on Canine Tumor Cells and Enhancement of IFN- γ Production from Tumor-Infiltrating Cells by PD-L1 Blockade. *PLoS One* **9**, (2014).
256. Maekawa, N. *et al.* Immunohistochemical Analysis of PD-L1 Expression in Canine Malignant Cancers and PD-1 Expression on Lymphocytes in Canine Oral Melanoma. *PLoS One* **11**, (2016).

257. Nemoto, Y., Shosu, K., Okuda, M., Noguchi, S. & Mizuno, T. Development and characterization of monoclonal antibodies against canine PD-1 and PD-L1. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **198**, 19–25 (2018).
258. Maekawa, N. *et al.* A canine chimeric monoclonal antibody targeting PD-L1 and its clinical efficacy in canine oral malignant melanoma or undifferentiated sarcoma. *Sci Rep* **7**, 8951 (2017).
259. Hitte, C. *et al.* Genome-Wide Analysis of Long Non-Coding RNA Profiles in Canine Oral Melanomas. *Genes (Basel)* **10**, (2019).
260. Prouteau, A. *et al.* Prognostic value of somatic focal amplifications on chromosome 30 in canine oral melanoma. *Vet Comp Oncol* (2019) doi:10.1111/vco.12536.
261. Davoli, T., Uno, H., Wooten, E. C. & Elledge, S. J. Tumor aneuploidy correlates with markers of immune evasion and with reduced response to immunotherapy. *Science* **355**, (2017).
262. Keenan, T. E., Burke, K. P. & Van Allen, E. M. Genomic correlates of response to immune checkpoint blockade. *Nat. Med.* **25**, 389–402 (2019).
263. Korbel, J. O. & Campbell, P. J. Criteria for inference of chromothripsis in cancer genomes. *Cell* **152**, 1226–1236 (2013).
264. Rode, A., Maass, K. K., Willmund, K. V., Lichter, P. & Ernst, A. Chromothripsis in cancer cells: An update. *Int. J. Cancer* **138**, 2322–2333 (2016).
265. Kloosterman, W. P. *et al.* Chromothripsis is a common mechanism driving genomic rearrangements in primary and metastatic colorectal cancer. *Genome Biol.* **12**, R103 (2011).
266. Magrangeas, F., Avet-Loiseau, H., Munshi, N. C. & Minvielle, S. Chromothripsis identifies a rare and aggressive entity among newly diagnosed multiple myeloma patients. *Blood* **118**, 675–678 (2011).
267. Molenaar, J. J. *et al.* Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes. *Nature* **483**, 589–593 (2012).
268. Northcott, P. A. *et al.* Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes. *Nature* **488**, 49–56 (2012).
269. Furgason, J. M. *et al.* Whole genome sequence analysis links chromothripsis to EGFR, MDM2, MDM4, and CDK4 amplification in glioblastoma. *Oncoscience* **2**, 618–628 (2015).
270. Liu, K. *et al.* TRPM7 overexpression enhances the cancer stem cell-like and metastatic phenotypes of lung cancer through modulation of the Hsp90 α /uPA/MMP2 signaling pathway. *BMC Cancer* **18**, (2018).
271. Liu, L. *et al.* TRPM7 promotes the epithelial–mesenchymal transition in ovarian cancer through the calcium-related PI3K / AKT oncogenic signaling. *J Exp Clin Cancer Res* **38**, (2019).
272. Meng, X. *et al.* TRPM7 mediates breast cancer cell migration and invasion through the MAPK pathway. *Cancer Letters* **333**, 96–102 (2013).
273. Yee, N. S. Role of TRPM7 in Cancer: Potential as Molecular Biomarker and Therapeutic Target. *Pharmaceuticals (Basel)* **10**, (2017).
274. Chen, S.-C. *et al.* Knockdown of GA-binding protein subunit β 1 inhibits cell proliferation via p21 induction in renal cell carcinoma. *International Journal of Oncology*

53, 886–894 (2018).

275. Bell, R. J. A. *et al.* The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer. *Science* **348**, 1036–1039 (2015).

276. Mancini, A. *et al.* Disruption of the β 1L isoform of GABP reverses glioblastoma replicative immortality in a TERT promoter mutation-dependent manner. *Cancer Cell* **34**, 513–528.e8 (2018).

277. Shin, S. *et al.* Deubiquitylation and stabilization of Notch1 intracellular domain by ubiquitin-specific protease 8 enhance tumorigenesis in breast cancer. *Cell Death Differ* **27**, 1341–1354 (2020).

278. Yan, M. *et al.* High Expression of Ubiquitin-Specific Protease 8 (USP8) Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Cervical Squamous Cell Carcinoma. *Med Sci Monit* **24**, 4934–4943 (2018).

279. Kong, X.-F. *et al.* Disruption of an anti-mycobacterial circuit between dendritic and Th cells in human SPPL2a deficiency. *Nat Immunol* **19**, 973–985 (2018).

280. Corcoran, R. B. & Chabner, B. A. Application of Cell-free DNA Analysis to Cancer Treatment. *N. Engl. J. Med.* **379**, 1754–1765 (2018).

281. Castelli, J., Cabel, L., Bidard, F.-C., Duvergé, L. & Bachet, J.-B. ADN tumoral circulant : principes, applications actuelles en radiothérapie et développement futur. [/data/revues/12783218/v22i6-7/S1278321818302671/](#) (2018).

282. Merker, J. D. *et al.* Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* **142**, 1242–1253 (2018).

283. Kwapisz, D. The first liquid biopsy test approved. Is it a new era of mutation testing for non-small cell lung cancer? *Ann Transl Med* **5**, 46 (2017).

284. Tagawa, M., Shimbo, G., Inokuma, H. & Miyahara, K. Quantification of plasma cell-free DNA levels in dogs with various tumors. *J. Vet. Diagn. Invest.* **31**, 836–843 (2019).

285. Schaefer, D. M. W. *et al.* Quantification of plasma DNA as a prognostic indicator in canine lymphoid neoplasia. *Vet Comp Oncol* **5**, 145–155 (2007).

286. Letendre, J.-A. & Goggs, R. Measurement of plasma cell-free DNA concentrations in dogs with sepsis, trauma, and neoplasia. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* **27**, 307–314 (2017).

287. Jeffery, U., Ruterbories, L., Hanel, R. & LeVine, D. N. Cell-Free DNA and DNase Activity in Dogs with Immune-Mediated Hemolytic Anemia. *J. Vet. Intern. Med.* **31**, 1441–1450 (2017).

288. Burnett, D. L., Cave, N. J., Gedye, K. R. & Bridges, J. P. Investigation of cell-free DNA in canine plasma and its relation to disease. *Vet Q* **36**, 122–129 (2016).

289. Tagawa, M. *et al.* Quantitative analysis of the BRAF V595E mutation in plasma cell-free DNA from dogs with urothelial carcinoma. *PLoS ONE* **15**, e0232365 (2020).

290. Beck, J. *et al.* Genome aberrations in canine mammary carcinomas and their detection in cell-free plasma DNA. *PLoS ONE* **8**, e75485 (2013).

291. Sato, M. *et al.* Minimal residual disease in canine lymphoma: An objective marker to assess tumour cell burden in remission. *The Veterinary Journal* **215**, 38–42 (2016).

292. Boyé, P. *et al.* Evaluation of serum thymidine kinase 1 activity as a biomarker for treatment effectiveness and prediction of relapse in dogs with non-Hodgkin lymphoma. *J Vet Intern Med* **33**, 1728–1739 (2019).

293. Chamel, G. *et al.* Retrospective evaluation of blood copper stable isotopes ratio $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$ as a biomarker of cancer in dogs. *Vet Comp Oncol* **15**, 1323–1332 (2017).
294. Galon, J. & Bruni, D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat Rev Drug Discov* **18**, 197–218 (2019).
295. Chan, T. A. *et al.* Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic. *Ann. Oncol.* **30**, 44–56 (2019).
296. Goodman, A. M. *et al.* Tumor Mutational Burden as an Independent Predictor of Response to Immunotherapy in Diverse Cancers. *Mol. Cancer Ther.* **16**, 2598–2608 (2017).
297. Liang, W. S. *et al.* Integrated genomic analyses reveal frequent TERT aberrations in acral melanoma. *Genome Res* **27**, 524–532 (2017).
298. Barthel, F. P. *et al.* Systematic analysis of telomere length and somatic alterations in 31 cancer types. *Nat. Genet.* **49**, 349–357 (2017).
299. Akincilar, S. C., Unal, B. & Tergaonkar, V. Reactivation of telomerase in cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 1659–1670 (2016).
300. Papazacharias, E., Röhn, G., Goldbrunner, R. & Timmer, M. P04.68 Relation of the expression between TERT and GABPA/B isoforms in gliomas using quantitative real time-PCR. *Neuro Oncol* **20**, iii295 (2018).
301. Billard, P. La télomérase: fonctions biologiques et ciblage thérapeutique. (2017).
302. Akin, S., Babacan, T., Sarici, F. & Altundag, K. A novel targeted therapy in breast cancer: cyclin dependent kinase inhibitors. *J BUON* **19**, 42–46 (2014).
303. Tang, B. *et al.* Palbociclib for treatment of metastatic melanoma with copy number variations of CDK4 pathway: case report. *Chin Clin Oncol* **7**, 62 (2018).
304. Sugarman, E. T., Zhang, G. & Shay, J. W. In perspective: An update on telomere targeting in cancer. *Mol. Carcinog.* **58**, 1581–1588 (2019).
305. Mender, I. *et al.* Telomerase-Mediated Strategy for Overcoming Non-Small Cell Lung Cancer Targeted Therapy and Chemotherapy Resistance. *Neoplasia* **20**, 826–837 (2018).
306. Zhang, G. *et al.* Induction of Telomere Dysfunction Prolongs Disease Control of Therapy-Resistant Melanoma. *Clin Cancer Res* **24**, 4771–4784 (2018).
307. Sengupta, S. *et al.* Induced Telomere Damage to Treat Telomerase Expressing Therapy-Resistant Pediatric Brain Tumors. *Mol. Cancer Ther.* **17**, 1504–1514 (2018).

ANNEXES

ANNEXE 1

Intérêts de la génétique en oncologie vétérinaire. Anaïs Prouteau et Benoît Hédan, Le Point vétérinaire, juillet 2019.

Article de synthèse



Anaïs Prouteau, Benoît Hédan

Équipe "généétique du chien"
Institut de génétique et développement
UMR6290, CNRS, université de Rennes
2, avenue du Pr Léon Bernard
35043 Rennes

ONCOLOGIE

Intérêts de la génétique en oncologie vétérinaire

La génétique est l'une des sciences fondamentales de ce début de siècle. Lorsqu'elle s'applique à comprendre certains mécanismes sous-jacents au développement des cancers, elle peut faire émerger de nouveaux traitements, parfois directement utilisables dans la pratique quotidienne.

Résumé

► Le cancer est l'une des principales causes de mortalité chez l'homme et chez les animaux de compagnie. La génétique est au cœur de son développement puisque la transformation d'une cellule saine en cellule tumorale résulte de la survenue de mutations sur des gènes clés, qui apparaissent spontanément au cours des divisions cellulaires ou en raison de facteurs environnementaux. Chez l'homme, une faible part de ces cancers sont

héréditaires (environ 10 %) et dus à la transmission de mutations dites "prédisposantes". Chez le chien au contraire, avec la sélection artificielle, de nombreuses races sont prédisposées à un ou plusieurs types de cancer. Les progrès de la biologie moléculaire ont permis d'améliorer la prise en charge de nombreux cancers chez l'homme. Chez les animaux de compagnie, l'étude de la génétique des différents cancers a permis le développement de certains tests de dépistage,

notamment pour le sarcome histiocytaire et le carcinome urothélial chez le chien. Elle apporte également sa contribution à l'histopathologie, afin de mieux caractériser certains cancers et prédire leur comportement biologique. Son principal intérêt pour le clinicien est qu'elle permet de développer des thérapies ciblées spécifiques de certaines altérations, complétant ainsi l'arsenal thérapeutique de l'oncologie vétérinaire.



1. Selon certaines études convergentes, le cancer est la première cause de mortalité chez le chien. Il regroupe un grand nombre de maladies qui ont comme point commun de provenir de cellules dont la division et la prolifération sont incontrôlées. Il s'agit de maladies génétiques, tant au niveau de leur apparition que de leur progression. Le décryptage des différentes altérations des gènes est l'une des clés pour mieux comprendre ce type de maladies.

PHOTO : M.-A. TROCHET

Conflit d'intérêts

Benoît Hédan collabore, avec le laboratoire Antagène, au développement du test génétique d'aide à la sélection pour le sarcome histiocytaire (test SH) cité dans cet article.

En médecine humaine comme en médecine vétérinaire, le cancer est l'une des principales préoccupations sanitaires du XXI^e siècle. Comme chez l'homme où son incidence suit une tendance croissante, différentes études nécropsiques menées chez le chien montrent que le cancer est la cause de mortalité de 45 % des individus de plus de 10 ans [7] et de 23 % des animaux tous âges confondus. D'autres études plus récentes, à l'initiative des collègues américains, de l'Institut national du cancer (NCI, États-Unis) ou des clubs de races anglais, placent le cancer en première cause de mortalité chez le chien [2, 14].

La recherche en oncologie a permis, au fil des années, de mieux connaître et appréhender ces maladies. Avec les récentes avancées en médecine vétérinaire canine et féline, les propriétaires sont de plus en plus demandeurs de soins et le vétérinaire a un rôle important à jouer dans le traitement, curatif ou palliatif, de l'animal cancéreux. Le cancer regroupe un grand nombre de maladies qui ont le point commun de provenir de cellules qui se divisent et prolifèrent de façon incontrôlée. Il est maintenant bien établi que les cancers sont des maladies génétiques, à la fois quant à leur apparition et à leur progression (photo 1). Pour bien comprendre la part de la génétique en oncologie, deux types d'altérations sont à distinguer : les mutations germinales ou "prédisposantes" qui expliquent la survenue de cancers familiaux ou héréditaires, et les mutations "somatiques" qui s'accumulent au cours de la vie d'un individu et génèrent l'apparition de cellules tumorales dans un tissu donné.

Cet article vise à apporter les connaissances nécessaires au praticien pour prendre la mesure du rôle grandissant de la génétique en oncologie vétérinaire.

TABEAU 1
Principaux facteurs de risque connus chez le chien comme favorisant le développement de certains cancers

FACTEUR DE RISQUE	CANCER
Tabac	Lymphome, carcinome des cavités nasales
Herbicides (phenoxy-acides)	Carcinome urothélial, lymphome canin (controversé)
Exposition aux rayons ultraviolets	Carcinome des zones glabres et faiblement couvertes par les poils, sarcome dermique (principalement hémangiosarcome)
Amiante	Mésotéliome canin
Imprégnation par les oestrogènes et la progestérone	Carcinome mammaire

D'après [54].

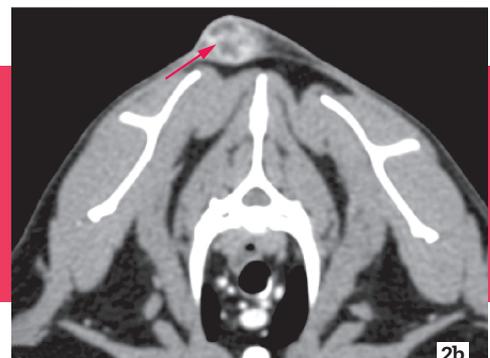
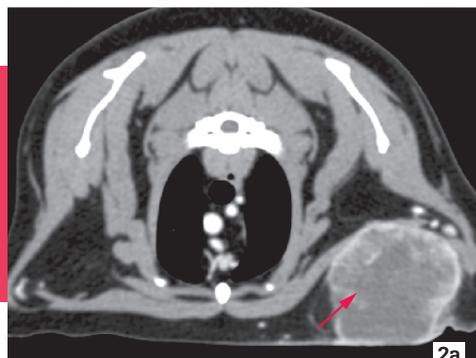
3. Importance de l'environnement dans le développement des cancers

Les différentes mutations génétiques qui donnent naissance à la cellule tumorale peuvent se produire spontanément au cours des divisions cellulaires, mais également être provoquées par des facteurs environnementaux mutagènes tels que le tabac ou les rayons ultraviolets. L'augmentation de l'incidence de certains cancers chez l'homme au cours du XX^e siècle montre l'influence majeure de l'environnement et reflète que certains comportements sont directement impliqués dans la survenue des cancers, comme la consommation de tabac et le cancer du poumon, les maladies infectieuses (notamment la présence d'*Helicobacter pylori*) et le cancer de l'estomac, ou encore l'urbanisation et le cancer du sein.

