



Université de Montréal

**Le rôle d'Akt dans la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN induits par  
les ultraviolets dans les cellules de mélanomes humains**

Par  
Soukaina Mansouri

Programme de biologie moléculaire  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.  
en biologie moléculaire  
option maladies complexes  
chez l'humain

Septembre 2014

© Soukaina Mansouri, 2014

Université de Montréal  
Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé :  
Le rôle d'Akt dans la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN induits par les ultraviolets  
dans les cellules de mélanomes humains

Présenté par :  
Soukaina Mansouri

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Dindial Ramotar  
Président-rapporteur

Dr Elliot Drobetsky  
Directeur de recherche

Dr Francis Rodier  
Membre du jury

## Résumé

Le mélanome malin est l'un des cancers les plus mortels dont l'incidence continue à augmenter chaque année avec peu de traitement efficace à long terme. Il est causé et initié principalement par l'exposition excessive aux rayons ultraviolets engendrant des photoproduits hautement génotoxiques. Il est bien connu que la cascade de signalisation PI3K/Akt joue un rôle crucial dans la régulation des processus qui sont généralement dérégulés durant le développement tumoral comme la prolifération, le contrôle du cycle cellulaire et l'apoptose. Néanmoins, l'implication de cette voie moléculaire dans la réponse aux dommages à l'ADN est peu caractérisée. Chez les mammifères, trois isoformes de la protéine kinase Akt ont été identifiées: Akt1, Akt2 et Akt3. Bien qu'elles soient très homologues en termes de séquence, plusieurs études ont montré que ces isoformes ont des fonctions biologiques distinctes, et nous suggérons qu'elles puissent contribuer différemment à la régulation de la réponse génotoxique. Les objectifs de ce projet étaient de: (i) évaluer l'activation d'Akt dans les cellules de mélanomes (ii) déterminer l'impact de l'inhibition de cette activité sur la régulation de la réponse cellulaire aux UV (iii) vérifier si la perte d'expression de l'un ou de l'autre des isoformes d'Akt peut réguler la réponse aux UV. Nous avons démontré qu'Akt est transitoirement hyperactivée par phosphorylation suite aux irradiations UV dans les lignées cellulaires de mélanomes. Afin de déterminer l'importance de cette activation dans la réponse cellulaire aux UV, notre approche était de diminuer (i) la phosphorylation d'Akt par l'usage d'inhibiteurs pharmacologiques ou (ii) l'expression de chaque isoforme d'Akt par l'approche des ARN interférents. Nous avons montré que l'inhibition de la phosphorylation d'Akt amène à l'augmentation du taux de l'apoptose induit par les UV d'une manière isoforme spécifique, alors qu'elle n'a aucun effet sur la régulation

de la voie de réparation par excision de nucléotides (NER), qui est la seule voie humaine pour éliminer les dommages à l'ADN induits par les UV. En somme, notre étude constitue un nouvel aspect qui permet de mieux comprendre les mécanismes moléculaires du développement de mélanomes malins suites aux irradiations ultraviolettes.

Mots clés: Mélanomes malins, réponse aux dommages à l'ADN, ultraviolet, PI3K, Akt, PTEN, réparation par excision de nucléotides, apoptose.

## **Abstract**

Malignant melanoma is one of the deadliest cancers whose incidence continues to rise each year with a few effective long-term treatments. It is caused and initiated mainly by excessive exposure to ultraviolet radiation generating highly genotoxic DNA photoproducts. It is well known that the PI3K/Akt signaling cascade plays a crucial role in the regulation of processes commonly deregulated in tumor development such as proliferation, cell cycle control and apoptosis. Nevertheless, the nuclear involvement of this molecular pathway in the genotoxic response is poorly characterized. In mammals, three Akt kinase isoforms have been identified: Akt1, Akt2 and Akt3. Although these exhibit a high degree of homology, several studies have shown that they have distinct biological functions; therefore, we suggest that these isoforms may contribute differently to the regulation of genotoxic response. The objectives of this project were to: (i) evaluate Akt activation in UV-irradiated melanoma cells, (ii) determine the effect of the Akt phosphorylation inhibition on the regulation of the cellular response to UV, (iii) evaluate whether the loss of the expression of one or more of Akt isoforms can regulate the cellular response to UV. We demonstrated that Akt undergoes transient hyperactivation after UV treatment in melanoma cell lines. To determine the importance of this activation, our approach was to reduce (i) the phosphorylation of Akt by the use of pharmacological inhibitors or (ii) the expression of each individual Akt isoform using RNA interference. We have shown that inhibition of Akt phosphorylation leads to increased rates of UV-induced apoptosis in an isoform specific manner, while exerting no effect on regulation of nucleotide excision repair (NER), the only human pathway for eliminating UV-induced DNA damage. In

summary, our study provides a better understanding of the molecular mechanisms of malignant melanoma development in response to UV.

Keywords: Malignant melanoma, DNA damage response, ultraviolet, PI3K, Akt, PTEN, nucleotide excision repair, apoptosis.

**Table de matières**

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table de matières .....	v
Liste des figures .....	viii
Liste des sigles et abréviations.....	ix
Remerciements.....	xiii
Introduction 1: La réponse aux dommages à l'ADN .....	1
Les types de dommages à l'ADN et leurs origines.....	1
Réponse aux dommages à l'ADN.....	5
La réponse UV .....	7
Vue générale sur les ultraviolets.....	7
Les dommages à l'ADN induits par les UV.....	8
La réponse cellulaire aux UV.....	10
Introduction 2 : Les bases moléculaires du développement de mélanome.....	17
Le mélanomes malin.....	17
Aspects génétiques et moléculaires de la mélanomagenèse .....	22



La voie des MAPKs .....	23
La voie de signalisation PI3K/Akt .....	26
Structure et expression d'Akt .....	26
Le contrôle de l'activité d'Akt.....	27
Effets biologiques de l'activation de la voie PI3K/Akt.....	31
Les fonctions biologiques spécifiques des isoformes d'Akt .....	36
Dérégulation de la voie PI3K/Akt dans le mélanome malin .....	36
Activation et rôles de la voie nucléaire PI3K/Akt dans la réponse aux dommages à l'ADN40	
Hypothèse et objectifs.....	44
Matériel et méthodes.....	46
Résultats.....	53
Préambule .....	53
La phosphorylation d'Akt et l'expression de PTEN dans les lignées cellulaires de mélanome .54	
Activation d'Akt induite par les UV dans différentes lignées cellulaires modèles .....	56
L'inhibition pharmacologique de la voie Akt.....	59
Le rôle de la voie PI3K/Akt dans la régulation de la NER.....	61
Effet de l'inactivation pharmacologique de la voie PI3K/Akt sur la survie des cellules de mélanome.....	66

Modulation de la mort cellulaire par apoptose par traitement aux inhibiteurs pharmacologiques des cellules de mélanomes exposées aux UV .....	69
Expression et inhibition des différents isoformes d'Akt dans le mélanomes malin .....	73
Le rôle des isoformes d'Akt dans la modulation de l'apoptose induite par les UV .....	75
Discussion .....	79
Rappel du projet .....	79
Phosphorylation/activation d'Akt par les UV dans le mélanome malin .....	80
La corrélation entre l'activation d'Akt et la régulation de la GG-NER .....	82
La régulation de l'apoptose dans les cellules de mélanome .....	84
L'induction de l'apoptose par les UV d'une manière spécifique aux isoformes d'Akt .....	86
Conclusion .....	89
Limites de l'étude .....	91
Expériences futures .....	93
Bibliographie .....	95
Annexe 1 .....	xvi

## Liste des figures

Figure 1: Représentation schématique de l'activation des voies de signalisation par les UV: la réponse aux UV.....	16
Figure 2: La voie de signalisation PI3K/Akt .....	35
Figure 3. La phosphorylation d'Akt et l'expression de PTEN dans les lignées cellulaires de mélanome.....	55
Figure 4. Activation d'Akt induite par les UV dans des lignées cellulaires de mélanome et des fibroblastes primaires humains. ....	58
Figure 5. Inhibition pharmacologique de la phosphorylation d'Akt induite par les UV dans des lignées cellulaires de mélanome .....	60
Figure 6. Évaluation de la réparation des 6-4PPs suite à l'inhibition de la voie oncogénique PI3K/Akt dans les lignées cellulaires de mélanome.....	65
Figure 7: Capacité de survie cellulaire aux UV des cellules de mélanome suite à l'inhibition pharmacologique de la voie PI3K/Akt.....	68
Figure 8 : Le rôle de l'activation d'Akt induite par les UV sur la modulation de l'apoptose dans les cellules humaines de mélanome.....	72
Figure 9 : Expression et inhibition des isoformes d'Akt (Akt1, 2 et 3) dans les lignées cellulaires de mélanome.....	74
Figure 10: Évaluation de l'apoptose des cellules de mélanome induite par les UV suite à l'inhibition de l'expression des isoformes d'Akt.....	77

**Liste des sigles et abréviations**

ADN Acide désoxyribonucléique

AGC cAMP-dependent protein kinase A/protein kinase G/ protein C

Akt Activated by kinase tyrosine

ARN Acide ribonucléique

ATM Ataxia telangiectasia mutated

ATR Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein

BSA Bovine serum albumin

cAMP Adénosine monophosphate cyclique

CDK Cyclin-dependent kinase

CDKN2A Cycline-dependent kinase inhibitor 2A

Cisplatine Cis-diamminedichloroplatinum(II)

CPDs Cyclobutane pyrimidine dimmers

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA-PKcs DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit

DSBs DNA double strand breaks

EGFR Epidermal growth factor receptor

FBS Fetal Bovine Serum

GG-NER Global genome nucleotide excision repair

HPRT Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase

HR Homologous recombination

ICL Interstrand DNA cross-link

IR Ionising radiation

MAPKs Mitogen-activated protein kinases

MDC1 Mediator of DNA-damage checkpoint 1

MDM2 Murine double minute

MM Mélanomes malins

MMC Mitomycine C

NER Nucleotide excision repair

NHEJ Non-homologous end joining

PARP-1 Poly (ADP-ribose) polymerase 1

PBS Phosphate buffered saline

PBS-TB Phosphate buffered saline/tween-BSA

PCNA Proliferating cell nuclear antigen

PIKK Phosphoinositide 3-kinase- related protein kinase

PI Propidium iodide

PI3K Phospho-inositide-3-kinase

PIP2 Phosphatidyl-inositol 3, 4-biphosphate

PIP3 Phosphatidyl-inositol 3, 4, 5-triphosphate

PKB Protein kinase B

PMSF phenylmethylsulfonyl fluoride

6-4PPs 6-4 photoproducts

PTEN Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10

PTP protein tyrosine phosphatase

Ras Rat sarcoma

Rb retinoblastoma

RIPA radioimmunoprecipitation assay

ROS Reactive oxygen species

RTK receptor tyrosine kinase

SSBs DNA single strand breaks

SPR +/- Réparant (+) ou pas (-) les 6-4PPs en phase S

siRNA Small interfering RNA

shRNA Short hairpin RNA

TC-NER Transcription coupled nucleotide excision repair

TOPBP1 DNA topoisomerase 2-binding protein 1

UV Ultraviolets

µg Microgramme

µM Micromolaire

ul Microlitre

*Je dédie ce travail*

*À mes parents*

## Remerciements

*Je voudrais adresser mes plus sincères remerciements à toutes les personnes qui ont participé scientifiquement et personnellement à la réalisation de mon projet de maîtrise.*

*Je tiens à remercier tout particulièrement mon superviseur Dr Elliot Drobetsky pour m'avoir accueillie au sein de son équipe, pour sa disponibilité, son encadrement très impliqué dans mon travail et les moyens qu'il donne à notre équipe afin de travailler dans les meilleures conditions. Un merci spécial pour son enthousiasme sans faille, sa franchise et sa rigueur. Surtout il ne faut pas oublier de le remercier pour son amitié et son soutien dans les moments de doute et des contraintes personnelles.*

*Je voudrais remercier tous les membres de mon jury pour le temps qu'ils consacrent pour la correction de mon travail. Je suis honorée par la participation du rapporteur Dr Dindial Ramotar, un professeur que j'apprécie énormément. Merci également à mon « parrain » Dr Francis Rodier d'avoir jugé ce travail tant qu'examineur et d'être disponible lorsque j'en ai eu besoin.*

*Au sein de notre équipe, je tiens à remercier Dr François Bélanger pour le partage de sa riche expérience dans le monde de recherche, sa participation et ses conseils scientifiques. Merci à notre assistante de recherche Annie Beaudry*



*pour son aide et l'énergie qu'elle apportait au sein de notre laboratoire. Merci tout spécialement à mes amis Meriem Sekheri et Jean-Philippe Angers pour votre aide, encouragement lors des présentations et surtout votre écoute lorsque j'évacuer mes frustrations. Grâce à vous tous, j'ai passé 2 années sans une super ambiance!*

*J'aimerais aussi remercier les membres d'autres laboratoires Sami, Rad et Nazar pour leur sympathie et leur soutien, et spécialement Dr Driss El kebir pour sa générosité scientifique et son aide technique. Aussi, merci à tous les membres de l'administration du centre de recherche de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont et du programme de biologie moléculaire pour leur aide.*

*Un grand merci à mes parents qui ont cru en moi, qui m'ont encouragé tout le long de mon parcours. C'est grâce à eux que j'ai réussi, je leur serais à tout jamais reconnaissante. Je vous dois énormément. Encore merci ! Je vous aime. J'ai une pensée particulière pour mes grands-parents qui auraient été très contents et fiers.*

*Enfin, un merci spécial pour mes amis Abdelilah, Wissam, Leïla, Rajae, Sophia et Meriem pour leur sincère amitié et leur soutien. Votre amour m'est précieux ☺!*

*Toutes mes excuses aux personnes que j'ai oubliées.*





## **Introduction 1: La réponse aux dommages à l'ADN**

### **Les types de dommages à l'ADN et leurs origines**

Bien que protégé au sein du noyau, l'ADN est continuellement exposé à plusieurs agents d'origine endogène ou exogène, pouvant former des milliers de lésions par jour (Lindahl and Barnes 2000). L'ADN peut être altéré par des facteurs endogènes, souvent par certains produits du métabolisme cellulaire qui peuvent causer des altérations non négligeables à l'ADN. Quant aux altérations d'origine exogène, elles sont principalement liées à des sources environnementales d'origine physique ou chimique.

### ***Les altérations spontanées de l'ADN***

Vu que l'ADN est confronté à des réactions chimiques spontanées avec l'eau et les molécules oxygénées du milieu, il survient en permanence des réactions d'hydrolyses entre les bases d'ADN et l'eau. Par exemple, l'élimination des bases azotées (dépuration) qui conduit à la formation des sites abasiques (ou sites AP) par l'hydrolyse de la liaison entre la base et le ribose-phosphate de l'ADN (Gates 2009). De plus, les réactions d'hydrolyse de la molécule d'ADN peuvent aussi mener à la déamination spontanée des bases dont la formation d'uracile par désamination de la cytosine est l'exemple le plus cité (Frederico, Kunkel et al. 1993).

### ***Le dommage oxydatif***

L'ADN peut être endommagé par certains produits du métabolisme cellulaire comme les dérivés réactifs de l'oxygène (« Reactive Oxygen Species », ROS) (Valko, Rhodes et al. 2006) et les radicaux libres. Les ROS peuvent réagir avec la molécule d'ADN et former différentes lésions oxydatives dont la 8-oxo Guanine est la plus fréquente et mutagénique (Nishimura 2002, Barnes and Lindahl 2004). Les ROS peuvent être également d'origine exogène, notamment générés par les radiations ionisantes (IR) comme les rayons X (Yokoya, Fuji et al. 2008). De plus, les UV peuvent aussi indirectement générer des dommages oxydatifs à l'ADN (Pattison and Davies 2006).

### ***Les pontages au niveau de l'ADN***

Les pontages intercaténaire (ICL) représentent des altérations hautement toxiques inhibant la séparation des brins d'ADN, ce qui empêche la réplication génomique. Ils peuvent se former entre deux bases des deux brins de l'ADN (pontage intercaténaire) ou entre deux bases du même brin (pontage intracaténaire). Les pontages sont généralement générés par les agents chimiothérapeutiques comme le cisplatine et la mitomycine C (MMC) (Deans and West 2011). En effet, le cisplatine cause des pontages intracaténaire situés principalement entre les purines adjacentes sur le même brin de l'ADN (Dasari and Bernard Tchounwou 2014), tandis que le MMC génère généralement des pontages intracaténaire formés entre les guanines (Rink, Lipman et al. 1996). Les ICLs peuvent également se former par des sources endogènes y compris les produits de la peroxydation des lipides comme les  $\beta$ -aldéhydes insaturés (Stone, Cho et al. 2008).

### ***Les mésappariements des bases de l'ADN***

La réplication de l'ADN est un mécanisme qui est relativement fidèle. Pourtant, certaines erreurs peuvent parvenir lors du processus et engendrer des réarrangements entre des bases qui se traduisent par l'incorporation d'une mauvaise base non complémentaire de la matrice. C'est ce qu'on appelle le mésappariement des bases (mismatch) (Pavlov, Minnick et al. 1994).

### ***L'alkylation des bases***

L'alkylation des bases se traduit par le transfert d'un groupement alkyl; méthyl ou éthyl sur les bases azotées de l'ADN, formant des adduits à l'atome N et O (Drablos, Feyzi et al. 2004). Citant l'exemple d'O6-méthylguanine (O6-meG) et N7-méthylguanine (N7MeG). Ces altérations proviennent généralement des agents alkylants comme le témozolomide (TMZ) et le méthylméthane sulfonate (MMS) ou des sources endogènes, principalement la S-adénosyl-méthionine (SAM) (Lindahl 1993, Ciccia and Elledge 2010) .

### ***Les cassures simple et double brins de l'ADN***

L'ADN est constamment sujet à des cassures monocaténares (ou SSBs) se formant sur un seul brin ou bicaténares (ou DSBs) sur les deux brins d'ADN. Ces cassures peuvent provenir de sources endogènes telles que la réplication d'ADN ou de sources environnementales comme les UV et les radiations ionisantes.

Les SSBs sont les altérations les plus communes atteignant au moins 10.000 lésions par jour. Elles sont principalement produites d'une manière directe par l'attaque des dérivés

réactifs de l'oxygène (ROS) et autres molécules électrophiles, causant la destruction des résidus désoxyriboses et des bases, ou par l'exposition aux radiations ionisantes (Ward 1988, McKinnon and Caldecott 2007, Caldecott 2008). Les SSBs peuvent également être induits par l'action des certains antibiotiques anti-tumoraux y compris la bléomycine (Chen, Ghorai et al. 2008).

Parmi les diverses formes de dommages à l'ADN citées, les DSBs représentent les lésions les plus toxiques à l'ADN (Huertas 2010), pouvant être impliquées dans la production des aberrations chromosomiques ainsi que la mort cellulaire (Johnston, MacPhail et al. 1998, Pfeiffer 1998). Les DSBs sont formés lorsque les deux brins complémentaires d'ADN sont simultanément cassés et l'appariement des bases est insuffisant pour garder les extrémités d'ADN proches l'un de l'autre. Ce type de lésions est essentiellement généré par l'exposition aux irradiations ionisantes et aux multiples agents chimiques radiomimétiques (Ohnishi, Mori et al. 2009). En effet, les lésions induites par les radiations ionisantes sont générées par les ROS et les radicaux libres et peuvent être converties en DSBs (Sutherland, Bennett et al. 2000). De même, les UV peuvent indirectement générer des DBSs comme conséquence de la réparation de l'ADN ou de la formation de dommages oxydatifs (Yajima, Lee et al. 2009). Quant aux DSBs d'origine endogène, elles peuvent se produire lorsque la machinerie de réplication rencontre d'autres lésions qui la bloquent, incluant les SSBs (Jackson 2009). Lorsque deux SSBs sont formés l'un près de l'autre, ils résultent à la formation de DSBs (Jackson and Bartek 2009). Enfin, les DBSs peuvent aussi se produire lors de la recombinaison V(D) J qui survient dans les lymphocytes B et T (Jackson 2002).

## Réponse aux dommages à l'ADN

Pour prévenir l'instabilité génomique causée par l'accumulation de dommages à l'ADN, la cellule dispose d'un mécanisme bien précis, dit réponse aux dommages à l'ADN (DDR), afin d'assurer l'intégrité du patrimoine génétique transmis aux cellules filles lors de la division cellulaire.

La DDR comprend plusieurs voies de signalisation activant des points de contrôle du cycle cellulaire et de réparation des dommages à l'ADN, spécifiques aux types de lésions (Harrison and Haber 2006, Harper and Elledge 2007). Brièvement, afin de prendre en charge d'éventuels dommages dans son ADN, la cellule doit d'abord être capable de les détecter grâce à l'intervention des protéines « senseurs » qui reconnaissent plus ou moins spécifiquement un type de lésion. Rapidement, ces senseurs recrutent des kinases essentielles dans la transduction du signal à travers la cellule, entraînant un recrutement des médiateurs qui vont à leur tour amplifier le signal. Ensuite, ces kinases vont phosphoryler et inhiber/activer une multitude de protéines effectrices, qui activent les points de contrôle du cycle cellulaire et régulent la transcription de nombreux gènes (Jackson and Bartek 2009).

Globalement, la présence d'une lésion d'ADN résulte en différentes réponses: l'accumulation des mutations des gènes suppresseurs de tumeurs ou de proto-oncogènes (Hoeijmakers 2009). D'autre part, la cellule peut induire l'apoptose ou la sénescence (Schumacher, Garinis et al. 2008).

**(i) La réparation des dommages à l'ADN:** lorsque le dommage à l'ADN n'est pas sévère, la cellule active une multitude d'enzymes et recrute plusieurs facteurs pour une réparation efficace et spécifique au type du dommage avec peu ou sans conséquences (Ciccia and



Elledge 2010). De ce fait, la cellule arrête activement le cycle cellulaire et active les points de son contrôle jusqu'à ce qu'elle garantisse que certains processus importants comme la réplication de l'ADN et la mitose sont bien complets et que la réparation est bien accomplie (Liu, Yu et al. 2006).

**(ii) Réparation défectueuse des dommages:** certaines cellules peuvent également survivre en présence du dommage non ou mal réparé, ce qui mène à l'accumulation des mutations, pouvant causer le développement de diverses maladies humaines, incluant le cancer (Ciccia and Elledge 2010, Negrini, Gorgoulis et al. 2010). Ainsi, l'activation d'un proto-oncogène ou la perte de fonction d'un gène suppresseur de tumeur peut mener au développement du cancer. Citant l'exemple du suppresseur de tumeur p53 qui est muté dans divers types de cancer (Olivier, Eeles et al. 2002).

**(iii) Apoptose:** Une réponse radicale en cas de dommage sévère est la mort cellulaire programmée ou apoptose. Il est supposé qu'elle soit mise en œuvre seulement en cas de dommages irréparables, afin d'éliminer de l'organisme une cellule potentiellement prédisposée au cancer. P53 est le premier déterminant de la susceptibilité à l'apoptose induite par les dommages à l'ADN à être identifié (Clarke, Purdie et al. 1993, Lowe, Schmitt et al. 1993). Tout d'abord, p53 active la transcription de nombreux gènes qui codent pour des protéines pré-apoptotiques et réprime celle des gènes anti-apoptotiques. De plus, P53 active la transcription des récepteurs de la mort cellulaire comme Fas et DR5-Killer (Oren 2003). Ce suppresseur de tumeur contribue au déclenchement du processus apoptotique non seulement par son rôle de facteur de transcription, mais également par des actions indépendantes de son activité transcriptionnelle. P53 semble être transloqué à la mitochondrie où il agirait comme stimulateur de la cascade apoptotique en se liant directement avec des protéines de la famille

Bcl-2 (Murphy, Leu et al. 2004) et va ainsi renforcer le relargage du cytochrome C (Mihara, Erster et al. 2003). Enfin, il est important de souligner que p53 est au carrefour des signalisations en réponse aux dommages à l'ADN et régule la balance entre l'arrêt du cycle cellulaire / réparation et l'apoptose. Autrement dit, elle participe à la décision du destin cellulaire.

**(iv) Sénescence:** il est important d'ajouter que la sénescence peut être aussi déclenchée lors d'un entretien défaillant du dommage à l'ADN. Elle représente un déterminant du vieillissement de l'organisme (Seviour and Lin 2010). La sénescence est définie par un arrêt permanent du cycle et de croissance cellulaire, pouvant causer des altérations dramatiques dans le métabolisme cellulaire, comme la sécrétion des protéines qui peuvent modifier le microenvironnement tissulaire (Campisi 2005). De plus, cette réponse est activée dans les étapes initiales de la transformation pré-maligne (Braig, Lee et al. 2005, Dimri 2005).

## **La réponse UV**

### **Vue générale sur les ultraviolets**

Les rayons ultraviolets (UV) représentent une source environnementale de dommages à l'ADN, à laquelle nous sommes quotidiennement exposés. Ils font partie des agents les plus étudiés (Cockell and Horneck 2001). L'exposition des cellules à ces radiations constitue un excellent système modèle et un outil facile pour étudier les conséquences biologiques des dommages à l'ADN. Nous recevons du soleil un rayonnement composé d'infrarouge, du rayonnement visible et enfin les UV.

Les radiations UV représentent 6% des radiations émises à la terre et comprennent des longueurs d'onde différentes entre 200 et 400 nm du spectre électromagnétique solaire. Les UV sont aussi subdivisés en trois types: UVA (320 – 400 nm), UVB (295 – 320 nm), et enfin les UVC (100 – 295 nm), dont les UVA et UVB représentent 95% et 5% des radiations UV terrestres (de Gruijl 2000, Anna, Blazej et al. 2007), alors que les courtes longueurs d'onde comme les UVC sont absorbées par la couche d'ozone (Kuluncsics, Perdiz et al. 1999). Les organismes vivants ne sont donc pas naturellement exposés aux radiations UVC. Pourtant, sur le plan pratique, les UVC sont fréquemment utilisés comme modèle, car leur longueur d'onde est proche de celle d'absorption optimale pour l'ADN qui est de 260 nm et n'est pas efficacement absorbée par les protéines (Batista, Kaina et al. 2009, Schuch and Menck 2010). Il est important de souligner que les radiations UV génèrent diverses lésions à l'ADN avec une fréquence différente dépendamment de la longueur d'onde d'UV.

### **Les dommages à l'ADN induits par les UV**

Les rayons ultraviolets (UV) représentent le composant le plus mutagène et néfaste du spectre du rayonnement solaire. Une journée d'exposition aux UV peut engendrer jusqu'à  $10^5$  de photoproduits par kératinocyte de peau (Hoeijmakers 2009). En effet, les irradiations UV peuvent être absorbées par plusieurs biomolécules telles que les protéines, l'ARN et l'ADN, en raison de leur capacité d'absorption des UV, et par conséquent, induire des lésions à l'ADN via deux mécanismes moléculaires (Pattison and Davies 2006).

**(i) L'absorption directe de l'énergie photonique UV par l'ADN.** Lors d'une excitation directe de l'ADN par des courtes longueurs d'onde (UVB et UVC), les photons hautement énergétiques peuvent être absorbés par les bases pyrimidiques thymine et cytosine de l'ADN,

ce qui conduit à leur excitation. Cette absorption induit des photoproduits dimériques entre les bases pyrimidiques adjacentes, les thymines, les cytosines et les 5-méthylcytosine (Ravanat, Douki et al. 2001). Les photoproduits les plus fréquemment engendrés par les UV sont les dimères de cyclobutane pyrimidique (CPD) et 6-4 pyrimidine pyrimidone (6-4 PP) (Sinha and Hader 2002). Les CPDs se traduisent par des liens covalents doubles entre les carbones 5 et 6 de chaque pyrimidine pour former une structure cyclique. En ce qui est trait aux 6-4 PPs, ils se définissent par un lien entre le carbone 6 de la pyrimidine en 5' avec le carbone 4 de la pyrimidine adjacente en 3'. La formation de telles lésions engendre une déformation structurale de la double hélice d'ADN, causant le blocage de la machinerie de la réplication et de la transcription de l'ADN (Naegeli 1994, Tornaletti 2005). Il est estimé qu'il y a de 3 à 10 fois davantage d'induction de CPDs que de 6-4PPs par les UV, engendrant des déformations différentes. En effet, les 6-4PPs induisent une courbure plus importante de l'ADN (44°) que les CPDs (9°), ce qui leur permet d'être éliminés plus efficacement et rapidement que les CPDs (Mitchell and Nairn 1989, Kim and Choi 1995, Mitchell, Cleaver et al. 1995). Le ratio CPD/6-4PP semble être influencé par la longueur d'onde d'UV (Cadet, Douki et al. 2001, Douki and Cadet 2001, Cadet, Sage et al. 2005). En effet, l'absorption directe des UVC par l'ADN au niveau des sites pyrimidines engendre les 6-4PPs et CPDs à un taux approximatif de 70-80% et 20-30% des dommages induits par les UVC, respectivement (Clingen, Arlett et al. 1995).

**(ii) l'action indirecte des photo-sensibilisateurs** (exogènes ou endogènes) sur l'induction des dommages à l'ADN, et leur excitation en état de triplet par les UV. Une fois excités, les photo-sensibilisateurs induisent des dommages à l'ADN par des mécanismes de type I et de type II: via respectivement (a) une interaction directe avec l'ADN par le transfert d'électrons

induisant la formation de radicaux libres, ou (b) un transfert d'énergie à la molécule de dioxygène menant ainsi à la formation des ROS, qui à leur tour endommagent l'ADN (Pattison and Davies 2006). Il est bien rapporté que les radiations UVA sont beaucoup plus efficaces que les UVB à induire le dommage oxydatif (Cadet, Douki et al. 2009). De plus, UVA contribuent aux réactions de photosensibilisation par la formation des ROS générées par des photo-sensibilisateurs endogènes (Ravanat, Douki et al. 2001, Cadet, Sage et al. 2005).

### **La réponse cellulaire aux UV**

Afin de faire face aux photo-dommages engendrés par les ultraviolets, les cellules mammifères ont développé un mécanisme de réparation par excision de nucléotides (NER). Chez les eucaryotes, la NER représente un système de réparation très conservé, représentant le seul mécanisme pour éliminer les photoproduits 6-4PPs et CPDs engendrés par les UV chez l'humain. Ce mécanisme de réparation nécessite l'intervention d'une panoplie de facteurs protéiques qui permettent l'excision de l'ADN endommagé et se déroule en trois étapes moléculaires principales: la reconnaissance du dommage, l'incision de l'ADN et finalement la resynthèse et la ligation. La NER pourrait être divisée en deux voies principales qui diffèrent uniquement au niveau de l'étape de reconnaissance du dommage (Volker, Mone et al. 2001). La NER globale du génome (GG-NER) répare les lésions sur l'ensemble du génome (Gillet and Scharer 2006). Quant à la NER couplée à la transcription, elle permet de réparer les lésions bloquant la transcription qui sont lentement réparées par GG-NER (Hanawalt 2002) et présentes uniquement sur les gènes transcrits (Svejstrup 2002). En ce qui concerne l'efficacité de réparation des photodommages, les 6-4PPs sont plus rapidement réparés que les CPDs par le GG-NER après une exposition aux UV, ce qui pourrait suggérer qu'ils sont mieux reconnus

par la NER (Mitchell 1988, Mitchell and Nairn 1989). Bien que les CPDs soient lentement réparés, la TC-NER permet une élimination accélérée de ces lésions présentes dans les régions transcriptionnellement actives (van Hoffen, Venema et al. 1995).

En plus du système de réparation, les cellules disposent d'une réponse spécifique aux UV et protectrice pour préserver l'intégrité de l'information génétique. Chez les humains, les voies déclenchées lors de la réponse aux UV peuvent être subdivisées en deux voies principales.

**(i) Voie dépendante des dommages à l'ADN:** Cette réponse est initiée au niveau du noyau et est induite par la présence des dommages à l'ADN (64PPs et CPDs). L'induction des photo-lésions permet d'activer des voies de signalisation contrôlant de multiples processus cellulaires. Il est bien connu que suite à l'exposition aux UV, les cellules de mammifères restent bloquées en phases G1 et G2. Ces points de contrôle du cycle cellulaire (*checkpoints*) permettent une réparation optimale des dommages à l'ADN avant que la cellule réinitialise la réplication d'ADN (arrêt en G1) et/ou rentre en mitose (arrêt en G2), afin d'éviter la transmission des aberrations chromosomiques. Pour cette réponse nucléaire, les kinases de la famille PIKKs (« phosphatidylinositol 3-kinase-like kinases »); ATM (« ataxia telangiectasia mutated ») et ATR (« ATM and rad3-related ») ainsi que leur effecteur p53 jouent un rôle central. ATM est exclusivement et rapidement activée par les DSBs en réponse aux IR. Tandis qu'ATR semble être plus polyvalente: en effet, la kinase ATR est stimulée en réponse au stress réplcatif par les régions simple brin provenant des fourches de réplication bloquées ou lors de l'induction des photo-produits (Shiloh 2003, Shechter, Costanzo et al. 2004). Il est important de souligner que les UV activent principalement et rapidement ATR, tandis que l'activation d'ATM par ceux-ci se fait tardivement (Yajima, Lee et al. 2009). ATR est, tout

d'abord, recrutée et stimulée par l'ADN simple brin lié à la protéine de réplication A (RPA). Ensuite, grâce à sa liaison avec RPA, ATRIP (ATR-interacting protein) va permettre le recrutement et l'activation d'ATR (Cortez, Guntuku et al. 2001, Zou and Elledge 2003). De plus, TopBP1, recrutée par le complexe 9-1-1, également active ATR via son interaction directe avec ATRIP (Kumagai, Lee et al. 2006, Ohashi, Takeishi et al. 2014). Une fois activées, ATM et ATR vont phosphoryler et activer de nombreuses cibles dont Chk1 et Chk2 sont les majeures, respectivement. ATR phosphoryle Chk1 aux sites S317 et S345 pour promouvoir l'arrêt du cycle cellulaire via l'inhibition des Cdk (cyclin-dependent kinase) (Sanchez, Wong et al. 1997, Liu, Guntuku et al. 2000). En réponse aux UV, l'activation d'ATM est dépendante de la phosphorylation d'ATR et induit la phosphorylation de la kinase Chk2 afin d'effectuer l'arrêt du cycle cellulaire en phases S et G2/M (Stiff, Walker et al. 2006, Yajima, Lee et al. 2009).

**(ii) Voie indépendante des dommages à l'ADN:** il s'agit d'une réponse extranucléaire initiée au niveau de la membrane plasmique, et ayant pour but le déclenchement de multiples voies de signalisation cytoplasmiques. Ces voies vont converger vers le noyau pour permettre la régulation d'expression génique et enfin une réponse adéquate. L'une des premières réponses des cellules humaines de la peau observées après l'exposition aux UV semble impliquer l'inactivation des protéines tyrosine phosphatases liées à la membrane (PTPs) qui maintiennent les récepteurs en leur état déphosphorylé (Herrlich, Karin et al. 2008). Cette inactivation résulte de l'oxydation de la cystéine hautement réactive dans leur site catalytique (Gross, Knebel et al. 1999). Par conséquent, ceci entraîne une autophosphorylation des multiples récepteurs tyrosine kinases (RTK) au niveau de la membrane, y compris EGFR (Sachsenmaier, Radler-Pohl et al. 1994), PDGFR (Knebel, Rahmsdorf et al. 1996), le

récepteur de TNF- $\alpha$  (Dy, Pei et al. 1999), parmi d'autres. Des évidences ont montré que la phosphorylation des RTKs par les UV est induite par l'activité intrinsèque de la tyrosine kinase (Coffer, Burgering et al. 1995) d'une manière indépendante du ligand (Knebel, Rahmsdorf et al. 1996). L'activation des récepteurs résulte donc en une activation d'une multitude de cascades de signalisation, principalement la voie induite par les MAPK (mitogen activated protein kinases) ERK1/2, JNK1/2 et p38 $\alpha/\beta$  (Bode and Dong 2003). Ces kinases vont ensuite phosphoryler une panoplie de facteurs de transcription (tels que p53) et autres protéines associées aux réponses génotoxiques comme l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation des dommages à l'ADN et l'apoptose. Il a été démontré que la voie p38 peut jouer des rôles pro- ou anti-apoptotiques d'une manière dépendante de la dose d'UV (Gong, Liu et al. 2010). De plus, l'activation de la voie JNK est nécessaire à l'induction de l'apoptose par les UV. Les voies MAPK pourraient également exercer des fonctions précises sur la progression des cellules selon la phase du cycle cellulaire (Bulavin, Higashimoto et al. 2001, Thornton and Rincon 2009, Gutierrez, Tsuji et al. 2010). En ce qui est trait à la NER, le rôle de la voie MAPK dans la régulation de cette voie de réparation reste encore contradictoire. En effet, il a été montré que les MAPKs ne régulent pas la réparation des dommages à l'ADN induits par les UV par la GG-NER (Rouget, Auclair et al. 2008), tandis que d'autres études ont montré que ces kinases sont requises pour le recrutement des facteurs de la voie NER (Zhao, Barakat et al. 2008, Wang, Han et al. 2013).

Tout comme les voies MAPK, les UV peuvent induire l'activation d'autres voies de signalisation cytoplasmiques. Il est important de souligner que la voie du contrôle de survie cellulaire PI3K/Akt peut être également activée en réponse aux UV (voir les détails en deuxième partie) (Wan, Wang et al. 2001). De même, l'activation de NF- $\kappa$ B a été aussi



identifiée en réponse aux UV (Wu, Tan et al. 2004) d'une manière indépendante des dommages (Devary, Rosette et al. 1993).

### **Le rôle de p53 dans la régulation de la réponse cellulaire aux UV**

Il semble que ces deux types de voie de signalisation nucléaire et extranucléaire soient induites indépendamment l'une de l'autre, mais elles participent à la réponse cellulaire d'une manière additive. Ces deux voies, toutes les deux, mènent à l'activation de multiples facteurs de transcription. Un de ces facteurs protégeant les cellules contre les dommages induits par les UV est p53. Il est bien établi que l'exposition aux UV provoque une induction de p53 d'une manière dépendante de la dose et du temps d'exposition. Comme il fut précédemment évoqué, p53 peut être phosphorylé par les voies MAPK et les voies ATM/ATR en réponse aux UV (Bulavin, Saito et al. 1999, Tibbetts, Brumbaugh et al. 1999, She, Chen et al. 2000). Cette régulation positive induit une réponse protectrice contre les dommages à l'ADN par transactivation des gènes d'arrêt du cycle cellulaire, de réparation d'ADN ou des gènes impliqués dans la réponse apoptotique (Davenport, Morris et al. 1999, Decraene, Agostinis et al. 2001). Tout comme la phosphorylation de p53, l'ubiquitine ligase MDM2, régulateur négatif de p53, peut être phosphorylée à la sérine 395 par ATM et à la sérine 407 par ATR en réponse au stress génotoxique, conduisant à la stabilité de p53 et la réduction de sa dégradation (Maya, Balass et al. 2001, Shinozaki, Nota et al. 2003). Cela résulte en une activation de p53 et sa participation au contrôle du cycle cellulaire, de l'apoptose et la régulation de la NER.

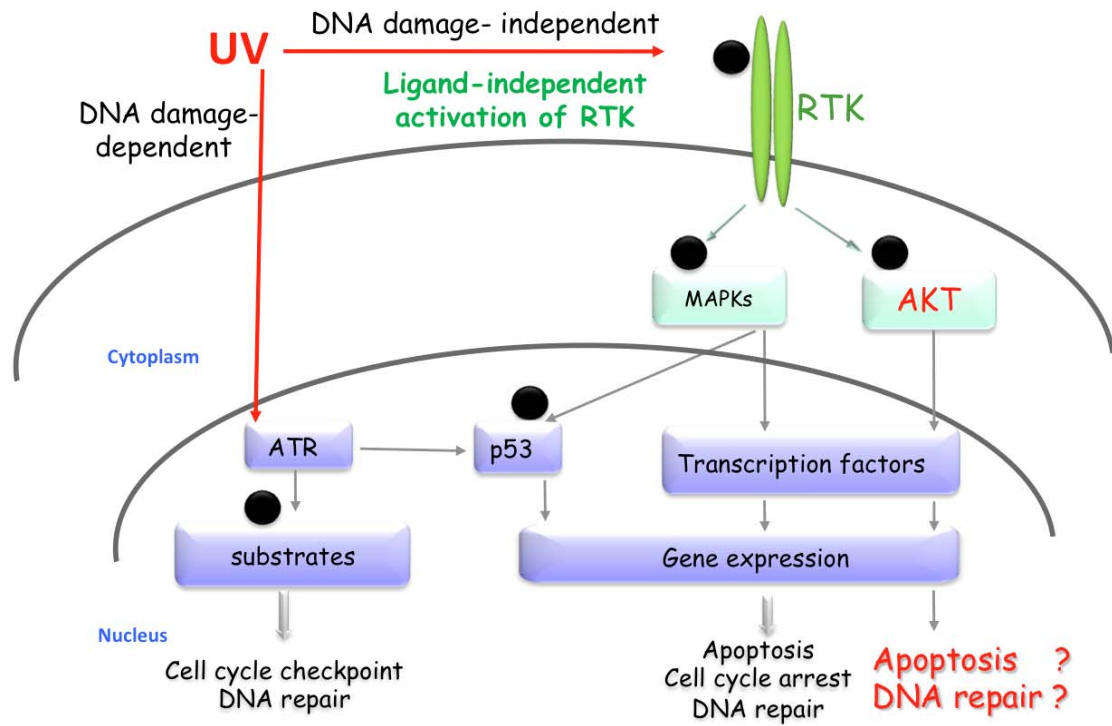
**Arrêt du cycle cellulaire.** Il est bien établi que p53 joue un rôle important dans ce processus en réponse aux UV. Il a été observé que les cellules exposées à faibles doses d'UV

promeuvent un arrêt modéré en phase G1 du cycle cellulaire d'une manière dépendante du p53 (Chang, Chen et al. 1999). De même, il a été démontré que durant l'inhibition de la prolifération cellulaire par p53, p21 (inhibiteur de la kinase cycline-dépendante 1) peut inhiber la réplication d'ADN (Waga, Hannon et al. 1994). Bien que p53 est capable de réguler la transition G2/M (Agarwal, Agarwal et al. 1995, Stewart, Hicks et al. 1995), il a été rapporté que les UV induisent l'accumulation des cellules en phase G2 d'une manière indépendante du p53 (Herzinger, Funk et al. 1995). En effet, il a été montré que l'inhibition de p53 n'induit pas une diminution du bloc des cellules en G2, au contraire il le favorise et le renforce (Ceraline, Deplanque et al. 1997).

**La régulation de la voie de réparation NER.** Étant donné sa fonction suppresseur de tumeur, Il est important de souligner que p53 est nécessaire pour une réparation efficace des photo-dommages à l'ADN principalement par la voie GG-NER, et semble être requis pour l'activité TC-NER (Ford and Hanawalt 1995). Il fut démontré que p53 est important dans le processus de la NER en ce qui est trait à l'élimination des CPDs, et non pas celle des 6-4PPs (Adimoolam, Lin et al. 2001, Ferguson and Oh 2005).

**Apoptose.** Il est communément admis que les photo-lésions non réparées constituent un signal primordial de l'induction d'apoptose suite aux irradiations UV. Notamment, les cellules déficientes en NER montrent une sensibilité extrême à la mort cellulaire en réponse aux UV (Meunier, Sarasin et al. 2002, Lehmann 2003). P53 induit l'apoptose par (i) la régulation des protéines de la famille Bcl-2, citant l'exemple de la répression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Knezevic, Zhang et al. 2007), et (ii) l'induction d'une protéine impliquée dans l'apoptose GADD45. Cela conduit à l'augmentation du ratio Bax : Bcl-2. Ces évidences

montrent clairement que les gènes permettant l'apoptose sont induits à fortes doses d'UV (Latonen, Taya et al. 2001).



**Figure 1: Représentation schématique de l'activation des voies de signalisation par les UV: la réponse aux UV**

## **Introduction 2 : Les bases moléculaires du développement de mélanome**

### **Le mélanome malin**

Le mélanome malin représente la forme la plus agressive des cancers de peau dont l'incidence augmente à un taux inquiétant, particulièrement dans la population caucasienne (Purdue, Freeman et al. 2008). D'après la société américaine du cancer, le risque de développer le mélanome augmente à 2% chez la population blanche, 0.5% chez les hispaniques et 0.1% chez la population noire (American Cancer Society, 2012). Bien que le carcinome spinocellulaire et le carcinome basocellulaire, connus tous les deux sous le nom de « cancer de peau non-mélanome », soient les types les plus fréquents du cancer de peau, le taux de mortalité est faible comparativement aux mélanomes qui sont de gravité particulière. Au Canada, en 2013, il y a eu 6000 cas de mélanome, dont 1050 en sont morts (Société canadienne du cancer, 2013). Ce type de cancer peut survenir à tout âge en dehors des enfants chez qui le mélanome est exceptionnel. Ainsi, le risque d'être atteint du mélanome est un peu plus important chez l'homme que la femme. Au Canada, il est représenté par 1 sur 63 chez les hommes et 1 sur 79 les femmes (Société de recherche sur le cancer, 2013).

Le mélanome est une tumeur cutanée maligne dont la gravité est associée à son potentiel de générer des métastases. Il est développé aux dépens des mélanocytes, les cellules de la couche épidermique basale de la peau qui fabriquent le pigment, et il se forme lorsque la croissance de ces cellules est dérégulée. Le traitement du mélanome est fortement associé au stade de sa détection. Un mélanome détecté à un stade précoce fait appel à l'excision par chirurgie qui démontre un taux de survie très élevé. Pourtant, la survie des patients atteints

d'un mélanome à un stade avancé semble être faible, représentant uniquement de 2 à 8 mois de survie après le diagnostic. Certains agents chimiothérapeutiques sont communément utilisés pour traiter le mélanome métastatique, comme l'hydroxyurée et la dacarbazine (DTIC), avec une réponse limitée (par exemple, 10 à 20% de patients répondent à la DTIC) (Eigentler, Caroli et al. 2003). La combinaison de ces agents chimiothérapeutiques avec d'autres agents ayant une activité anti-mélanome (comme les composés du platine) semble améliorer le taux de réponse des patients, mais aussi augmenter la toxicité du traitement (Chin, Garraway et al. 2006).

Les mélanomes sont actuellement regroupés en plusieurs sous-types, en fonction de la présence (mélanome superficiel extensif, lentigo et acral) ou l'absence (mélanome nodulaire) de la phase de croissance radiale, ainsi que par leur localisation et le stade de progression (Barnhill and Mihm 1993, Jhappan, Noonan et al. 2003). Lorsque la croissance est radiale (in situ), le mélanome se manifeste comme une tumeur plate. Mais, le mélanome malin invasif et potentiellement létal est caractérisé par la présence d'un nodule indiquant une croissance verticale, pénétrant la couche supérieure de l'épiderme et le derme sous-jacent (Jhappan, Noonan et al. 2003). Cette invasion des cellules tumorales témoigne une grave atteinte des vaisseaux sanguins et lymphatiques, représentant ainsi un fort risque de métastases.

Comme tout cancer, le mélanome est une maladie multifactorielle, résultante de différentes causes qui interagissent entre elles. Plusieurs facteurs responsables de cette physiopathologie ont été mis en évidence, dont la prédisposition génétique et l'exposition excessive aux ultraviolets représentent les facteurs majeurs. L'ensemble de ces différents facteurs de risque mène à une répartition très inégale des cas de mélanomes.

**Le phototype et les caractéristiques physiques** sont des facteurs de risque pour le développement du mélanome. Le phototype caractérise la sensibilité de la peau aux rayonnements UV. Il comprend la couleur de la peau, des yeux et des cheveux, ainsi que la réaction de la peau face aux coups de soleil. Il existe divers phototypes allant d'une peau et des cheveux clairs (phototypes I, II et III) jusqu'à des peaux et des cheveux plus foncés (phototypes IV, V et VI). Plus le phototype est clair, plus la sensibilité aux rayonnements solaires et le risque de développer un mélanome sont importants (Gandini, Sera et al. 2005, Cummins, Cummins et al. 2006).

**Le nombre de nævi (grains de beauté)** représente aussi un risque de facteur fort et indépendant. Bien que la majorité des mélanomes surgissent spontanément, certains peuvent se développer à partir d'une lésion existante. En effet, 26% des mélanomes se développent sur un nævus préexistant avec 43 % d'entre eux provenant de nævi dysplasiques et 57% d'autres types de nævi (Bevona, Goggins et al. 2003). Le risque de développer un mélanome est d'autant plus élevé que le nombre de nævi existants dans le corps est important (Bauer and Garbe 2003). Les nævi mélanocytaires présents à la naissance ou rapidement après la naissance sont définis comme congénitaux. Ils ont un risque de se transformer en mélanome qui augmente avec leur taille (Watt, Kotsis et al. 2004).

**L'antécédent familial de mélanome** prédispose au risque de développement d'un mélanome. Les individus issus des familles ayant des antécédents de mélanomes sont à fort risque pour le développement de cette tumeur maligne, avec 6 à 12% de tous les cas surviennent dans un cadre familial (pour revue, (Cummins, Cummins et al. 2006)). Un sujet ayant un parent de

premier degré diagnostiqué pour un mélanome est prédisposé au développement du mélanome à 50% relativement à un sujet n'ayant aucun antécédent familial (Olsen, Carroll et al. 2010).

**Les gènes de susceptibilité** confèrent également un risque important de développer le mélanome. Deux gènes très fréquemment mutés dans les mélanomes familiaux ont été mis en évidence: CDKN2A et CDK4. Le gène CDKN2A (cyclin- dépendent kinase inhibitor 2A), situé sur le chromosome 9p21, agit comme un suppresseur de tumeur et exerce un rôle primordial dans la régulation du cycle cellulaire. Les mutations germinales de CDKN2A ont été observées chez 20 -50 % des familles atteintes du mélanome (Goldstein, Chan et al. 2006), alors que juste 0.2-2% de sujets atteints du mélanome de forme sporadique aient des mutations dans ce gène (Aitken, Welch et al. 1999). CDKN2A code pour deux protéines suppresseurs de tumeur: INK4A (aussi appelée p16) et ARF. Ces deux protéines sont négativement impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. INK4A intervient dans le contrôle de la transition G1-S en inhibant la phosphorylation et l'inactivation de Rb (rétinoblastome) médiée par CDK4/6 (Serrano, Hannon et al. 1993, Sherr and Roberts 1999). Ce qui est à la protéine ARF, elle stabilise p53 en inhibant son ubiquitination par mdm2 (HDM2 chez l'humain), ce qui permet à p53 d'agir via l'inhibiteur de cycle cellulaire p21 (Kamijo, Weber et al. 1998). Pourtant, le gène codant pour p53 (TP53) est rarement muté dans les mélanomes (Bennett 2008), ce qui peut s'expliquer par la mutation fréquente du gène CDKN2A, conduisant à l'inhibition de p14ARF et p53. Le second gène de susceptibilité pour le mélanome est le gène CDK4 situé en 12q13 et codant pour la protéine CDK4. Il agit comme un gène oncogène en stimulant la progression du cycle cellulaire via la phosphorylation de Rb (Zuo, Weger et al. 1996). Les mutations dans ce locus ont été retrouvées dans le codon 24 qui est impliqué directement dans la liaison avec p16INK4A

(Goldstein, Struewing et al. 2000). Un autre gène de susceptibilité mis en évidence est le gène MC1R. Il code pour le récepteur transmembranaire de la mélanocortine I. Ce gène est responsable de la pigmentation et de la protection contre les UV via la production de la mélanine. Ses variantes sont associées à un risque accru du mélanome et sont à l'origine d'un phénotype particulier: la présence d'éphélides, une chevelure rousse et une hypersensibilité au soleil (Palmer, Duffy et al. 2000, Nelson and Tsao 2009).

**Les facteurs de risque environnementaux : l'exposition aux ultraviolets.** L'exposition au soleil et plus largement aux rayonnements ultraviolets joue un rôle déterminant dans le développement du mélanome malin, surtout chez les individus à peau blanche. En effet, de nombreuses études épidémiologiques attribuent le rôle critique aux expositions intermittentes au soleil (Walter, King et al. 1999). Bien que le mélanome survienne très rarement avant l'âge de 20 ans, l'exposition au soleil pendant l'enfance, notamment l'exposition intense provoquant les coups de soleil, constitue également un déterminant clé dans l'apparition du mélanome à l'âge adulte. De plus, les individus qui ont passé leur enfance dans des régions ensoleillées sont à risque plus important pour développer un mélanome comparativement aux individus passant leur enfance dans des régions à faible exposition aux rayonnements ultraviolets (Weinstock, Colditz et al. 1989, Autier, Dore et al. 1997). Il est bien évidemment connu que les radiations atteignant la surface de la terre UVA et UVB contribuent relativement au développement du cancer de la peau, en particulier le mélanome (Garland, Garland et al. 2003). Pourtant, il est sujet de controverses à savoir la contribution spécifique de chacune de ces radiations dans la mélanomagenèse (Wang, Setlow et al. 2001, De Fabo, Noonan et al. 2004). Bien que les UVA pénètrent plus profondément dans la peau que les UVB pour atteindre les mélanocytes, la plupart des évidences focalisent sur l'étude des UVB



et montrent ses implications dans l'induction de mélanomes. En effet, l'irradiation chronique aux UVB peut induire des lésions mélanocytaires humaines, y compris le mélanome (Atillasoy, Seykora et al. 1998). De plus, il a été observé que les mélanocytes semblent être plus résistants à des doses physiologiques d'UVB et avoir un potentiel de survie qui est caractéristique de la transformation maligne (Lai, Di Girolamo et al. 2007). En ce qui est trait aux UVA, certaines évidences épidémiologiques et expérimentales ont indiqué que chez l'humain, les radiations UVA peuvent jouer un rôle significatif dans l'induction de mélanomes (Moan, Dahlback et al. 1999).

Concernant l'exposition des individus, dont l'âge ne dépasse pas 30 ans, aux UV des cabines de bronzage et le risque de développement de mélanomes, les résultats obtenus des études réalisées sont contradictoires et non concluantes. Certaines études ont mis en évidence une relation significative entre l'exposition aux UV artificiels et l'augmentation du risque de mélanomes (Walter, Marrett et al. 1990, Westerdahl, Olsson et al. 1994), alors que d'autres études n'ont pas pu trouver une telle relation (Osterlind, Tucker et al. 1988)

### **Aspects génétiques et moléculaires de la mélanomagenèse**

En dépit du rôle important dans la prédisposition aux mélanomes, les mutations dans les gènes CDKN2A et CDK4 représentent seulement une proportion des mélanomes familiaux et sporadiques. Cela indique la présence d'autres gènes pertinents du mélanome. Les progrès techniques de la génétique moléculaire ont beaucoup apporté à la compréhension des aspects et mécanismes moléculaires du développement et de progression du mélanome. Le passage d'un mélanocyte à un mélanome malin est le fruit de l'accumulation d'altérations géniques

apportant un avantage favorable à l'expansion clonale. Ce phénomène met en jeu l'activation d'oncogènes et l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeur qui sont impliqués dans une multitude de voies de signalisation pouvant affecter le contrôle de la prolifération cellulaire et de l'apoptose. Regardons, plus tard, plus en détail les rôles spécifiques des deux voies de signalisation majeures hautement dérégulées dans les mélanomes: les voies MAPKs (mitogen-activated protein kinases) et PI3K (phospho-inositide-3-kinase), ainsi que les mutations des gènes impliqués dans celles-ci.

### **La voie des MAPKs**

La voie de signalisation MAPK est une voie de transduction des signaux hautement conservée et se retrouve chez tous les eucaryotes, de la levure à l'humain. L'activation de cette voie permet la régulation de diverses fonctions cellulaires, y compris la prolifération, la différenciation, et la migration cellulaire. La voie MAPK est l'une des voies les plus potentiellement ciblées dans le mélanome. En effet, l'activation aberrante de cette voie est détectée dans plus de 80% de mélanomes, suite à l'activation d'oncogènes comme NRAS, BRAF, suggérant ainsi son rôle-clé dans la mélanomagenèse (Fecher, Amaravadi et al. 2008). Une méta-analyse a récemment démontré que les mutations du gène *BRAF* sont plus fréquentes lorsque le mélanome survient sur des zones d'exposition au soleil intense et intermittente, alors que les mutations de NRAS paraissent plus fréquentes sur une peau chroniquement exposée au soleil (Lee, Choi et al. 2011).

**N- Ras:** Ras est l'oncogène le plus fréquemment muté dans les cancers humains, avec près de 30% des tumeurs sont porteuses des mutations activatrices (Bos 1989). Il existe trois membres de la famille Ras: NRas, HRas et KRas. Ces protéines Ras sont des oncogènes codant pour

des protéines G associées à la membrane, jouant un rôle de transduction de signaux de croissance et de différenciation extracellulaire (Lowy and Willumsen 1993). Une fois mutées, les protéines Ras perdent l'activité intrinsèque de leurs GTPases ce qui leur permet de rester sous une forme liée au GTP et alors de s'activer d'une manière constitutive. Ceci entraîne la stimulation d'une multitude de voies effectrices, en particulier les voies PI3K et RAF-MEK-ERK (Trahey and McCormick 1987). Les mutations de NRAS sont les plus communes dans les mélanomes alors que KRAS et HRAS sont mutés dans seulement 2% et 1% des cas, respectivement (Milagre, Dhomen et al. 2010).