Des études épidémiologiques menées chez le chien (études de cohortes et cas-témoins) ont également mis en évidence des facteurs de risque dans le développement de certains cancers (tableau 1). Chez le chat, les principaux facteurs de risques connus sont les injections répétées de vaccins pour le fibrosarcome au site d'injection, et l'infection par le FIV ou le FeLV pour le lymphome (le FeLV entraînant principalement l'apparition de lymphomes médiastinaux, photos 2a et 2b).

2. Images tomographiques de fibrosarcome axillaire (flèche) et sarcome au site d'injection (flèche) chez deux chats. L'utilisation de drogues à longue action et de vaccins adjuvés est associée à l'apparition de fibrosarcomes. La plupart du temps, la tumeur se développe entre 4 mois et 3 ans après l'injection.

PHOTOS : P. DE FERNEL-THIBAUD



4 Le Point Vétérinaire / Juillet-août 2019 / N° 397

PRÉDISPOSITIONS RACIALES À CERTAINS CANCERS

L'apparition de certains cancers est parfois favorisée par des mutations dites "germinales" ou prédisposantes, transmises de génération en génération et qui réduisent le nombre d'étapes nécessaires à la transformation tumorale. Cela concerne environ 10 % des cas de cancer chez l'homme et explique la forte augmentation du risque, dans certaines familles, de développer un mélanome ou les cancers du sein et de l'ovaire. Chez le chien, la dermatofibrose nodulaire se transmet selon un mode autosomal dominant et est associée à des cystadénomes ou à des cystadénocarcinomes rénaux. Elle touche principalement le berger allemand, le boxer et le golden retriever et est une bonne illustration du cancer familial [31].

Cependant, chez l'homme comme chez le chien, la majorité des cancers sont des maladies multifactorielles qui impliquent des facteurs de prédisposition et des facteurs environnementaux.

1. De nombreux cancers spécifiques d'une race

Bien que sensibilisé aux spécificités raciales, il est difficile pour le praticien d'évaluer l'importance des cancers au sein d'une race. En effet, cela nécessite le plus souvent de vastes études épidémiologiques (menées par exemple avec les assurances de santé, les laboratoires d'anatomopathologie, etc.) pour mettre en évidence l'influence de la race sur les prévalences, les types et les âges d'apparition des cancers. Ces études pointent le risque légal élevé associé au cancer chez de nombreuses races, qui représente parfois plus de la moitié des causes de mortalité, comme chez le bouvier bernois (tableau 2 et photo 3) [22].

Les études réalisées avec les laboratoires d'anatomopathologie ont permis d'identifier des prédispositions raciales pour des cancers spécifiques (tableau 3). Ainsi, le golden retriever est prédisposé au mastocytome, au sarcome des tissus mous et au sarcome histiocytaire. Certaines études américaines montrent que cette race est également prédisposée au lymphome [35, 52], mais

TABEAU 2

Prévalence des cancers au sein de différentes races canines

ÉTUDE	PROSCHOWSKY ET COLL. 2003		FLEMING ET COLL. 2011		ADAMS ET COLL. 2010		BONNET ET COLL. 2005	
ORIGINE DES DONNÉES	Envoi d'un questionnaire aux membres de clubs		Écoles vétérinaires américaines		Envoi d'un questionnaire aux membres de clubs (15 881 chiens)		Données de contrats d'assurance entre 1995 et 2000	
PAYS	Danemark		États-Unis		Royaume-Uni		Suède	
	Races	Pourcentage de morts par cancer	Races	Pourcentage de morts par cancer	Races	Pourcentage de morts par cancer	Races	Mortalité par cancers pour 10 000 chiens-année
	Bouvier bernois	34,2 %	Bouvier bernois	54,6 %	Épagneul d'eau irlandais	55,8 %	Bouvier bernois	306
	Retriever à poil plat	31,6 %	Golden retriever	49,9 %	Retriever à poil plat	54,3 %	Irish wolfhound	296
	Beagle	28,3 %	Scottish terrier	47,6 %	Braque hongrois	46,7 %	Boxer	203
	Rottweiler	20,4 %	Bouvier des Flandres	46,6 %	Bouvier bernois	45,7 %	Leonberg	197
	Golden retriever	20,3 %	Boxer	44,3 %	Rottweiler	45,3 %	Saint-Bernard	172
	Teckel à poil dur	19,6 %	Bull mastiff	44 %	Griffon italien	44,7 %	Doberman	168
	Braque allemand	18,9 %	Irish setter	40,8 %	Leonberg	44,7 %	Dogue allemand	119
	Teckel à poil long	17,3 %	Airedale terrier	40,2 %	Staffordshire bull terrier	44,4 %	Berger des Pyrénées	108
	Colley	16,4 %	Gordon setter	38,3 %	Welsh terrier	43,5 %	Terre-Neuve	105
	Épagneul de Münster	16,1 %	Basset hound	37,8 %	Airedale terrier	39,5 %	Berger allemand	71

D'après [21].

cela n'a pas été confirmé par une récente étude européenne [10]. Cette différence peut s'expliquer par la présence de facteurs de risque différents selon les régions géographiques, mais également par des variations génétiques entre les lignées de golden retriever européennes et américaines [10]. Par ailleurs, dans le cadre de l'étude d'un type de cancer, certaines races peuvent apparaître prédisposées à différents sous-types. Ceci est bien illustré avec le mélanome : le caniche le labrador, le golden retriever et le rottweiler sont prédisposés au mélanome buccal et ce dernier est aussi touché par les mélanomes digités et unguéaux (photo 4). Le labrador, quant à lui, est prédisposé au mélanome oculaire [18]. Dans le cas du lymphome de haut grade, le boxer et le labrador présentent particulièrement l'immunophénotype T, alors que le rottweiler et le doberman développent plutôt des lymphomes B (photo 5) [10, 35].

Ces cancers spécifiques à certaines races sont en fait des cancers familiaux. En effet, les chiens d'une même race étant apparentés à plus ou moins de générations, la construction du pedigree permet de montrer la transmission familiale de ces cancers au sein de grandes familles. Cela reflète l'enrichissement en mutations prédisposantes observé chez certaines races en lien avec des pratiques d'élevage comme la consanguinité et la surutilisation de certains étalons champions (figure 2).



3. Chez le bouvier bernois, le cancer représente la cause de la mort d'environ 50 % des individus, selon les études. Le sarcome histiocytaire et le lymphome sont les plus fréquents.

PHOTO : ÉQUIPE GÉNÉTIQUE DU CHIEN, CNRS

TABLEAU 3

Prédisposition à des cancers spécifiques de 16 races de chiens fréquentes en France

RACES	TAUX DE MORTALITÉ DUE À DES CANCERS	PRINCIPALES PRÉDISPOSITIONS DÉCRITES OU SUPPOSÉES
Beauceron	ND	Carcinome épidermoïde du doigt, fibrosarcome, lymphome
Berger allemand	9,6 à 27,7 %	Dermatofibrose nodulaire cutanée/rénale, hémangiosarcome, mésothéliome, adénocarcinome des glandes apocrines des sacs anaux, tumeurs colorectales, tumeurs nasales, lymphome, méningiome, carcinome épidermoïde buccal, ostéosarcome
Berger australien	23,6 %	Lymphome, hémangiosarcome, ostéosarcome
Berger belge	23 %	Tumeurs des cavités nasales, carcinome gastrique, lymphome, hémangiosarcome
Bouledogue français	38 %	Gliome, lymphome, mastocytome, mélanome
Boxer	11,6 à 44,3 %	Mastocytome, mélanome, hémangiosarcome, carcinome épidermoïde cutané, tumeur de la thyroïde, tumeur cérébrale, insulinoïme, ostéosarcome, lymphome
Caniche	8,5 à 18,5 %	Mélanome, carcinome épidermoïde du doigt, lymphome, tumeur de l'hypophyse, carcinome épidermoïde buccal
Cavalier king Charles	ND	Adénocarcinome des glandes apocrines des sacs anaux, carcinome épidermoïde, lymphome B diffus à grandes cellules
Cocker anglais	14,6 à 29,4 %	Fibrosarcome, adénocarcinome des glandes apocrines des sacs anaux, mélanome, lymphome
Épagneul breton	17,9 à 26,5 %	Liposarcome, mélanome cutané, fibrosarcome
Golden retriever	20,3 à 49,9 %	Hémangiosarcome, mastocytome, lymphome, mélanome, mésothéliome, thymome, fibrosarcome, ostéosarcome
Retriever du Labrador	13,1 à 34 %	Mastocytome, carcinome épidermoïde digité, mélanome, insulinoïme, lymphome, hémangiosarcome, thymome, mésothéliome, ostéosarcome, fibrosarcome
Rottweiler	20,4 à 45,3 %	Sarcome histiocytaire, fibrosarcome, lymphome, mélanome, mastocytome, ostéosarcome
Setter anglais	33,8 à 35,7 %	Fibrosarcome, hémangiosarcome, mastocytome, tumeur du cerveau
Staffordshire terrier américain	22 %	Mastocytome, épithélioma basocellulaire, hémangiosarcome
Yorkshire terrier	11,2 %	Tumeur testiculaire, tumeur de l'hypophyse

D'après [22].

4. Mélanome buccal chez un chien localisé à la gencive maxillaire.

Ce cancer est le plus fréquent de la cavité orale chez le chien. Certaines races sont particulièrement prédisposées comme le caniche, le labrador, le golden retriever et le scottish terrier. Cette tumeur présente un comportement particulièrement agressif avec une agressivité locale (noter l'invasion de l'os maxillaire sur l'image scanner, flèche) et un fort potentiel métastatique.

PHOTOS : P. DE FORNEL-THIBAUD

2. Conséquences pour le clinicien

Connaître les races à risque permet de suspecter plus précocement un type de cancer ou de mettre en place des moyens de prévention lorsqu'ils existent. Une étude récente sur les facteurs de risque du sarcome histiocytaire chez le bouvier bernois montre que le risque de développer la maladie est augmenté chez les chiens ayant présenté des troubles orthopédiques, et qu'il est diminué chez ceux qui ont reçu un traitement anti-inflammatoire [43].

Il est important d'inciter le propriétaire à informer l'éleveur du développement d'un cancer spécifique chez un chien issu de son élevage. En effet, ces retours sont nécessaires pour que les éleveurs et les clubs prennent conscience des cancers qui affectent leurs races et des unions à risque. Bien que souvent désemparés en l'absence d'outil de sélection, les éleveurs peuvent toutefois limiter les accouplements potentiellement à risque et sélectionner sur la longévité, afin de limiter l'expression



de cancers chez le jeune chien. Ces cancers sont susceptibles d'être plus agressifs et plus fréquemment observés chez les collatéraux d'un chien atteint dans son jeune âge. Le développement des études génétiques a permis d'identifier des altérations prédisposantes chez le bouvier bernois notamment [1, 23, 47], et des tests génétiques d'aide à la sélection sont maintenant proposés aux éleveurs pour le sarcome histiocytaire (<http://www.antagene.com/fr/commander/test-sh>, **photo 6**). Le praticien doit être conscient des avantages et des limites de ces tests afin de les recommander de façon pertinente et adaptée à ses clients. Ils bénéficient principalement aux éleveurs en permettant d'améliorer leur sélection pour limiter la prévalence du sarcome histiocytaire.

ALTÉRATIONS SOMATIQUES PROPRES AU TISSU TUMORAL

Grâce aux récentes avancées technologiques, un séquençage rapide de génomes entiers est désormais possible. Ce séquençage de nouvelle génération (NGS) a permis

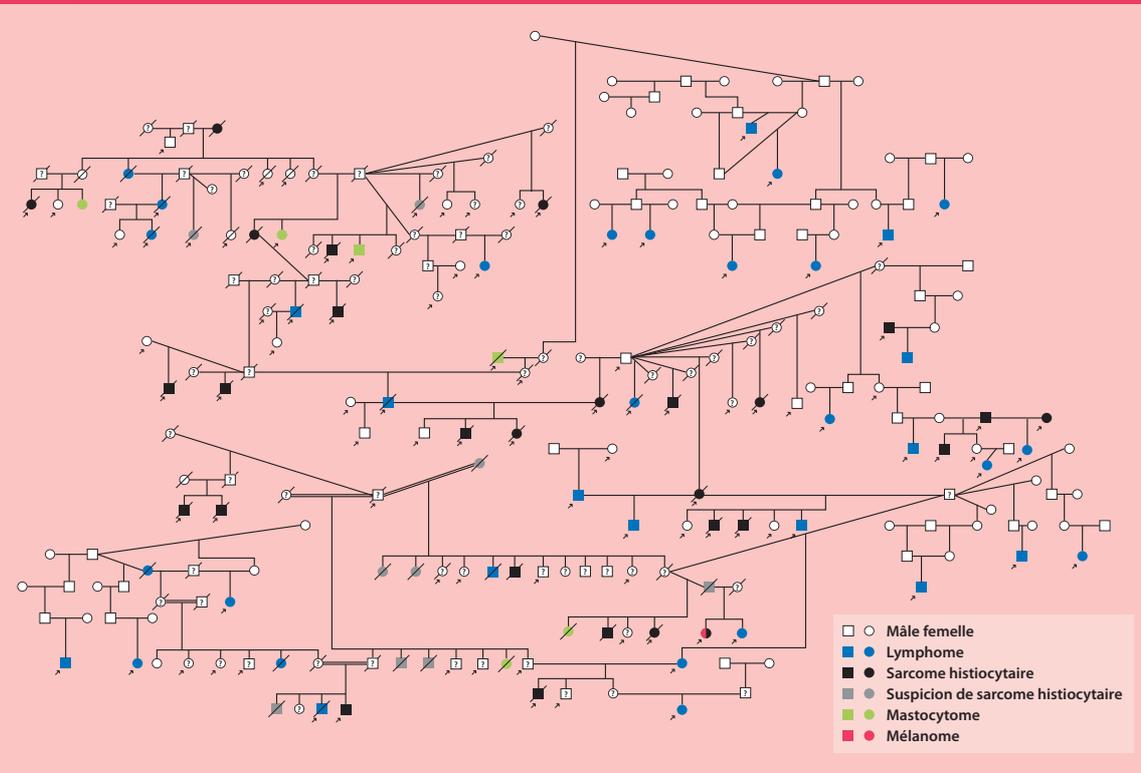


5. Les prédispositions raciales pour des cancers spécifiques sont bien établies.

Puis, en considérant un type de cancer, il apparaît que certaines races sont prédisposées à différents sous-types. Par exemple, dans le cas du lymphome de haut grade, le boxer et le labrador présentent particulièrement l'immunophénotype T, alors que le rottweiler et le doberman développent plutôt des lymphomes B.

PHOTO : M.-A. TROCHET

FIGURE 2
Pedigree de bouviers bernois



Pedigree de bouviers bernois montrant le caractère "familial" de la transmission des cancers dans cette race : ici, sarcome histiocytaire (en noir), lymphome (en bleu), mastocytome (en vert). Ce pedigree illustre le mode de sélection associant consanguinité et étalons champions.

6. Test génétique développé par Antagène pour détecter des altérations prédisposantes au sarcome histiocytaire chez le bouvier bernois.

PHOTO : LABORATOIRE ANTAGÈNE



de séquencer des milliers de tumeurs humaines de différents types et sous-types histologiques. À l'aide de ces techniques, des altérations spécifiques de certains cancers, et récurrentes chez différents individus atteints, ont été identifiées. Ces découvertes expliquent l'intérêt croissant de la génétique en oncologie humaine, tant pour la prévention, le diagnostic, le pronostic que pour le choix thérapeutique. Cette discipline devrait également se développer en médecine vétérinaire, pour bénéficier à l'oncologie.

1. Définition et illustration dans les cancers canins

Une altération somatique est une modification du support génétique apparue lors du développement tumoral, donc présente dans l'ADN de la tumeur, mais pas dans l'ADN constitutionnel de l'individu. Ces mutations peuvent soit apporter un avantage à la cellule tumorale et être sélectionnées (elles sont alors dites mutations "driver"), soit être des événements secondaires reflétant l'anarchie du

matériel génétique dans la tumeur (elles sont appelées mutations "passager").

Les principales altérations somatiques étudiées sont les mutations ponctuelles (changement d'une partie d'un gène affectant un ou quelques nucléotides) et les remaniements chromosomiques, qui touchent de grandes régions génomiques, comme les fusions de gènes (translocations), les gains ou les pertes de régions chromosomiques (amplifications/délétions) ou encore les inversions (figure 3). L'étude de la récurrence de ces événements sur un grand nombre de tumeurs permet de distinguer les mutations "driver" des "passager".