**B-RAF:** Les protéines Raf sont des sérines/thréonines kinases faisant partie des MAPKKK. Chez les mammifères, elles sont codées par 3 gènes homologues ARAF, BRAF et CRAF dont les fonctions ne sont pas redondantes. Les mutations de BRAF ont été retrouvées dans plusieurs types de cancer. Par ailleurs, le taux le plus important de ces mutations a été observé dans les mélanomes. En effet, une forte association entre les mutations du gène BRAF et le mélanome a été rapportée en 2002 (Davies, Bignell et al. 2002). En ce qui a trait aux deux autres isoformes; ARAF et CRAF, ils ont rarement été retrouvés mutés dans les cancers (Emuss, Garnett et al. 2005, Lee, Soung et al. 2005). Parmi les quarante mutations activatrices de BRAF identifiées, la mutation V600E, affectant la valine en position 600 du domaine catalytique, est la plus commune, représentant 92% des mutations de BRAF retrouvées dans les mélanomes sporadiques, et 82% des naevi bénins (Kumar, Angelini et al. 2003, Pollock, Harper et al. 2003). Cela pourrait s'expliquer en partie par l'implication des mutations BRAF dans la progression d'une forme bénigne en tumeur. La protéine mutée BRAF a une forte activité kinase comparativement à la forme sauvage de BRAF, ce qui stimule la phosphorylation de la protéine ERK et induit une activation anormale de la voie signalisation

cellulaire (Wan, Garnett et al. 2004). L'ensemble de ces événements résulte en une croissance et une survie anormale des mélanomes, deux caractéristiques de transformation maligne.

**TP53:** Les mutations du gène TP53 sont un événement commun dans les cancers (Hollstein, Sidransky et al. 1991). Lorsque ce gène est muté, la protéine p53 devient inactive et les promoteurs de la croissance cellulaire stimulent un développement anarchique des cellules. Il s'agit de l'un des gènes les plus souvent mutés dans les cancers associés aux dommages à l'ADN induits par les UV (Ziegler, Leffell et al. 1993). Les mutations du gène TP53 ont particulièrement été retrouvées dans les sites dipyrimidines (transitions C à T ou CC à TT) dans les cancers de la peau, ce qui pourrait s'expliquer par l'induction directe de ces mutations par les lésions induites par les UV et donc l'implication de TP53 dans le développement du cancer de la peau (Ziegler, Leffell et al. 1993, Nakazawa, English et al. 1994). Bien que 50% des mutations de TP53 ont été identifiées dans divers types de cancer, incluant les cancers de la peau non mélanomes (Benjamin and Ananthaswamy 2007), des études basées sur le séquençage de TP53 ont clairement montré que les mutations de ce gène sont rares dans les mélanomes (9%) (Bennett 2008). Bien qu'il soit rarement muté dans les mélanomes, d'autres gènes impliqués dans la même voie de signalisation semblent être fréquemment mutés et/ou dérégulés dans les mélanomes. Il a été démontré que MDM2 est fréquemment surexprimé dans les mélanomes ce qui entraîne l'inactivation de p53 requise pour le développement tumoral (Jochemsen 2014).

## La voie de signalisation PI3K/Akt

### Structure et expression d'Akt

Les origines de la protéine Akt reviennent à la découverte, par Staal et ses collaborateurs en 1977, d'un rétrovirus Akt-8 isolé à partir d'une lignée de souris qui développait spontanément des lymphomes thymiques. Ce groupe de chercheurs a démontré que le virus Akt-8 codait pour un oncogène dit Akt. Aussi connue sous le nom de protéine kinase B (PKB), il s'agit d'une protéine sérine/thréonine kinase de 56 KDa et membre de la famille des sérines/thréonines kinases AGC (cAMP-dependent protein kinase A/protein kinase G/ protein C). Chez les mammifères, la famille des kinases Akt consiste en trois membres; Akt1, Akt2 et Akt3, aussi connus sous le nom de PKB $\alpha$ , PKB $\beta$  et PKB $\gamma$ , respectivement (Jones, Jakubowicz et al. 1991, Cheng, Godwin et al. 1992, Brodbeck, Cron et al. 1999). Bien que les trois isoformes soient codées par des gènes séparés localisés sur différents chromosomes 14q32 / 19q13/ 1q43, elles partagent une forte similarité structurelle. En effet, elles ont plus que 80% d'homologie au niveau des séquences d'acides aminés (Nicholson and Anderson 2002). Chacun des isoformes d'Akt est formée de trois domaines fonctionnels:

- (i) Un domaine d'homologie pleckstrine (PH) en position N-terminale consistant en 100 acides aminés et permettant les interactions protéine-protéine et protéine-lipide et lie les phospholipides.
- (ii) Un domaine kinase catalytique localisé dans la région centrale de la protéine. Il s'agit des résidus de la thréonine T308, T309 et T305 pour Akt1, Akt2 et Akt3 respectivement. C'est ce domaine kinase qui confère à Akt un fort degré de similarité avec les protéines kinases A et C (PKA et PKC).

(iii) Un domaine régulateur carboxy-terminal contenant un motif hydrophobique, caractéristique de la famille des protéines kinases AGC. Cette région présente des résidus sérines dépendamment de l'isoforme d'Akt S473 (Akt1), S474 (Akt2) et S472 (Akt3).

Les isoformes d'Akt sont différemment distribuées dans divers tissus humains, de telle sorte qu'Akt1 et Akt2 sont largement abondantes presque partout, tandis que l'expression Akt3 semble être plus limitée et restrictive. En effet, Akt1 est exprimée d'une façon prédominante dans le cerveau, le thymus et les testicules (Yang, Tschopp et al. 2003). Akt2 est spécifiquement exprimée dans les tissus qui répondent hautement à l'insuline, tels que le tissu adipeux brun, le muscle squelettique et le foie (Altomare, Lyons et al. 1998). En ce qui est à Akt3, elle est exprimée d'une manière abondante dans seulement le cerveau, les testicules, les poumons, les glandes mammaires et le tissu adipeux (Yang, Tschopp et al. 2003). Or, l'expression de chacun des isoformes n'est pas nécessairement associée à son activité. Dépendamment de la lignée cellulaire, les isoformes d'Akt ont été montrées pour localiser différents compartiments sous-cellulaires. Des études réalisées avec différentes cellules transformées et non transformées ont bien montré que, dans la majorité des cas, Akt1 est localisée dans le cytoplasme, Akt2 dans la mitochondrie, et Akt3 dans le noyau (Santi and Lee 2010).

### **Le contrôle de l'activité d'Akt**

La voie de signalisation PI3K/Akt est activée par différents facteurs, y compris l'exposition aux facteurs de croissance, l'activation de leurs propres récepteurs tyrosine kinase (RTKs) ou les récepteurs couplés à la protéine G et aussi celle des protéines RAS

(Burgering and Coffèr 1995, Franke, Yang et al. 1995, Gupta, Ramjaun et al. 2007). Tout d'abord, la liaison ligand-récepteur entraîne l'activation du récepteur par phosphorylation sur les résidus tyrosines (Ullrich and Schlessinger 1990). Ensuite, ces résidus phosphotyrosines peuvent recruter des protéines possédant le domaine SH-2 (Src homology 2), y compris la kinase phosphoinoside-3 (PI3K). L'ensemble de ces événements contribue à l'activation de PI3K, qui consiste en une sous-unité régulatrice (PI3KR; p85) et une sous-unité catalytique (PI3KC; p110). Une fois l'activité catalytique est stimulée, PI3K phosphoryle les lipides phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2) au niveau de la membrane plasmique, générant ainsi des seconds messagers; les phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) (Vanhaesebroeck and Alessi 2000). Ces phospholipides recrutent à la membrane plasmique les protéines possédant un domaine PH comme la protéine Akt (Takeuchi, Kanematsu et al. 1997). Akt est une protéine cytosolique, maintenue dans un état inactif par une liaison intramoléculaire entre son domaine PH et son domaine kinase. Une fois recrutée à la membrane plasmique, les phosphoinositides provoquent des changements conformationnels d'Akt, ce qui entraîne l'exposition de ses sites de phosphorylation sérine 473 et thréonine 308 (Osaki, Oshimura et al. 2004). Tout d'abord, une sérine/thréonine kinase, PDK1, (phosphoinositide- dependent kinase 1) ayant un domaine PH va phosphoryler Akt sur le résidu T308 (Anderson, Coadwell et al. 1998). La phosphorylation de ce site active partiellement Akt. Par ailleurs, une activation complète requiert également la phosphorylation sur le deuxième résidu S473 (Alessi, Andjelkovic et al. 1996). Le mécanisme de la phosphorylation de la S473 demeure à ce jour controversé. Il semble que certains candidats sont mis en jeu. L'un de ces derniers est PDK2 (protein- dependent kinase 2) dont l'identité n'est pas encore claire. Des évidences récentes ont cependant démontré que le facteur le plus

susceptible de phosphoryler la S473 est le complexe mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2), composé de la sous-unité catalytique de mTOR et de cinq protéines accessoires; Rictor, mSIN1, GβL, Protor, et Deptor (Sarbasov, Guertin et al. 2005, Bozulic and Hemmings 2009). De plus, il a été montré que les kinases ILK (integrin-linked kinase) et DNA-PK peuvent phosphoryler Akt (Delcomenne, Tan et al. 1998, Bozulic and Hemmings 2009). À la suite de son activation, Akt se dissocie de la membrane plasmique et transloque vers le cytoplasme ou le noyau, où elle va phosphoryler à son tour une multitude de substrats afin de réguler différents processus cellulaires. De plus, la translocation d'Akt vers le noyau semble avoir aussi un rôle important dans la régulation de son activité dans le cytoplasme (Kandel and Hay 1999). Akt peut être également activée d'une manière indépendante de PI3K. Il a été rapporté que les agents élevant l'AMP cyclique comme le forskoline, 8-bromo-AMPC et le chlorophenylthio-AMPC peuvent activer Akt via la protéine kinase A (PKA) et que cette induction indirecte ne nécessite que l'activation du résidu T308 (Filippa, Sable et al. 1999). Cependant, la kinase dépendante de Ca<sup>2+</sup>/calmoduline peut directement phosphoryler Akt au site T308 in vitro (Yano, Tokumitsu et al. 1998). D'autres études ont mis en évidence l'activation d'Akt par le stress cellulaire et le choc thermique via l'association avec une petite protéine du choc thermique HSP27 (Konishi, Matsuzaki et al. 1997). De plus, l'activité d'Akt peut être positivement régulée par l'agoniste β-adrénérique, isoprotérenol, d'une manière résistante à l'inhibition de PI3K (Moule, Welsh et al. 1997). L'activité basale d'Akt dans la cellule dépend de l'équilibre entre les facteurs positifs (niveau élevé de PIP3) et les facteurs négatifs qui provoquent l'inactivation d'Akt, suggérant alors qu'il peut y avoir une régulation transitoire de cette kinase.



Akt est négativement régulée par des phosphatases qui ciblent les sites de phosphorylation. PP2A (protein phosphatase 2A) agit comme régulateur négatif de l'activité d'Akt en induisant la déphosphorylation du résidu T308, tandis que les PHLPP (PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase) inhibent l'activité de cette kinase en la déphosphorylant sur le résidu S473 (Resjo, Goransson et al. 2002, Gao, Furnari et al. 2005, Kuo, Huang et al. 2008). Deux isoformes des phosphatases PHLPP ont été mises en évidence; PHLPP1 et PHLPP2, déphosphorylant directement la S473 en régulant les différents isoformes d'Akt. En effet, PHLPP1 déphosphoryle Akt2 et Akt3, tandis que PHLPP2 est spécifique pour Akt1 et Akt3. SHIP (SH2-containing inositol 5-phosphatase) peut également inhiber l'activité d'Akt via l'hydrolyse de PIP3 pour générer PIP2 (Liu, Sasaki et al. 1999). Finalement, il est important de souligner que l'activité d'Akt est principalement inhibée par PTEN (Maehama and Dixon 1998).

Le gène PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten), également nommé MMACI (mutated in multiple advanced cancers) ou TEPI (TGF- regulated and epithelial cell-enriched phosphatase), est un gène suppresseur de tumeur majeur localisé sur le long bras du chromosome 10, en 10q23 (Li and Sun 1997). La protéine encodée par ce gène agit comme un suppresseur de tumeur en régulant diverses fonctions biologiques; la division cellulaire, la migration, et l'apoptose (Stambolic, Suzuki et al. 1998, Cheney, Neuteboom et al. 1999, Huang, Cheville et al. 2001). PTEN possède à la fois une activité phosphatase lipidique et phosphatase protéique. Or, c'est l'activité phosphatase lipidique qui semble être la fonction majeure de cette phosphatase. La fonction phosphatase lipidique de PTEN semble avoir un rôle important dans la tumorigenèse. En effet, PTEN agit comme antagoniste de la voie PI3K/Akt en catalysant la déphosphorylation du 3' phosphate de la boucle inositol de

PIP3, générant ainsi un produit biphosphate PIP2 et l'inhibition de l'activité d'Akt (Maehama and Dixon 1998). En ce qui est à la fonction phosphatase protéique, PTEN peut déphosphoryler FAK ou kinase d'adhésion focale, et inhiber l'activité de la voie MAPK, empêchant ainsi l'adhésion et la migration cellulaire (Tamura, Gu et al. 1998).

### **Effets biologiques de l'activation de la voie PI3K/Akt**

Akt activée joue un rôle primordial dans de nombreux processus cellulaires tels que la survie cellulaire, la prolifération, le contrôle du cycle cellulaire, le métabolisme cellulaire, en phosphorylant divers substrats contenant le motif consensus R-X-R-X-X-S/T (Manning and Cantley 2007). L'analyse de ce motif a rapporté l'existence des milliers de cibles pour Akt dont juste 60-70 sont bien connues à ce jour. Akt régule négativement ou positivement ses substrats en affectant leur fonction, localisation cellulaire ou leur stabilité. En revanche, l'activation aberrante de cette kinase proto-oncogénique peut conduire au développement du cancer ainsi que d'autres maladies comme le diabète (Hers, Vincent et al. 2011).

### **Akt et survie cellulaire**

La promotion de la survie cellulaire est la fonction de la voie Akt la plus étudiée. L'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt déclenche des signaux de survie permettant à la cellule de résister aux stimuli apoptotiques. Akt permet l'inactivation par phosphorylation des protéines pro-apoptotiques dont Bad est la première à être découverte (voir **figure 2**). Bad est un membre de la famille des protéines Bcl-2 qui lie les protéines BCL-2 ou BCL-XL et inhibe leur potentiel anti-apoptotique. Cependant, lorsque la protéine Bad est phosphorylée sur la sérine136 par Akt, elle se dissocie de Bcl-2 ou Bcl-XL localisés sur la membrane mitochondriale, et forme un complexe avec les protéines 14-3-3 dans le cytosol, résultant en

une inhibition de l'apoptose (Datta, Dudek et al. 1997, Datta, Ranger et al. 2002). De même, des facteurs de transcription de la famille forkhead (FKHR/FoxO1, FoxO2, FKHL1/FoxO3 et AFX/FoxO4) sont également phosphorylés par Akt menant à leur exclusion du noyau et leur inactivation (voir **figure 2**). Une fois phosphorylées sur les résidus T24 et S256, les protéines FOXO lient les protéines 14-3-3 et forme, donc, un complexe retenu dans le cytosol (Tzivion, Dobson et al. 2011, Zhang, Tang et al. 2011). L'ensemble de ces événements contribue au blocage de la transcription des gènes requis pour l'induction de l'apoptose comme TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), le ligand Fas et TRADD (TNF receptor type 1 associated death domain) (Brunet, Bonni et al. 1999). Lors de l'induction d'apoptose, la cellule déclenche une cascade de protéases de la famille des caspases initiée par la caspase-9 qui est activée à partir de la pro-caspase-9. Par conséquent, l'activation d'Akt induit la phosphorylation de ces pro-caspases-9 sur la S196 menant à la diminution de leur activité protéase in vitro (Cardone, Roy et al. 1998) (voir **figure 2**). D'autres cibles promouvant la survie cellulaire ont été également activées par phosphorylation, incluant IKK $\alpha$  (inhibitor of kappa B kinase- $\alpha$ ), qui à son tour phosphoryle et dégrade l'inhibiteur du facteur NF $\kappa$ B, I $\kappa$ B (voir **figure 2**). Ceci provoque la translocation nucléaire et l'activation de NF $\kappa$ B, menant alors à la transcription des gènes de pro-survie, comme les gènes codant pour les inhibiteurs des protéines apoptotiques IAP1 et IAP2 (Romashkova and Makarov 1999). D'une manière indirecte, Akt inhibe la fonction de la protéine pro-apoptotique p53 via l'activation de l'ubiquitine ligase Mdm2 (Murine double minute 2). En effet, Akt phosphoryle Mdm2 sur la S166 et S186, ce qui va promouvoir sa translocation vers le noyau, là où elle va induire l'ubiquitination et la dégradation de p53 (Feng, Tamaskovic et al. 2004) (voir **figure 2**). De plus, l'activité du facteur de transcription CREB (cyclic AMP-response element binding

protein) est régulée positivement via sa phosphorylation sur la S133 par Akt, permettant ainsi l'augmentation de la transcription des gènes anti-apoptotiques incluant Mcl-1 (Du and Montminy 1998, Wang, Chao et al. 1999).

### **Akt et régulation du cycle cellulaire**

La voie de signalisation Akt peut également affecter la prolifération cellulaire par la régulation des protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire, soit par phosphorylation directe des cibles elles-mêmes ou indirectement par la régulation des niveaux d'expression des protéines. Akt peut contrôler indirectement la stabilité des promoteurs de la progression cellulaire, cyclin D1 et c-Myc, via l'inactivation de son substrat GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3). En effet, GSK3 $\beta$  phosphoryle cyclin D1 sur T286 et Myc sur T58, ce qui induit leur export nucléaire et leur dégradation par ubiquitination, causant l'arrêt du cycle cellulaire en G1 (Diehl, Cheng et al. 1998, Gregory, Qi et al. 2003). Akt peut également réguler positivement l'activité des cyclin/Cdk via la phosphorylation et l'inactivation des inhibiteurs de Cdks, incluant p21<sup>Cip/Waf1</sup> et p27<sup>KIP1</sup> (voir **figure 2**). Elle phosphoryle p21 sur deux résidus T145 et S146. La phosphorylation de T145 résulte au recrutement de p21 du noyau au cytoplasme et la suppression de son effet inhibiteur de la progression du cycle cellulaire (Xia, Chen et al. 2004), tandis que, la phosphorylation du site S146 entraîne l'assemblage et l'activation du complexe de la transition G1/S, cyclin D-Cdk4 (Li, Dowbenko et al. 2002). De même, p27 peut aussi être phosphorylé par Akt sur le site T157 et relocalisé au cytoplasme, ce qui empêche alors sa liaison avec les substrats nucléaires Cdk2/cyclin E et Cdk2/cyclin A afin d'induire la progression du cycle cellulaire (Shin, Yakes et al. 2002). En ce qui est trait à la régulation de la transition G2/M du cycle cellulaire, il a été rapporté que la protéine Akt phosphoryle, sur le site S353, le membre de la famille des

phosphatases à double spécificité Cdc25B qui joue un rôle important dans le contrôle de l'activité des Cdk1/cyclin B. Ceci entraîne l'accumulation cytoplasmique et donc l'inactivation de Cdc25B (Baldin, Theis-Febvre et al. 2003). Récemment, une étude a suggéré qu'Akt peut également réguler la progression G2/M via la phosphorylation de Cdk2 sur T39 et sa translocation cytoplasmique temporaire requise pour la progression du cycle cellulaire de la phase S à G2/M (Maddika, Ande et al. 2008). De même, Akt phosphoryle et inhibe deux cibles majeures impliqués dans l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire; Chk1 (p-S280) et TopBP1 (p-S1159) (voir **figure 2**).

### **Akt et croissance cellulaire**

L'implication d'Akt dans la croissance cellulaire, augmentation de la synthèse protéique, a également été mise en évidence. Tout d'abord, suite à son activation, Akt active phosphoryle TSC2 (tuberous sclerosis complex 2) et entraîne la dissociation du complexe TSC1/TSC2 impliqué dans le contrôle négatif de la kinase mTOR (mammalian target of rapamycin) (voir **figure 2**). L'ensemble de ces événements contribue à l'activation de mTOR et donc à la stimulation la synthèse protéique (Sekulic, Hudson et al. 2000). Ensuite, mTOR va phosphoryler deux protéines effectrices: «70-kDa ribosomal protein S6 kinase» (P70S6K) et «4E-binding protein 1» (4E-BP1). 4E-BP1 joue un rôle important dans la traduction de l'ARNm, tandis que p70S6K permet l'augmentation de la biogenèse des ribosomes (Fingar, Salama et al. 2002, Tee, Fingar et al. 2002).

### **Akt et métabolisme du glucose**

Akt peut jouer un rôle dans la régulation du métabolisme du glucose en activant le transport du glucose via l'induction de l'expression des transporteurs GLUT1 et GLUT3 et le recrutement de GLUT4 à la membrane plasmique (Kohn, Summers et al. 1996, Hajduch,

Alessi et al. 1998, Barthel, Okino et al. 1999). Elle active également la synthèse du glycogène via la phosphorylation et l'inactivation de GSK3 $\beta$  (Cross, Alessi et al. 1995).

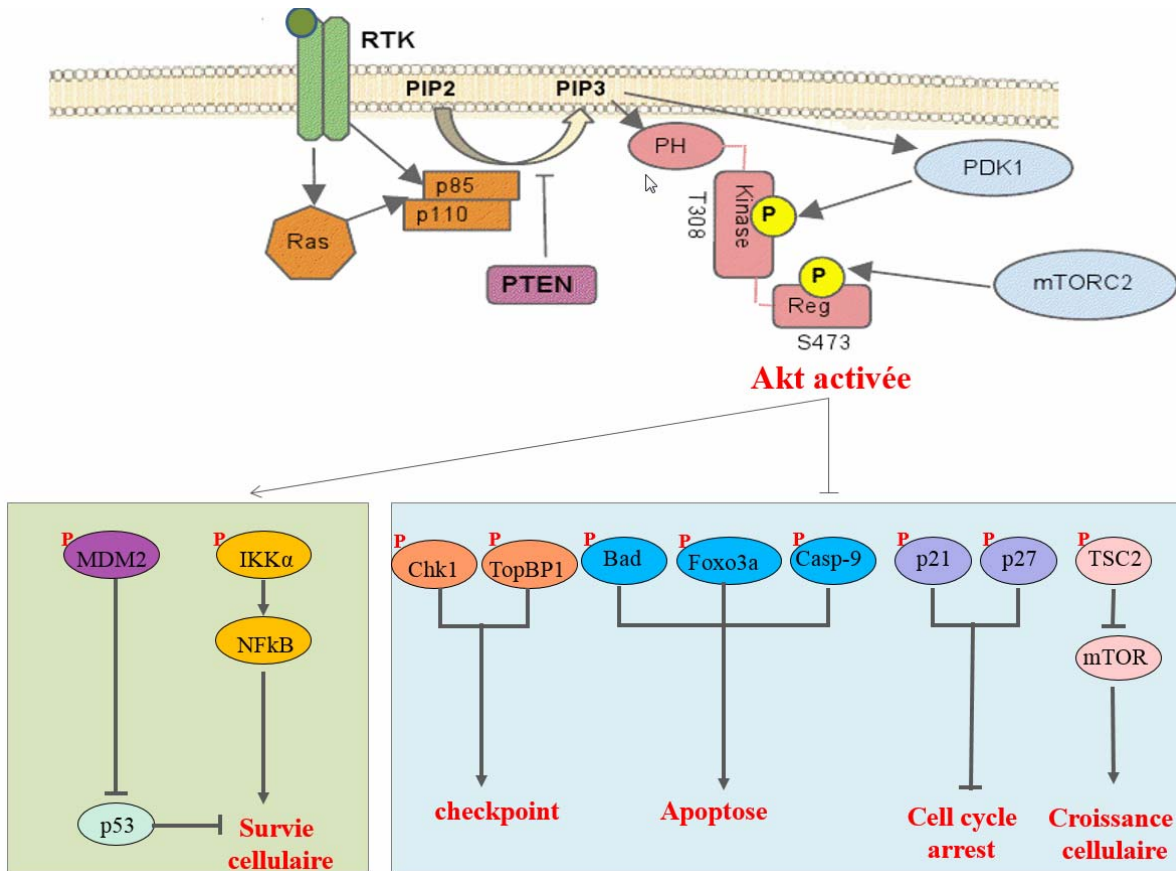


Figure 2: La voie de signalisation PI3K/Akt

## **Les fonctions biologiques spécifiques des isoformes d'Akt**

Bien que les isoformes d'Akt soient très homologues en termes de séquence, multiples études menées sur des souris déficientes en un des trois isoformes suggèrent que les différentes isoformes d'Akt jouent distincts rôles biologiques. Il a été rapporté que les souris Akt1<sup>-/-</sup> montrent un retard de croissance et une augmentation d'apoptose, ainsi qu'une mortalité néonatale (Chen, Xu et al. 2001, Yang, Tschopp et al. 2003). En ce qui est à Akt2, il a été montré que les souris Akt2<sup>-/-</sup> sont résistantes à l'insuline et donc atteignent des syndromes du diabète type 2 (Cho, Mu et al. 2001, Garofalo, Orena et al. 2003). D'autres études ont démontré que les souris déficientes en Akt3 ont un cerveau plus petit que celui des souris sauvages (Easton, Cho et al. 2005, Tschopp, Yang et al. 2005). L'ensemble de ces études suggère donc qu'Akt1 est principalement importante pour la survie cellulaire, Akt2 est importante pour l'homéostasie du glucose, tandis qu'Akt3 joue un rôle clé dans le développement du cerveau (Gonzalez and McGraw 2009). Des études avec des souris transgéniques ont été réalisées afin d'évaluer le chevauchement des fonctions des trois isoformes. Par exemple, la déficience simultanée en Akt1 et Akt3 provoque la létalité embryonnaire causée par des défauts intenses du développement du système nerveux et cardiovasculaire (Yang, Tschopp et al. 2005).

## **Dérégulation de la voie PI3K/Akt dans le mélanome malin**

Des évidences ont rapporté que seules les mutations activatrices dans BRAF ne pourraient pas expliquer la pathogenèse du mélanome. Comme évoqué précédemment, les mutations activatrices BRAF et NRAS sont présentes dans un taux élevé des naevi bénins et ont un

faible potentiel dans la transformation maligne (Pollock, Harper et al. 2003, Poynter, Elder et al. 2006). De plus, certaines évidences ont rapporté que certaines tumeurs et lignées cellulaires sont résistantes aux inhibiteurs de BRAF et continuent à survivre, ce qui pourrait expliquer la contribution d'autres voies de survie alternatives dans la pathogenèse de mélanomes et donc la nécessité d'autres interventions thérapeutiques (Nazarian, Shi et al. 2010, Villanueva, Vultur et al. 2010).

Une voie candidate est la voie de signalisation PI3K/Akt. En effet, pour stimuler le développement du mélanome, l'activation de la cascade de signalisation BRAF-MAPK nécessite une activation simultanée de la voie PI3K/Akt. L'activation aberrante ou la présence des mutations au niveau des composants de la voie PI3K/Akt a été observée fréquemment dans divers types de cancers (Staal 1987, Li, Yen et al. 1997, Samuels, Wang et al. 2004). Il semble bien que l'activation de cette cascade signalétique est associée avec le stade tumoral, jouant ainsi un rôle important dans les processus d'invasion et de métastases. En effet, elle est activée dans 17% des naevi, 49% des mélanomes primaires et 77% des mélanomes métastatiques (Dai, Martinka et al. 2005). Les mutations de la protéine PI3K elle-même est rare dans les mélanomes (Omholt, Krockel et al. 2006). Par contre, au niveau protéique, PI3K est fréquemment surexprimé dans les mélanomes. Il existe aussi des mutations activatrices dans des molécules qui sont mises en jeu dans l'activation de la voie PI3K/Akt. Contrairement à BRAF, NRAS peut aussi activer la voie PI3K/Akt et ses mutations ponctuelles ont été identifiées dans environ 15% de mélanomes. De plus, des mutations somatiques dans ERBB4, membre de la famille des EGFR, ont été détectées dans ~20% des mélanomes (Prickett, Agrawal et al. 2009). Par ailleurs, dans les mélanomes, la suractivation d'Akt et la perte de PTEN sont les événements les plus communs qui sont bien étudiés.