De cette manière, des marqueurs spécifiques de certains cancers ont été identifiés chez le chien, comme l'inactivation des gènes *BRCA1* et *BRCA2* (*breast cancer 1* et *2*) dans les tumeurs mammaires de la chienne ou la mutation de l'oncogène *BRAF* (codant pour la protéine kinase B-Raf) retrouvée dans 80 % des carcinomes prostatiques et dans de nombreux carcinomes transitionnels de la vessie et de l'urètre (67 à 87 %) [12, 37]. De même, le proto-oncogène *KIT* est retrouvé muté dans les tumeurs stromales gastro-intestinales humaines, dans 8 à 35 % des mastocytomes canins selon le grade [13] et jusqu'à 67 % des mastocytomes félines [11, 27, 28], conférant aux cellules tumorales un avantage prolifératif et d'inhibition de l'apoptose.

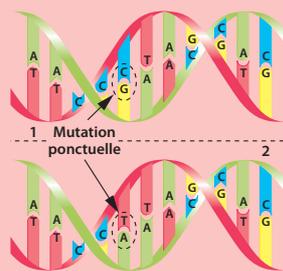
Ces marqueurs spécifiques peuvent avoir quatre fonctions majeures :

- aide au diagnostic ;
- valeur pronostique ;
- aide pour le choix thérapeutique ;
- suivi du patient.

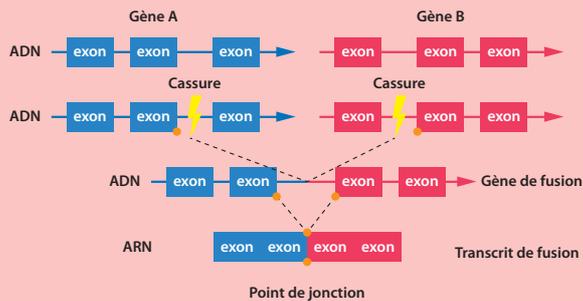
FIGURE 3

Représentation schématique des principales altérations somatiques des cancers

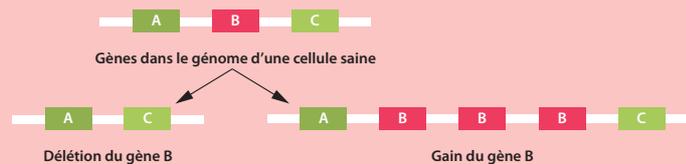
A : mutation ponctuelle (d'après [24])



B : fusion de gènes (d'après [25])



C : gain/perte de régions chromosomiques (d'après [26])



2. Intérêt de ces altérations génétiques pour le diagnostic

Voici quelques exemples de cancers canins pour lesquels des altérations génétiques sont connues et utilisées dans le cadre du diagnostic.

Sarcome histiocytaire

En médecine humaine, les lymphomes et les sarcomes des tissus mous représentent des catégories de cancers très hétérogènes dont les sous-types sont caractérisés par l'identification d'altérations génétiques spécifiques. En médecine vétérinaire, le sarcome histiocytaire et le lymphome, en l'absence d'immunomarquages spécifiques, peuvent être confondus histologiquement. La connaissance des altérations chromosomiques spécifiques permet à la société Sentinel, aux États-Unis [49], de proposer un test (the Cadet[®] HM assay) pour établir un diagnostic de certitude.

Lymphomes canin et félin

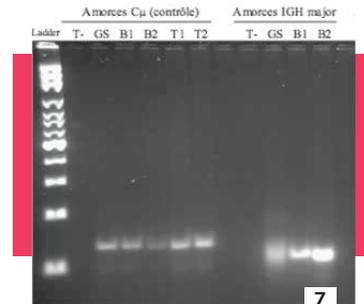
La *polymerase chain reaction for antigen receptor rearrangement* (Parr), ou test de clonalité, est un outil développé pour différencier une prolifération lymphocytaire néoplasique d'une lymphoprolifération non néoplasique. Elle consiste à amplifier les régions génomiques spécifiques des lymphocytes qui codent pour les récepteurs aux antigènes, correspondant au TCR pour les lymphocytes T (*T cell receptor*) et à l'IGH (chaîne lourde de l'immunoglobuline) pour les lymphocytes B. Cette région amplifiée par *polymerase chain reaction* (PCR) est spécifique d'un clone lymphocytaire et chaque clone sera représenté par un produit de PCR unique. Lors de l'analyse d'un échantillon, la présence d'un seul et unique produit de PCR indique la présence d'un clone lymphocytaire majoritaire, qui est fréquemment un clone tumoral, alors que de multiples produits de PCR soulignent l'existence de différents lymphocytes présents lors de l'inflammation (photo 7). Chez le chien et le chat, le manque de spécificité de la méthode provient du fait que certaines infections (comme celle à *Ehrlichia canis* chez le chien [8]) et inflammations (infiltrations digestives lymphoplasmocytaires chez le chien et le chat [29, 39, 41]) peuvent présenter une monoclonalité. Ces dernières années, plusieurs équipes ont mis au point différentes amorces afin d'améliorer la sensibilité de la méthode. En tant qu'outil diagnostique, la Parr n'intervient qu'après l'analyse histologique et l'immunophénotypage lors de diagnostic difficile, et il est montré qu'elle peut apporter un gain de sensibilité dans la détection des lymphomes digestifs félines lorsqu'elle est associée à ces analyses [29].

Cet examen peut être réalisé sur des biopsies, du liquide d'épanchement ou des cytoponctions.

La Parr est également d'une aide précieuse dans le suivi de la maladie résiduelle dans le sang ou les nœuds lymphatiques lors de lymphome chez le chien, et permet ainsi de documenter une rémission sur le plan moléculaire (photo 8) [3, 34, 48].

Carcinome urothélial

Un laboratoire américain a récemment développé un test diagnostique pour le carcinome urothélial canin grâce à l'identification de la mutation du gène *BRAF* dans les



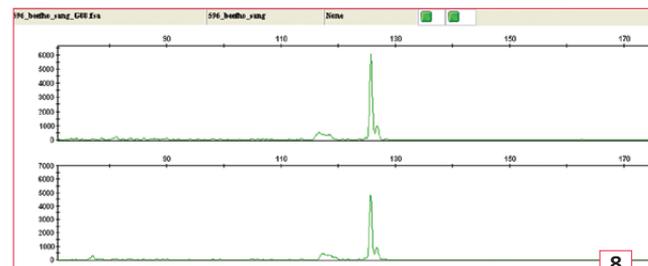
7. Visualisation des résultats de la Parr par électrophorèse sur gel d'agarose. Les fragments d'ADN amplifiés lors de la Parr migrent sur le gel selon leur taille. Les amorces C μ servent de contrôle et indiquent que la PCR a bien fonctionné. Une bande unique est observée dans les échantillons de lymphome B avec les amorces IGH (récepteur à l'antigène des lymphocytes B), mettant en évidence le clone tumoral majoritaire. Un smear est observé dans le prélèvement de ganglion sain, représentant la diversité des remaniements d'immunoglobuline de tous les lymphocytes sains (d'après [15]).
Ladder : marqueur de taille ; T- : témoin négatif (eau stérile) ; GS : ganglion sain ; B1 et B2 : deux prélèvements de lymphome B ; T1 et T2 : deux lymphomes T.

PHOTO : A GAUTIER

urines des chiens atteints [12]. Comme cela a été mentionné plus haut, cette mutation est présente dans un grand nombre de cas (67 à 87 %) et permet un diagnostic aisé et non invasif, ainsi qu'un suivi thérapeutique. L'étude de Decker et coll. a montré une concordance de 100 % (n = 9) entre la détection de cette mutation dans la tumeur et l'urine.

3. Intérêt de ces altérations pour préciser le pronostic

Dans certains cas, l'étude d'altérations génétiques peut compléter les données histologiques et préciser un pronostic. Le récepteur tyrosine kinase c-kit est une protéine transmembranaire codée par le gène *KIT*, présente sur de



8. Visualisation des résultats de génotypage Parr après migration sur un séquenceur. L'ADN contenu dans le prélèvement de nœud lymphatique (en haut) et dans le sang (en bas) a été extrait. Une Parr a été effectuée avec des amorces spécifiques de l'IGH (récepteur à l'antigène des lymphocytes B). Noter la présence au génotypage d'un pic unique de 125 pb sur les deux profils, avec un signal intense. Ce pic unique correspond au remaniement d'immunoglobuline du clone lymphocytaire tumoral, présent majoritairement dans le ganglion lymphomateux (en haut), mais aussi dans le sang périphérique (en bas).

PHOTO : ÉQUIPE GÉNÉTIQUE DU CHIEN, CNRS

nombreux types cellulaires et particulièrement sur les mastocytes. Ce récepteur est activé par le *stem cell factor* (SCF) qui induit une cascade de signalisations et active la prolifération, la motilité et la survie des cellules [9, 32] (figure 4). Lorsqu'il est muté, le récepteur est continuellement activé, indépendamment de sa liaison avec le SCF. Cette mutation est maintenant bien connue dans le mastocytome canin et est devenue un facteur pronostique supplémentaire des deux systèmes de classification existants (grading de Patnaik et grading de Kiupel). Plusieurs études montrent que les mutations du gène *KIT*, qui ont lieu le plus souvent dans l'exon 11, sont corrélées à un grade élevé (entre 30 et 55 % des tumeurs de grade II-III de Patnaik ou haut grade de Kiupel) et signent un phénotype agressif du mastocytome associé à un pronostic plus sombre [13, 17, 50, 51, 57]. La détection de

la mutation peut être réalisée par certains laboratoires d'anatomo-pathologie vétérinaires, par séquençage du gène (de l'exon 11 plus particulièrement) sur un prélèvement tumoral. Selon certaines études, la mutation de *KIT* est corrélée à un pattern d'expression aberrant de sa protéine au sein de la cellule tumorale [53]. Ce pattern, observé par immunohistochimie, peut être membranaire (cas normal) ou cytoplasmique (focal ou diffus) et présente aussi une valeur pronostique [17, 30].

D'autres marqueurs génétiques restent à définir dans les différents types de cancers pour mieux prédire leur comportement biologique et leur pronostic.

4. Intérêt de ces altérations pour le traitement : avènement des thérapies ciblées

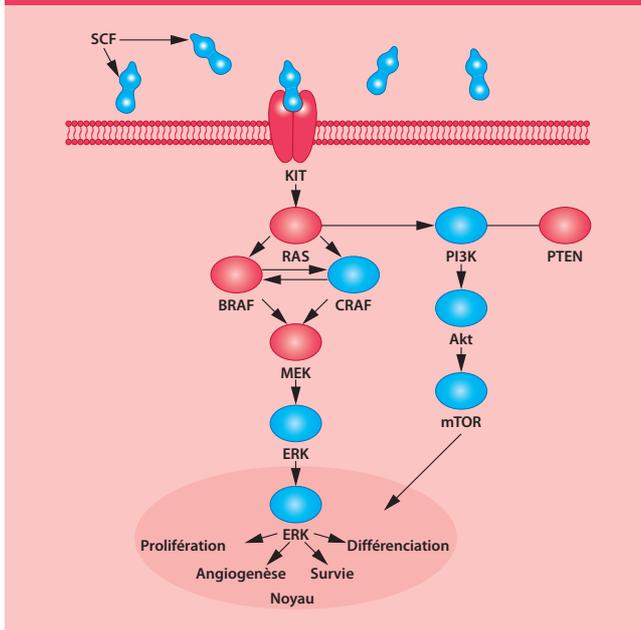
En plus de leur potentielle valeur pronostique, les altérations génétiques du cancer peuvent constituer des cibles thérapeutiques intéressantes.

En oncologie humaine et vétérinaire, il existe différents axes de traitement du cancer : la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie/biothérapie (qui inclut l'immunothérapie), et les techniques d'oncologie interventionnelles (chémioembolisation, cryoablation, radiofréquence, etc.) qui tendent à se développer chez le chien et le chat. Ces dernières années, la compréhension des mécanismes fonctionnels de la cellule cancéreuse a permis l'essor de l'immunothérapie et des thérapies ciblées chez l'homme. Les thérapies ciblées consistent à bloquer une particularité de la cellule cancéreuse qui est impliquée dans la chaîne d'informations responsable de la prolifération et de la survie cellulaire. De cette manière, la cellule tumorale ne peut plus se diviser. Ces médicaments reposent sur le profil moléculaire de la tumeur (présence ou absence d'une mutation somatique spécifique) et non plus sur son type histologique. Ainsi, une même thérapie peut se révéler efficace sur des cancers qui touchent des organes différents ayant les mêmes altérations moléculaires. Chez l'homme, de nombreuses molécules de thérapie ciblée ont déjà obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) ou sont en cours d'essais cliniques.

En médecine vétérinaire, seules deux molécules de thérapie ciblée disposent actuellement d'une AMM : il s'agit du tocéranib (Palladia®) et du masitinib (Masivet®), qui font partie de la classe des inhibiteurs des récepteurs tyrosine kinase (ITK). Ces deux molécules n'ont pas tout à fait les mêmes cibles et disposent d'une AMM légèrement différente. Le masitinib agit notamment sur le récepteur c-kit et le *platelet derived growth factor receptor* (PDGFR). Il est indiqué dans le traitement du mastocytome canin de grades II et III de Patnaik non opérable portant la mutation c-kit [6, 32]. Le tocéranib possède un spectre plus large, car il cible notamment les récepteurs c-kit, PDGFR-β et le *vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR-2) [6, 30]. Ses indications sont les mastocytomes canins de grades II et III non opérables et récidivants. Les différents essais cliniques montrent une efficacité des deux molécules en monothérapie, avec un meilleur taux de réponse clinique chez les chiens porteurs d'une mutation du gène *KIT* [6, 17]. Il est également démontré que lors de mastocytome métastaté, la mutation *KIT* est présente dans

FIGURE 4

Représentation schématique du récepteur tyrosine kinase c-kit et de son activation par son ligand, le *stem cell factor* (SCF), et des principales voies de transduction induisant la prolifération et la survie cellulaires



D'après [9].

SCF : *stem cell factor*

KIT : récepteur de la tyrosine kinase

RAS : protéine « ras » (tiré de l'origine de sa découverte dans le sarcome du rat)

BRAF : *v-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma murine sarcoma viral oncogene homolog B*

CRAF : idem sauf B remplacé par C

PTEN : *phosphatase and tensin homolog*

MEK : *Mitogen-activated protein kinase kinase*

ERK : *Extracellular signal-regulated kinases*

PI3K : *phosphoinositide 3-kinase*

AKT : *Protein kinase B*

mTOR : *mechanistic target of rapamycin*

la tumeur primaire et dans les métastases, ce qui illustre l'intérêt des ITK dans la prise en charge des maladies à un stade avancé [36].

Leur utilisation hors AMM dans le traitement de certains cancers du chien et du chat se révèle intéressante, notamment lors de carcinome thyroïdien, de carcinome des glandes apocrines des sacs anaux, des carcinomes de la tête et du cou et des tumeurs stromales gastro-intestinales (Gist) (photo 9) [4, 33, 46]. De plus, certaines études de toxicité montrent que les ITK peuvent être utilisés en association avec des molécules de chimiothérapie cytotoxiques comme la doxorubicine [42], la vinblastine [40] et le carboplatine [55]. Chez le chat, le tocéranib a démontré son efficacité dans le traitement du mastocytome, avec un bénéfice clinique obtenu dans 80 % des cas [5, 21].

5. Intérêt de ces altérations génétiques pour le suivi thérapeutique

Plus récemment, il a été montré qu'il est possible de détecter les cellules tumorales circulantes chez des chiens atteints de lymphome de haut grade [56]. Au cours de la chimiothérapie, la quantité de cellules tumorales diminue et passe sous le seuil de détection clinique et de l'imagerie. Les cellules lymphomateuses résiduelles sont à l'origine des récurrences et peuvent être détectées dans le sang par les techniques de biologie moléculaire (comme la Parr détaillée plus haut). Grâce à la technique très sensible de PCR quantitative, des équipes japonaises ont déterminé la maladie résiduelle circulante chez des chiens à différents stades du traitement de chimiothérapie (type Chop : cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, prednisolone, protocole Wisconsin-Madison de 6 mois), avec une sensibilité de détection d'une cellule tumorale sur 10 000 cellules. La quantité de maladie résiduelle à la 11^e semaine de traitement et à la fin du protocole a une valeur pronostique [45, 56]. Cette technique permet également de prédire la rechute clinique 2 semaines ou plus avant celle-ci (14 chiens sur 15) et semble être un outil intéressant à intégrer dans le suivi de l'animal sous traitement [44].

6. Vers un nouveau concept : les biopsies liquides

En oncologie humaine, la réalisation de "biopsies liquides" s'est largement développée ces dernières années. Le principe est d'obtenir des informations sur l'ensemble de la tumeur grâce à l'analyse des cellules, des métabolites et de l'ADN tumoral libre présents dans le plasma ou les autres liquides biologiques (urine, épanchement, etc.). Au cours du développement d'une tumeur, des cellules tumorales vont relarguer leur ADN dans la circulation générale *via* des phénomènes de nécrose, d'apoptose, ou de sécrétion active (figure 5). Il est donc possible de détecter et de quantifier des altérations spécifiques de cancer dans le plasma grâce à la présence d'ADN tumoral circulant.

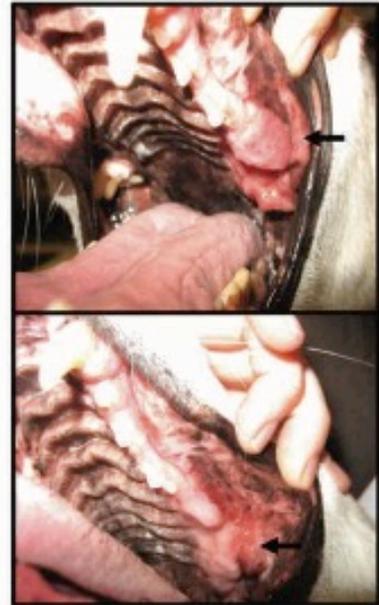
L'intérêt de détecter l'ADN circulant comme biomarqueur spécifique a déjà été démontré dans certains cancers pour le diagnostic, le pronostic, mais aussi lors du suivi thérapeutique, et ces nouvelles méthodes devraient bientôt s'appliquer à l'oncologie vétérinaire. Actuellement, le

9. Carcinome épidermoïde buccal maxillaire chez un labrador. Les images montrent l'aspect clinique de la tumeur (flèches) avant et après un traitement au tocéranib, avec une réponse quasi complète (d'après [33]).

PHOTO : C. BRIDON
© NILES 2012

10. Extraction de l'ADN circulant dans le plasma de chiens atteints de lymphome. Les plasmas passent dans une colonne qui concentre l'ADN avant sa purification et son élution (remise en solution).

PHOTO : ÉQUIPE GÉNÉTIQUE
DE CHEN, CHEN



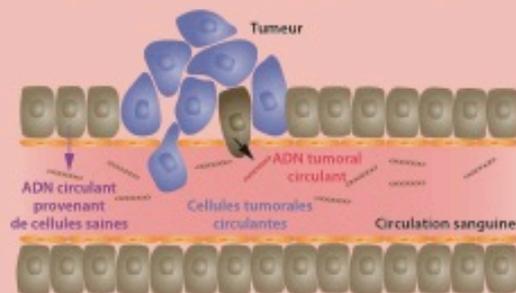
9



10

FIGURE 5

Biopsies liquides et principaux biomarqueurs du sang périphérique



Les biopsies liquides reposent sur la présence dans le plasma de cellules tumorales circulantes et d'ADN tumoral circulant, lequel est relargué par les cellules tumorales *via* l'apoptose, la nécrose et la sécrétion. Une part de l'ADN circulant est également constituée par l'ADN relargué par les cellules saines de l'organisme. D'après [38].

Points forts

- Le cancer est une maladie multifactorielle due à l'interaction entre la génétique et l'environnement.
- Les races de chiens sont des isolats génétiques qui peuvent concentrer un type de cancer particulier avec une forte prévalence.
- L'étude du profil moléculaire des cancers a de nombreuses applications cliniques en médecine humaine. Certaines altérations ont une valeur pronostique et permettent de stratifier les patients. Le plus bel exemple en oncologie vétérinaire est la présence de la mutation *KIT* qui est associée à un mauvais pronostic lors de mastocytome canin.
- Les altérations moléculaires du cancer peuvent être des cibles thérapeutiques. C'est encore le cas du mastocytome canin avec le développement des inhibiteurs des tyrosines kinases qui bloquent le récepteur *c-kit* muté.
- En médecine vétérinaire, des techniques de biologie moléculaire sont à l'étude pour détecter la maladie résiduelle. Elles pourraient bientôt être intégrées dans le suivi du traitement des animaux atteints d'un cancer.

laboratoire de génétique du chien étudie la possibilité de détecter précocement des marqueurs plasmatiques de sarcome histiocyttaire et de lymphome pour suivre leur évolution au cours d'un traitement, dans le but d'améliorer la détection et la prise en charge de ces cancers (photo 10).

Conclusion

Le futur de l'oncologie vétérinaire passera-t-il par une médecine personnalisée ? Avec les progrès de la génétique humaine, la caractérisation moléculaire des cancers est devenue une étape indispensable pour orienter les choix thérapeutiques. À titre d'exemple en France, 55 000 patients humains ont bénéficié, en 2011, d'un test de génétique moléculaire déterminant l'accès à une thérapie ciblée disposant d'une AMM. De plus, l'Institut national du cancer a permis la réalisation de 76 300 tests de génétique pour la recherche d'altérations moléculaires et la réalisation d'essais cliniques avec de nouvelles molécules. La sensibilité de ces méthodes de génétique ayant considérablement augmenté, ces marqueurs sont parfois utilisés en routine à l'hôpital pour le choix de la thérapie à

mettre en place, pour préciser le pronostic ou pour le suivi de la réponse au traitement du patient. Pour des raisons de coûts, l'accès à ces outils en médecine vétérinaire est limité au monde de la recherche et à quelques centres américains de référence. Par exemple, le laboratoire américain Innogenics propose déjà des tests génétiques pour certains cancers canins (lymphome, sarcome, différents carcinomes, mélanome) permettant d'identifier des marqueurs moléculaires pour mieux les caractériser, et notamment prédire la sensibilité de la tumeur à différentes molécules. Il est probable que ces techniques s'intègrent peu à peu à la prise en charge des animaux en oncologie vétérinaire, en Europe et en France, dans les années à venir. ■

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Pauline de Fornel-Thibaud et MICEN-VET pour leur avoir aimablement fourni certaines photographies.

Summary

Use of genetics in veterinary oncology

► Cancer is one of the leading causes of death in humans and mortality in pets. Genetics is at the heart of its development since the transformation of a healthy cell into a tumour cell results from the occurrence of mutations on key genes, which appear spontaneously during cell divisions or because of environmental factors. In humans, a small proportion of cancers are hereditary (about 10%) and due to the transmission of so-called «predisposing» mutations. Many breeds of dogs are predisposed to one or more types of cancer due to artificial selection. Advances in molecular biology have improved the management of many cancers in humans. In pets, the study of the genetics of different cancers has led to the development of certain screening tests, for example, for histiocytic sarcoma and urothelial carcinoma in dogs. Genetics is also useful in histopathology to better characterize certain cancers and predict their biological behaviour. The main interest for the clinician is that targeted therapies specific for certain alterations can be developed, thus supplementing the therapeutic arsenal of veterinary oncology.

Keywords

Genetics, cancer, somatic mutations, predisposing mutations, cell proliferation, targeted therapy, biomarkers.

Anaïs Prouteau, Benoît Hédan

Équipe "généétique du chien"
Institut de génétique et développement
UMR6290, CNRS, université de Rennes
2, avenue du Pr Léon Bernard
35043 Rennes

Intérêts de la génétique en oncologie vétérinaire

Références

- Abadie J, et coll. Epidemiology, pathology, and genetics of histiocytic sarcoma in the Bernese mountain dog breed. *J. Hered.* 2009;100(Suppl. 1):S19-27.
- Adams VJ, Evans KM, Sampson J, Wood JLN. Methods and mortality results of a health survey of purebred dogs in the UK. *J. Small Anim. Pract.* 2010;51:512-524.
- Aresu L, et coll. Minimal residual disease detection by flow cytometry and PARR in lymph node, peripheral blood and bone marrow, following treatment of dogs with diffuse large B-cell lymphoma. *Vet. J. Lond. Engl.* 2014;200:318-324.
- Berger EP, et coll. Retrospective evaluation of toceranib phosphate (Palladia®) use in the treatment of gastrointestinal stromal tumors of dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 2018. doi:10.1111/jvim.15335.
- Berger EP, et coll. Retrospective evaluation of toceranib phosphate (Palladia®) use in cats with mast cell neoplasia. *J. Feline Med. Surg.* 2018;20:95-102.
- Blackwood L, et coll. European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. *Vet. Comp. Oncol.* 2012;10:e1-e29.
- Bronson RT. Variation in age at death of dogs of different sexes and breeds. *Am. J. Vet. Res.* 1982;43:2057-2059.
- Burnett RC, et coll. Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. *Vet. Pathol.* 2003;40:32-41.
- Carlomagno F, Chiariello M. Growth factor transduction pathways: paradigm of anti-neoplastic targeted therapy. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 2014;92:723-733.
- Comazzi S, et coll. Breed-associated risks for developing canine lymphoma differ among countries: an European canine lymphoma network study. *BMC Vet. Res.* 2018;14: 232.
- Dank G, Chien MB, London CA. Activating mutations in the catalytic or juxtamembrane domain of c-kit in splenic mast cell tumors of cats. *Am. J. Vet. Res.* 2002;63:1129-1133.
- Decker B, et coll. Homologous mutation to human BRAF V600E is common in naturally occurring canine bladder cancer-evidence for a relevant model system and urine-based diagnostic test. *Mol. Cancer Res.* 2015;13:993-1002.
- Downing S, Chien MB, Kass PH, Moore PE, London CA. Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs. *Am. J. Vet. Res.* 2002;63:1718-1723.
- Fleming JM, Creevy KE, Promislow DEL. Mortality in north american dogs from 1984 to 2004: an investigation into age-, size-, and breed-related causes of death. *J. Vet. Intern. Med.* 2011;25:187-198.
- Gautier A. Validation d'un test de clonalité pour le diagnostic des lymphomes canins par analyse moléculaire des réarrangements du récepteur à l'antigène (Parr). Thèse vétérinaire, 2014.
- Giam M, Rancati G. Aneuploidy and chromosomal instability in cancer: a jackpot to chaos. *Cell Div.* 2015;10:3.
- Gil da Costa RM. C-kit as a prognostic and therapeutic marker in canine cutaneous mast cell tumours: from laboratory to clinic. *Vet. J. Lond. Engl.* 1997. 2015;205:5-10.
- Gillard M, et coll. Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014;27:90-102.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-674.
- Harper A, Blackwood L. Toxicity and response in cats with neoplasia treated with toceranib phosphate. *J. Feline Med. Surg.* 2017;19:619-623.
- Hédan B. Cancer chez le chien : prédispositions raciales et formes familiales. *Le Point Vétérinaire.* 2015;354:54-62.
- Hédan B, et coll. Molecular cytogenetic characterization of canine histiocytic sarcoma: a spontaneous model for human histiocytic cancer identifies deletion of tumor suppressor genes and highlights influence of genetic background on tumor behavior. *BMC Cancer.* 2011;11:201.
- <http://slideplayer.com/slide/3882398/>
- <http://www.tumorfusions.org/>
- <https://www.yourgenome.org/facts/what-is-a-chromosome-disorder>
- Isotani M, et coll. Mutations in the fifth immunoglobulin-like domain of kit are common and potentially sensitive to imatinib mesylate in feline mast cell tumours. *Br. J. Haematol.* 2010;148:144-153.
- Isotani M, et coll. Identification of a c-kit exon 8 internal tandem duplication in a feline mast cell tumor case and its favorable response to the tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2006;114:168-172.
- Kiupel M, et coll. Diagnostic algorithm to differentiate lymphoma from inflammation in feline small intestinal biopsy samples. *Vet. Pathol.* 2011;48:212-222.
- Kiupel M, et coll. The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet. Pathol.* 2004;41(4): 371-377.
- Lingaa F, et coll. A mutation in the canine BHD gene is associated with hereditary multifocal renal cystadenocarcinoma and nodular dermatofibrosis in the German shepherd dog. *Hum. Mol. Genet.* 2003;12:3043-3053.
- London CA. Small molecule inhibitors in veterinary oncology practice. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 2014;44:893-908.
- London C, et coll. Preliminary evidence for biologic activity of toceranib phosphate (Palladia®) in solid tumours. *Vet. Comp. Oncol.* 2012;10:194-205.
- Manachai N, Lacharoe S, Techangamsuwan S, Rungkipipat A. Detection of minimal residual disease (MRD) in canine lymphoma. *Comp. Clin. Pathol.* 2014;23:199-204.
- Modiano JF, et coll. Distinct B-cell and T-cell lymphoproliferative disease prevalence among dog breeds indicates heritable risk. *Cancer Res.* 2005;65:5654-5661.
- Marconato L, et coll. Concordance of c-kit mutational status in matched primary and metastatic cutaneous canine mast cell tumors at baseline. *J. Vet. Intern. Med.* 2014;28:547-553.
- Mochizuki H, Kennedy K, Shapiro SG, Breen M. BRAF mutations in canine cancers. *PLoS One.* 2015;10:e0129534.
- Nurwidya F, et coll. Circulating tumor cell and cell-free circulating tumor DNA in lung cancer. *Chonnam Med. J.* 2016;52:151-158.
- Ohmi A, et coll. Significance of clonal rearrangements of lymphocyte antigen receptor genes on the prognosis of chronic enteropathy in 22 Shiba dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 2017;79:1578-1584.
- Olsen JA, Thomson M, O'Connell K, Wyatt K. Combination vinblastine, prednisolone and toceranib phosphate for treatment of grades II and III mast cell tumours in dogs. *Vet. Med. Sci.* 2018.
- Paulin MV, et coll. Feline low-grade alimentary lymphoma: an emerging entity and a potential animal model for human disease. *BMC Vet. Res.* 2018;14:306.
- Pellin MA, et coll. Safety evaluation of combination doxorubicin and toceranib phosphate (Palladia®) in tumour bearing dogs: a phase I dose-finding study - safety of concurrent doxorubicin and toceranib combination therapy. *Vet. Comp. Oncol.* 2017;15:919-931.
- Ruple A, Morley PS. Risk factors associated with development of histiocytic sarcoma in Bernese mountain dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 2016;30:1197-1203.
- Sato M, et coll. Minimal residual disease in canine lymphoma: an objective marker to assess tumour cell burden in remission. *Vet. J. Lond. Engl.* 1997. 2016;215:38-42.
- Sato M, et coll. The prognostic significance of minimal residual disease in the early phases of chemotherapy in dogs with high-grade B-cell lymphoma. *Vet. J. Lond. Engl.* 1997. 2013;195:319-324.
- Sayag D, Pastor M. Utilisation hors AMM des inhibiteurs des tyrosines kinases en cancérologie vétérinaire. *Le Point Vétérinaire.* 2014;349:66-71.
- Shearin AL, et coll. The MTAP-CDKN2A locus confers susceptibility to a naturally occurring canine cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 2012;21:1019-1027.
- Sirivisoot S, Teewasutrakul P, Techangamsuwan S, Tangkawattana S, Rungkipipat A. Monitoring minimal residual disease in canine lymphomas treated with modified L-COP or L-CHOP protocols. *Acta Vet. Hung.* 2018;66:66-84.
- Société Sentinel. <http://www.sentinelbiomedical.com/>
- Takeuchi Y, et coll. Validation of the prognostic value of histopathological grading or c-kit mutation in canine cutaneous mast cell tumours: a retrospective cohort study. *Vet. J. Lond. Engl.* 1997. 2013;196:492-498.
- Tamlin VS, et coll. Prevalence of exon 11 internal tandem duplications in the C-KIT proto-oncogene in Australian canine mast cell tumours. *Aust. Vet. J.* 2017;95:386-391.
- Villamil JA, et coll. Hormonal and sex impact on the epidemiology of canine lymphoma. *J. Cancer Epidemiol.* 2009;2009:591753.
- Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Kaneene JB, Miller R, Resau JH, Kiupel M. The role of C-KIT in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. *Neoplasia (New York, N.Y.)* 2006;8(2):104-111.
- Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology. Elsevier, 2013.
- Wouda RM, Hocker SE, Higginbotham ML. Safety evaluation of combination carboplatin and toceranib phosphate (Palladia®) in tumour-bearing dogs: a phase I dose finding study. *Vet. Comp. Oncol.* 2018;16:E52-E60.
- Yamazaki J, et coll. Monitoring of minimal residual disease (MRD) after multidrug chemotherapy and its correlation to outcome in dogs with lymphoma: a proof-of-concept pilot study. *J. Vet. Intern. Med.* 2010;24:897-903.
- Zemke D, Yamini B, Yuzbasiyan-Gurkan V. Mutations in the juxtamembrane domain of c-KIT are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. *Vet. Pathol.* 2002;39:529-535.