PTEN a été retrouvé muté et inactivé dans une large fraction de cancers (Li, Yen et al. 1997, Steck, Pershouse et al. 1997). Toutes ces altérations résultent en une activation aberrante de la voie PI3K, et donc à une suractivation de la protéine kinase Akt, ce qui est caractéristique des cancers (Stambolic, Suzuki et al. 1998, Suzuki, de la Pompa et al. 1998). Des études fonctionnelles ont mis en évidence le rôle clé de PTEN dans le développement de mélanomes. En effet, le gène PTEN peut être altéré dans les mélanomes via plusieurs mécanismes, y compris la perte allélique dans 23% de mélanomes, l'altération de l'expression dans 19% des tumeurs, ou les délétions d'un seul allèle et l'inactivation du gène dans 57-60% des lignées cellulaires de mélanomes (Pollock, Walker et al. 2002, Goel, Lazar et al. 2006). De plus, l'expression ectopique du gène PTEN dans des cellules de mélanomes montre une inhibition de la croissance cellulaire, impliquant fortement la fonction suppressive de tumeur de PTEN dans le développement de cette malignité (Robertson, Furnari et al. 1998). Plusieurs études ont mis en évidence l'interaction de la perte de PTEN avec d'autres mutations dans les mélanomes. Les mutations de PTEN sont souvent détectées dans les tumeurs et lignées cellulaires de mélanomes mutées pour BRAF (Tsao, Goel et al. 2004). Il a été démontré que la délétion de PTEN dans des souris transgéniques mutées pour BRAF peut mener au développement de mélanomes malins (Dankort, Curley et al. 2009). Cependant, les mutations de NRAS sont exclusives avec des mutations PTEN en raison de l'activation redondante de la voie PI3K/Akt (Tsao, Zhang et al. 2000). Mais, d'une façon étonnante, le niveau d'activation d'Akt est plus élevé dans les tumeurs et les lignées cellulaires de mélanomes à faible taux de PTEN que dans celles mutées pour NRAS (Davies, Stemke-Hale et al. 2009).

De même, l'activation anormale de la protéine kinase Akt a également été détectée dans les cancers humains. En effet, Akt est fréquemment hyperphosphorylée dans les naevi dysplasiques et les mélanomes, contrairement aux naevi normaux (Dhawan, Singh et al. 2002). D'une manière importante, Akt1, Akt2 et Akt3 ont été retrouvées surexprimées ou hyperphosphorylées dans différents types de cancer. En effet, l'amplification d'Akt1 a été rapportée dans les adénocarcinomes gastriques primaires (Staal 1987), tandis qu'Akt2 a été retrouvée surexprimée et amplifiée dans le cancer du sein, de l'ovaire et du pancréas (Bellacosa, de Feo et al. 1995, Ruggeri, Huang et al. 1998). Il semble qu'Akt3 est la forme la plus dérégulée dans les mélanomes, pourtant, la raison de cette sélectivité n'est pas encore connue à ce jour. En effet, une activation forte et sélective de cette isoforme a été détectée dans 40-63% de mélanomes sporadiques métastatiques et est due à l'augmentation du nombre de copies du gène Akt3 ou à la sur-régulation d'Akt3 via la perte de PTEN (Madhunapantula and Robertson 2009). De plus, la phosphorylation d'Akt3 semble corrélérer avec la progression du mélanome suggérant ainsi son rôle dans l'agressivité de cette malignité (Stahl, Sharma et al. 2004).

Plusieurs études ont bien mis en évidence l'importance potentielle du ciblage thérapeutique de la voie PI3K/Akt dans l'inhibition de la croissance tumorale et la chimiosensibilisation. Il existe différentes classes d'inhibiteurs qui sont développés contre les différents composants de la cascade de signalisation PI3K/Akt, incluant les inhibiteurs de la kinase PI3K (comme le wortmannin), les inhibiteurs de mTORC1 (rapamycine) et les inhibiteurs d'Akt (MK-2206) (Brognard, Clark et al. 2001, Sinnberg, Lasithiotakis et al. 2009, Hirai, Sootome et al. 2010, Isosaki, Nakayama et al. 2011). Bien qu'il soit en phase clinique II, MK-2206, un inhibiteur allostérique d'Akt, montre une efficacité particulière (Hirai, Sootome et al. 2010). De même,

d'autres inhibiteurs d'Akt comme le périfosine ont été testés et ne semblent pas être efficaces pour traiter le mélanome car ils ont montré des limitations pharmaceutiques (Ernst, Eisenhauer et al. 2005). Récemment, une étude a rapporté l'efficacité thérapeutique des inhibiteurs de la voie Akt3, les isoselenocyanates synthétiques, dans l'inhibition de la survie cellulaire et du potentiel tumoral du mélanome (Sharma, Sharma et al. 2009).

### **Activation et rôles de la voie nucléaire PI3K/Akt dans la réponse aux dommages à l'ADN**

Afin de se protéger contre l'accumulation des mutations, la cellule promouvoit des réponses protectives comme l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation ainsi que l'apoptose. De même, pour maintenir l'intégrité tissulaire, la cellule active d'autres mécanismes par lesquels elle peut survivre sous stress génotoxique. Parmi ces mécanismes, nous citons l'activation de la voie de survie PI3K/Akt.

La voie de signalisation PI3K/Akt a très tôt montré sa capacité d'être activée non seulement par des facteurs de croissance, mais aussi en réponse au stress génotoxique. En effet, Akt semble être activée par certains agents endommageables à l'ADN incluant le cisplatine, les radiations ionisantes (IR), ainsi que les UV (Wan, Wang et al. 2001, Zhang, Maddock et al. 2001, Zingg, Riesterer et al. 2004, Winograd-Katz and Levitzki 2006). En ce qui est aux UV, l'activation d'Akt par phosphorylation est transitoire et dépendante des récepteurs tyrosine kinase EGFR (Wan, Wang et al. 2001). De même, il a été démontré qu'en réponse aux UVB, l'expression de PTEN s'affaiblit dans les kératinocytes épidermiques ce qui corrèle avec l'activation d'Akt (Ming, Han et al. 2010). Comme il fut déjà précisé, Akt peut se transloquer vers le noyau, là où elle peut phosphoryler une multitude de substrats nucléaires. Donc, ce n'est pas surprenant qu'Akt nucléaire puisse être mise en jeu dans la

régulation des réponses cellulaires induites par le stress génotoxique. Il a été rapporté que les membres de la famille PIKK; ATM, ATR et DNA-PK sont impliqués dans l'activation d'Akt en réponse aux dommages à l'ADN, y compris ceux induits par IR, afin d'assurer les signaux de survie cellulaire (Vinięra, Martinez et al. 2005, Bozulic, Surucu et al. 2008, Caporali, Levati et al. 2008).

Certaines études suggèrent le rôle d'Akt dans la modulation de la réparation des dommages à l'ADN et du contrôle du cycle cellulaire. L'activation d'Akt semble réguler négativement l'arrêt du cycle cellulaire induit par les dommages à l'ADN. Il a été démontré qu'en réponse aux agents génotoxiques comme les radiations ionisantes, l'activation d'Akt peut supprimer l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 et exercer son potentiel anti-apoptotique indépendamment du statut de p53 (Kandel, Skeen et al. 2002). Comme fut précédemment évoqué, Chk1 s'active en réponse au stress génotoxique d'une manière dépendante d'ATR pour favoriser l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M et aussi lors de la réplication d'ADN. Cette kinase peut être directement phosphorylée par Akt sur la S280, induisant sa séquestration cytoplasmique et donc l'inhibition de son activation par ATR sur la S345 (King, Skeen et al. 2004). Le même phénotype a été observé dans des cellules déficientes en PTEN en réponse aux radiations ionisantes (Puc, Keniry et al. 2005). De plus, la protéine TopBP1 (DNA topoisomérase 2 binding protein 1) a été également identifiée comme cible importante d'Akt. TopBP1 joue un rôle important dans la réplication d'ADN et le contrôle du cycle cellulaire (Garcia, Furuya et al. 2005). Suite à l'exposition aux agents génotoxiques, TopBP1 interagit avec ATR afin de stimuler son activité (Kumagai, Lee et al. 2006). Cependant, la phosphorylation de TopBP1 sur la S1159 par Akt prévient son association avec ATR. L'ensemble de ces événements résulte, alors, en une inhibition de l'activation d'ATR et de

l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M (Pedram, Razandi et al. 2009). Dans des modèles souris, l'activation du récepteur épidermique Erbb2 (epidermal growth factor receptor 2) suite aux radiations UVB/UVA conduit à la progression du cycle cellulaire d'une manière dépendante de la phosphorylation de chk1 par Akt et aussi via le maintien du régulateur du cycle cellulaire Cdc25a (Madson, Lynch et al. 2009). De même, l'exposition des kératinocytes humaines aux radiations UVB et UVA inhibe l'arrêt du cycle cellulaire en G1/S d'une manière dépendante de EGFR et Akt (He, Council et al. 2008, Han and He 2009).

En ce qui est à la réparation des dommages à l'ADN, plusieurs évidences ont montré qu'Akt peut être mise en jeu dans la régulation de l'efficacité de ce processus. En réponse aux radiations, l'inhibition d'Akt réduit la phosphorylation d'une kinase impliquée dans la réparation des DSBs via la voie NHEJ, DNA-PK, sur la T2609 et S2056, ce qui implique le rôle d'Akt dans l'activation de DNA-PK et la réparation de dommages à l'ADN via la voie NHEJ (Toulany, Kehlbach et al. 2008, Golding, Morgan et al. 2009). Contrairement à la voie NHEJ, la voie de la recombinaison homologue (HRR), qui est une deuxième voie de réparation des DSBs, semble être négativement régulée par Akt. Il a été observé que dans des lignées cellulaires du cancer de sein exprimant un haut niveau d'Akt1 phosphorylé, l'induction de la voie HRR en réponse aux IR est très faible comparativement aux cellules avec un faible niveau d'Akt1 (Plo, Laulier et al. 2008). Quant au NER, le rôle de la voie PI3K/Akt dans la régulation de cette voie de réparation des photo-produits est peu caractérisé et reste à date un sujet de controverses. Récemment, des évidences ont montré que la perte de PTEN et l'activation d'Akt régulent négativement la NER en réponse aux UVB (Ming, Feng et al. 2011). De même, d'une manière spécifique à chacune des phases du cycle cellulaire, il a été démontré que la kinase ATR est un régulateur majeur de la NER exclusivement en phase S

(Auclair, Rouget et al. 2008). En raison de l'inactivation d'ATR via la phosphorylation de Chk1 par Akt, il est potentiellement possible qu'Akt puisse également réguler l'activité de la NER. Par ailleurs, d'autres études ont impliqué le rôle d'Akt dans la régulation positive de la NER. Très récemment, il a été montré que, lors de l'induction des lésions par les UV, p300 va être phosphorylé sur la S1834 par les kinases Akt et p38 MAPK et dégradé afin de permettre aux protéines de la voie NER à être recrutées (Wang, Han et al. 2013). P300 est un cofacteur de transcription qui est, tout d'abord, recruté au niveau des sites de dommages à l'ADN induits par les UV d'une manière dépendante de p53 afin de permettre la relaxation de la chromatine (Rubbi and Milner 2003).

Concernant la survie cellulaire, certaines études ont suggéré le rôle d'Akt dans l'inhibition de l'apoptose induite par le stress génotoxique. Les niveaux de PTEN ont été retrouvés réduits dans les kératinocytes épidermiques d'une manière dépendante des caspases dans les cellules apoptotiques, et aussi dépendamment de l'activation d'ERK/Akt dans les cellules vivantes (Ming, Han et al. 2010). Ainsi, p51, un des membres de la famille de p53, peut induire également le blocage de l'apoptose des kératinocytes induite par les UV d'une manière dépendante de sa phosphorylation par Akt (Ogawa, Okuyama et al. 2008). Certaines études ont démontré que l'inhibiteur pharmacologique de la voie Akt, périfosine, renforce l'induction de l'apoptose par les radiations ionisantes et les ultraviolets dans des cellules cancéreuses de la prostate et des fibroblastes et kératinocytes, respectivement (Gao, Ishiyama et al. 2011, Ji, Yang et al. 2012). Il a été aussi rapporté que les fibroblastes de souris embryonnaires déficients en Akt2, et non pas en Akt1, montrent une hypersensibilité aux radiations UV, ce qui suggère le rôle d'Akt2 dans la promotion de la survie cellulaire (Kim, Kim et al. 2009).

## **Hypothèse et objectifs**

En dépit du rôle de la voie Akt dans la régulation de divers processus comme la survie et la prolifération cellulaire et son activation dans les cancers, son implication dans la réponse aux UV reste beaucoup moins caractérisée et étudiée. La nécessité de l'activation normale de cette voie proliférative pour induire une homéostasie à l'échelle cellulaire face au stress, révèle la nécessité d'étudier l'importance de sa sur-activation en réponse aux dommages induits par les UV. Il a été déjà mis en évidence une forte corrélation entre la sur-activation de la voie oncogénique Akt et le développement de mélanomes. Plus précisément, l'activation de l'isoforme Akt3 semble augmenter le potentiel tumoral dans les cellules de mélanome. De plus, en raison du rôle crucial des UV dans le développement de mélanomes, il se pourrait d'ailleurs que l'activation de la voie Akt dans les mélanomes interfère avec son activation et son importance dans la réponse aux UV. Finalement, pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires du développement de mélanomes induits par les UV et établir un lien entre l'activation de la voie Akt dans les mélanomes et la régulation de la réponse aux UV par cette dernière, il est suggéré dans notre étude d'évaluer le rôle de la voie Akt dans la régulation de la réponse aux UV dans les cellules de mélanomes. Il est préférable de caractériser l'importance de la suractivation d'Akt dans des mélanocytes primaires mais, malheureusement, ces cellules poussent d'une manière très lente (plusieurs mois pour doubler la population cellulaire). Pourtant, il est aussi intéressant d'étudier la suractivation d'Akt, en réponse aux UV, dans des lignées de mélanome qui expriment faiblement Akt sous sa forme phosphorylée.

Notre hypothèse de travail est que, l'hyperactivation de la protéine kinase Akt dans les cellules de mélanome pourrait potentiellement réguler les réponses cellulaires aux dommages à l'ADN induits par les ultraviolets, d'une manière spécifique aux isoformes.

Afin de vérifier cette hypothèse, nos objectifs consistent principalement à:

- Caractériser l'induction de la phosphorylation d'Akt dans les lignées cellulaires de mélanome versus les lignées cellulaires primaires.
- D'une manière globale, inhiber la phosphorylation d'Akt pour évaluer son rôle dans la réponse cellulaire aux ultraviolets, incluant l'apoptose, la survie cellulaire, l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de dommages à l'ADN par excision de nucléotides (NER).
- Inhiber l'expression des différentes isoformes d'Akt dans des lignées cellulaires de mélanomes.
- Déterminer, selon sur les résultats antérieurement obtenus, le rôle potentiel des isoformes d'Akt dans la réponse aux UV.



## **Matériel et méthodes**

### *Lignées et conditions de la culture cellulaire*

Les lignées cellulaires de mélanomes de la collection Wistar et de cellules primaires (mélanocytes et fibroblastes de peau) ont été commercialement fournies par l'institut de Coriell. Les lignées de mélanomes ont été cultivées dans un milieu de culture minimum, essentiel et complet EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) (Wisent), supplémenté avec 15% de sérum fœtal de bovin (FBS), d'acides aminés essentiels et non essentiels, de L-glutamine, de vitamines et d'antibiotiques (Invitrogen). Quant aux lignées de mélanocytes primaires (GM21810), elles ont été cultivées dans le milieu 254 (Invitrogen) auquel on a additionné un supplément pour la croissance des mélanocytes humains (Invitrogen) et des antibiotiques. Les fibroblastes de la peau (GM21808) proviennent du même donneur des mélanocytes primaires, et ont été cultivés dans d'autres milieux Ham's F12 Medium/ Dulbecco Modified Eagles Medium (1 :1). Toutes ces lignées cellulaires ont été maintenues en culture dans des incubateurs à 37°C sous une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub>.

### *Conditions d'irradiation aux UV*

Tout d'abord, les cellules ont été trypsinisées et transférées sur des pétris la veille de l'irradiation. Généralement, les cellules ont été mises dans des pétris de 60mm à une densité de 750 000 cellules (pour la mesure de l'efficacité du NER) ou 500 000 (pour la mesure de l'apoptose et des points de contrôle du cycle cellulaire). Concernant la mesure de la survie clonogénique, les cellules ont été transférées sur des pétris de 100mm à différentes densités. Ensuite, les cellules ont été lavées 2 fois au PBS 1X (tampon phosphate salin), puis ont été

exposées à différentes doses (5, 10 ou 15 J/m<sup>2</sup>) d'UVC (254nm) à l'aide d'une lampe germicide G25T8. La fluence a été de 0.2 J/m<sup>2</sup>/s et mesurée par un radiomètre de type DRC 100X, équipé avec un senseur DIX254 (Spectroline).

*Mesure de l'activation d'Akt par immuno-buvarpage (Western Blotting)*

Dans l'objectif d'évaluer la phosphorylation d'Akt, les cellules ont été tout d'abord cultivées dans un milieu complet la veille de l'extraction protéique. Les protéines ont été extraites en lavant les cellules au PBS, les grattant et les resuspendant dans une solution de lyse RIPA contenant des inhibiteurs de protéases (cocktail d'inhibiteurs de protéases, 1mM PMSF) et des inhibiteurs de phosphatases (0.5mM orthovanadate de sodium, 100 mM fluorure de sodium et 1mM phosphates  $\beta$ -glycérol) afin d'empêcher la dégradation des protéines d'intérêt ainsi que leur forme active. Les échantillons ont été incubés sur glace pendant 10 minutes et ensuite soniqués et stockés à - 80°C. La concentration des protéines a été mesurée en utilisant un kit BCA (Pierce) et un lecteur de microplaques. Le niveau de la phosphorylation d'Akt a été immuno-détecté par l'utilisation des anticorps primaires de lapin anti-Akt (phospho-S473) (polyclonal, #9271, Cell signaling) et un anti-Akt (phospho-T308) (polyclonal, # 9275, Cell Signaling), à 1/1000. Quant au niveau d'expression des différents isoformes d'Akt, des anticorps anti-Akt1 de lapin (C73H10, #2938, Cell signaling), anti-Akt2 de la souris (8B7 : sc-81436, Santa Cruz Biotechnology), et un anti-Akt3 de lapin (polyclonal, #07-383, EMD Millipore) ont été utilisés à 1/1000. Pour détecter le niveau d'expression de PTEN, des anticorps anti-PTEN de lapin (polyclonal, #9552, Cell Signaling) 1/1000 ont été utilisés. De plus, les anticorps de lapin contre la bêta-actine (polyclonal, #4967, Cell signaling) ont été utilisés à 1/1000 en tant que contrôle de chargement pour vérifier l'utilisation d'une quantité égale des protéines. Les anticorps secondaires utilisés (Cell

signaling) ont été anti-souris (#7076) et anti-lapin (#7074) (1/2000). Enfin, grâce à un kit de détection ECL Plus (Amersham) et un appareil Fujifilm LAS-4000, les immunobuvardages ont pu être détectés.

#### *Traitement avec des inhibiteurs pharmacologiques*

Les lignées cellulaires ont été prétraitées 2h ou 1h, avant l'exposition aux UV ou l'extraction des protéines, avec des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques d'Akt, solubles dans du DMSO; 1uM MK2206 (Selleck Chemicals) ou 100uM Triciribine (Selleck Chemicals) respectivement. Immédiatement après l'irradiation, un milieu frais et complet contenant l'inhibiteur a été ajouté aux cellules. Les cellules contrôles ont été incubées dans un milieu complet en présence du DMSO pour la même durée de temps que les cellules traitées.

#### *Transfection d'ARN interférents(ARNi)*

La déplétion transitoire de l'expression d'Akt1, Akt2 et Akt3 a été réalisée à l'aide d'ARN interférents. Tout d'abord, les cellules ont étéensemencées dans 8ml du milieu complet sur des pétris de 100mm à une densité de 2 millions de cellules par pétri. Le jour de la première transfection, 20 ul du lipofectamine 2000 ont été ajoutés à 0.6 ml d'Opti-MEM (Invitrogen), et les deux ont été incubés pendant 5 min à température ambiante. Puis, 20 uM d'ARN interférents Smartpool d'Akt1, 2 et3 ou d'ARNi non spécifiques (*scrambled*) (Dharmacon) ont été additionnés de 500 ul d'Opti-MEM et ajoutés à la solution et incubés pendant 30 minutes à température pièce. Lors de la transfection des cellules, le milieu a été changé avec un milieu dépourvu d'antibiotiques et du sérum auquel le mélange d'ARNi/Opti-MEM/lipofectamine a été ajouté. Par la suite, les cellules ont été incubées pendant 7h à 37°C. Après ces heures d'incubation, le milieu a été remplacé avec un autre qui est complet. 24 heures après la première transfection, les cellules ont été transfectées pour une deuxième fois dans les

mêmes conditions. 24h post-la dernière transfection, les cellules a étéensemencées afin d'être utilisées pour les expériences.

Les oligonucléotides des ARN interférents d'Akt :

- On-target plus huamn Akt1 (207) siRNA-smartpool, 10nmol:  
CAUCACACCACCUGACCAA/ACAAGGACGGGCACAUUA/  
CAAGGGCAUUUCGGCAAG/UCACAGCCCUGAAGUACUC.
- On-target plus human Akt2 (208) siRNA – smartpool, 10nmol:  
ACACAAGGUACUUCGAUGA/GCAAGGCACGGGCUAAAGU/  
GUGAAUACAUCAAGACCUG/CAUGAAUGACUUCGACUAU.
- On-target plus human Akt3 (10000) siRNA-smartpool, 10nmol:  
GCACACACUCUAACUGAAA/GAAGAGGGGAGAAUAUUA/  
GUACCGUGAUCUCAAGUUG/GACAGAUGGCUCAUUCAUA

*Analyse de la capacité de réparation des 6-4PPs en fonction du cycle cellulaire*

L'évaluation de la cinétique de la GG-NER a été réalisée par l'utilisation de la cytométrie en flux. Après irradiation des cellules, celles-ci ont été recouvertes du milieu et incubées à 37°C pour le temps indiqué. À différents temps post-UV, les cellules ont été lavées une fois au PBS 1X, traitées à la trypsine et puis récupérées dans 1ml de PBS. Ensuite, ces suspensions cellulaires ont été fixées avec 3ml d'éthanol anhydre (100%) froid et placées à -20°C pour un minimum de 12 heures. Certaines cellules utilisées comme contrôles n'ont pas été irradiées pour savoir le bruit de fond des anticorps, tandis que d'autres ont été trypsinisées immédiatement après irradiation afin de déterminer la fluorescence maximale lorsqu'aucun dommage n'est réparé. Après l'incubation à -20°C, les cellules ont été perméabilisées par 0.5% triton X-100 (Sigma) auquel a été ajouté 0.2N d'acide chlorhydrique, et incubées

pendant 5 minutes à température pièce. Ensuite, les cellules ont été rincées une fois avec du PBS, resuspendues dans une solution de PBS avec 100ug/ml d'ARNase A pendant 45 minutes à 37°C. Par la suite, elles ont été rincées avec une solution PBS-TB (PBS à 1% d'albumine de sérum d'origine bovine (BSA) et 0.25% de Tween 20 (Sigma)). Ensuite, les cellules ont été resuspendues dans du PSB-TB contenant des anticorps de souris dirigés contre les 6-4 PP (*Kamiya Biomedical company*) dilués 1/1000, et incubées 1h30 à température ambiante. Après un rinçage avec du PBS-TB, les cellules ont été resuspendues dans une solution de PBS-TB contenant des anticorps anti-souris couplés à la fluorescence (FITC) (Sigma) sont dilués à 1/200 pendant 1h à température pièce dans l'obscurité. Ensuite, elles ont été rincées à nouveau au PBS, resuspendues dans 350ul de PBS auquel 5 g/ml d'iodure de propidium (PI, *Molecular Probe*) ont été ajouté afin de marquer les cellules selon leur contenu ADN et incubées pendant 15 à 30 minutes à température pièce. Par la suite, les cellules ont été analysées par la cytométrie en flux FACScan ou FACSCalibur (BD). L'analyse des résultats obtenus s'est effectuée à l'aide du logiciel FlowJo qui permet d'isoler les cellules dans chaque phase du cycle cellulaire selon le marquage au PI. Le pourcentage de réparation des 6-4 PPs en fonction du cycle cellulaire a été obtenu en soustrayant l'autofluorescence du FITC (cellules contrôles) des intensités de fluorescence obtenues pour chaque condition, puis en comparant le tout avec l'intensité de fluorescence des cellules immédiatement fixées après irradiation (0h d'incubation). Toutes les mesures d'intensité représentaient la moyenne géométrique de la fluorescence de triplicatas indépendamment traités.

### *Survie clonogénique*

La détermination de la survie clonogénique a été conduite dans des cellules traitées ou non aux inhibiteurs pharmacologiques. Tout d'abord, les cellules ont été comptées puis mises en

culture dans des pétris de 100mm à différentes concentrations, au minimum 12 heures avant le traitement. Ensuite, les cellules ont été rincées avec du PBS, exposées aux UV tel qu'évoqué ci-dessus et incubées, par la suite, jusqu'à l'apparition des colonies visibles (2 à 3 semaines) à 37°C. Après l'incubation, les colonies présentes sur les pétris ont été révélées par fixation et coloration au bleu méthylène (0.5% bleu méthylène (Sigma) dilué dans 50% méthanol) pendant 5 minutes, rincées à l'eau puis comptées pour chaque condition. La survie est exprimée en % de survie clonogénique par rapport aux cellules contrôles non traitées aux UV.

#### *Évaluation de l'apoptose*

Tout d'abord 500 000 des cellules ont été cultivées dans des pétris de 60mm la veille du traitement. Ensuite, elles ont été prétraitées ou non avec des inhibiteurs ou ainsi transfectées avec des ARN interférents, puis exposées aux UV. Après l'irradiation, les cellules ont été recouvertes du milieu contenant ou non des inhibiteurs et incubées à 37°C pour le temps indiqué. À temps différents post-UV, l'apoptose a été évaluée par deux méthodes: (i) analyse des pics de sub-G1 à l'aide du marquage de l'ADN à l'iodure de propidium et, (ii) par marquage à l'Annexin-V en utilisant un kit de marquage (*Annexin V-FITC apoptosis detection / Sytox green kit, Sigma*) tel qu'indiqué par le manufacturier. Ensuite, les cellules positives pour l'Annexin-V ou leurs pics sub-G1 ont été détectées et quantifiées à l'aide de la cytométrie en flux tel que décrit auparavant.

En ce qui est trait à la deuxième méthode d'évaluation de l'apoptose, l'Annexin-V et le Sytox permettent de détecter les cellules apoptotiques les cellules nécrotiques, respectivement, et émettent dans une longueur d'onde très similaire. Donc, ils sont détectés sur le même couloir de couleur par le FACS. Il est important de souligner que les cellules de moyenne

intensité de fluorescence verte sont les cellules apoptotiques (FITC+/Sytox-), alors que les cellules de forte intensité de fluorescence verte sont les cellules nécrotiques (FITC+/Sytox+).

## **Résultats**

### **Préambule**

Afin de réaliser les objectifs de notre étude, certaines lignées cellulaires provenant de la collection des lignées Wistar ont été essentielles. Un résumé des informations pertinentes sur ces cellules est représenté dans l'annexe 1.

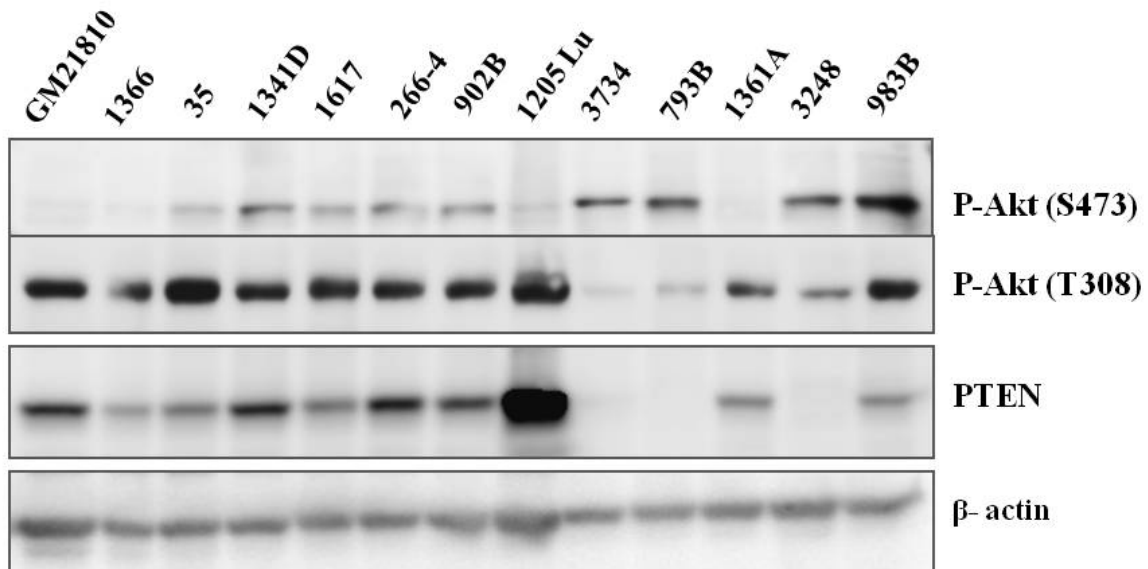


## **La phosphorylation d'Akt et l'expression de PTEN dans les lignées cellulaires de mélanome**

Avant d'étudier le rôle d'Akt dans la réponse aux UV, il est pertinent de connaître le niveau d'expression d'Akt phosphorylé ainsi que celui de PTEN dans les lignées de mélanomes malins et les mélanocytes primaires. En effet, des anticorps spécifiques à la phosphorylation des deux sites d'Akt (S473 et T308) et au PTEN ont été utilisés.