ANNEXE 2

A retrospective epidemiological study of 402 canine melanocytic tumors (2008-2016) : clinical outcome, prognostic factors and comparative histopathology,
Prouteau et al. In prep

**A retrospective epidemiological study of 402 canine melanocytic tumors
(2008-2016): Clinical outcome, prognostic factors and
comparative histopathology**

Anaïs Prouteau*¹, Clotilde De Brito*¹, Edouard Cadieu¹, Aline Primot¹, Nadine Botherel¹,
Jérôme Abadie², Laetitia Lagoutte¹, Béatrice Vergier³, Frédérique Degorce³, Marie
Lagadic⁵, Pauline de Fornel-Thibaud⁶, Didier Lanore⁷, Olivier Dejardin⁸, Benoît Hédan¹ and
Catherine André¹

* Authors equally contributed to the work

¹CNRS-University of Rennes 1, UMR6290, Institute of Genetics and Development of Rennes,
Faculty of Medicine, SFR Biosit, Rennes, France

²Oniris, Laboniris - Department of Biology, Pathology and Food Sciences, Nantes, France

³ Pathology service, Haut-Lévêque Hospital, Pessac, France

⁴ LAPVSO Veterinary Pathology laboratory, Toulouse, France

⁵Idexx Veterinary Pathology laboratory, Saint-Denis, France

⁶ Micen Vet, Créteil, France

⁷ Veterinary clinic Alliance, Bordeaux, France

⁸ INSERM U1086 ANTICIPE, Caen Hospital, Caen, France

Abstract

Background: Melanocytic tumors are relatively frequent in dogs and oral melanoma is the first canine oral malignancy. The goal of this study was to report epidemiological data and statistically significant prognostic factors from a large collection of melanocytic tumors and to propose a human-based histological classification that would help comparative oncology studies. Data from 402 client-owned dogs were gathered from June 2008 to January 2015, thanks to the Cani-DNA biological resource center, through French veterinarians and pathology laboratories. Information collected included age at diagnosis, sex, breed, tumor characteristics (ulceration and pigmentation), tumor size and location, clinical signs at diagnosis, treatment and survival data. A follow-up was done every 6 months, until April 2016 (end of the study).

Results: Out of the 402 melanocytic tumors, 83% were malignant (n=335) and the most frequent location was oral (63.5%). Other locations included skin (18.5%), digits (17%) and uvea (1%). Dogs with oral melanoma (n=247) had the poorest outcome with a median survival time (MST) of 6 months and negative prognostic factors included ulceration, location on the gingiva and incomplete surgical resection. Cutaneous melanoma (n=27) had the best prognosis with a MST > 18 months. Melanomas of the digits (n=60) were intermediate with a MST of 11.8 months and significant prognostic factors were tumor size, recurrence and development of metastases.

In addition, an histopathological comparative approach was performed on a subset of 205 canine melanocytic tumors reviewed by two pathologists, in an attempt to classify canine melanomas according to human pathology criteria. We described animal-type, epidermoid, and nevocytoid tumors: the animal-type tumors were mostly associated to benign forms (melanocytomas) that are of excellent prognosis. In contrast, the epidermoid and nevocytoid types were more frequent in malignant tumors, but we couldn't find a significant prognostic value between the epidermoid and nevocytoid types for oral melanoma.

Conclusion: This study brings epidemiological, clinical and survival data of a large sample of 402 dogs with melanocytic tumors, and highlights statistically significant prognostic factors for the 247 oral and the 60 digit melanomas. We also propose a human-based histopathological classification that can be useful in a comparative oncology perspective, but not for a differential prognosis between the 2 morphological epidermoid and nevocytoid for oral melanomas.

Keywords : dog, melanoma, epidemiology, survival, clinical prognostic factors, human-based histopathological classification

Background

Melanocytic tumors are relatively frequent in dogs, and account for 4-7% of all canine neoplasms. They develop from melanocytes that are dendritic cells in the dermo-epidermic junction. These tumors occur mostly in old dogs, in the haired skin and oral cavity and more rarely on the footpads, nailbed, muco-cutaneous junctions, eyeball or gastro-intestinal tract. Most of them are malignant, indeed melanomas account for 9-20% of skin tumors in dogs, and is the most common malignant tumor in the oral cavity(1–5). Melanoma can metastasize in regional lymph nodes, lungs, liver, bones or in the central nervous system(6). Some breeds are predisposed and particularly affected like the Labrador, golden retriever, poodles, schnauzer, Scottish terrier, dachshunds, cocker spaniel, doberman, pinscher, rottweiler, Beauce shepherd, Irish and Gordon setter, Airedale terrier, Boston terrier, boxer and chihuahua(1,4–11). Labradors, golden retrievers, cocker spaniel and poodles are more prone to develop oral forms whereas schnauzers have mostly cutaneous and digital forms(4,5,9,11,12).

Biological behavior and outcomes depend on several known prognostic factors such as location, tumor size, clinical stage (according to the World Health Organization staging scheme(10)), evidence of bone lysis and histological features(4–6,10,13–15). Cutaneous and uveal tumors are often benign(4,5,12,16,17), whereas oral melanomas, muco-cutaneous melanomas and melanomas of the distal extremities are generally aggressive tumors that grow rapidly, locally invasive and highly metastatic(2,4,5,10,14,18,19). Surgical resection is the most effective treatment for canine melanoma, but complete resection is not always achievable. Radiation therapy can be a primary treatment when surgery is not possible, or it can be used as an adjuvant therapy. It induces partial or complete clinical response in 82%-94.4% of cases and is helpful in controlling local disease(6,20,21). The role of chemotherapy as an adjuvant therapy, especially using platinum agents didn't show extending of survival time(17,20,22–26). Immunotherapy with the use of xenogeneic DNA vaccine, combined with surgery or radiation therapy seems to be promising but need further investigations with randomized trials as current results are controversial(27–30).

The purposes of this study were 1) to report epidemiological data from a large cohort of 402 canine melanocytic tumors with a clinical follow-up, 2) to identify prognostic factors for each melanoma subtype independently, 3) to propose a histological classification of 205 canine melanomas, according to the human melanoma classification.

Results

Canine melanocytic tumors

Four hundred and two dogs with melanocytic tumors met the inclusion criteria.

The location of the tumors was oral in 63.5% of these cases, cutaneous in 18.5%, digital (on the footpads, digits or claw bed) in 17% and ocular in only 1%. Among these melanocytic tumors, 83% were malignant corresponding to melanomas (n=335) and 17% were described as melanocytomas, benign tumors (n=67). Oral and digital tumors were mostly malignant (in 97% and 90% of cases, respectively), whereas cutaneous types were more often benign, in 52% of cases. Similarly, ocular types were benign, as observed for 3 out

of the 4 cases included here. Among digital tumors, all subungual (claw bed) forms were malignant. For the 67 benign melanocytomas, no dogs died due to tumor related causes. These data are concordant with previous findings(12,31).

Canine melanomas

The 335 dogs with oral (n=247, 74%), digital (n=60, 18%), cutaneous (n=27, 8%) or ocular (n=1, 0.3%) malignant melanomas had a median survival time (MST) of 9 months (CI: 6.7-9.5 months). The average age at diagnosis was 11.5 years old (minimum 5.1 and maximum 18.2 years old). Surgery concerned 90% and 12 dogs received adjuvant therapy (3 dogs had chemotherapy, 2 DNA vaccine, 3 radiation therapy alone and 4 received radiation therapy in combination with chemotherapy or vaccine). The others 10% did not receive any treatment.

Univariate analyses showed that the following features were associated with survival time: tumor location, age at diagnosis, neutering status, breed, enlarged lymph nodes at diagnosis, lethargy and dysorexia at diagnosis, tumor size, ulceration, pigmentation, type of surgical resection, recurrence and development of pulmonary metastasis (Table 1). Oral and digital melanomas were of worse prognosis compared to cutaneous forms (Figure 3). Amelanitic tumors were found to carry a worse prognosis than pigmented ones. Surprisingly, neutered dogs were found to have a better prognosis than others, but this was not confirmed in the multivariate analyses and could be due to confounding factors.

Canine cutaneous melanomas

Dogs with cutaneous melanoma (n=27) had the best prognosis with a MST over 18 months (1st quartile, median not reached in this study). Mean age at diagnosis was 8.9 years old (range 5.1-13.9) and the most represented breeds were German shepherd, Labrador, schnauzer, golden retriever, Yorkshire terrier and Brie Shepherd. The most frequent locations included head (40%) and limbs (26%). None of these dogs had enlarged lymph nodes at diagnosis and none of them developed signs compatible with pulmonary metastases. The major part of the tumors was pigmented (89%), non-ulcerated (79%) and measured less than 3 cm (88%). Only 8/27 (35%) dogs died due to the tumor and the median survival time was not reached in this subgroup.

Canine digital melanomas

Mean age at diagnosis for dogs with digital melanoma (n=60) was 10 years old (range 5.7-16.1) and there were 60% of males. The most frequent breeds were Labrador, rottweiler, schnauzer and Scottish terrier. The most frequent location was the nail bed (60%), while others included fingers, interdigital space and footpads. Only 5/60 dogs didn't have a complete resection. The majority of these tumors were pigmented (67%), ulcerated (47%) and measured less than 3 cm (72%). Regional adenomegaly was found in 33% of cases and 30% of dogs developed pulmonary metastasis during disease course. Median survival time for these dogs was 11.8 months (CI: 8.7-19 months) and the one-year survival rate was 47% (+/- 6%).

In univariate analysis, tumor size \geq 3cm, enlarged regional lymph nodes at diagnosis, recurrence and development of pulmonary metastases were associated with a worse prognosis

(Table 2). Survival time wasn't statistically different between dogs with subungual melanomas and those arriving on digital cutaneous tissue (fingers, footpad and interdigital space).

In the multivariate model, tumor size ≥ 3 cm, pulmonary metastases during clinical course, and recurrence after surgery were significantly linked to a poor outcome (Table 2). Survival curves stratified according to tumor size are represented in Figure 4. Median survival time for dogs having a tumor ≥ 3 cm was 4.6 months, whereas dogs with tumor < 3 cm had a MST of 18 months.

Canine oral melanomas

Among dogs with oral melanoma (n=247), there were 58% of males and 5 breeds representing 50% of the affected dogs: poodles (13%), golden retriever (9.5%), Labrador (11%), rottweiler (9.5%) and Yorkshire terrier (7%). Mean age at diagnosis was 12.2 (range 5.1-18.2) years old. The most frequent locations in the mouth were gingiva and oral mucosa (labial and cheeks), representing 48% and 38%, respectively (Table 3). Other sites included tongue, soft and hard palate, pharynx and tonsils. Median survival time for these dogs was 6 months (CI: 5-7.3 months) and the one-year survival rate was only 30% (+/- 3%).

In univariate analyses, neutering status, enlarged lymph nodes at diagnosis, lethargy and dysorexia at diagnosis, tumor size, ulceration, location in the mouth, surgical resection and recurrence were found associated with survival time.

Multivariate analysis showed that wideness of surgical resection, ulceration and tumor location in the mouth were significant prognostic factors (Table 4). Tumors of the oral mucosa (cheeks and lips) or other sites (tongue, palate, pharynx and tonsils) had better prognosis than melanoma of the gingiva with MST of 11.8 months (CI: 8.8-15.6 months), 8 months (CI: 4.3-9.8 months) and 4 months (CI: 3-5 months), respectively (Figure 5). The dogs with wide resection (43%) had a MST of 13 months (CI: 8.3-14.7 months) whereas the dogs with incomplete resection (44%) had a MST of 4.5 months (CI: 3.6-5.4 months) (Figure 6). Other dogs that had no surgery (3%) had a poor MST of 2.4 months (CI: 2-3.2 months). At diagnosis, ulceration of the tumor was observed for 55% of the cases and this sign was associated with a shorter MST (4.2 months vs 9 months).

Canine uveal melanocytic tumors

Mean age at diagnosis for ocular melanocytic tumors was 10 years old. The four melanocytic tumors were localized in the anterior uvea and in two cases (one malignant and one benign melanoma) the tumor invaded the sclera. The 3 dogs with benign uveal tumors had a survival time of 680, 1486 and 1748 days after diagnosis and none of them died from tumor-related cause. The dog with malignant uveal melanoma developed another melanoma on the contralateral eye 3 months later, and died 193 days after the first diagnosis. Those findings are in agreement with a study on 244 cases that showed that dogs with malignant uveal melanoma had a shorter survival time than dogs with uveal melanocytoma(32).

Histological classification

Histological classification was done for half of this cohort: 205 dogs with oral, cutaneous, digital and ocular melanocytic tumors totalizing 29 benign and 176 malignant tumors. Tumors were defined as animal-type when cells were heavily pigmented and well

differentiated, nevocytoid when cells were small, round and/or spindle and clustered and epithelioid when cells were large, round to polygonal with a large nuclei (Figure 2). Melanocytomas were mainly animal-type (72%) and this association was statistically significant ($p=3.3E-5$). Some of them were nevocytoid (17%) or mixed types (11%).

On the other side, melanomas were mostly nevocytoid (43%) or epithelioid (43%), while animal-type was much less frequent (7%). Cutaneous melanomas were epithelioid (45%), nevocytoid (36%) or animal-types (13%), and digital melanomas were mostly nevocytoid (59%) or epithelioid (35%) with a few mixed types. The major part of oral melanomas was classified as nevocytoid or epithelioid (44% and 41%) or mixed nevocytoid/epithelioid (8%); a few of them were animal-type (6%) or mixed nevocytoid/epithelioid. The classification of oral melanomas between epithelioid, nevocytoid and composite types was not associated with survival in univariate analysis (Table 5).

Mitotic index was available for 113/126 dogs with oral melanoma. It was first analyzed as a continuous variable and then categorized in three classes according to terciles. The mean mitotic index was 31 and it ranged from 5 to 80. Mitotic index was a significant prognostic factor in univariate analysis, with dogs having less than 23 mitoses over 10 high-power fields (HPF) having a longer survival than those with mitotic index between 23 and 34. However mitotic index superior to 34 was not significantly associated to a worse prognosis compared with the categorical reference (23-34 mitoses over ten HPF). Multivariate analysis on this subgroup showed that mitotic index ≥ 23 over ten HPF and incomplete surgical margins or tumor biopsy as sole treatment were negative prognostic factors (Table 5).

Discussion

This retrospective study reports epidemiological data and clinical outcome of 402 dogs with melanocytic tumors, as well as prognostic factors. Moreover, 205 cases were reviewed and classified by pathologists following the human melanoma classification.

In agreement with the literature(4,5,12), we found that melanocytic tumors of the oral cavity and digits were most of the time malignant (97% and 90% of cases respectively), whereas tumors on the skin were more often benign.

The observed breed distribution for canine melanomas is consistent with the published literature, with Labrador, golden retriever, poodle, rottweiler and Yorkshire terrier being the most represented breeds(4,9,12,33,34). However this distribution was not compared to the general canine population and some of these breeds (Labrador, golden retriever, Yorkshire) are very popular in France.

Considering all melanoma subtypes, one of the most significant prognostic factor was melanoma location and that confirms previous findings. Consistent with the recent study of Laver *et al.*, cutaneous melanomas in our study have often a benign behavior with low recurrence rate after surgery and a low frequency of metastases(17). Laprie *et al.* reported a one-year survival rate of 55% after treatment (16). We observed a particular low rate of death in this subgroup with only 8/27 dogs dying due to the tumor during follow-up. This may be due to a probable selection bias or a misclassification according to histologic malignant features. In fact, the study of Laprie *et al.* suggests that in spite of histological features of malignancy, some cutaneous melanocytic tumors behave a benign manner, and this could be

better predicted thanks to Ki-67 index. We found that digital melanomas (located on the digits, nail bed and footpads) carry a worse prognosis than other cutaneous forms, with 30% of dogs developing pulmonary metastases during clinical course. In our study, median survival time of dogs with digital melanoma was 11.8 months, with 47% of dogs alive at one year after diagnosis, which is in agreement with previous reports showing one year survival rates between 42-58% and two years survival rate of 11-13%(18,35,36). Dogs with oral melanomas had the poorest outcome with a MST of 6 months and one-year survival rate of 30%. This is in agreement with the recent study of Sarowitz *et al.* evaluating outcome of dogs with oral tumors after curative intent surgery, showing a MST of 6,8 months for dogs with oral melanoma(2). Golden retrievers were found to have a worse prognosis than the other breeds when we considered all melanoma subtypes. However, most melanomas of this breed are oral forms and this higher risk was not found in the subgroup analysis according to tumor location.

As canine melanomas carry different biological behavior according to their location, we chose to stratify the dogs into 3 groups: oral, cutaneous and digital melanomas. Thanks to multivariate analyses, we demonstrated that tumor location in the mouth, tumor ulceration and completeness of surgical resection are three pejorative prognostic factors in canine oral melanomas. We also found that tumor size ≥ 3 cm, development of pulmonary metastases and recurrence, are three other complementary pejorative prognostic factors for digital melanomas.

The location in the mouth was a significant prognostic factor, and dogs with melanoma of the gingiva had the highest risk of death compared to other sites (cheeks, lips or tongue, palate, pharynx and tonsils). This feature had not been previously shown, but caudal locations was already indicated to carry a poor prognosis(21,37), probably because of their more advanced stage at diagnosis and the difficulty to excise the whole tumor.

We found that tumor ulceration at diagnosis was a significant negative prognostic factor in canine oral melanoma. It is well-known as a sign of tumor aggressiveness, however, some studies found opposite results (Hahn *et al.* (1994) ; Laprie *et al.* (2001) (15,38).

We also showed the importance of completeness of surgery in the management of canine oral melanoma, since it was strongly associated with survival time in multivariate analysis. Indeed, dogs with incomplete surgical resection were twice as likely to die compared to dogs with wide resection, and dogs with no surgery were 3 times as likely to die. This is consistent with the fact that curative-intent surgery (surgery with wide margins and/or bone resection) conferred an extended progression free interval (PFI) and survival time (38,39). However, this variable was not confronted with histological analysis of margins, indeed margin completeness is a controversial prognostic factor shown to be significant (41) or not (38,40).

Tumor size was found to be a significant prognostic factor in multivariate analysis for dogs with digital melanoma. Indeed, dogs with tumor ≥ 3 cm were almost seven times as likely to die compared with those with smaller tumors. In published studies, whether or not tumor size is a prognostic factor is still questionable, and a statistically validated threshold should be determined(42).

Tumor macroscopic pigmentation and adenomegaly at diagnosis were not significant in our multivariate models. In the literature, it is emphasized that well-differentiated

neoplasms would be highly pigmented with accordingly a better prognosis. Two studies demonstrated that highly pigmented oral melanoma (43) and achromatic tumors(44) were linked to a better and a poor outcome. It has been shown that lymph nodes size alone is not clinically relevant to attest lymph nodes metastasis, and that cytological and histological examination is needed(45). In our study, lymph nodes state was just clinically attested and their predictive value doesn't exceed 70%(45). This may explain why this variable is not significant in the multivariate models.

Concerning histological features, we showed that animal-type which is well-differentiated and highly pigmented, was most frequently found in benign tumors: 62% of animal-type tumours were melanocytomas with an excellent prognosis. In contrast, nevocytoid and epithelioid features were mostly found in malignant melanomas. However, in canine oral melanomas, we found no difference in terms of survival time between nevocytoid, epithelioid and mixed types tumors. Animal-type oral melanomas were not considered in this survival analysis because they represented a small sample size of the oral melanoma subgroup (as the major part of them was benign). We anticipate that these morphological features, associated with genetic markers that could be handled as immuno-histological or FISH labeling, could be concordant and prognostic, to better anticipate the outcome and treatments associated. We found that the mitotic index was a strong prognostic factor in multivariate analysis for canine oral melanoma: dogs having mitotic index ≥ 23 over ten HPF had a higher risk of death. Previous studies showed that the most discriminant threshold for oral and lip melanocytic tumors was ≥ 4 over ten HPF(43). However, here, for all malignant melanoma, MI, when available, was systematically ≥ 4 .

As already reported, we observed 8 well-differentiated melanocytic tumors of the oral cavity, and most of them were localized on the mucosal side of the lip and classified as benign. None of these dogs died because of the tumor, similarly to dogs diagnosed with melanocytomas. It underlines that melanocytic tumors, even from the oral cavity, might be of good prognosis. Such oral benign tumors have been described in the literature, they don't need any adjuvant treatment after surgical excision(5,39,46).

Due to its retrospective aspect, our study presents limitations: the "tumor-related death" endpoint might be biased since the cause of death was reported by the referring veterinarians and it is unlikely that they did complementary examinations or necropsy at the time of death. Hence, censoring was based on best available data, lacking full necropsy, the cases could have been incorrectly censored. Moreover, we lack information concerning staging at diagnosis according to the WHO classification scheme. This has been shown to be prognostic and it could have been more accurate to adjust models on this factor. Other known histological prognostic factors should have been taken into account like nuclear atypia, degree of pigmentation, level of infiltration and Ki-67 index (47). Last point is the heterogeneity of treatments for dogs with melanocytic tumors: most of them underwent surgical resection (90%) but few received different adjuvant therapies (12 dogs) and this was not taken into account during the analysis. However this situation gives the state of the art of what is done in general veterinary practice in France.

Conclusion

In conclusion, based on epidemiological data of a cohort of 402 canine melanocytic tumors, we were able to confirm that tumor location is a very important prognostic factor, with oral forms having the worse prognosis, then the digital forms. We showed that location on the gingiva, tumor ulceration and incomplete surgical resection were negative prognostic factors for canine oral melanoma, in agreement with other reports. However, veterinary practice still lacks a better histological classification, which might be prognostic. In this study, based on 205 melanocytic tumors, we observed that animal-type morphological subtypes are more often benign and nevocytoid and epithelioid subtypes are more often malignant. However, among canine oral melanomas, we didn't find a significative association between survival time and nevocytoid and epithelioid subtypes classification was not found to be significant. More prognostic factors are thus needed to improve prognosis and classification of canine melanoma to better adapt treatments. In this aim, part of the cohort described here was used to identify genetic somatic alterations, and to show that they were significantly associated with survival(44).

Materials and methods

Case selection

Case recruitment was performed with the collaboration of 3 French pathologists laboratories (IDEXX, LAPVSO and LHA) to include dogs that had histological diagnosis of melanocytic tumor. Tumors were classified as malignant or benign according to defined histological features (6,15,47,48). Malignant features included nuclear atypia, multiple nucleoli, anisocytosis, low degree or no pigmentation and mitotic index ≥ 3 for cutaneous tumor, and ≥ 4 for oral tumors (which is the number of mitoses over 10 high-power fields, x 400). A total of 402 cutaneous, oral, digital and ocular melanoma and melanocytoma cases diagnosed by histopathology between June 2008 and January 2015 were initially selected.

Medical records review and follow-up data

Epidemiological data were gathered from referring veterinarians thanks to a questionnaire. Around 78% of the questionnaires were sent back. Information requested in the questionnaire included age at diagnosis, sex, neutering status, breed, tumor macroscopic ulceration and pigmentation, tumor size and location, enlarged lymph nodes at diagnosis, dysorexia at diagnosis, lethargy at diagnosis and tumor treatment. For dogs alive at time of inclusion, clinical follow-up was done every 6 months thanks to the collaboration of referring veterinarians, until 2016/04/01 (ending of the study) to collect data concerning development of metastasis during clinical course, tumor recurrence, date and cause of death.

To perform analyses, the population was divided in subgroups. Dogs with malignant melanoma were considered first, and this population was then stratified according to tumor location (oral, digital and cutaneous) because it is known that the behavior differs greatly (3,13,47) (Figure 1).

Cutaneous tumors were defined as tumors arising in the haired skin of the abdomen, trunk, head, limbs, but also on eyelids and peri-anal region. Oral tumors were those arising on the gingiva, oral mucosa (cheeks and lips), tongue, palate (hard and soft), pharynx and tonsils. Digital melanomas were those occurring on the digits, footpads, interdigital space and claw bed (subungual). Ocular melanocytic tumors were defined as tumors of the eyeball and were all uveal. Surgical resection was classified as wide when the referring veterinarian removed all the tumor with wide margins and as conservative when the totality couldn't be removed. The development of metastasis was assessed by referring veterinarians through imaging (X-ray or CT scan) when clinically suspected.

The histological classification proposed in this study was performed by two anatomopathologists in human and veterinary medicine (Dr Vergier, CHU Bordeaux, and Dr Abadie, ECVP, ONIRIS, Nantes, respectively). They classified 205 canine melanocytic tumors into different subtypes described in the human melanoma classification: epithelioid (cells are large, round to polygonal with a large nuclei), nevocytoid (cells are small, round and/or spindle and clustered), animal-type (cells are heavily pigmented and well differentiated) or mixed types (Figure 2). Samples were classified as mixed type when they were less than 70% of one defined subtype. The mitotic index was defined as the number of mitoses over 10 consecutive fields (over 10 HPF) x 400, starting in the area of highest mitotic activity. However, in many cases the mitotic index could not be determined because of the pigmentation that hides nuclear details.

The details about cases selection and subgroups used for the statistical analysis are presented in Figure 1.

Statistical analysis

To describe this study population, mean and median of continuous variables were calculated and categorical variables were described with frequencies and percentages.

Kaplan Meier analysis and log-rank test were respectively used to estimate the median survival times and their 95% confidence intervals (CI), and statistical significance for the whole cohort and for the three location subgroups: oral, cutaneous and digital melanomas. Survival time was calculated as the time from diagnosis to death attributed to the tumor. Death was presumed tumor related when dogs died or were euthanized because of tumor progression, recurrence or metastases. Dogs dead from unrelated causes, dogs alive at the end of the survey period (2016/04/01) and dogs lost to follow-up, were censored.

To assess the strength of association between different factors and survival, we used Hazards Ratios (HR) and their 95% confidence intervals from univariate analyses with Cox proportional hazards models. Variables evaluated were age at diagnosis, sex, neutering status, breed, tumor malignancy, ulceration, tumor size (≥ 3 cm) and location (cutaneous, oral, digital, ocular), enlarged lymph nodes at diagnosis, dysorexia at diagnosis, lethargy at diagnosis, development of metastasis during clinical course, surgery (complete resection, incomplete resection, biopsy), recurrence, and histologic features when available (classification and mitotic index). Age was categorized in two or three classes using median for cutaneous and digital groups or terciles for the oral group. According to breed frequencies, breed was categorized in 6 classes: poodles, Labrador, golden retriever, rottweiler, Yorkshire terrier and others.

To perform the statistical analyses, different subgroups were considered (Figure 1). As no dog with melanocytoma died due to the tumor, we first considered the group of dogs with malignant melanomas (n=335) to perform univariate analyses. Then we divided this group into three subgroups according to tumor location: cutaneous, digital and oral. Only the oral and digital melanoma groups had enough events to perform a multivariate analysis using Cox regression. For the cutaneous melanomas group, univariate analyses were also performed. Inside the oral melanoma group, we defined a subgroup (n=136) with available histological data (human-based classification and mitotic index). A multivariate analysis was thus performed on this subgroup adding the 2 variables histological classification and mitotic index (categorized according terciles). The « animal » and « mixed nevocytoid/animal » categories were excluded because of their small sample size. Multivariate Cox analyses were performed using stepwise regression. Proportional hazard hypothesis was checked graphically for all variables and inflation variance factors were calculated to assess the absence of multicollinearity between variables. All statistical analyses were performed using SAS version 9.4 SAS Institute Inc, using “proc lifetest” and “proc phreg”. Findings were considered statistically significant if two-sided P values were <0.05.

Acknowledgment

We thank the Cani-DNA BRC (<http://dog-genetics.genouest.org>), which is part of the CRB-Anim infra-structure, ANR-11-INBS-0003 and all referring veterinarians who contributed epidemiologic and medical clinical information as well as French pathology Laboratories. The authors thank M.D. Galibert (IGDR Rennes, France), F. Demenais (Université de Paris, UMR-1124 INSERM, Paris, France), E. Maubec (Université de Paris, UMR-1124 INSERM and AP-HP, Paris, France), P. Devauchelle (MICEN-Vet, Creteil, France) for their continuous encouragements and interest into dog - human comparative oncology for melanoma and A. Fautrel (Platform H2P2 Biosit Rennes, France) for histopathology technical support and advice. Authors warmly thank Susan Cure (Paris, France) for careful reading and correcting of the manuscript.

Availability of data and materials: The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Competing interests : The authors declare that they have no competing interests

Funding:

The work was funded by the INCA PLBio Melanoma project (2012-2015), the AVIESAN INSERM AAP « spontaneous tumours » 2012-08-Mélanomes (2012-2015), the Canceropole Grand Ouest mission n°8, comparative oncology (2015-2016), and the Ligue Régionale contre le cancer (2016-2017). The PhD of Anais Prouteau was supported by the Rennes hospital federation FHU CAMIn (2017- 2020).

Author's contribution: APro did all the statistical analysis and was a major contributor in writing the manuscript. CDB did the recruitment part and gathered the epidemiological and survival data and first statistical analyses. EC and APri contributed for the sampling, databases and organization of the retrospective study as well as the analysis of the epidemiological and histological data. NB and LL are part of the Cani-DNA BRC that manage canine samples. BV and JA (histopathologists) reviewed the melanoma cases with a human based comparison approach. FD, ML, JA, PD, DL and PDFT provided histologically confirmed melanoma cases and contributed to the clinical and epidemiological data and study. OD reviewed the statistical data, methods and analyses. BH and CA supervised this work and contributed in writing and editing the manuscript.

References

1. Modiano JF, Ritt MG, Wojcieszyn J. The molecular basis of canine melanoma: pathogenesis and trends in diagnosis and therapy. *J Vet Intern Med.* 1999 Jun;13(3):163–74.
2. Sarowitz BN, Davis GJ, Kim S. Outcome and prognostic factors following curative-intent surgery for oral tumours in dogs: 234 cases (2004 to 2014). *J Small Anim Pract.* 2017 Mar 1;58(3):146–53.
3. Bergman PJ. Canine Oral Melanoma. *Clin Tech Small Anim Pract.* 2007 May;22(2):55–60.
4. Nishiya AT, Massoco CO, Felizzola CR, Perlmann E, Batschinski K, Tedardi MV, et al. Comparative Aspects of Canine Melanoma. *Vet Sci.* 2016 Feb 19;3(1).
5. Prouteau A, André C. Canine Melanomas as Models for Human Melanomas: Clinical, Histological, and Genetic Comparison. *Genes.* 2019 30;10(7).
6. Withrow M's. Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology - 5th Edition [Internet]. 2012 [cited 2017 Feb 15]. Available from: <https://www.elsevier.com/books/withrow-and-macewens-small-animal-clinical-oncology/vail/978-1-4377-2362-5>
7. 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 Jan;27(1):90–102.
8. van der Weyden L, Patton EE, Wood GA, Foote AK, Brenn T, Arends MJ, et al. Cross-species models of human melanoma. *J Pathol.* 2016 Jan;238(2):152–65.
9. Ramos-Vara JA, Beissenherz ME, Miller MA, Johnson GC, Pace LW, Fard A, et al. Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. *Vet Pathol.* 2000 Nov;37(6):597–608.
10. Bergman PJ. Canine oral melanoma. *Clin Tech Small Anim Pract.* 2007 May;22(2):55–60.