Tout d'abord, l'immunobuvardage (voir **figure 3**) montre que certaines lignées cellulaires comme WM3248 et WM793B montrent une déficience en PTEN tel que décrit dans l'Annexe 1 (pour WM3248). Ces deux lignées cellulaires, plus de la lignée WM3734, montrent aussi un niveau important de la phosphorylation d'Akt surtout sur le site S473. Il est important de savoir que c'est la phosphorylation d'Akt qui indique si la protéine PTEN est fonctionnelle, et non pas le niveau d'expression de cette dernière. Citons l'exemple des lignées WM35, WM1205 Lu, WM1366 et WM1361A, elles expriment PTEN fonctionnelle vu que le niveau de phosphorylation d'Akt sur S473 est bas. Par contre, le niveau de phosphorylation d'Akt sur T308 reste élevé même dans les autres lignées exprimant PTEN. En effet, la phosphorylation d'Akt sur le site T308 n'est pas suffisante pour l'activation complète d'Akt (Alessi, Andjelkovic et al. 1996). De même ces résultats obtenus pourraient s'expliquer par le fait que le statut d'expression de PTEN est associé à la phosphorylation d'Akt sur le site S473 et non pas T308, tel que démontré dans une étude faite sur des lignées cellulaires de rhabdomyosarcomes (Wan and Helman 2003). Les résultats pour les lignées WM1617, WM1341D, WM902B, WM983B et WM266-4 ne sont pas très clairs. Ces lignées expriment

un niveau de phosphorylation d'Akt (S473) supérieur à celui des lignées exprimant PTEN (citées ci-dessus) même si elles ne sont pas déficientes en PTEN, et ceci pourrait s'expliquer par la différence d'intensité de l'activation de la voie PI3K/Akt.

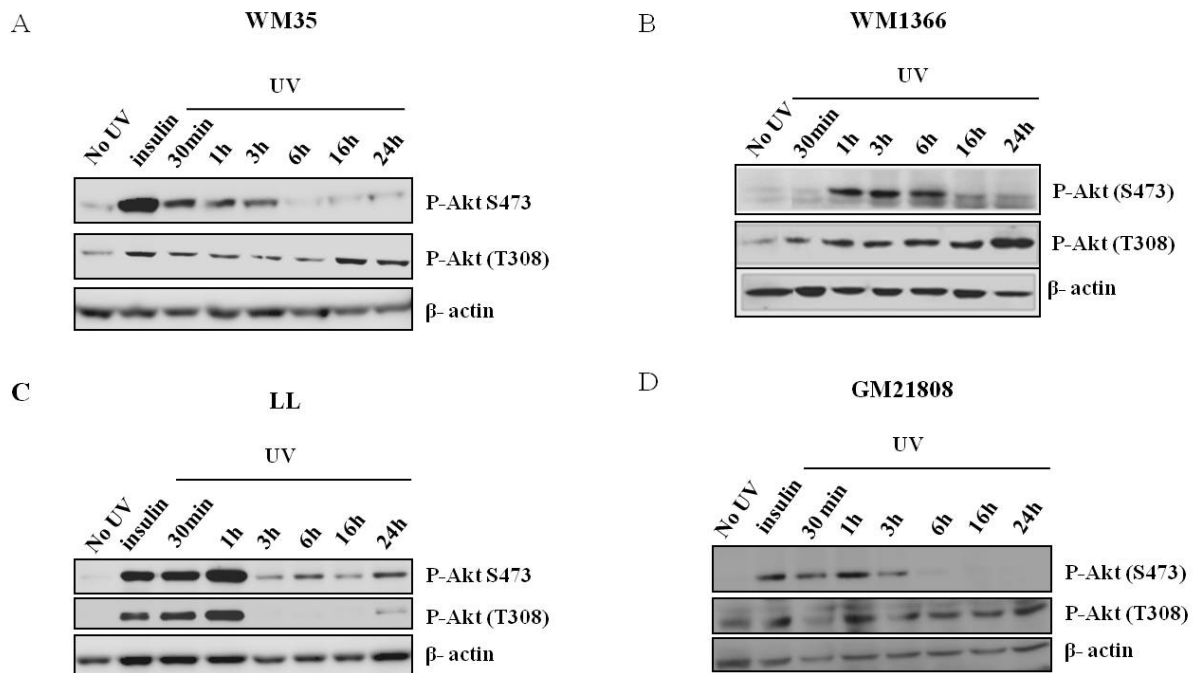


**Figure 3. La phosphorylation d'Akt et l'expression de PTEN dans les lignées cellulaires de mélanome.** Immuno-buvardage indiquant les niveaux de la phosphorylation d'Akt sur les résidus S473 et T308 et les niveaux d'expression de PTEN dans 12 différentes lignées de mélanome et les mélanocytes primaires (GM21810).

## **Activation d'Akt induite par les UV dans différentes lignées cellulaires modèles**

Avant d'étudier l'effet de l'inactivation de la voie PI3K/Akt sur la régulation de la réponse cellulaire aux UV dans les lignées cellulaires de mélanome, il est évident de vérifier si les lignées modèles de mélanomes sont capables d'induire l'activation de la protéine kinase Akt en réponse aux UV. En effet, les cellules sont exposées à des doses convenables à notre étude ( $15 \text{ J/m}^2$ ) afin d'éviter une forte génération du stress cellulaire par les UV. Afin de déterminer si la régulation à la hausse d'Akt est dépendante du type cellulaire, différentes lignées cellulaires de mélanomes ou des fibroblastes humains primaires ont été étudiées. Ainsi, il est pertinent de déterminer que l'activation d'Akt n'est pas la conséquence de la transformation cellulaire, qui est une caractéristique des cellules cancéreuses. Suite à une irradiation à  $15 \text{ J/m}^2$  d'UVC, les lignées cellulaires de mélanome WM35 et WM1366 et les lignées primaires non tumorales; les fibroblastes de la peau GM21808 et les fibroblastes de poumons LL sont immédiatement collectées à différents temps (de 30minutes à 24h) après exposition aux UV, ensuite testées pour leur capacité à induire la phosphorylation d'Akt en réponse aux UV. L'insuline a été utilisée comme un contrôle positif pour l'induction de la phosphorylation d'Akt, tel que montré dans la littérature (Alessi, Andjelkovic et al. 1996). En effet, les lignées cellulaires choisies expriment des faibles niveaux d'Akt phosphorylée, d'où l'intérêt d'examiner l'induction de la phosphorylation d'Akt dans ces lignées. Selon les résultats obtenus (voir **figure 4**), une phosphorylation importante d'Akt sur les deux sites d'activation a été clairement observée, tel qu'attendu, suite à l'exposition aux UV dans les lignées cellulaires primaires et de mélanomes. Il est important de souligner que

l'immunobuvardage montre clairement une phosphorylation d'Akt sur le résidu S473 qui est transitoire atteignant un niveau maximal d'activation à des temps précoces (30 minutes-1h) et retournant à un niveau basal faible à quelques heures après exposition aux UV. En ce qui est trait au résidu T308, des différences importantes ont été observées dans la capacité des différentes lignées cellulaires à activer Akt ce qui pourrait s'expliquer par la dépendance d'activation d'Akt sur le résidu T308 au type cellulaire. En effet, les lignées cellulaires de mélanomes WM35 et WM1366 montrent une activation rapide dès la première heure qui progresse au cours du temps atteignant des hauts niveaux d'activation à 24h (voir **figure 4 A-B**). La lignée GM21808 montre un maximum d'activation à 1h après exposition aux UV qui reste plus au moins maintenue jusqu'à 24h (voir **figure 4D**). Concernant la lignée LL (fibroblastes de poumons), le profil d'activation d'Akt sur T308 illustre une forte activation durant la première heure et après laquelle le niveau de phosphorylation retourne au niveau basal (voir **figure 4C**).

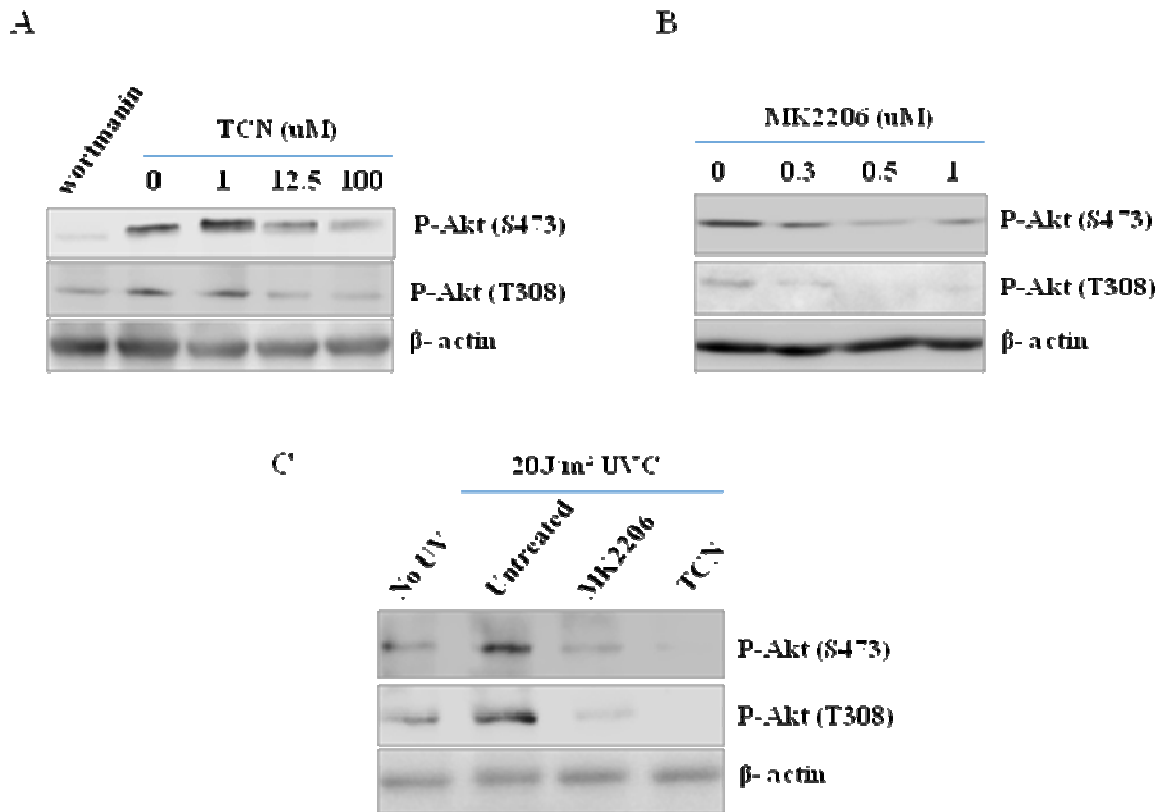


**Figure 4. Activation d’Akt induite par les UV dans des lignées cellulaires de mélanome et des fibroblastes primaires humains.** Immunobuvardage montrant la double phosphorylation d’Akt sur les sérines et thréonines à différents temps après exposition des cellules à 15 J/m<sup>2</sup> d’UVC. Grâce aux anticorps primaires dirigés contre les sérines et thréonines phosphorylées, l’induction de la phosphorylation d’Akt a été déterminée sur les lignées cellulaires de mélanomes WM35 (A) et WM1366 (B), les fibroblastes de poumons (LL) (C) et les fibroblastes de peau GM21808 (D). Les cellules traitées avec l’insuline (contrôle positif pour l’induction de p-Akt) ont été exposée à 5ug/ml d’insuline pendant 15 minutes.

## L'inhibition pharmacologique de la voie Akt

Avant de déterminer si l'inhibition d'Akt peut réguler la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN induits par les UV, il est pertinent de vérifier l'efficacité des inhibiteurs pharmacologiques choisis pour l'inhibition de l'activation de la voie Akt, induite par les UV. Après avoir testé plusieurs inhibiteurs de la voie Akt comme le périfosine, wortmanin, MK2206 et triciribine, il s'est avéré que les deux derniers inhibiteurs sont plus spécifiques à inhiber Akt. En effet, le triciribine et MK2206 sont des inhibiteurs très sélectifs pour Akt1, Akt2 et Akt3, bloquant la phosphorylation d'Akt sur les résidus T308 et S473 sans inhiber les activateurs d'Akt comme PI3K et PDK1. L'immunobuvardage (voir **figure 5**) a été réalisé afin de déterminer la concentration optimale pour l'abrogation de l'activation d'Akt. Il a montré, qu'après avoir traité les lignées cellulaires avec différentes doses de MK2206 et de triciribine, la phosphorylation d'Akt sur ses deux résidus a été efficacement inhibée d'une manière dépendante de la dose. L'effet des deux inhibiteurs d'Akt a été déterminé sur la lignée cellulaire de mélanome WM3248 exprimant un haut niveau d'Akt dans les conditions normales (No UV), tel que montré dans les **figures 5**[Error! Reference source not found. A-B](#). En effet, le niveau de la phosphorylation d'Akt baisse dès une exposition à 12.5 uM de triciribine et 0.5 uM de MK2206 comparativement à l'absence d'inhibiteurs. L'inhibition de p-Akt a été jugée optimale à une concentration non cytotoxique de 100 uM de triciribine et 0.5 uM de MK2206, respectivement. De plus, les résultats présentés dans la [Error! Reference source not found. C](#) indiquent que les concentrations choisies inhibent efficacement l'activation de la protéine Akt évoquée par les UVC (20 J/m<sup>2</sup>) dans la lignée WM35, ayant un niveau

basal faible d'Akt phosphorylée, comparativement aux cellules non traitées aux inhibiteurs (cellules contrôles).



**Figure 5. Inhibition pharmacologique de la phosphorylation d'Akt induite par les UV dans des lignées cellulaires de mélanome.** A-B. Immunobuvardage indiquant les niveaux de phosphorylation d'Akt sur les S473 et T308 à différentes concentrations de TCN (A) ou de MK2206 (B) sur la lignée de mélanomes WM3248 C. Immunobuvardage représentant les inhibitions pharmacologiques de la double phosphorylation d'Akt induite par 20 J/m<sup>2</sup> d'UVC. Les cellules ont été exposées ou non aux UV puis lysées à 1h post irradiation après un traitement avec 0.5 uM MK2206 ou 100 uM TCN sur la lignée de mélanome WM35.

## **Le rôle de la voie PI3K/Akt dans la régulation de la NER**

Afin de quantifier la capacité des cellules à réparer les 6-4 PPs suite à l'exposition aux UV, notre laboratoire a développé une nouvelle technique basée sur la cytométrie en flux permettant d'évaluer la cinétique de réparation de la GG-NER en fonction du cycle cellulaire. À l'aide de cette approche, il a été rapporté que certaines lignées tumorales modèles comportent une déficience importante en GG-NER exclusivement en phase S du cycle cellulaire. Ceci peut suggérer qu'une telle déficience est une caractéristique relativement commune de nombreuses tumeurs humaines. De ce fait, l'équipe de notre laboratoire ont montré que la majorité des lignées de mélanomes ont un défaut en GG-NER uniquement en phase S acquis au cours de leur développement tumoral relativement aux mélanocytes primaires.

D'après les résultats précédemment représentés (voir **figure 3**), on observe que les lignées de mélanome déficientes en GG-NER en phase S (SPR-) sont généralement caractérisées par une phosphorylation importante d'Akt surtout sur le résidu S473, citant l'exemple des lignées WM983B, WM3248 et WM793B. Contrairement aux lignées SPR-, les lignées ayant la capacité de réparer leurs dommages en phase S (SPR+) tel que WM35 et WM1366 sont caractérisées par une faible expression d'Akt phosphorylée par rapport aux cellules exprimant une forte phosphorylation d'Akt et un faible niveau de PTEN. Ceci pourrait suggérer une corrélation entre la déficience de la GG-NER en phase S et l'activation de la protéine Akt. En 2011, des études ont montré que le suppresseur de tumeur PTEN régule positivement la GG-NER en réponse aux UVB d'une manière dépendante de l'inhibition d'Akt (Ming, Feng et al.

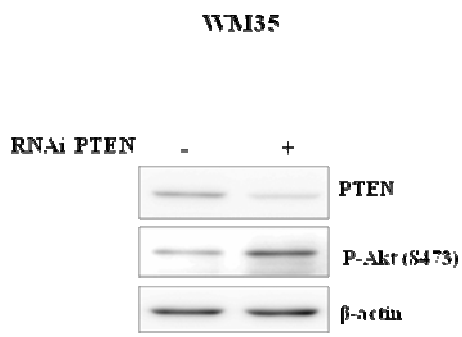


2011). Mettant l'hypothèse que PTEN peut réguler l'efficacité de la GG-NER en phase S, il est important de déterminer si cela est dû à son activité lipide phosphatase qui régule négativement l'activité d'Akt ou à une autre fonction. Tout d'abord, pour affirmer le rôle de PTEN dans la régulation de la NER en réponse aux UV, la lignée de mélanome WM35 a été transfectée avec un ARNi (Smartpool) de PTEN. Cette lignée a été choisie se basant sur l'expression importante de PTEN, l'expression modérée d'Akt phosphorylée et finalement sa capacité à réparer les 6-4PPs dans toutes les phases du cycle cellulaire. Tout d'abord, des immunobuvardages ont été effectués afin d'affirmer l'effet des ARNi de PTEN, indiquant bel et bien une abolition de l'expression de PTEN et une augmentation de la phosphorylation d'Akt dans les cellules transfectées versus les cellules contrôles non transfectées par des ARNi de PTEN (voir **figure 6A**). L'expérience évaluant la GG-NER a été effectuée sur les mêmes cellules après leur transfection et leur fixation à 6h après exposition à 15J/m<sup>2</sup> UVC. Les résultats montrent que la lignée WM35 traitée avec un ARNi contrôle répare efficacement les 6-4PPs avec des niveaux pareils pour toutes les phases du cycle cellulaire et qu'aucune différence significative avec les cellules ayant PTEN sous-exprimé n'a été remarquée (voir **figure 6B, E**). De plus, comme fut montré par immunobuvardage, l'abolition de l'expression de PTEN entraîne une augmentation de la phosphorylation d'Akt, d'où l'importance de valider les résultats précédemment obtenus et de déterminer le rôle d'Akt dans la régulation de la NER. De ce fait, la lignée SPR- WM3248 exprimant un haut niveau d'Akt phosphorylée et peu de PTEN a été utilisée dans cette expérience. Vu qu'aucun effet a été observé dans les cellules WM35 exposées aux UVC, nous avons décidé d'utiliser, cette fois-ci, les UVB comme modèle mutagène, tel qu'utilisé dans l'étude citée ci-dessus. Comme cité auparavant, la lignée WM3248 comporte une déficience de réparation en phase S (approximativement

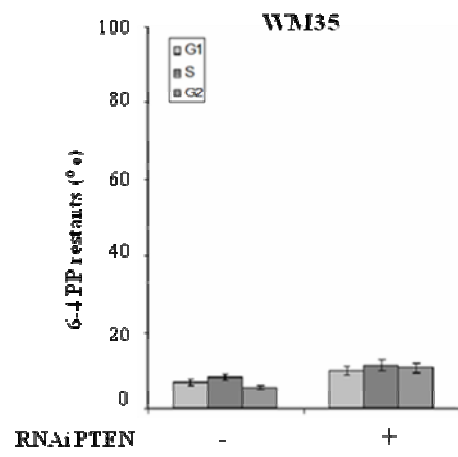
70% de 6-4PPs restants à 6h post-exposition aux UV) comparativement aux phases G1 et G2. L'utilisation de l'inhibiteur de la phosphorylation d'Akt MK2206 (voir **figure 6C**) n'exerce aucun effet significatif sur l'efficacité de réparation des 6-4PPs en phase S, ainsi qu'en phase G1, relativement aux cellules exprimant Akt phosphorylée (cellules non traitées au MK2206). En phase G2, une légère augmentation des 6-4PPs résiduels a été observée (voir **figure 6D, E**).

L'ensemble de ces résultats montre que l'inhibition de la voie PI3K/Akt par l'abolition de l'expression de PTEN ou de la phosphorylation d'Akt, avant et après traitement aux UV, n'entraîne aucune régulation de la NER durant la phase S.

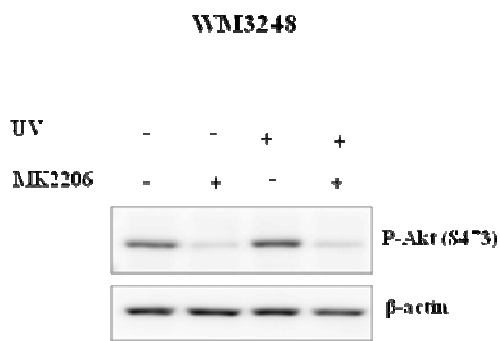
A



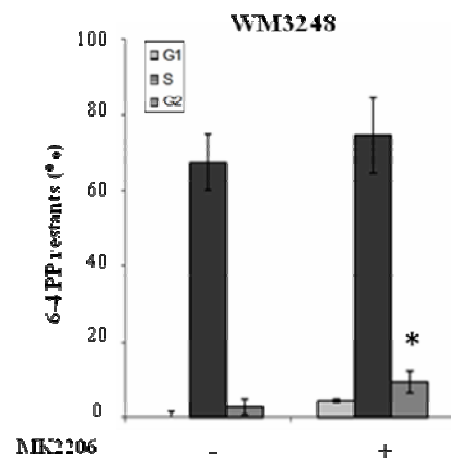
B

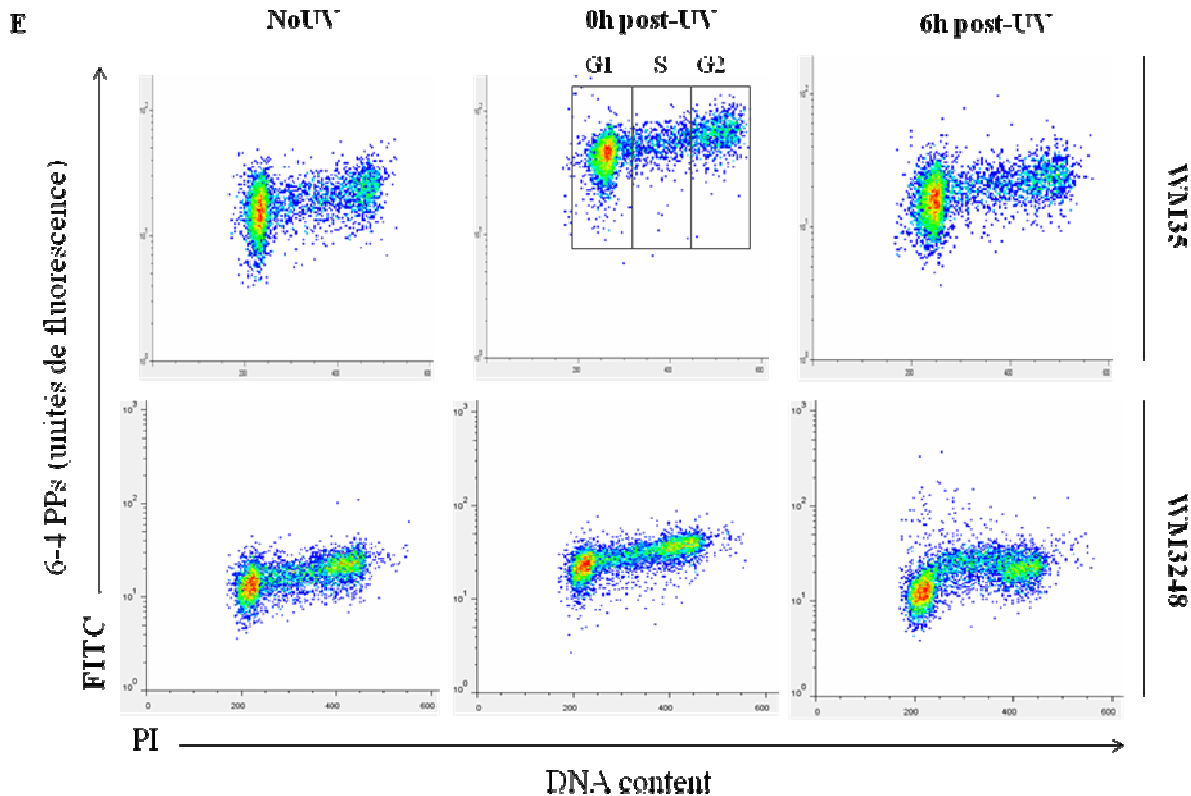


C



D





**Figure 6. Évaluation de la réparation des 6-4PPs suite à l'inhibition de la voie oncogénique PI3K/Akt dans les lignées cellulaires de mélanome.** A. Immunobuvardage indiquant le niveau d'expression de PTEN et de la phosphorylation d'Akt dans la lignée WM35 (SPR+) transfectée avec des ARN interférants de PTEN. B. Efficacité de réparation des 6-4PPs dans la lignée WM35 transfectée par des ARN interférants de PTEN. Les résultats représentent le pourcentage des 6-4PPs non réparés en fonction du cycle cellulaire à 6heures après traitement à 15J/m<sup>2</sup> d'UVC dans les cellules traitées aux ARNi de PTEN ou ARNi contrôles. C. Immunobuvardage représentant l'efficacité du MK2206 à inhiber la phosphorylation d'Akt avant et après exposition à 400J/m<sup>2</sup> d'UVB (à 1h post-irradiation) dans la lignée WM3248 (SPR-). D. Pourcentage des 6-4PPs résiduels à 6 heures après irradiation à 400J/m<sup>2</sup> d'UVB dans la lignée de mélanomes WM3248 traitée ou non avec l'inhibiteur MK2206 (0.5 uM). Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

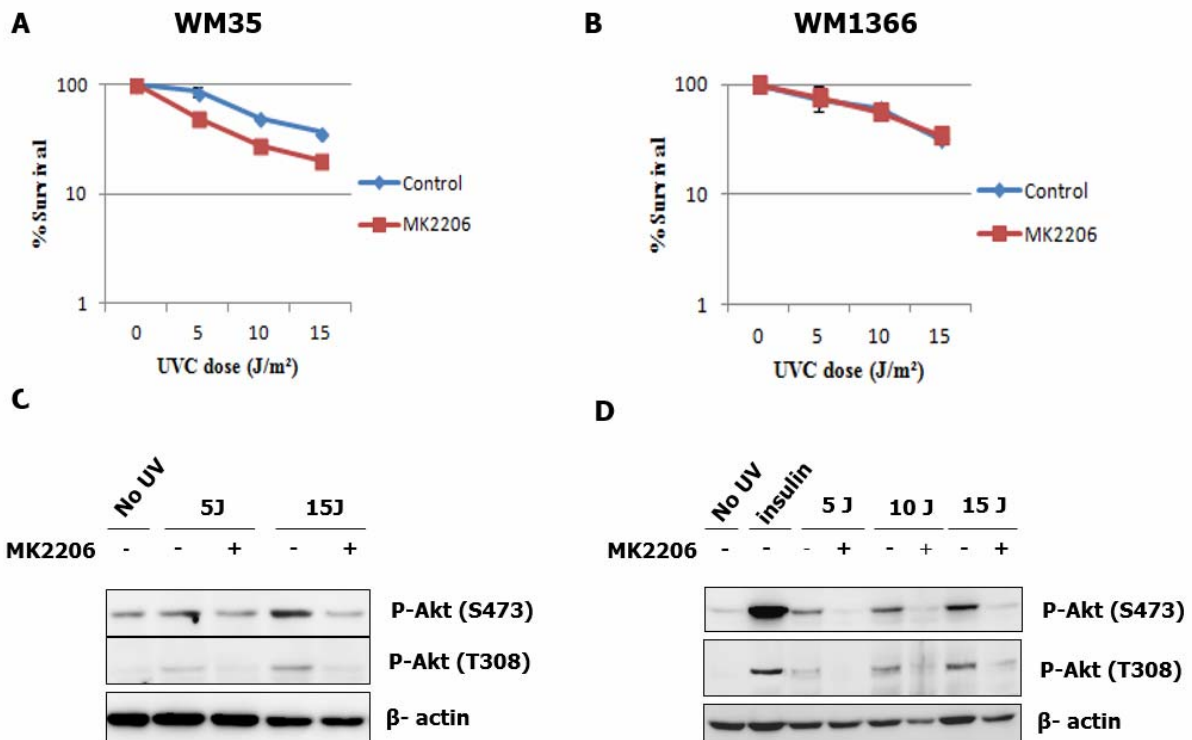
La quantité des 6-4PPs résiduels en phase G2 dans les cellules traitées au MK2206 est significativement différente de celle des cellules non traitées (\*, p=0.014), selon le test T de student. E. Distribution de la réparation des 6-4PPs (FITC) en fonction du contenu ADN des cellules de mélanomes WM35 et WM3248 après exposition à 15J/m<sup>2</sup> et 400J/m<sup>2</sup>, respectivement. Les profils des cellules WM35 traitées aux ARNi de PTEN et de WM3248 prétraitées au MK2206 ne sont pas représentés en raison de leur similarité aux profils des cellules contrôles. Les cadres représentés sur le profil de WM35 (0h post-UV) délimitent chacune des phases du cycle cellulaire.