11. Dobson JM. Breed-predispositions to cancer in pedigree dogs. *ISRN Vet Sci.* 2013;2013:941275.
12. 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 Jan;27(1):90–102.
13. Spangler WL, Kass PH. The histologic and epidemiologic bases for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia. *Vet Pathol.* 2006 Mar;43(2):136–49.
14. Tuohy JL, Selmic LE, Worley DR, Ehrhart NP, Withrow SJ. Outcome following curative-intent surgery for oral melanoma in dogs: 70 cases (1998-2011). *J Am Vet Med Assoc.* 2014 Dec 1;245(11):1266–73.
15. Laprie C, Abadie J, Amardeilh M-F, Net J-L l. e., Lagadic M, Delverdier M. MIB-1 immunoreactivity correlates with biologic behaviour in canine cutaneous melanoma. *Vet Dermatol.* 2001 Jun 1;12(3):139–47.
16. Bostock. Prognosis after surgical excision of canine melanomas. *Vet Pathol.* 1979 Jan;16(1):32–40.
17. Laver T, Feldhaeusser BR, Robat CS, Baez JL, Cronin KL, Buracco P, et al. Post-surgical outcome and prognostic factors in canine malignant melanomas of the haired skin: 87 cases (2003-2015). *Can Vet J Rev Veterinaire Can.* 2018 Sep;59(9):981–7.
18. Wobeser BK, Kidney BA, Powers BE, Withrow SJ, Mayer MN, Spinato MT, et al. Diagnoses and clinical outcomes associated with surgically amputated canine digits submitted to multiple veterinary diagnostic laboratories. *Vet Pathol.* 2007 May;44(3):355–61.
19. Henry CJ, Jr WGB, Whitley EM, Tyler JW, Ogilvie GK, Norris Ai, et al. Canine Digital Tumors: A Veterinary Cooperative Oncology Group Retrospective Study of 64 Dogs. *J Vet Intern Med.* 2005 Sep 1;19(5):720–4.
20. Freeman KP, Hahn KA, Harris FD, King GK. Treatment of dogs with oral melanoma by hypofractionated radiation therapy and platinum-based chemotherapy (1987-1997). *J Vet Intern Med.* 2003 Feb;17(1):96–101.
21. Proulx DR, Ruslander DM, Dodge RK, Hauck ML, Williams LE, Horn B, et al. A Retrospective Analysis of 140 Dogs with Oral Melanoma Treated with External Beam Radiation. *Vet Radiol Ultrasound.* 2003 May 1;44(3):352–9.
22. Brockley LK, Cooper MA, Bennett PF. Malignant melanoma in 63 dogs (2001-2011): the effect of carboplatin chemotherapy on survival. *N Z Vet J.* 2013 Jan;61(1):25–31.
23. Murphy S, Hayes AM, Blackwood L, Maglennon G, Pattinson H, Sparkes AH. Oral malignant melanoma - the effect of coarse fractionation radiotherapy alone or with adjuvant carboplatin therapy. *Vet Comp Oncol.* 2005 Dec;3(4):222–9.
24. Cancedda S, Rohrer Bley C, Aresu L, Dacasto M, Leone VF, Pizzoni S, et al. Efficacy and side effects of radiation therapy in comparison with radiation therapy and

- temozolomide in the treatment of measurable canine malignant melanoma. *Vet Comp Oncol.* 2016 Dec;14(4):e146–57.
25. Dank G, Rassnick KM, Sokolovsky Y, Garrett LD, Post GS, Kitchell BE, et al. Use of adjuvant carboplatin for treatment of dogs with oral malignant melanoma following surgical excision. *Vet Comp Oncol.* 2014 Mar;12(1):78–84.
 26. Rassnick KM, Ruslander DM, Cotter SM, Al-Sarraf R, Bruyette DS, Gamblin RM, et al. Use of carboplatin for treatment of dogs with malignant melanoma: 27 cases (1989-2000). *J Am Vet Med Assoc.* 2001 May 1;218(9):1444–8.
 27. Atherton MJ, Morris JS, McDermott MR, Lichty BD. Cancer immunology and canine malignant melanoma: A comparative review. *Vet Immunol Immunopathol.* 2016 Jan;169:15–26.
 28. Barutello G, Rolih V, Arigoni M, Tarone L, Conti L, Quaglino E, et al. Strengths and Weaknesses of Pre-Clinical Models for Human Melanoma Treatment: Dawn of Dogs' Revolution for Immunotherapy. *Int J Mol Sci.* 2018 Mar 10;19(3).
 29. Almela RM, Ansón A. A Review of Immunotherapeutic Strategies in Canine Malignant Melanoma. *Vet Sci.* 2019 Feb 12;6(1).
 30. Manley CA, Leibman NF, Wolchok JD, Rivière IC, Bartido S, Craft DM, et al. Xenogeneic murine tyrosinase DNA vaccine for malignant melanoma of the digit of dogs. *J Vet Intern Med.* 2011 Feb;25(1):94–9.
 31. Spangler WL, Kass PH. The histologic and epidemiologic bases for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia. *Vet Pathol.* 2006 Mar;43(2):136–49.
 32. Giuliano EA, Chappell R, Fischer B, Dubielzig RR. A matched observational study of canine survival with primary intraocular melanocytic neoplasia. *Vet Ophthalmol.* 1999;2(3):185–90.
 33. Hernandez B, Adissu HA, Wei B-R, Michael HT, Merlino G, Simpson RM. Naturally Occurring Canine Melanoma as a Predictive Comparative Oncology Model for Human Mucosal and Other Triple Wild-Type Melanomas. *Int J Mol Sci.* 2018 Jan 30;19(2).
 34. Withrow SJ, Vail DM, Page RL, editors. *Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology.* 5th edition. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2013. 750 p.
 35. Henry CJ, Brewer WG, Whitley EM, Tyler JW, Ogilvie GK, Norris A, et al. Canine digital tumors: a veterinary cooperative oncology group retrospective study of 64 dogs. *J Vet Intern Med.* 2005 Oct;19(5):720–4.
 36. Marino DJ, Matthiesen DT, Stefanacci JD, Moroff SD. Evaluation of dogs with digit masses: 117 cases (1981-1991). *J Am Vet Med Assoc.* 1995 Sep 15;207(6):726–8.
 37. Schwarz PD (Colorado SU, Withrow SJ, Curtis CR, Powers BE, Straw RC. Mandibular resection as a treatment for oral cancer in 81 dogs. *J Am Anim Hosp Assoc USA* [Internet]. 1991 [cited 2019 Sep 5]; Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9322901>

38. Hahn KA, DeNicola DB, Richardson RC, Hahn EA. Canine oral malignant melanoma: Prognostic utility of an alternative staging system. *J Small Anim Pract.* 1994;35(5):251–6.
39. Tuohy JL, Selmic LE, Worley DR, Ehrhart NP, Withrow SJ. Outcome following curative-intent surgery for oral melanoma in dogs: 70 cases (1998-2011). *J Am Vet Med Assoc.* 2014 Dec 1;245(11):1266–73.
40. Schultheiss PC. Histologic features and clinical outcomes of melanomas of lip, haired skin, and nail bed locations of dogs. *J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc.* 2006 Jul;18(4):422–5.
41. Sarowitz BN, Davis GJ, Kim S. Outcome and prognostic factors following curative-intent surgery for oral tumours in dogs: 234 cases (2004 to 2014). *J Small Anim Pract.* 2017 Mar;58(3):146–53.
42. Smedley RC, Spangler WL, Esplin DG, Kitchell BE, Bergman PJ, Ho H-Y, et al. Prognostic markers for canine melanocytic neoplasms: a comparative review of the literature and goals for future investigation. *Vet Pathol.* 2011 Jan;48(1):54–72.
43. Bergin IL, Smedley RC, Esplin DG, Spangler WL, Kiupel M. Prognostic evaluation of Ki67 threshold value in canine oral melanoma. *Vet Pathol.* 2011 Jan;48(1):41–53.
44. Prouteau A, Chocteau F, De Brito C, Cadieu E, Primot A, Botherel N, et al. Prognostic value of somatic focal amplifications on chromosome 30 in canine oral melanoma. *Vet Comp Oncol.* 2019 Aug 28;
45. Williams LE, Packer RA. Association between lymph node size and metastasis in dogs with oral malignant melanoma: 100 cases (1987–2001). *J Am Vet Med Assoc.* 2003 May 1;222(9):1234–6.
46. Esplin DG. Survival of Dogs Following Surgical Excision of Histologically Well-differentiated Melanocytic Neoplasms of the Mucous Membranes of the Lips and Oral Cavity. *Vet Pathol.* 2008 Nov 1;45(6):889–96.
47. Smedley RC, Spangler WL, Esplin DG, Kitchell BE, Bergman PJ, Ho H-Y, et al. Prognostic Markers for Canine Melanocytic Neoplasms: A Comparative Review of the Literature and Goals for Future Investigation. *Vet Pathol.* 2011 Jan 1;48(1):54–72.
48. Donal J. Meuten. *Tumors in domestic animals*, 5th edition. Wiley-Blackwell. 2016.

Figure 1: Flow chart summarizing the subgroups of dogs used for the statistical analysis.

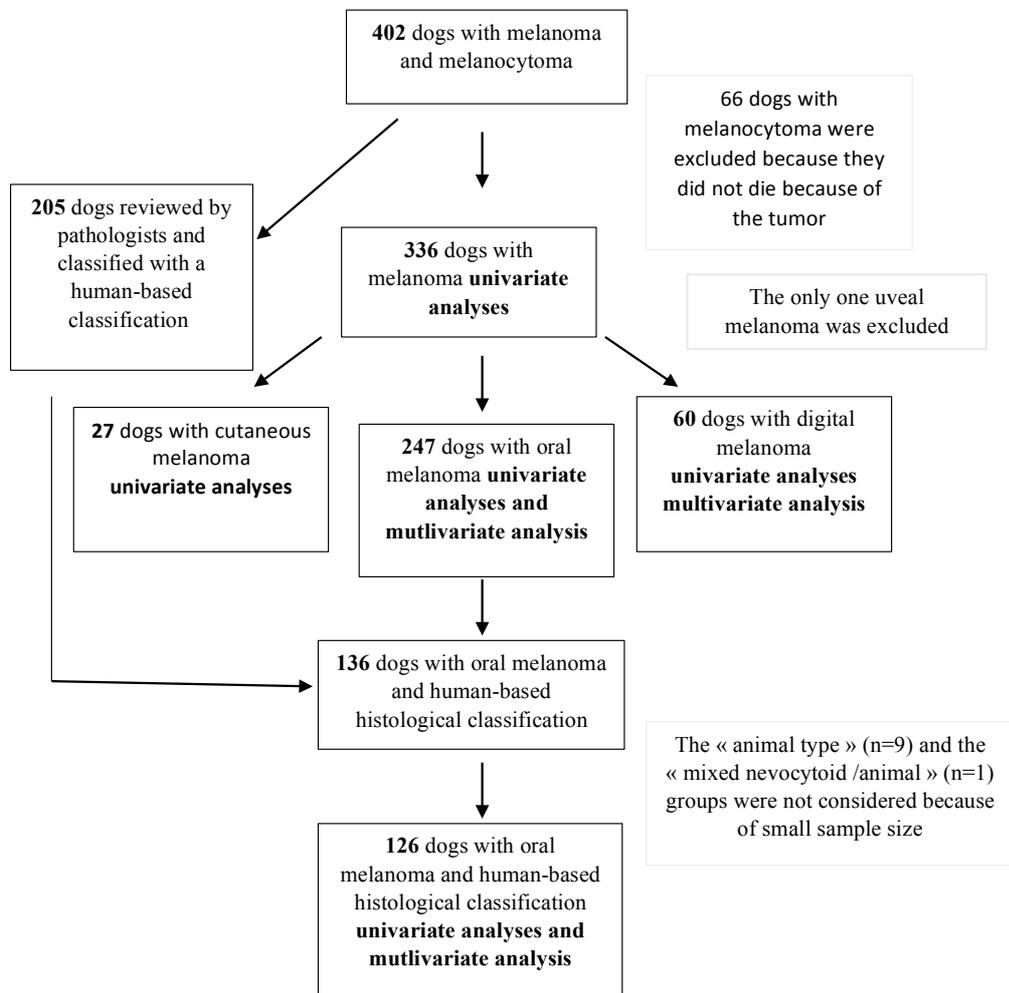


Figure 2: Histopathologic features of canine melanomas (hematoxylin-eosin-saffron staining). **A:** Canine oral melanoma classified as epithelioid melanoma (x400). Cells are large, round to polygonal with a large nuclei. **B:** Animal-type melanocytic tumors (x400). Cells are heavily pigmented and well differentiated. **C:** Oral melanoma classified as nevocytoid (x400). Cells are small, round and/or spindle and clustered. **D:** Proliferation of neoplastic cells in the dermo-epidermal junction in an oral melanoma classified as epithelioid (junctional activity) (x100).

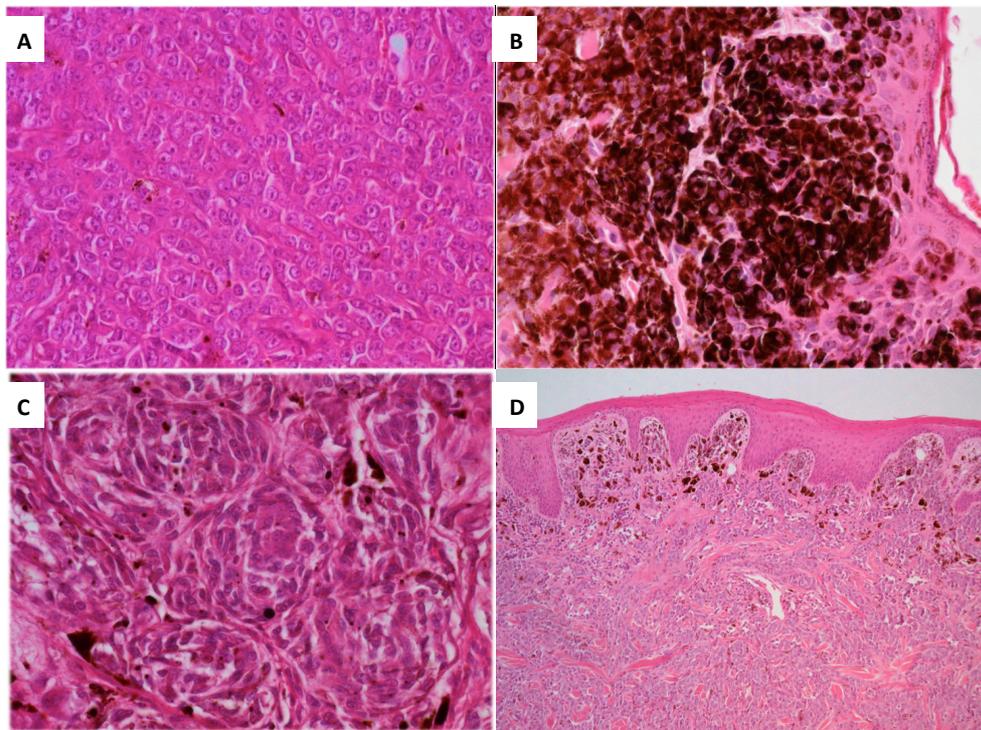


Figure 3: Kaplan Meier survival curve of 335 dogs with oral (green line), digital (blue line) and cutaneous (red line) melanoma. ($p < .0001$, log-rank test). Oral melanomas carry the worse prognosis with a MST (Median Survival Time) of 6 months, whereas survival times were highest in cutaneous forms (MST not reached). Digital forms display an intermediate prognosis with a MST of 11.8 months.

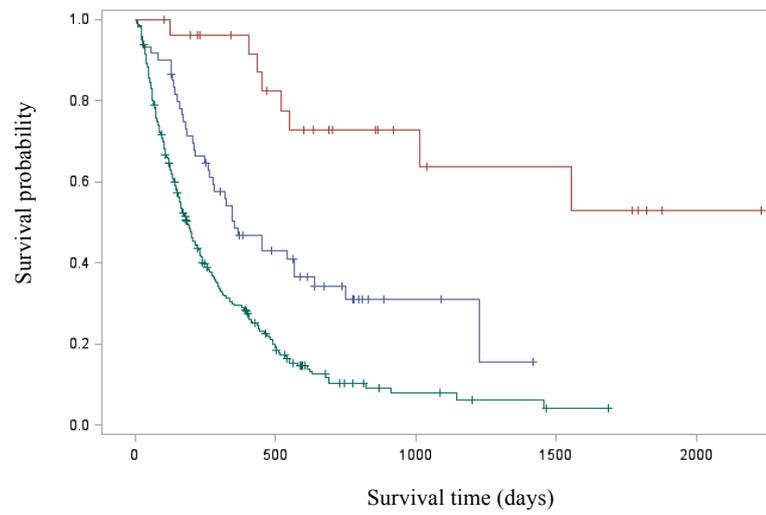


Table 1: Baseline characteristics of study population (n=335 dogs with melanoma) and univariate survival analyses using Cox model. Tumor location, age at diagnosis, breed, neutering status, clinical signs at diagnosis (enlarged lymph nodes, anorexia, and lethargy at diagnosis), tumor size, pigmentation and ulceration, surgical resection wideness, recurrence and appearance of pulmonary metastases are associated with survival time. Median survival times and their 95% confidence intervals (CI) were determined thanks to Kaplan Meier analyses and log-rank test.

Variables		Sample size (number of death)	%	Median survival time in months (95 % confidence interval)	Hazard ratio, IC 95%	p-value
Location	Cutaneous	27 (8)	8%	> 18 months, not reached	1.00	<.0001
	Digital	60 (39)	18%	11.8 (8.7-19)	3.58 (1.65-7.76)	
	Oral	247 (206)	74%	6 (5-7.3)	7.12 (3.46-14.65)	
	Eye	1	0.3%	-		
Age at diagnosis (years)	≤ 10.5	111 (72)	33%	13 (8.2-16)	1.00	<.0001
	10.6-12.6	111 (85)	33%	8.3 (6-11.8)	1.45 (1.05-1.99)	
	≥ 12.7	113 (93)	34%	5.3 (4.3-6.3)	2.26 (1.65-3.09)	
Sex	Female	141 (102)	42%	9.9 (6.8-12)	1.00	0.31
	Male	194 (151)	58%	7.1 (5.8-8.7)	1.14 (0.88-1.46)	
Breed	Others	167 (122)	50%	9 (6.8-13)	1.00	0.036
	Poodle	44 (35)	13%	6.3 (4.5-11)	1.39 (0.95-2.02)	
	Labrador	37 (28)	11%	7 (4.3-11.5)	1.15 (0.76-1.73)	
	Rottweiler	32 (24)	9.5%	8 (5.3-15)	1.06 (0.68-1.65)	
	Golden retriever	32 (29)	9.5%	5.6 (4.1-8)	1.94 (1.28-2.92)	
	Yorkshire	23 (15)	7%	14.7 (2.8-23)	0.94 (0.55-1.61)	
Neutering status	No	208 (165)	62%	6.5 (5.3-7.8)	1.00	0.02
	Yes	127 (88)	38%	10.6 (8.3-14)	0.73 (0.57-0.95)	
Enlarged lymph nodes at diagnosis	No	231 (161)	69%	10.6 (8.7-13.5)	1.00	<.0001
	Yes	79 (72)	24%	3.6 (2.4-5)	2.38 (1.8-3.16)	
	Unknown	25	7%			
Dysorexia at diagnosis	No	260 (187)	77%	9.4 (7.7-11.8)	1.00	<.0001
	Yes	61 (53)	19%	3.2 (2-5.3)	2.15 (1.58-2.92)	

	Unknown	14	4%			
Lethargy at diagnosis	No	283 (210)	84.5%	8.8 (7.3-10.8)	1.00	0.0004
	Yes	37 (29)	11%	2.3 (1-5.3)	2.04 (1.38-3.01)	
	Unknown	15	4.5%			
Tumor size	< 3cm	157 (97)	47%	14.4 (10.8-16.4)	1.00	<.0001
	≥ 3cm	141 (127)	42%	4.5 (4-5.3)	2.81 (2.15-3.69)	
	Unknown	37	11%			
Ulceration	No	109 (74)	33%	5.3 (4.4-6.6)	1.00	<.0001
	Yes	148 (121)	44%	13.5 (9-16.6)	1.92 (1.43-2.58)	
	Unknown	78	23%			
Pigmentation	Pigmented	212 (149)	63.5%	9.4 (7.6-11.5)	1.00	0.0008
	Amelanic	122 (104)	36.5%	5.6 (4.5-8.7)	1.54 (1.19-1.98)	
	Unknown	1				
Surgical resection	Complete	152 (94)	45%	14.4 (11.4-18)	1.00	<.0001
	Incomplete	93 (84)	28%	4.5 (3.7-5.5)	2.93 (2.17-3.96)	
	Biopsy	29 (27)	9%	2.3 (2-3.2)	6.25 (3.97-9.83)	
	Unknown	61	18%			
Pulmonary metastases	No	260 (184)	77.5%	6.9 (4.8-8.8)	1.00	0.0015
	Yes	53 (52)	16%	8.7 (6.8-11.5)	1.65 (1.21-2.26)	
	Unknown	22	6.5%			
Recurrence	No	173 (103)	52%	11.8 (8.8-16)	1.00	<.0001
	Yes	148 (140)	44%	5.9 (4.8-7.3)	2.17 (1.68-2.81)	
	Unknown	14	4%			

Figure 4: Kaplan Meier survival curve of dogs with digital melanoma with tumor <3cm (blue line, MST, 18 months) and tumor \geq 3cm (red line, MST, 4.6 months). P-value was significant (0.0002, log-rank test). MST: median survival time

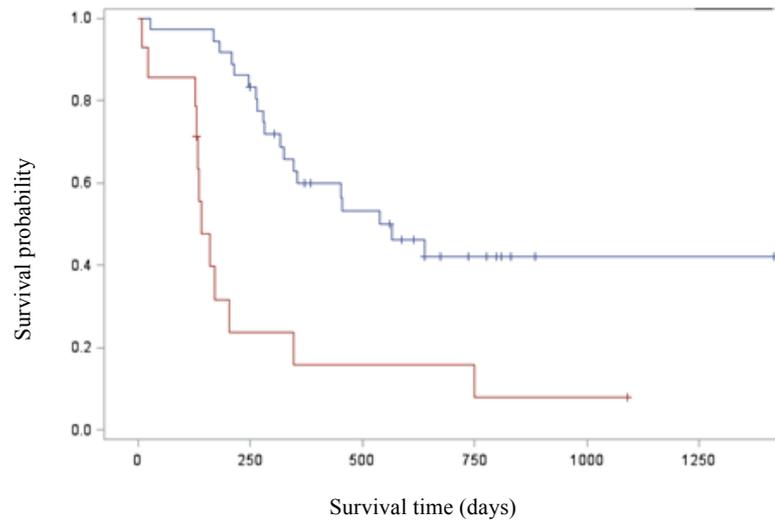


Table 2: Risk of death in relation to age, sex, enlarged lymph nodes at diagnosis, tumor size, tumor recurrence and development of pulmonary metastases in dogs with digital melanoma (n=60). The Cox model was used. Only significant variables are presented in this table. In the multivariate analysis, tumor size, recurrence and appearance of pulmonary metastases were significantly associated with survival time.

Variables	Univariate analysis Hazard ratio (IC 95%)	P-value	Multivariate analysis Hazard ratio (IC 95%)	P-value
Age	1.00	0.72		
≤ 10.1				
> 10.1	1.12 (0.59-2.11)			
Sex	1.00	0.82		
Female				
Male	1.08 (0.57-2.05)			
Enlarged lymph node	1.00	0.025		
No				
Yes	2.10 (1.09-4.04)			
Tumor size	1.00	0.0002	1.00	<.0001
< 3cm				
≥ 3cm	3.99 (1.90-8.38)		6.94 (2.92-16.49)	
Recurrence	1.00	0.04	1.00	0.01
No				
Yes	2.05 (1.03-4.07)		2.96 (1.29-6.81)	
Pulmonary metastases	1.00	0.0036	1.00	0.0013
No				
Yes	2.69 (1.38-5.25)		3.66 (1.67-8.08)	

Table 3: Distribution of the locations of oral melanomas in 247 dogs. The most frequent locations were gingiva and mucosal of the lips.

Location in the mouth	Percentages (frequency)
Gingiva	48% (111)
Mucosa of the lips	29% (66)
Mucosa of the cheeks	9% (21)
Gingiva and palate / or labial mucosa	4% (10)
Tongue	3% (8)
Tonsils	1% (3)
Palate	3% (8)
Pharynx	3% (7)

Table 4: Risk of death in relation to age, sex, neutering status, clinical signs at diagnosis, tumor size, ulceration, type of surgery, location and recurrence in dogs with oral melanoma (n=247). The Cox model was used to get Hazard ratios and their 95% CI. Only significant variables are presented here, and multivariate model was adjusted on age and sex. Tumor ulceration, location in the mouth and surgical resection were significantly associated with survival time.

Variables	Univariate analyses Hazard ratio (IC 95%)	P-value	Multivariate analysis Hazard ratio (IC 95%)	P-value
Age at diagnosis (years)	1.00	0.16	1.00	0.99
≤ 11.1				
11.2-13	1.24 (0.89-1.74)		1.03 (0.65-1.63)	
> 13	1.39 (0.98-1.95)		0.99 (0.62-1.59)	
Sex	1.00	0.93	1.00	0.15
Female				
Male	1.01 (0.76-1.34)		0.76 (0.52-1.11)	
Neutering status	1.00	0.01		
No				
Yes	0.68 (0.51-0.92)			
Enlarged lymph nodes	1.00	<.0001		
No				
Yes	2.25 (1.64-3.09)			
Dysorexia at diagnosis	1.00	0.0003		
Non				
Oui	1.81 (1.31-2.50)			
Lethargy at diagnosis	1.00	0.01		
No				
Yes	1.68 (1.12-2.53)			
Tumor size	1.00	<.0001		
< 3cm				
≥ 3cm	1.98 (1.47-2.67)			
Ulceration	1.00	<.0001	1.00	<.0001
No				
Yes	2.32 (1.67-3.22)		3.16 (2.05-4.87)	
Surgical resection	1.00	<.0001	1.00	0.0006
Complete resection				
Incomplete resection	2.46 (1.74-3.47)		1.96 (1.25-3.08)	
Biopsy	4.88 (2.98-7.98)		2.99 (1.64-5.49)	
Location	1.00	<.0001	1.00	0.0001
Gingiva				
Mucosa (cheeks, lips)	0.40 (0.29-0.56)		0.40 (0.25-0.65)	
Other (tongue, palate, pharynx, tonsils)	0.65 (0.40-1.04)		0.37 (0.19-0.71)	
Recurrence	1.00	0.001		
No				
Yes	1.62 (1.20-2.16)			

Figure 5: Kaplan Meier survival curve of dogs with oral melanoma (n=247) according to location in the mouth: gingiva (blue line), lip or cheeks mucosa (red line) and other sites (green line) including tongue, pharynx, tonsils, and palate.
MST: median survival time

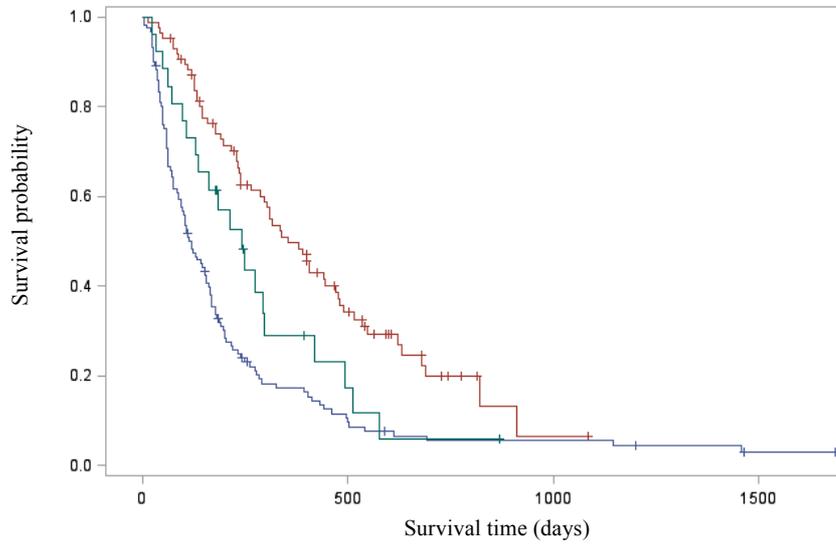


Figure 6: Kaplan Meier survival curve of dogs with oral melanoma who received complete surgical resection (red line), incomplete surgical resection (blue line) or just a biopsy (green line).
MST: median survival time

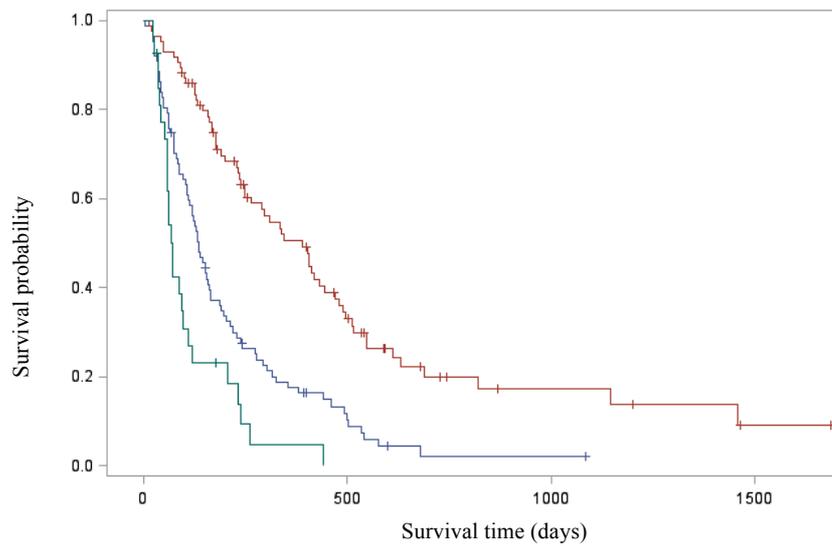


Table 5: Risk of death in relation to tumor location, ulceration, surgical resection and histological data. Cox models were performed in the sub-group of dogs with oral melanoma and histological data (n=126). «Animal-types » and « mixed nevocytoid/animal » were not considered. Surgical resection and mitotic index were significantly associated with survival time in the multivariate analysis.

Variables	Univariate analyses	P-value	Multivariate analysis	P-value
Age at diagnosis	1.00	0.16		
≤11.2				
11.3-12.9	0.73 (0.46-1.17)			
>12.9	1.13 (0.71-1.80)			
Sex	1.00	0.28		
Female				
Male	0.81 (0.55-1.19)			
Histological classification		0.96		
Nevocytoid	0.95 (0.64-1.41)			
Composite	0.93 (0.45-1.89)			
Nevocytoid/Epithelioid				
Epithelioid	1.00			
Mitotic index		0.012		0.035
≤ 22	0.47 (0.28-0.78)		0.43 (0.22-0.82)	
23-34	1.00		1.00	
≥ 35	0.75 (0.46-1.21)		0.30 (0.34-0.69)	
Location		0.0002		
Gingiva	1.00			
Mucosa (lips, cheeks)	0.41 (0.26-0.62)			
Others (tongue, palate, pharynx, tonsils)	0.27 (0.36-1.33)			
Ulceration		0.04		
Non	1.00			
Oui	1.63 (1.02-2.59)			
Surgery				
Complete resection	1.00	<.0001	1.00	
Incomplete resection	2.26 (1.41-3.64)		2.59 (1.39-4.83)	<.0001
Biopsy	6.73 (3.32-13.63)		7.00 (2.95-16.61)	

Les mélanomes muqueux canins comme modèle génétique et thérapeutique des mélanomes muqueux humains

Mots clés : modèle chien, mélanome muqueux, génétique, thérapie ciblée

Résumé: Ma thèse s'inscrit dans le cadre de l'oncologie comparée et a porté sur l'étude génétique du mélanome muqueux (MM) chez le chien qui développe spontanément des mélanomes buccaux, fréquents dans certaines races et particulièrement sévères. Ils constituent de bons modèles naturels pour les MM humains, rares et très agressifs. L'analyse par séquençage d'exome de 70 cas de MM canin par l'équipe a permis d'identifier des altérations géniques somatiques récurrentes. J'ai d'abord travaillé sur les amplifications focales des chromosomes canins CFA30 et CFA10 sur une cohorte de 73 cas de MM canins. J'ai montré que ces altérations étaient présentes dans la moitié des cas et que l'amplification du CFA 30 avait une valeur pronostique péjorative. Nous avons montré que ces gènes amplifiés étaient surexprimés et avaient un rôle dans la prolifération cellulaire. Le séquençage de génomes entier de 4 lignées cellulaires canines a

montré que ces amplifications focales signaient des réarrangements chromosomiques complexes, à l'instar de ce qui est observé dans les MM humains. En parallèle, l'analyse transcriptomique de 32 cas de MM canins nous a permis de distinguer deux sous-groupes moléculaires: l'un caractérisé par la surexpression de gènes de l'immunité et l'autre par la surexpression d'oncogènes comme *TERT* et *MITF*. De plus, ces deux groupes se distinguent par leur type de variants structuraux, plus nombreux dans le second groupe. Ces résultats suggèrent l'utilisation de l'immunothérapie et de thérapies ciblées respectivement. Ces travaux ont permis de mieux caractériser les MM canins sur le plan génétique et ouvrent des perspectives thérapeutiques profitant à la recherche translationnelle en médecine humaine et vétérinaire pour les mélanomes non liés aux UV.

Canine mucosal melanoma as a genetic and therapeutic model for human mucosal melanoma

Keywords : dog model, mucosal melanoma, genetic, targeted therapy

Abstract : My PhD is in the frame of the comparative oncology field about the genetic study of mucosal melanoma (MM) in dogs, that spontaneously develop oral melanoma, frequent in some breed and severe. Thus, it constitutes a good natural model for human MM that is rare and very aggressive. The exome sequencing analysis of 70 canine MM cases by the team allowed to identify recurrent somatic alterations. I first focused on amplifications on canine chromosome (CFA) 10 and 30. On a cohort of 73 cases, I showed that the amplification of CFA 30 had a prognostic value. We showed that amplified genes were also overexpressed and had a role on tumour cell proliferation. The whole genome sequencing of canine cell lines showed that those amplifications signed

complex chromosomal rearrangements, as it is seen in human MM. In the same time, the transcriptomic analysis of 32 canine MM samples showed the existence of two molecular subgroups: the first characterized by the overexpression of genes related to immune microenvironment, and the second by overexpression of oncogenes like *TERT* and *MITF*. Moreover, those groups differ in their structural variants content, more important in the second one. Those results suggest the use of different therapies, immunotherapy and targeted therapy respectively. This work allowed to better characterize genetics of canine MM and opens therapeutic perspectives to benefit human and veterinary oncology for non UV-induced melanomas.