## **Effet de l'inactivation pharmacologique de la voie PI3K/Akt sur la survie des cellules de mélanome**

En premier lieu, notre projet a été généralement basé sur l'étude de la régulation de la voie NER par la voie oncogénique PTEN/Akt et plus spécifiquement la détermination des effets de l'inactivation des isoformes d'Akt sur cette régulation. Ensuite, on a voulu caractériser d'autres effets phénotypiques de l'inactivation d'Akt. Puisqu'il n'y a pas d'effets de l'inhibition de la voie oncogénique PTEN/Akt sur la réparation des 6-4PPs, il est devenu pertinent de caractériser s'il existe une corrélation l'inactivation de cette voie et la sensibilité aux UV.

Afin d'atteindre tel objectif, des cellules de mélanome WM35 et WM1366, exprimant des faibles niveaux d'Akt phosphorylée et une induction importante de celle-ci en réponse aux UV, ont été choisies. De plus, il a été démontré que ces cellules ont la capacité de réparer leurs dommages à l'ADN, et par conséquent, de survivre après traitement aux UV, tel qu'indiqué dans les **figures A et B**. Nous avons donc déterminé la sensibilité des cellules mélanomes traitées ou non avec l'inhibiteur de la phosphorylation d'Akt à différentes doses d'UVC à l'aide de la survie clonogénique (voir matériel et méthodes). Généralement, cette dernière permet d'évaluer la capacité de la cellule à se multiplier en réponse à un agent génotoxique. Selon la littérature, il semble que l'inhibition de la phosphorylation d'Akt augmente la sensibilité des cellules aux agents génotoxiques y compris les UV, tel qu'indiqué dans l'introduction. La plupart des études précédemment faites utilisent des inhibiteurs pharmacologiques non spécifiques à Akt (périfosine et wortmanin) dans des cellules autres que les cellules utilisées dans notre étude. Dans notre cas, le traitement des cellules avec

l'inhibiteur MK2206 ne semble pas être capable d'augmenter la sensibilité des cellules aux UV. En effet, le profil de survie de la lignée WM1366 traitée à MK2206 est similaire à celui des cellules contrôles, tandis qu'une diminution modérée de la survie cellulaire a été observée après traitement des cellules WM35 à MK2206. L'utilisation d'un autre inhibiteur de p-Akt, périfosine, ne montre également aucun effet sur la régulation des cellules de mélanome, mais à cause de sa non spécificité pour p-Akt, nous n'avons pas pris en considération les résultats obtenus.



**Figure 7: Capacité de survie cellulaire aux UV des cellules de mélanome suite à l'inhibition pharmacologique de la voie PI3K/Akt.** A-B. Courbes de tendance de survie clonogénique des cellules de mélanome WM35 (A) et WM1366 (B) traitées ou non à l'inhibiteur MK2206 (MK2206, control) et exposées à différentes doses d'UVC. Chaque point représente la moyenne de trois expériences indépendantes exprimée en pourcentage de survie clonogénique. En effet, les cellules ont été prétraitées à MK2206 pendant 2h, puis irradiées. L'inhibiteur a été remis dans le milieu après exposition aux UVC. A 72h post-UV, l'inhibiteur a été enlevé du milieu, et donc, les cellules ont restées incubées dans un milieu sans MK2206 pendant, approximativement, 2 semaines. C-D. Évaluation de la phosphorylation d'Akt basale et induite par différentes doses d'UVC par immunobuvardage dans les lignées cellulaires de mélanome WM35 (C) et WM1366 (D).

## **Modulation de la mort cellulaire par apoptose par traitement aux inhibiteurs pharmacologiques des cellules de mélanome exposées aux UV**

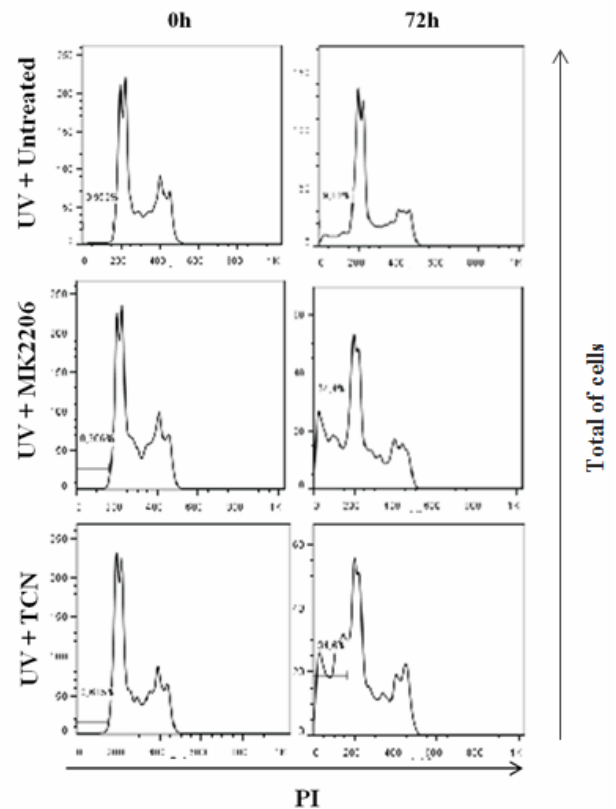
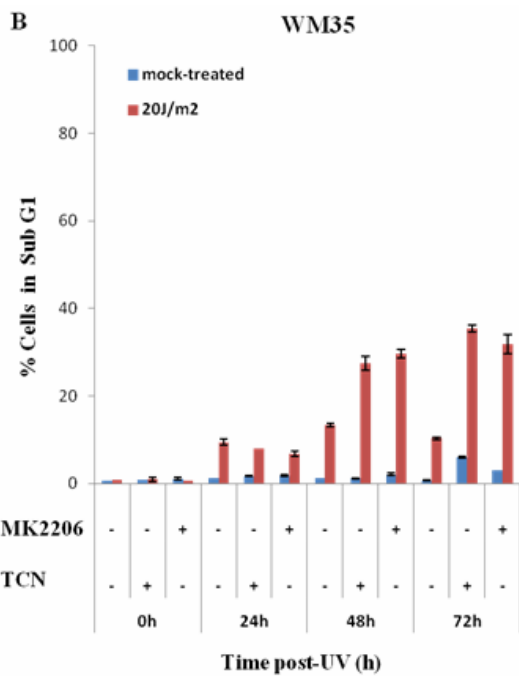
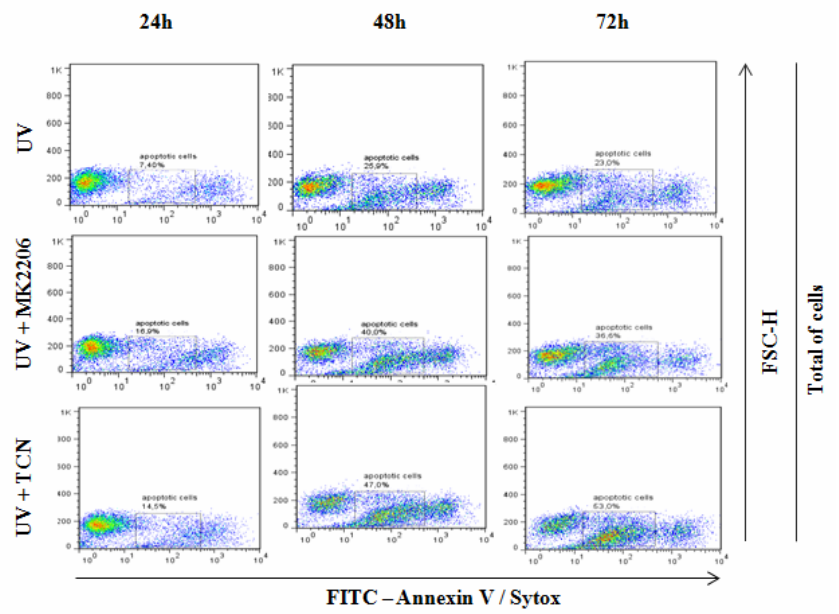
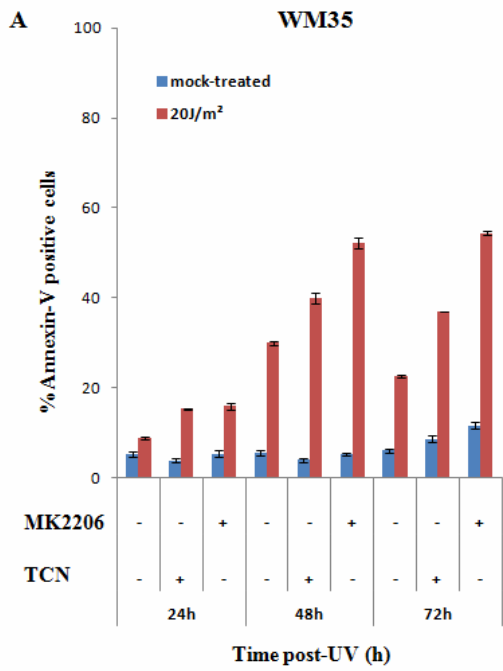
D'après les résultats précédents, il est devenu impératif de quantifier les cellules apoptotiques suite au traitement aux UV et aux inhibiteurs pharmacologiques de la phosphorylation d'Akt. Dans ce but, l'étude fut restreinte à l'utilisation de deux inhibiteurs, MK2206 et triciribine (spécifiques à Akt dans sa forme phosphorylée) dans la lignée WM35 exprimant une forte induction de la phosphorylation en réponse aux UV et dans laquelle un effet modéré sur la survie clonogénique a été observé. En ce qui trait à la dose d'UVC, on l'a augmenté à 20J/m<sup>2</sup> afin d'induire davantage la mort cellulaire et de déterminer si l'effet de l'inactivation de la phosphorylation d'Akt sur la régulation d'apoptose est dépendant de la dose d'UV.

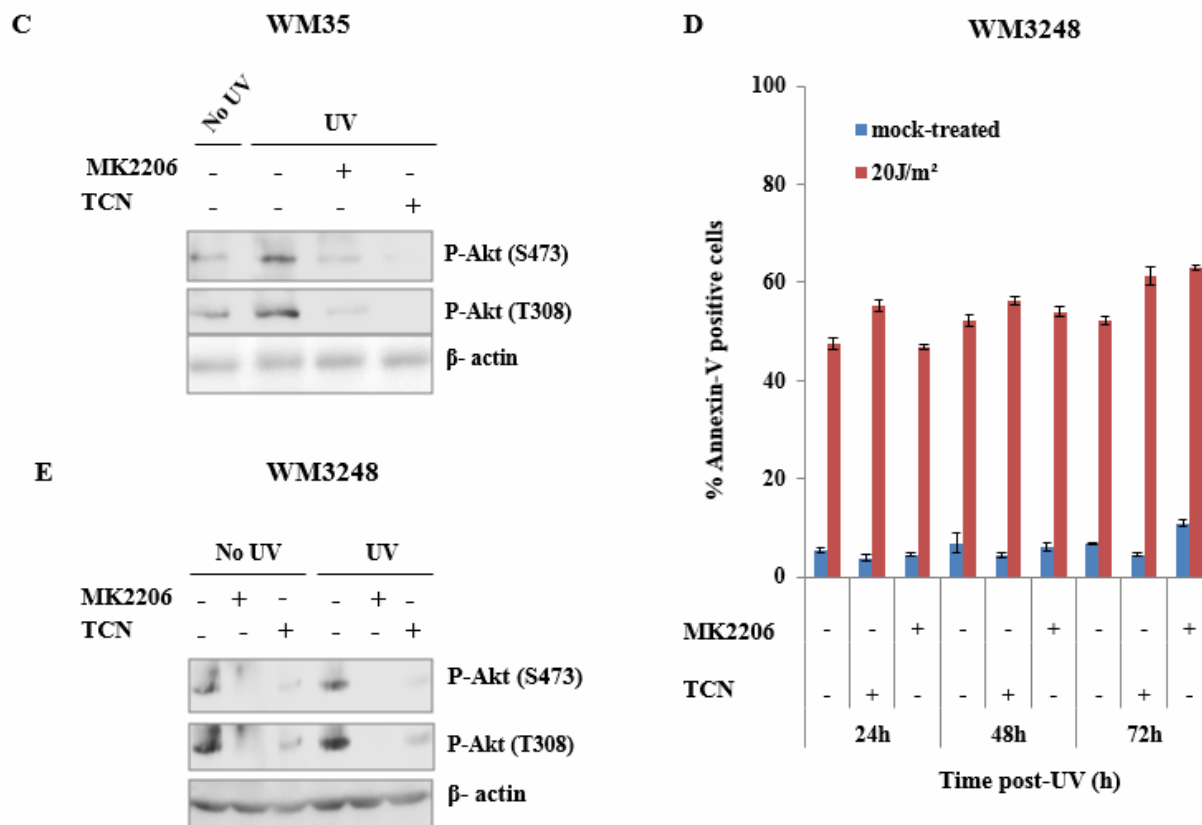
Tout d'abord, une approche plus précise a été utilisée comme la détection de la translocation des phosphatidyl-sérines par l'annexine-V (voir matériel et méthodes). Les cellules traitées ou non aux UV ont été marquées par l'annexine-V et ensuite analysées afin de quantifier les populations cellulaires qui sont annexine-V positives. Le dot plot représenté dans la **figure 8A** montre trois populations des cellules : les cellules vivantes de très faible intensité de fluorescence (FITC-/Sytox-), les cellules apoptotiques de moyenne intensité de fluorescence (FITC+/Sytox-), et les cellules nécrotiques de très forte intensité de fluorescence (FITC-/Sytox+). Dans notre étude, nous nous intéressons à quantifier la population des cellules apoptotiques. L'analyse des résultats obtenus (voir **figure 8A**) montre une augmentation du taux de cellules apoptotiques après exposition aux UV versus les cellules



non irradiées (mock-treated). De plus, l'induction de l'apoptose à différents temps après exposition aux UV est renforcée par traitement des cellules avec l'un des inhibiteurs MK2206 ou TCN et est très importante à 48 heures et 72 heures post-irradiation. En effet, le traitement au TCN semble être plus efficace que MK2206 à sensibiliser les cellules aux UV. Cette action pro-apoptotique des inhibiteurs de la phosphorylation d'Akt est absente chez les cellules non irradiées (mock-treated), ce qui prouve que l'effet phénotypique sur la mort cellulaire est spécifique aux UV.

Ensuite, pour valider les résultats obtenus avec le marquage à l'annexine-V, une analyse de la population cellulaire Sub-G1 a été effectuée. Le pique Sub-G1 représente les fragments des cellules généralement issus de l'apoptose. Dans la **figure 8B**, un traitement à MK2206 ou TCN révèle également un effet important; il est capable de sensibiliser les cellules à l'apoptose induite par les UV à 48 heures et 72 heures post-irradiation, tel que présenté par l'analyse à l'aide de l'annexine-V. L'ensemble des données et résultats présentés dans la **figure 8** montre bel et bien les effets importants de l'inhibition de la voie Akt sur la mort cellulaire par apoptose induite suite à une exposition aux UV. Ainsi, nos données expérimentales obtenues sont en accord avec les résultats rapportés dans d'autres études. Cependant, dans la lignée WM3248, exprimant un haut niveau d'Akt phosphorylé, aucun effet de l'inhibition d'Akt sur l'apoptose n'a été observé, ce qui suggère que la régulation de l'apoptose par Akt est dépendante de la lignée cellulaire.





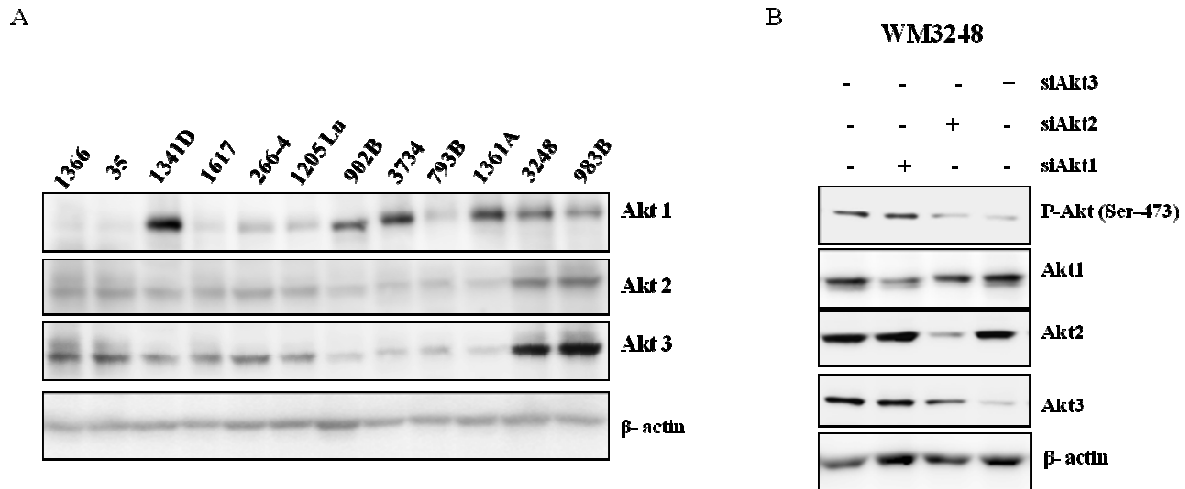
**Figure 8 : Le rôle de l'activation d'Akt induite par les UV sur la modulation de l'apoptose dans les cellules humaines de mélanome.** A. représentation graphique montrant le pourcentage des cellules Annexin-V positives à différents temps après traitement ou non aux inhibiteurs d'Akt dans les cellules WM35 exposées ou non à 20J/m<sup>2</sup> d'UVC. Graphique du bas; dot plot montrant l'analyse de l'apoptose par FACS en utilisant des anticorps anti-Annexin-V après traitement ou non de WM35 aux inhibiteurs d'Akt (échantillon irradié versus non irradié). Les cellules ont été aussi marquées par le sytox vert pour déterminer les cellules nécrotiques. B. Quantification de la population des cellules en Sub-G1 à différents temps (juste 0h et 72h représentés) post- traitement en absence ou présence d'inhibiteurs d'Akt dans les cellules WM35 traitées à 20J/m<sup>2</sup> d'UVC. Graphique du bas; dot plot montrant le pourcentage des cellules WM35 en Sub-G1 en utilisant un marquage au propidium iodide, après traitement ou non de WM35 aux inhibiteurs d'Akt (échantillon irradié versus non irradié). C. Immunobuvardage représentant l'induction de la phosphorylation d'Akt (S743 et T308) à 1h post- 20J/m<sup>2</sup> d'UVC dans la lignée WM35 traitée ou non aux inhibiteurs d'Akt. D. représentation graphique montrant le pourcentage des cellules Annexin-V positives à différents temps après traitement ou non aux inhibiteurs d'Akt dans les cellules WM3248 exposées ou non à 20J/m<sup>2</sup> d'UVC. E. Immunobuvardage indiquant l'inhibition de la phosphorylation d'Akt (S743 et T308) dans les cellules WM3248 exposées (à 1h post-UV) ou non aux UV.

## Expression et inhibition des isoformes d'Akt dans le mélanome malin

Après analyse de l'expression d'Akt phosphorylée dans le mélanome malin et étant donné l'existence de trois isoformes d'Akt exprimées dans différents tissus, il est pertinent d'important de déterminer les niveaux d'expression des différentes isoformes (Akt1, -2 et 3) dans le mélanome malin. Il a été démontré dans la littérature que les trois isoformes d'Akt sont exprimées dans le mélanome et qu'Akt3 est l'isoforme la plus activée. Ainsi, l'augmentation de l'expression/activité d'Akt3 est observée dans 60-70% de mélanomes sporadiques d'où l'importance de cette isoforme dans le développement de cette malignité. L'objectif de déterminer l'expression des trois isoformes dans mélanomes était principalement, à long terme, d'abolir leur expression pour pouvoir caractériser l'importance de leurs activités et fonctions.

Tout d'abord, l'immunobuvardage montre clairement que les trois isoformes d'Akt (Akt1, -2 et 3) sont exprimées dans le mélanome malin, mais d'une manière non équitable dépendamment de la lignée cellulaire. En effet, l'isoforme Akt3 est majoritairement exprimée lignées cellulaires de mélanome (8 sur 12 lignées cellulaires) tel que montré dans la **figure 9A**. Pourtant, l'expression d'une isoforme ne signifie pas nécessairement son activité. De ce fait, pour déterminer l'isoforme ou les isoformes responsable(s) de l'activité d'Akt dans le mélanome malin, nous avons inhibé individuellement l'expression des trois isoformes d'Akt en utilisant des ARN interférents d'Akt1, Akt2 et Akt3 dans la lignée WM3248. Le choix de cette lignée a été raisonnable en raison de la forte expression de toutes les isoformes d'Akt. Des immunobuvardages effectués indiquent que la transfection des ARNi entraîne bel et bien une sous-expression d'Akt1, Akt2 et Akt3 comparativement aux cellules transfectées avec des

ARNi contrôles (voir **figure 9B**). En effet, l'inhibition de l'expression d'Akt2 ou Akt3 induit une diminution de la phosphorylation/activation basale d'Akt contrairement à l'inhibition d'Akt1.



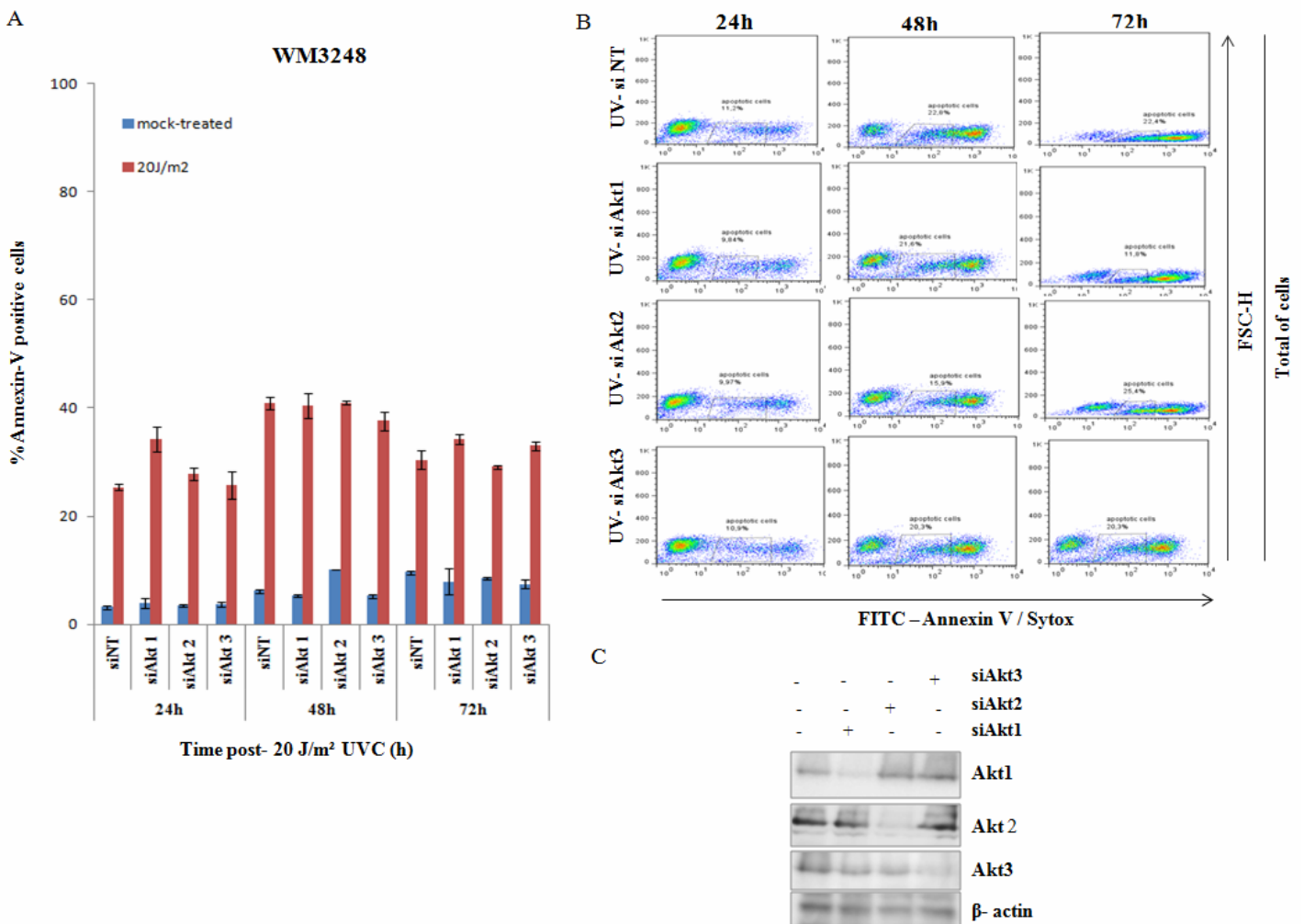
**Figure 9 : Expression et inhibition des isoformes d'Akt (Akt1, 2 et 3) dans les lignées cellulaires de mélanome.** A. Immunobuvardage représentant les niveaux d'expression des différentes isoformes d'Akt dans 12 diverses lignées de mélanome. B. Immunobuvardage indiquant l'effet des ARNi d'Akt1, -2 et Akt3 sur l'expression des trois isoformes d'Akt dans la lignée de mélanome WM3248.

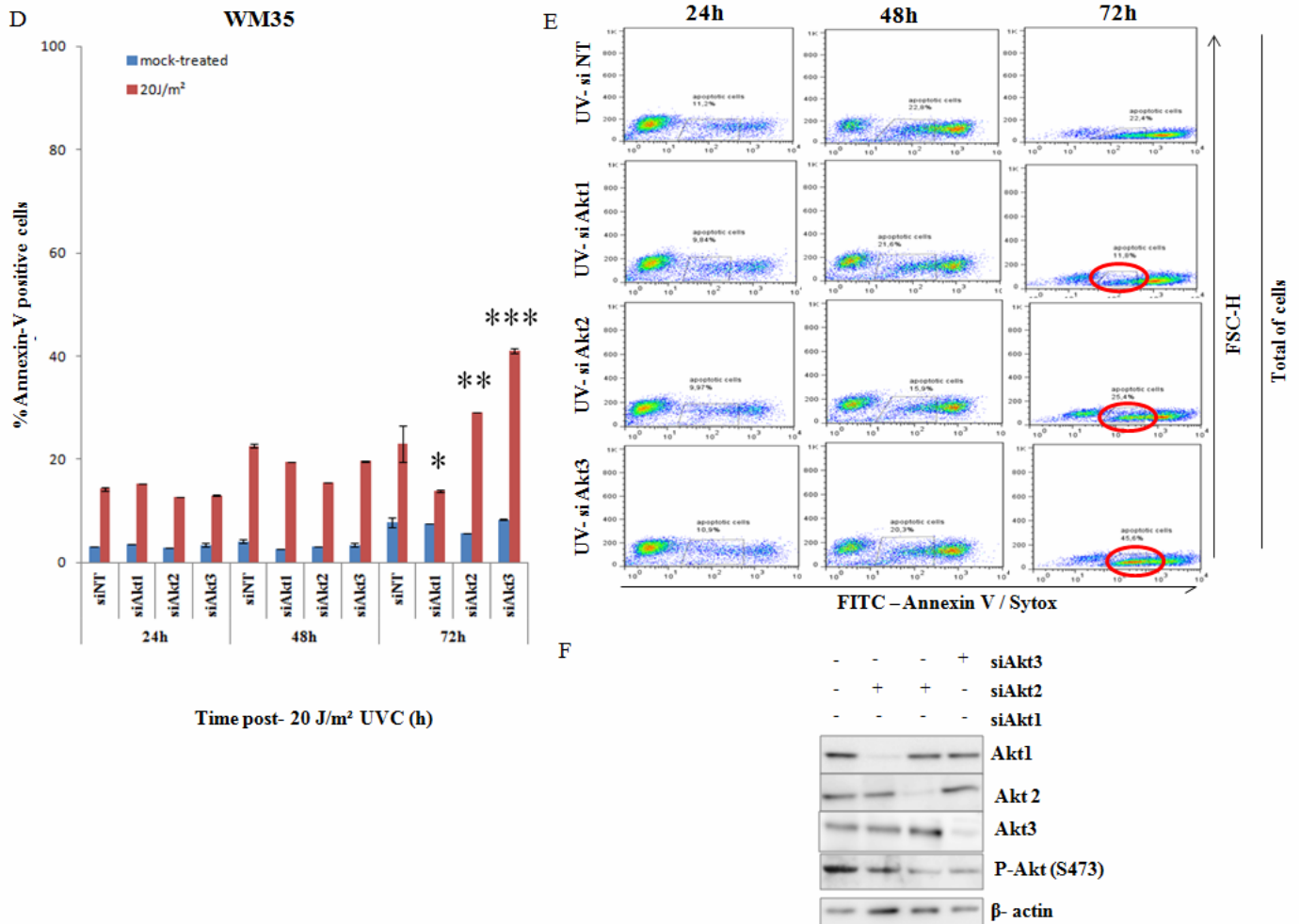
## **Le rôle des isoformes d'Akt dans la modulation de l'apoptose induite par les UV**

En raison des effets non spécifiques des inhibiteurs pharmacologiques et le manque d'études sur les rôles potentiels de chacune des isoformes d'Akt dans la réponse aux UV dans le mélanome malin, il est devenu important de caractériser si la déplétion de l'une des isoformes d'Akt pourrait réguler l'apoptose induite par les UV. De même, selon les résultats précédemment montrés (voir **figure 8**), des effets importants des inhibiteurs pharmacologiques d'Akt ont été observés dans la lignée WM35 contrairement à la lignée WM3248 qui montre déjà un taux élevé de l'apoptose en absence d'inhibiteurs suite aux irradiations UV. Afin de confirmer toutes ces données, les lignées WM35 et WM3248 ont été individuellement transfectées avec des ARNi d'Akt1,-2 ou 3. Tout d'abord, des immunobuvardages ont été effectués, indiquant que la transfection des cellules WM35 et WM3248 avec des ARNi résulte bel et bien en une sous-expression de chacun des isoformes d'Akt d'une manière individuelle (voir **figures 10 C et F**).

Des expériences de quantification de l'apoptose ont été faites sur les mêmes cellules transfectées afin de savoir si l'inhibition de l'expression de l'une des isoformes peut influencer l'apoptose induite par les UV en utilisant le marquage avec l'annexine-V. D'après les résultats obtenus (voir **figures 10 A et B**), il est clairement montré que la déplétion de l'expression de chacune des isoformes d'Akt dans la lignée de mélanome WM3248 n'exerce aucun effet important sur l'apoptose induite par les UV à tous les temps (24h, 48h et 72h post-20 J/m<sup>2</sup> d'UVC). Cependant, des effets phénotypiques sur l'apoptose ont été observés lors de l'inhibition de l'expression de l'une des isoformes d'Akt dans la lignée de mélanome WM35

(voir **figures 10 D et E**). Plus spécifiquement, l'inhibition de l'expression d'Akt2 et Akt3 induit une diminution de la phosphorylation d'Akt et, par conséquent, sensibilise d'une manière significative les cellules de mélanome WM35 à l'apoptose induite par 20 J/m<sup>2</sup> uniquement à 72 heures post-irradiation. En effet, le taux des cellules Annexine-V positives transfectées aux ARNi d'Akt2 et d'Akt3 représente, respectivement, 30% et 45% versus les cellules contrôles (10%). Cependant, l'inhibition d'Akt1 ne montre une diminution modérée de l'apoptose. Une telle induction d'apoptose dans la lignée de mélanome WM35 à 72h post-20 J/m<sup>2</sup> a été déjà observée avec l'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques de la phosphorylation d'Akt.





**Figure 10: Évaluation de l'apoptose des cellules de mélanome induite par les UV suite à l'inhibition de l'expression des isoformes d'Akt.** A. représentation graphique montrant le pourcentage des cellules Annexin-V positives à différents temps après transfection des ARNi d'Akt1, -2 et 3 et des ARNi contrôles dans les cellules WM3248 exposées ou non à 20J/m<sup>2</sup> d'UVC. B. dot plot montrant l'analyse de l'apoptose à différents temps post 20 J/m<sup>2</sup> d'UVC, par FACS en utilisant des anticorps anti-Annexin-V, après traitement des cellules WM3248 aux ARNi pour les différentes isoformes d'Akt (versus les cellules contrôles (siNT)). C. Immunobuvardage représentant l'inhibition de l'expression d'Akt1, -2 et 3 par des ARNi dans la lignée WM3248. D. représentation graphique montrant le pourcentage des cellules Annexin-V positives à différents temps après irradiation à 20 J/m<sup>2</sup> d'UVC des cellules WM35 transfectées avec des ARNi d'Akt1, -2 et 3 (versus les ARNi contrôles (siNT)). Le pourcentage des cellules apoptotiques (Annexin-V positives) à temps 72h post-UV dans les cellules transfectées avec des ARNi pour Akt1, -2 ou 3 est significativement différent de celui



des cellules transfectées avec des ARNi contrôles (\* :  $p=0.004$ , \*\* :  $p=0.02$ , \*\*\* :  $p=0.03$ ) E. dot plot montrant l'analyse de l'apoptose à différents temps post 20 J/m<sup>2</sup> d'UVC, par FACS en utilisant des anticorps anti-Annexin-V, après traitement des cellules WM35 aux ARNi de différentes isoformes d'Akt (versus les cellules contrôles (siNT)). La population encadrée en rouge représente les cellules apoptotiques, dans les échantillons où l'effet de l'inhibition des isoformes d'Akt est significatif. F. Immunobuvardage indiquant l'inhibition de l'expression des différentes isoformes d'Akt et de la forme phosphorylée d'Akt dans les cellules WM35 traitées aux ARNi d'Akt1, -2 et 3 ou des ARNi contrôles (siNT).

## **Discussion**

### **Rappel du projet**

Le mélanome représente la forme la plus mortelle du cancer de la peau dont l'incidence augmente annuellement avec peu de traitement à long terme. En effet, malgré le développement pharmaceutique de plusieurs inhibiteurs des voies dérégulées dans le mélanome y compris ceux de la voie PI3K/Akt, des limitations ont été cliniquement observées (Mouawad, Sebert et al. 2010). De ce fait, il est devenu nécessaire de mieux comprendre le rôle de l'activation de la voie PI3K/Akt dans le développement du mélanome, en particulier en réponse aux radiations UV qui sont un déterminant majeur du développement de ce type de cancer.

Il a été précédemment bien rapporté que la protéine Akt est suractivée suite à l'exposition aux UV (Wan, Wang et al. 2001). Nous avons donc voulu caractériser cette activation et son importance dans la régulation de la réponse cellulaire, telle que l'apoptose et la réparation des dommages à l'ADN, dans les cellules de mélanome. En effet, l'activation d'Akt mène à la phosphorylation de Chk1 permettant sa séquestration dans le cytoplasme et aussi celle de TopBP1 ce qui affecte l'activation du régulateur de la voie NER; ATR (Puc, Keniry et al. 2005, Pedram, Razandi et al. 2009). De même, la phosphorylation d'Akt semble diminuer l'apoptose induite suite à l'induction de dommages à l'ADN (Gao, Ishiyama et al. 2011, Ji, Yang et al. 2012). De plus, il est bien connu que l'isoforme Akt3 est prépondéramment activé dans le mélanome (Dhawan, Singh et al. 2002, Stahl, Sharma et al. 2004). Pourtant, la raison de cette activation préférentielle d'Akt3 versus les autres isoformes ainsi que son importance

dans la régulation de la réponse UV n'a pas été à date élucidée. Vu que les trois isoformes d'Akt ne jouent pas les mêmes fonctions biologiques, il serait bien de caractériser leur rôle potentiel dans la réponse aux UV.

### **Phosphorylation/activation d'Akt par les UV dans le mélanome malin**

L'exposition aux UV représente un risque important dans le développement du cancer de la peau, incluant le mélanome. Le processus de la transformation maligne corrèle avec l'induction de dommages à l'ADN induits par les UV, ce qui engendre des mutations dans le cas où ces altérations ne sont pas réparées. Afin de maintenir l'intégrité génomique, les UV induisent l'activation des voies de signalisation par lesquelles la cellule peut survivre sous les conditions de stress. Parmi ces voies, on cite la voie oncogénique PI3K/Akt. En effet, une activation aberrante de la voie de survie PI3K/Akt a été observée dans le mélanome, résultant soit des mutations des gènes impliqués dans la cascade de signalisation, la perte de PTEN ou bien les altérations moléculaires d'Akt. Il a déjà mis en évidence que l'exposition aux UV cause une sur-activation d'Akt via sa phosphorylation sur les résidus S473 et T308. Des études précédentes faites sur des kératinocytes primaires ont démontré que l'activation d'Akt est plus importante dans des cellules exposées aux UV versus des cellules non irradiées (Wan, Wang et al. 2001, Zhang, Maddock et al. 2001, Ming, Han et al. 2010).

L'analyse de la cinétique de la phosphorylation d'Akt par les UV révèle que dans toutes les lignées choisies; les lignées de mélanome, les fibroblastes primaires de la peau et les fibroblastes de poumons, une augmentation transitoire de l'activation d'Akt a été observée. Pourtant, la cinétique de la phosphorylation d'Akt diffère selon le site phosphorylé et le type cellulaire. En effet, pour toutes les lignées cellulaires, la phosphorylation du résidu S473

commence à augmenter à 30 minutes et reste élevée jusqu'à 1h post-irradiation. En ce qui est à la phosphorylation du résidu T308, elle est un peu tardive par rapport à la phosphorylation de S473. Elle commence dès la première heure post-irradiation, mais atteint un niveau élevé à 24h. Pourtant, la lignée des fibroblastes de poumons fait exception; la phosphorylation de la T308 est maximale à 1h post-UV puis revient au niveau basal faible après ce temps-là. L'ensemble de ces observations indique que la phosphorylation d'Akt par les UV se fait d'une manière précoce et transitoire, ce qui valide les résultats rapportés dans d'autres études (Wan, Wang et al. 2001, Zhang, Maddock et al. 2001). Ainsi, les différences observées au niveau de la cinétique de l'activation d'Akt pourraient expliquer que l'activation d'Akt sur les résidus sérines et thréonines se fait d'une manière dépendante du temps et du type cellulaire. Il est important de noter que la plupart des études n'accordent pas d'importance à l'activation d'Akt sur le résidu thréonine, alors que l'activation complète d'Akt nécessite la phosphorylation des résidus sérines et thréonines.

## **La corrélation entre l'activation d'Akt et la régulation de la GG-NER**

Cette étude rapporte bel et bien que l'abrogation de l'activité de la voie Akt soit par l'utilisation des ARNi de PTEN dans la lignée WM35 (SPR+) ou de l'inhibiteur de la phosphorylation d'Akt (MK2206) dans WM3248 (SPR-), ne montre aucun effet sur la réparation des photoproduits (6-4 PPs) induits par les UV en phase S. Pourtant, il est important de souligner que l'absence de tout effet de l'inhibition de la voie Akt sur la réparation NER était inattendue, en raison des études précédemment faites.

D'après les immunobuvardages présentés dans la **figure 3** et les résultats de l'efficacité de la NER dans le mélanome, on déduit que la majorité des lignées cellulaires de mélanome sont SPR- (par exemple les lignées WM793B, WM983B, WM3734 et WM3248) sous-exprimant PTEN et exprimant un niveau important d'Akt phosphorylée. Les cellules SPR+ comme WM35 et WM1366 expriment un niveau plus élevé de PTEN et sous-expriment Akt phosphorylé comparativement aux SPR-. Il est logique de penser qu'une telle déficience en NER pourrait s'expliquer par l'activité de la voie Akt. D'ailleurs, il est important de constater que la perte de PTEN est fréquemment identifiée dans le mélanome et corrèle avec le développement tumoral (Stahl, Cheung et al. 2003). Selon des études antérieures, la sous-régulation de PTEN par les UV est associée à la tumorigenèse de la peau. De même, PTEN a été rapporté comme modulateur de l'efficacité de la NER. Plus spécifiquement, la perte de PTEN provoque une réduction de la réparation des 6-4PPs à 6h post-UV, et ceci est associé à l'activation d'Akt (Ming, Feng et al. 2011). Cependant, cette contradiction avec les résultats obtenus dans notre étude concernant l'implication de l'activation d'Akt/perte de PTEN dans

régulation de la réparation des 6-4PPs induits par les UV pourrait s'expliquer par, tout d'abord, l'utilisation des types cellulaires différents, pouvant révéler un effet dépendant au type cellulaire. De plus, les résultats indiquent que l'inhibition de la réparation des 6-4PPs par la perte de PTEN n'est pas assez importante comparativement à la réparation des CPDs. Dans la même étude, le rôle positif de l'activation d'Akt sur la réparation des 6-4PPS a été mis en évidence seulement par l'utilisation d'un inhibiteur de PI3K, LY294002, qui est non spécifique pour Akt. D'autre part, la capacité de réparation des photoproduits induits par les UV n'a pas été évaluée en fonction du cycle cellulaire, tel que fait dans notre étude.

Selon la littérature, la phosphorylation de Chk1 et de TopBP1 par Akt affecte l'activation d'ATR qui est un régulateur majeur de la voie NER (King, Skeen et al. 2004, Pedram, Razandi et al. 2009). L'ensemble de ces événements pourrait influencer l'efficacité de la NER en phase S. D'autres évidences n'invalident pas les résultats de l'étude citée auparavant. En effet, peu après la génération de nos résultats, une étude récemment publiée a montré que l'activité d'Akt joue un rôle positif sur la NER via la phosphorylation de p300 qui est un cofacteur du remodelage de la chromatine (Wang, Han et al. 2013). Plus spécifiquement, l'inhibition d'Akt cause une diminution de la réparation des CPDs et non des 6-4PPs. Globalement, il est difficile de comparer nos résultats avec ceux des études citées au-dessus, en raison de la méthode avec laquelle la réparation a été évaluée et les conditions utilisées dans chacune des études.

## **La régulation de l'apoptose dans les cellules de mélanome**

L'exposition aux UV peut induire des altérations génétiques d'oncogènes et de suppresseurs de tumeurs si les dommages persistent et ne sont pas réparés, menant par la suite à une prolifération aberrante des cellules endommagées. La protection de la survie non contrôlée repose sur l'élimination des cellules altérées par l'apoptose induite par les UV. Cependant, l'induction de la mort cellulaire d'une manière excessive peut aussi affecter l'intégrité des tissus. De ce fait, les UV induisent une réponse adéquate assurant un équilibre entre les signaux pro- et anti-apoptotiques. Généralement, la réponse aux UV converge à l'activation de p53 pour permettre à la cellule de s'auto-éliminer par apoptose quand elle est incapable de réparer ses dommages. L'activité de p53 est contrôlée par l'ubiquitine ligase mdm2 dont son activité dépend de la phosphorylation d'Akt pour promouvoir la dégradation de p53.

Vu le rôle important d'Akt dans la promotion de la survie cellulaire et la forte induction de la phosphorylation de cette kinase par les UV, il est logique de constater que l'inhibition de son activation pourrait renforcer l'apoptose induite par les UV. De même, en raison de l'absence des effets de l'inactivation de la voie Akt sur la NER, il est devenu indispensable de vérifier si cette inactivation pourrait réguler la mort cellulaire, tel qu'attendu. Tout d'abord, les résultats de la survie clonogénique ne montre aucun effet significatif de l'inhibition d'Akt sur la survie des cellules de mélanome. Une diminution modérée de la survie cellulaire a été observée dans la lignée de mélanome WM35 après le traitement aux inhibiteurs pharmacologiques de la phosphorylation d'Akt, ce qui nous avait laissés penser que les

résultats obtenus peuvent être biaisés par certaines limitations. En effet, le traitement des cellules par les inhibiteurs utilisés montre une forte cytotoxicité au-delà du troisième jour post-traitement, alors que le test de survie clonogénique nécessite 2 à 3 semaines d'incubation des cellules dans le milieu pour former des colonies. De ce fait, il est devenu impératif d'analyser la sensibilité des cellules aux UV, à court terme (maximum 72 heures post-UV), en utilisant d'autres approches.

Selon la littérature, il semble que l'activation d'Akt régule l'apoptose via la phosphorylation d'une panoplie de substrats pro- et anti-apoptotiques, tel qu'évoqué dans l'introduction. L'inhibition d'Akt entraîne une forte augmentation de l'apoptose induite par les UV (500 J/m<sup>2</sup>) dans les kératinocytes humains via le renforcement du processus des caspases et du relâchement de cytochrome C (Wang, Quan et al. 2003). De même, le traitement avec le périfosine, un inhibiteur d'Akt, renforce la perte de viabilité des fibroblastes et des kératinocytes primaires induite par 150 et 200 J/m<sup>2</sup> d'UVB (Ji, Yang et al. 2012). L'ensemble de ces études montre une corrélation entre l'hyperactivation d'Akt en réponse aux UV et la résistance à la mort cellulaire.

Les résultats du marquage annexine-V des cellules WM35 ainsi que la quantification des populations cellulaires Sbu-G1 montrent bel et bien que l'inhibition de la phosphorylation d'Akt par les inhibiteurs MK2206 et TCN entraîne une augmentation de l'apoptose induite par 20J/m<sup>2</sup> d'UVC d'une manière dépendante du temps (effet observé à 48h et 72h et non pas 24h post-UV), ce qui valide l'hypothèse de notre étude. Cependant, l'effet de l'inactivation d'Akt sur l'apoptose semble être dépendant de la lignée cellulaire. En effet, dans une autre lignée de mélanome exprimant un haut niveau basal d'Akt phosphorylée, WM3248, aucun effet significatif de l'inactivation d'Akt sur l'apoptose n'a été observé. En effet, la lignée



WM328 (non traitée aux inhibiteurs d'Akt) montre une forte induction d'apoptose en réponse aux UV ce qui suggère l'activation d'une voie apoptotique, par les UV, pouvant agir comme un régulateur négatif de la voie de survie Akt, d'où la nécessité de caractériser la corrélation entre l'induction de l'apoptose et l'activation d'autres voies de signalisation en réponse aux UV.

### **L'induction de l'apoptose par les UV d'une manière spécifique aux isoformes d'Akt**

Il existe trois isoformes d'Akt produits de trois gènes différents et ayant différentes activités. En effet, une distribution des isoformes dans les tissus, une activité intracellulaire particulière et une stimulation dominante de l'un des isoformes sont tous des mécanismes permettant à Akt d'être isoforme spécifique. De plus, l'activité d'un isoforme en particulier repose sur la balance entre les signaux activateurs et inhibiteurs de son activité. Il existe une corrélation importante entre l'hyperactivation spécifique des isoformes et le développement spécifique de certains cancers, ce qui soulève la possibilité que la signalisation spécifique aux isoformes d'Akt puisse être impliquée dans le développement tumoral. Dans le cas de mélanome, toutes les isoformes d'Akt sont exprimées, avec une activation prédominante de l'isoforme Akt3 (Madhunapantula and Robertson 2009). Des données expérimentales ont déjà montré que l'activité d'Akt3 augmente dans les stades avancés de mélanome (phase de croissance radiale), ce qui suggère le rôle d'Akt dans le développement de mélanome (Stahl, Sharma et al. 2004, Robertson 2005). De plus, il a été mis en évidence que l'isoforme Akt3 est une kinase de pro-survie dans le mélanome. Akt3 inhibe l'apoptose via l'augmentation des niveaux d'expression des caspases-3 et PARP clivés, ce qui rend les cellules de mélanome

plus résistantes aux agents chimiothérapeutiques (Stahl, Sharma et al. 2004, Sharma, Sharma et al. 2009).

Vu l'absence des anticorps spécifiques pour la forme phosphorylée de chaque isoforme d'Akt, nous avons pensé d'inhiber individuellement l'expression des trois isoformes d'Akt par des ARNi spécifiques de chaque isoforme et quantifier l'expression totale d'Akt phosphorylée. Les résultats d'immunobuvardage montrent que la déplétion d'Akt2 ou Akt3 dans les cellules de mélanome entraîne une diminution de la phosphorylation d'Akt, ce qui indique qu'Akt2 et Akt3 semblent être les formes activées dans le mélanome.

En raison de l'effet phénotypique de l'inhibition d'Akt sur l'induction de l'apoptose en réponse aux UV observé dans la lignée de mélanome WM35, il est devenu impératif de valider ces résultats et déterminer la spécificité des isoformes d'Akt à réguler cette réponse protectrice. Les données expérimentales de notre étude rapportent que l'inhibition de la phosphorylation d'Akt causée par l'inhibition de l'expression d'Akt2 ou Akt3 renforce l'induction de l'apoptose par les UV d'une manière dépendante du temps, alors que l'inhibition de l'expression d'Akt1 induit une diminution modérée de l'apoptose. Pourtant, ces effets n'ont pas été, encore une fois, observés dans la lignée WM3248, suggérant ainsi un effet dépendant de la lignée cellulaire.

Dans le contexte de la réponse UV, l'implication spécifique des isoformes d'Akt n'a pas été élucidée à ce jour. Une étude effectuée sur des fibroblastes de souris a démontré que les cellules déficientes en Akt2 sont hypersensibles aux UV comparativement aux cellules déficientes en Akt1 (Kim, Kim et al. 2009). Pourtant, cette étude a été faite sur des fibroblastes déficients en Akt1 ou Akt2 sans accorder aucune importance à l'effet de la déplétion d'Akt3, la raison pour laquelle il est difficile de déterminer laquelle des isoformes est essentielle pour

la survie des cellules en réponse aux UV. Finalement, en accord avec l'effet positif des inhibiteurs pharmacologiques de phospho-Akt sur l'induction de l'apoptose en réponse aux UV, l'inhibition spécifique d'Akt2 et Akt3 pourrait être protectrice pour la cellule afin d'éliminer les cellules endommagées.

## Conclusion

La réponse aux UV est un mécanisme qui permet à la cellule de bien gérer l'induction des photoproduits et donc assurer l'intégrité génomique. Cette réponse fait appel à plusieurs voies de signalisation moléculaires qui vont induire une réponse adaptée.

D'après les résultats présentés dans notre étude, il apparaît que la voie de signalisation PI3K/Akt est potentiellement activée dans les cellules de mélanome suite à l'exposition aux UV. Cette régulation pourrait avoir une grande importance dans la compréhension des mécanismes moléculaires survenant dans les cellules de mélanomes suite à l'exposition aux UV, ce qui pourrait être critique pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Après avoir évalué l'expression d'Akt dans sa forme phosphorylée et de PTEN, il semble que les lignées SPR- expriment souvent un niveau important de la phosphorylation d'Akt et un faible niveau de PTEN. De plus, les lignées SPR+ ne sont pas caractérisées par un niveau marqué d'Akt phosphorylée, ce qui nous a laissés penser qu'une telle déficience en NER pourrait être associée à l'activation de la voie PI3K/Akt. Selon les résultats obtenus, il semble qu'en dépit de ces observations et du lien entre la voie PI3K/Akt et la voie nucléaire ATR, l'inhibition spécifique d'Akt ou de son antagoniste PTEN ne contrôle pas l'efficacité de la réparation des 6-4PPs en réponse aux UV.

Cependant, nous ne pouvons pas exclure que l'inhibition de l'activation d'Akt pourrait conduire aux effets phénotypiques sur la sensibilisation des cellules de mélanome aux UV. L'inhibition pharmacologique de la phosphorylation d'Akt dans une lignée de mélanome dont le niveau basal de phospho-Akt est faible, mais augmente en réponse aux UV est fortement

capable de sensibiliser les cellules aux UV d'une manière dépendante du temps. Cependant cet effet n'a pas été observé dans une lignée de mélanome exprimant, à la base, une forte phosphorylation d'Akt en absence d'UV.

En dernier lieu, afin de voir si l'effet observé par l'emploi des inhibiteurs pharmacologiques de la phosphorylation d'Akt dans la lignée de mélanome WM35 est isoforme spécifique, l'expression d'Akt1, -2 et -3 a été réduite par l'usage d'ARN interférents spécifiques à chacune des isoformes. Tout d'abord, les résultats d'immunobuvardage ont montré qu'Akt2 et Akt3 sont les isoformes activées dans les cellules de mélanome. En addition, la réduction de l'expression d'Akt2 et Akt3 par l'approche des ARNi montre une forte sensibilité des cellules de mélanome aux UV. Ainsi, elle pourrait être utile pour bien comprendre l'implication thérapeutique d'Akt2 et Akt3 dans le traitement de mélanomes.

## Limites de l'étude

La limite principale dans ce projet est associée à la croissance des cellules primaires choisies. En effet, il aurait dû préférablement utilisé des mélanocytes primaires qui, après leur transformation maligne, deviennent des mélanomes, mais le temps de leur doublement est très long pouvant aller à des mois. De plus, en raison des mutations génétiques accumulées lors du processus tumoral, il devient impératif de vérifier si l'inhibition de la phosphorylation d'Akt dans les mélanocytes primaires pourrait induire des réponses cellulaires différentes. De même, les fibroblastes primaires de poumons ne représentent pas un bon modèle des cellules primaires à être comparées avec les cellules de mélanomes en raison de la différence d'origine tissulaire et des caractéristiques génétiques.

En addition, la diversité des mutations accumulées lors du développement tumoral dans les lignées de mélanomes peut conduire à différentes altérations dans la physiologie de la cellule, et par conséquent, avoir un impact important sur la fiabilité des résultats obtenus.

Il est important de mentionner qu'en dépit de l'effet marqué des inhibiteurs pharmacologiques choisis sur la phosphorylation d'Akt, ces derniers peuvent avoir des effets non spécifiques. De ce fait, les données expérimentales générées devaient être consolidées par l'utilisation du mix d'ARN interférents visant à la fois les trois isoformes d'Akt. Pourtant, les conditions de cette déplétion étaient difficiles à établir. De même, l'inhibition de la phosphorylation d'Akt *in vitro* ne veut pas nécessairement dire que les mêmes effets auront lieu *in vivo*.

Une autre limite majeure est l'optimisation des conditions pour avoir une réduction significative de l'expression des trois isoformes d'Akt. Cette étape nécessitait beaucoup de

temps et constituait un grand obstacle pour l'avancement du projet. De plus, la plupart des lignées cellulaires sont difficiles à être transfectées avec des ARN interférents.

## **Expériences futures**

Afin de consolider les résultats présentés dans ce mémoire, plusieurs travaux futurs pourraient être réalisés.

En raison du rôle d'Akt dans la phosphorylation de certains substrats impliqués dans la régulation de la NER, il serait donc utile de réviser l'implication de la voie PI3K / Akt dans l'efficacité de cette voie de réparation dans un grand nombre de lignées cellulaires de mélanome, mais cette fois-ci en évaluant la phosphorylation de TopBP1 et Chk1, et donc, d'ATR en réponse aux UV. Entre autres, il serait aussi important de vérifier la localisation de Chk1 par immunofluorescence et d'évaluer l'interaction de TopBP1 avec ATR dans les lignées de mélanome irradiées aux UV après leur traitement aux inhibiteurs de la phosphorylation d'Akt ou aux ARN interférents visant simultanément Akt1, -2 et 3. Ensuite, il serait intéressant de générer des lignées ayant Chk1 ou TopBP1 non phosphorylable par Akt et voir l'effet de ceci sur l'efficacité de la NER.

Il serait aussi intéressant d'évaluer l'expression d'autres marqueurs de la voie de réponse aux dommages à l'ADN induits par les UV, comme p53, p21, phospho-H2AX.

Il est bien connu que les mutations peuvent être provoquées lorsque la réparation du dommage à l'ADN est inefficace. Il serait donc intéressant de tester l'effet de l'inhibition de la phosphorylation d'Akt sur le taux de mutations induites suite aux irradiations UV dans les cellules de mélanome, en utilisant l'essai de mutation HPRT.

Une compréhension plus approfondie des mécanismes moléculaires marquant l'induction de l'apoptose permettrait de mieux élucider le rôle de la phosphorylation d'Akt dans cette réponse induite par les UV. Pour ce point, il serait pertinent de tester l'effet de l'inactivation



d'Akt sur le taux de phosphorylation de ses cibles protéiques pro- et anti-apoptotiques. L'ensemble de ces expériences devrait être effectué par l'usage des inhibiteurs pharmacologiques de la phosphorylation d'Akt et aussi des mutants non phosphorylables d'Akt.

Une fois ces mécanismes bien caractérisés, il serait jugé pertinent de déterminer la spécificité des différentes isoformes d'Akt à influencer l'ensemble des réponses cellulaires aux UV, en utilisant des ARN interférents et des shRNA. De Plus, il est important de valider les résultats obtenus avec d'autres agents mutagènes comme les radiations ionisantes, afin de savoir si les effets observés sont spécifiques aux UV.

Si l'inhibition de la phosphorylation montrait des effets potentiels sur la réponse des cellules de mélanome aux UV, ceci pourrait être aussi important dans la réponse clinique des patients aux inhibiteurs de la phosphorylation d'Akt. En addition, les inhibiteurs d'Akt pourraient être utilisés pour les patients atteints du mélanome muté BRAF (V600E), en raison de la coopération de l'activation d'Akt et le mutant BRAF dans la progression tumorale et la chimiorésistance (Tran, Gowda et al. 2008, Shao and Aplin 2010). Il n'est pas donc surprenant qu'une combinaison des inhibiteurs de la phosphorylation d'Akt et des inhibiteurs de MEK puisse donner des résultats plus prometteurs qu'une monothérapie.

## **Bibliographie**

Adimoolam, S., C. X. Lin and J. M. Ford (2001). "The p53-regulated cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 (cip1, waf1, sdi1), is not required for global genomic and transcription-coupled nucleotide excision repair of UV-induced DNA photoproducts." J Biol Chem **276**(28): 25813-25822.

Agarwal, M. L., A. Agarwal, W. R. Taylor and G. R. Stark (1995). "p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(18): 8493-8497.

Aitken, J., J. Welch, D. Duffy, A. Milligan, A. Green, N. Martin and N. Hayward (1999). "CDKN2A variants in a population-based sample of Queensland families with melanoma." J Natl Cancer Inst **91**(5): 446-452.

Alessi, D. R., M. Andjelkovic, B. Caudwell, P. Cron, N. Morrice, P. Cohen and B. A. Hemmings (1996). "Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1." EMBO J **15**(23): 6541-6551.

Altomare, D. A., G. E. Lyons, Y. Mitsuuchi, J. Q. Cheng and J. R. Testa (1998). "Akt2 mRNA is highly expressed in embryonic brown fat and the AKT2 kinase is activated by insulin." Oncogene **16**(18): 2407-2411.

Anderson, K. E., J. Coadwell, L. R. Stephens and P. T. Hawkins (1998). "Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B." Curr Biol **8**(12): 684-691.

Anna, B., Z. Blazej, G. Jacqueline, C. J. Andrew, R. Jeffrey and S. Andrzej (2007). "Mechanism of UV-related carcinogenesis and its contribution to nevi/melanoma." Expert Rev Dermatol **2**(4): 451-469.

Atilasoy, E. S., J. T. Seykora, P. W. Soballe, R. Elenitsas, M. Nesbit, D. E. Elder, K. T. Montone, E. Sauter and M. Herlyn (1998). "UVB induces atypical melanocytic lesions and melanoma in human skin." Am J Pathol **152**(5): 1179-1186.

Auclair, Y., R. Rouget, B. Affar el and E. A. Drobetsky (2008). "ATR kinase is required for global genomic nucleotide excision repair exclusively during S phase in human cells." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(46): 17896-17901.

Autier, P., J. F. Dore, O. Gefeller, J. P. Cesarini, F. Lejeune, K. F. Koelmel, D. Lienard and U. R. Kleeberg (1997). "Melanoma risk and residence in sunny areas. EORTC Melanoma Co-operative Group. European Organization for Research and Treatment of Cancer." Br J Cancer **76**(11): 1521-1524.

Baldin, V., N. Theis-Febvre, C. Benne, C. Froment, M. Cazales, O. Burlet-Schiltz and B. Ducommun (2003). "PKB/Akt phosphorylates the CDC25B phosphatase and regulates its intracellular localisation." Biol Cell **95**(8): 547-554.

Barnes, D. E. and T. Lindahl (2004). "Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells." Annu Rev Genet **38**: 445-476.

Barnhill, R. L. and M. C. Mihm, Jr. (1993). "The histopathology of cutaneous malignant melanoma." Semin Diagn Pathol **10**(1): 47-75.

Barthel, A., S. T. Okino, J. Liao, K. Nakatani, J. Li, J. P. Whitlock, Jr. and R. A. Roth (1999). "Regulation of GLUT1 gene transcription by the serine/threonine kinase Akt1." J Biol Chem **274**(29): 20281-20286.

Batista, L. F., B. Kaina, R. Meneghini and C. F. Menck (2009). "How DNA lesions are turned into powerful killing structures: insights from UV-induced apoptosis." Mutat Res **681**(2-3): 197-208.

Bauer, J. and C. Garbe (2003). "Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. A comprehensive review of epidemiological data." Pigment Cell Res **16**(3): 297-306.

Bellacosa, A., D. de Feo, A. K. Godwin, D. W. Bell, J. Q. Cheng, D. A. Altomare, M. Wan, L. Dubeau, G. Scambia, V. Masciullo, G. Ferrandina, P. Benedetti Panici, S. Mancuso, G. Neri and J. R. Testa (1995). "Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas." Int J Cancer **64**(4): 280-285.

Benjamin, C. L. and H. N. Ananthaswamy (2007). "p53 and the pathogenesis of skin cancer." Toxicol Appl Pharmacol **224**(3): 241-248.

Bennett, D. C. (2008). "How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events?" Pigment Cell Melanoma Res **21**(1): 27-38.

Bevona, C., W. Goggins, T. Quinn, J. Fullerton and H. Tsao (2003). "Cutaneous melanomas associated with nevi." Arch Dermatol **139**(12): 1620-1624; discussion 1624.

Bode, A. M. and Z. Dong (2003). "Mitogen-activated protein kinase activation in UV-induced signal transduction." Sci STKE **2003**(167): RE2.

Bos, J. L. (1989). "ras oncogenes in human cancer: a review." Cancer Res **49**(17): 4682-4689.

Bozulic, L. and B. A. Hemmings (2009). "PIKKing on PKB: regulation of PKB activity by phosphorylation." Curr Opin Cell Biol **21**(2): 256-261.

Bozulis, L., B. Surucu, D. Hynx and B. A. Hemmings (2008). "PKBalpha/Akt1 acts downstream of DNA-PK in the DNA double-strand break response and promotes survival." Mol Cell **30**(2): 203-213.

Braig, M., S. Lee, C. Loddenkemper, C. Rudolph, A. H. Peters, B. Schlegelberger, H. Stein, B. Dorken, T. Jenuwein and C. A. Schmitt (2005). "Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development." Nature **436**(7051): 660-665.

Brodbeck, D., P. Cron and B. A. Hemmings (1999). "A human protein kinase Bgamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain." J Biol Chem **274**(14): 9133-9136.

Brognaard, J., A. S. Clark, Y. Ni and P. A. Dennis (2001). "Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation." Cancer Res **61**(10): 3986-3997.

Brunet, A., A. Bonni, M. J. Zigmond, M. Z. Lin, P. Juo, L. S. Hu, M. J. Anderson, K. C. Arden, J. Blenis and M. E. Greenberg (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." Cell **96**(6): 857-868.

Bulavin, D. V., Y. Higashimoto, I. J. Popoff, W. A. Gaarde, V. Basrur, O. Potapova, E. Appella and A. J. Fornace, Jr. (2001). "Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase." Nature **411**(6833): 102-107.

Bulavin, D. V., S. Saito, M. C. Hollander, K. Sakaguchi, C. W. Anderson, E. Appella and A. J. Fornace, Jr. (1999). "Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation." EMBO J **18**(23): 6845-6854.

Burgering, B. M. and P. J. Coffey (1995). "Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction." Nature **376**(6541): 599-602.

- Cadet, J., T. Douki, J. P. Pouget, J. L. Ravanat and S. Sauvaigo (2001). "Effects of UV and visible radiations on cellular DNA." Curr Probl Dermatol **29**: 62-73.
- Cadet, J., T. Douki, J. L. Ravanat and P. Di Mascio (2009). "Sensitized formation of oxidatively generated damage to cellular DNA by UVA radiation." Photochem Photobiol Sci **8**(7): 903-911.
- Cadet, J., E. Sage and T. Douki (2005). "Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA." Mutat Res **571**(1-2): 3-17.
- Caldecott, K. W. (2008). "Single-strand break repair and genetic disease." Nat Rev Genet **9**(8): 619-631.
- Campisi, J. (2005). "Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors." Cell **120**(4): 513-522.
- Caporali, S., L. Levati, G. Starace, G. Ragone, E. Bonmassar, E. Alvino and S. D'Atri (2008). "AKT is activated in an ataxia-telangiectasia and Rad3-related-dependent manner in response to temozolomide and confers protection against drug-induced cell growth inhibition." Mol Pharmacol **74**(1): 173-183.
- Cardone, M. H., N. Roy, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, T. F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch and J. C. Reed (1998). "Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation." Science **282**(5392): 1318-1321.
- Ceraline, J., G. Deplanque, B. Duclos, J. M. Limacher, F. Vincent, S. Goldblum and J. P. Bergerat (1997). "[Relationships between p53 induction, cell cycle arrest and survival of normal human fibroblasts following DNA damage]." Bull Cancer **84**(11): 1007-1016.

Chang, D., F. Chen, F. Zhang, B. C. McKay and M. Ljungman (1999). "Dose-dependent effects of DNA-damaging agents on p53-mediated cell cycle arrest." Cell Growth Differ **10**(3): 155-162.

Chen, J., M. K. Ghorai, G. Kenney and J. Stubbe (2008). "Mechanistic studies on bleomycin-mediated DNA damage: multiple binding modes can result in double-stranded DNA cleavage." Nucleic Acids Res **36**(11): 3781-3790.

Chen, W. S., P. Z. Xu, K. Gottlob, M. L. Chen, K. Sokol, T. Shiyanova, I. Roninson, W. Weng, R. Suzuki, K. Tobe, T. Kadowaki and N. Hay (2001). "Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene." Genes Dev **15**(17): 2203-2208.

Cheney, I. W., S. T. Neuteboom, M. T. Vaillancourt, M. Ramachandra and R. Bookstein (1999). "Adenovirus-mediated gene transfer of MMAC1/PTEN to glioblastoma cells inhibits S phase entry by the recruitment of p27Kip1 into cyclin E/CDK2 complexes." Cancer Res **59**(10): 2318-2323.

Cheng, J. Q., A. K. Godwin, A. Bellacosa, T. Taguchi, T. F. Franke, T. C. Hamilton, P. N. Tsichlis and J. R. Testa (1992). "AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(19): 9267-9271.

Chin, L., L. A. Garraway and D. E. Fisher (2006). "Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era." Genes Dev **20**(16): 2149-2182.

Cho, H., J. Mu, J. K. Kim, J. L. Thorvaldsen, Q. Chu, E. B. Crenshaw, 3rd, K. H. Kaestner, M. S. Bartolomei, G. I. Shulman and M. J. Birnbaum (2001). "Insulin resistance and a

diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta)." Science **292**(5522): 1728-1731.

Ciccia, A. and S. J. Elledge (2010). "The DNA damage response: making it safe to play with knives." Mol Cell **40**(2): 179-204.

Clarke, A. R., C. A. Purdie, D. J. Harrison, R. G. Morris, C. C. Bird, M. L. Hooper and A. H. Wyllie (1993). "Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways." Nature **362**(6423): 849-852.

Clingen, P. H., C. F. Arlett, L. Roza, T. Mori, O. Nikaido and M. H. Green (1995). "Induction of cyclobutane pyrimidine dimers, pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts, and Dewar valence isomers by natural sunlight in normal human mononuclear cells." Cancer Res **55**(11): 2245-2248.

Cockell, C. S. and G. Horneck (2001). "The history of the UV radiation climate of the earth--theoretical and space-based observations." Photochem Photobiol **73**(4): 447-451.

Coffer, P. J., B. M. Burgering, M. P. Peppelenbosch, J. L. Bos and W. Kruijer (1995). "UV activation of receptor tyrosine kinase activity." Oncogene **11**(3): 561-569.

Cortez, D., S. Guntuku, J. Qin and S. J. Elledge (2001). "ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling." Science **294**(5547): 1713-1716.

Cross, D. A., D. R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich and B. A. Hemmings (1995). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B." Nature **378**(6559): 785-789.

Cummins, D. L., J. M. Cummins, H. Pantle, M. A. Silverman, A. L. Leonard and A. Chanmugam (2006). "Cutaneous malignant melanoma." Mayo Clin Proc **81**(4): 500-507.



Dai, D. L., M. Martinka and G. Li (2005). "Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases." J Clin Oncol **23**(7): 1473-1482.

Dankort, D., D. P. Curley, R. A. Cartledge, B. Nelson, A. N. Karnezis, W. E. Damsky, Jr., M. J. You, R. A. DePinho, M. McMahon and M. Bosenberg (2009). "Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma." Nat Genet **41**(5): 544-552.

Dasari, S. and P. Bernard Tchounwou (2014). "Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action." Eur J Pharmacol.

Datta, S. R., H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh and M. E. Greenberg (1997). "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery." Cell **91**(2): 231-241.

Datta, S. R., A. M. Ranger, M. Z. Lin, J. F. Sturgill, Y. C. Ma, C. W. Cowan, P. Dikkes, S. J. Korsmeyer and M. E. Greenberg (2002). "Survival factor-mediated BAD phosphorylation raises the mitochondrial threshold for apoptosis." Dev Cell **3**(5): 631-643.

Davenport, V., J. F. Morris, R. Motazed and A. C. Chu (1999). "p53 induction in normal human skin in vitro following exposure to solar simulated UV and UV-B irradiation." J Photochem Photobiol B **49**(2-3): 177-186.

Davies, H., G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M. J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B. A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G. J. Riggins, D. D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J. W. Ho, S. Y. Leung, S. T. Yuen, B. L. Weber, H. F.

Seigler, T. L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C. J. Marshall, R. Wooster, M. R. Stratton and P. A. Futreal (2002). "Mutations of the BRAF gene in human cancer." Nature **417**(6892): 949-954.

Davies, M. A., K. Stemke-Hale, E. Lin, C. Tellez, W. Deng, Y. N. Gopal, S. E. Woodman, T. C. Calderone, Z. Ju, A. J. Lazar, V. G. Prieto, K. Aldape, G. B. Mills and J. E. Gershenwald (2009). "Integrated Molecular and Clinical Analysis of AKT Activation in Metastatic Melanoma." Clin Cancer Res **15**(24): 7538-7546.

De Fabo, E. C., F. P. Noonan, T. Fears and G. Merlino (2004). "Ultraviolet B but not ultraviolet A radiation initiates melanoma." Cancer Res **64**(18): 6372-6376.

de Gruijl, F. R. (2000). "Photocarcinogenesis: UVA vs UVB." Methods Enzymol **319**: 359-366.

Deans, A. J. and S. C. West (2011). "DNA interstrand crosslink repair and cancer." Nat Rev Cancer **11**(7): 467-480.

Decraene, D., P. Agostinis, A. Pupe, P. de Haes and M. Garmyn (2001). "Acute response of human skin to solar radiation: regulation and function of the p53 protein." J Photochem Photobiol B **63**(1-3): 78-83.

Delcommenne, M., C. Tan, V. Gray, L. Rue, J. Woodgett and S. Dedhar (1998). "Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(19): 11211-11216.

Devary, Y., C. Rosette, J. A. DiDonato and M. Karin (1993). "NF-kappa B activation by ultraviolet light not dependent on a nuclear signal." Science **261**(5127): 1442-1445.

Dhawan, P., A. B. Singh, D. L. Ellis and A. Richmond (2002). "Constitutive activation of Akt/protein kinase B in melanoma leads to up-regulation of nuclear factor-kappaB and tumor progression." Cancer Res **62**(24): 7335-7342.

Diehl, J. A., M. Cheng, M. F. Roussel and C. J. Sherr (1998). "Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization." Genes Dev **12**(22): 3499-3511.

Dimri, G. P. (2005). "What has senescence got to do with cancer?" Cancer Cell **7**(6): 505-512.

Douki, T. and J. Cadet (2001). "Individual determination of the yield of the main UV-induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggests a high mutagenicity of CC photolesions." Biochemistry **40**(8): 2495-2501.

Drablos, F., E. Feyzi, P. A. Aas, C. B. Vaagbo, B. Kavli, M. S. Bratlie, J. Pena-Diaz, M. Otterlei, G. Slupphaug and H. E. Krokan (2004). "Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance." DNA Repair (Amst) **3**(11): 1389-1407.

Du, K. and M. Montminy (1998). "CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB." J Biol Chem **273**(49): 32377-32379.

Dy, L. C., Y. Pei and J. B. Travers (1999). "Augmentation of ultraviolet B radiation-induced tumor necrosis factor production by the epidermal platelet-activating factor receptor." J Biol Chem **274**(38): 26917-26921.

Easton, R. M., H. Cho, K. Roovers, D. W. Shineman, M. Mizrahi, M. S. Forman, V. M. Lee, M. Szabolcs, R. de Jong, T. Oltersdorf, T. Ludwig, A. Efstratiadis and M. J. Birnbaum (2005). "Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size." Mol Cell Biol **25**(5): 1869-1878.

Eigentler, T. K., U. M. Caroli, P. Radny and C. Garbe (2003). "Palliative therapy of disseminated malignant melanoma: a systematic review of 41 randomised clinical trials." Lancet Oncol **4**(12): 748-759.

Emuss, V., M. Garnett, C. Mason and R. Marais (2005). "Mutations of C-RAF are rare in human cancer because C-RAF has a low basal kinase activity compared with B-RAF." Cancer Res **65**(21): 9719-9726.

Ernst, D. S., E. Eisenhauer, N. Wainman, M. Davis, R. Lohmann, T. Baetz, K. Belanger and M. Smylie (2005). "Phase II study of perifosine in previously untreated patients with metastatic melanoma." Invest New Drugs **23**(6): 569-575.

Fecher, L. A., R. K. Amaravadi and K. T. Flaherty (2008). "The MAPK pathway in melanoma." Curr Opin Oncol **20**(2): 183-189.

Feng, J., R. Tamaskovic, Z. Yang, D. P. Brazil, A. Merlo, D. Hess and B. A. Hemmings (2004). "Stabilization of Mdm2 via decreased ubiquitination is mediated by protein kinase B/Akt-dependent phosphorylation." J Biol Chem **279**(34): 35510-35517.

Ferguson, B. E. and D. H. Oh (2005). "Proficient global nucleotide excision repair in human keratinocytes but not in fibroblasts deficient in p53." Cancer Res **65**(19): 8723-8729.

Filippa, N., C. L. Sable, C. Filloux, B. Hemmings and E. Van Obberghen (1999). "Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMP-dependent protein kinase." Mol Cell Biol **19**(7): 4989-5000.

Fingar, D. C., S. Salama, C. Tsou, E. Harlow and J. Blenis (2002). "Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E." Genes Dev **16**(12): 1472-1487.

Ford, J. M. and P. C. Hanawalt (1995). "Li-Fraumeni syndrome fibroblasts homozygous for p53 mutations are deficient in global DNA repair but exhibit normal transcription-coupled repair and enhanced UV resistance." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(19): 8876-8880.

Franke, T. F., S. I. Yang, T. O. Chan, K. Datta, A. Kazlauskas, D. K. Morrison, D. R. Kaplan and P. N. Tsichlis (1995). "The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase." Cell **81**(5): 727-736.

Frederico, L. A., T. A. Kunkel and B. R. Shaw (1993). "Cytosine deamination in mismatched base pairs." Biochemistry **32**(26): 6523-6530.

Gandini, S., F. Sera, M. S. Cattaruzza, P. Pasquini, R. Zanetti, C. Masini, P. Boyle and C. F. Melchi (2005). "Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors." Eur J Cancer **41**(14): 2040-2059.

Gao, T., F. Furnari and A. C. Newton (2005). "PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth." Mol Cell **18**(1): 13-24.

Gao, Y., H. Ishiyama, M. Sun, K. L. Brinkman, X. Wang, J. Zhu, W. Mai, Y. Huang, D. Floryk, M. Ittmann, T. C. Thompson, E. B. Butler, B. Xu and B. S. Teh (2011). "The alkylphospholipid, perifosine, radiosensitizes prostate cancer cells both in vitro and in vivo." Radiat Oncol **6**: 39.

Garcia, V., K. Furuya and A. M. Carr (2005). "Identification and functional analysis of TopBP1 and its homologs." DNA Repair (Amst) **4**(11): 1227-1239.

Garland, C. F., F. C. Garland and E. D. Gorham (2003). "Epidemiologic evidence for different roles of ultraviolet A and B radiation in melanoma mortality rates." Ann Epidemiol **13**(6): 395-404.

Garofalo, R. S., S. J. Orena, K. Rafidi, A. J. Torchia, J. L. Stock, A. L. Hildebrandt, T. Coskran, S. C. Black, D. J. Brees, J. R. Wicks, J. D. McNeish and K. G. Coleman (2003). "Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta." J Clin Invest **112**(2): 197-208.

Gates, K. S. (2009). "An overview of chemical processes that damage cellular DNA: spontaneous hydrolysis, alkylation, and reactions with radicals." Chem Res Toxicol **22**(11): 1747-1760.

Gillet, L. C. and O. D. Scharer (2006). "Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair." Chem Rev **106**(2): 253-276.

Goel, V. K., A. J. Lazar, C. L. Warneke, M. S. Redston and F. G. Haluska (2006). "Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma." J Invest Dermatol **126**(1): 154-160.

Golding, S. E., R. N. Morgan, B. R. Adams, A. J. Hawkins, L. F. Povirk and K. Valerie (2009). "Pro-survival AKT and ERK signaling from EGFR and mutant EGFRvIII enhances DNA double-strand break repair in human glioma cells." Cancer Biol Ther **8**(8): 730-738.

Goldstein, A. M., M. Chan, M. Harland, E. M. Gillanders, N. K. Hayward, M. F. Avril, E. Azizi, G. Bianchi-Scarra, D. T. Bishop, B. Bressac-de Paillerets, W. Bruno, D. Calista, L. A. Cannon Albright, F. Demenais, D. E. Elder, P. Ghiorzo, N. A. Gruis, J. Hansson, D. Hogg, E. A. Holland, P. A. Kanetsky, R. F. Kefford, M. T. Landi, J. Lang, S. A. Leachman, R. M. Mackie, V. Magnusson, G. J. Mann, K. Niendorf, J. Newton Bishop, J. M. Palmer, S. Puig, J. A. Puig-Butille, F. A. de Snoo, M. Stark, H. Tsao, M. A. Tucker, L. Whitaker and E. Yakobson (2006). "High-risk melanoma susceptibility genes and pancreatic cancer, neural system tumors, and uveal melanoma across GenoMEL." Cancer Res **66**(20): 9818-9828.

Goldstein, A. M., J. P. Struewing, A. Chidambaram, M. C. Fraser and M. A. Tucker (2000). "Genotype-phenotype relationships in U.S. melanoma-prone families with CDKN2A and CDK4 mutations." J Natl Cancer Inst **92**(12): 1006-1010.

Gong, X., A. Liu, X. Ming, P. Deng and Y. Jiang (2010). "UV-induced interaction between p38 MAPK and p53 serves as a molecular switch in determining cell fate." FEBS Lett **584**(23): 4711-4716.

Gonzalez, E. and T. E. McGraw (2009). "The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer." Cell Cycle **8**(16): 2502-2508.

Gregory, M. A., Y. Qi and S. R. Hann (2003). "Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-myc proteolysis and subnuclear localization." J Biol Chem **278**(51): 51606-51612.

Gross, S., A. Knebel, T. Tenev, A. Neining, M. Gaestel, P. Herrlich and F. D. Bohmer (1999). "Inactivation of protein-tyrosine phosphatases as mechanism of UV-induced signal transduction." J Biol Chem **274**(37): 26378-26386.

Gupta, S., A. R. Ramjaun, P. Haiko, Y. Wang, P. H. Warne, B. Nicke, E. Nye, G. Stamp, K. Alitalo and J. Downward (2007). "Binding of ras to phosphoinositide 3-kinase p110alpha is required for ras-driven tumorigenesis in mice." Cell **129**(5): 957-968.

Gutierrez, G. J., T. Tsuji, J. V. Cross, R. J. Davis, D. J. Templeton, W. Jiang and Z. A. Ronai (2010). "JNK-mediated phosphorylation of Cdc25C regulates cell cycle entry and G(2)/M DNA damage checkpoint." J Biol Chem **285**(19): 14217-14228.

Hajdich, E., D. R. Alessi, B. A. Hemmings and H. S. Hundal (1998). "Constitutive activation of protein kinase B alpha by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid

transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase kinase 3 in L6 muscle cells." Diabetes **47**(7): 1006-1013.

Han, W. and Y. Y. He (2009). "Requirement for metalloproteinase-dependent ERK and AKT activation in UVB-induced G1-S cell cycle progression of human keratinocytes." Photochem Photobiol **85**(4): 997-1003.

Hanawalt, P. C. (2002). "Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation." Oncogene **21**(58): 8949-8956.

Harper, J. W. and S. J. Elledge (2007). "The DNA damage response: ten years after." Mol Cell **28**(5): 739-745.

Harrison, J. C. and J. E. Haber (2006). "Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint." Annu Rev Genet **40**: 209-235.

He, Y. Y., S. E. Council, L. Feng and C. F. Chignell (2008). "UVA-induced cell cycle progression is mediated by a disintegrin and metalloprotease/epidermal growth factor receptor/AKT/Cyclin D1 pathways in keratinocytes." Cancer Res **68**(10): 3752-3758.

Herrlich, P., M. Karin and C. Weiss (2008). "Supreme EnLIGHTenment: damage recognition and signaling in the mammalian UV response." Mol Cell **29**(3): 279-290.

Hers, I., E. E. Vincent and J. M. Tavaré (2011). "Akt signalling in health and disease." Cell Signal **23**(10): 1515-1527.

Herzinger, T., J. O. Funk, K. Hillmer, D. Eick, D. A. Wolf and P. Kind (1995). "Ultraviolet B irradiation-induced G2 cell cycle arrest in human keratinocytes by inhibitory phosphorylation of the cdc2 cell cycle kinase." Oncogene **11**(10): 2151-2156.

Hirai, H., H. Sootome, Y. Nakatsuru, K. Miyama, S. Taguchi, K. Tsujioka, Y. Ueno, H. Hatch, P. K. Majumder, B. S. Pan and H. Kotani (2010). "MK-2206, an allosteric Akt



inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs in vitro and in vivo." Mol Cancer Ther **9**(7): 1956-1967.

Hoeijmakers, J. H. (2009). "DNA damage, aging, and cancer." N Engl J Med **361**(15): 1475-1485.

Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein and C. C. Harris (1991). "p53 mutations in human cancers." Science **253**(5015): 49-53.

Huang, H., J. C. Cheville, Y. Pan, P. C. Roche, L. J. Schmidt and D. J. Tindall (2001). "PTEN induces chemosensitivity in PTEN-mutated prostate cancer cells by suppression of Bcl-2 expression." J Biol Chem **276**(42): 38830-38836.

Huertas, P. (2010). "DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break." Nat Struct Mol Biol **17**(1): 11-16.

Isosaki, M., H. Nakayama, Y. Kyotani, J. Zhao, S. Tomita, H. Satoh and M. Yoshizumi (2011). "Prevention of the wortmannin-induced inhibition of phosphoinositide 3-kinase by sulfhydryl reducing agents." Pharmacol Rep **63**(3): 733-739.

Jackson, S. P. (2002). "Sensing and repairing DNA double-strand breaks." Carcinogenesis **23**(5): 687-696.

Jackson, S. P. (2009). "The DNA-damage response: new molecular insights and new approaches to cancer therapy." Biochem Soc Trans **37**(Pt 3): 483-494.

Jackson, S. P. and J. Bartek (2009). "The DNA-damage response in human biology and disease." Nature **461**(7267): 1071-1078.

Jhappan, C., F. P. Noonan and G. Merlino (2003). "Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma." Oncogene **22**(20): 3099-3112.

Ji, C., Y. L. Yang, Z. Yang, Y. Tu, L. Cheng, B. Chen, J. P. Xia, W. L. Sun, Z. L. Su, L. He and Z. G. Bi (2012). "Perifosine sensitizes UVB-induced apoptosis in skin cells: new implication of skin cancer prevention?" Cell Signal **24**(9): 1781-1789.

Jochemsen, A. G. (2014). "Reactivation of p53 as therapeutic intervention for malignant melanoma." Curr Opin Oncol **26**(1): 114-119.

Johnston, P. J., S. H. MacPhail, T. D. Stamato, C. U. Kirchgessner and P. L. Olive (1998). "Higher-order chromatin structure-dependent repair of DNA double-strand breaks: involvement of the V(D)J recombination double-strand break repair pathway." Radiat Res **149**(5): 455-462.

Jones, P. F., T. Jakubowicz and B. A. Hemmings (1991). "Molecular cloning of a second form of rac protein kinase." Cell Regul **2**(12): 1001-1009.

Kamijo, T., J. D. Weber, G. Zambetti, F. Zindy, M. F. Roussel and C. J. Sherr (1998). "Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(14): 8292-8297.

Kandel, E. S. and N. Hay (1999). "The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB." Exp Cell Res **253**(1): 210-229.

Kandel, E. S., J. Skeen, N. Majewski, A. Di Cristofano, P. P. Pandolfi, C. S. Feliciano, A. Gartel and N. Hay (2002). "Activation of Akt/protein kinase B overcomes a G(2)/m cell cycle checkpoint induced by DNA damage." Mol Cell Biol **22**(22): 7831-7841.

Kim, J. K. and B. S. Choi (1995). "The solution structure of DNA duplex-decamer containing the (6-4) photoproduct of thymidylyl(3'-->5')thymidine by NMR and relaxation matrix refinement." Eur J Biochem **228**(3): 849-854.

Kim, M. A., H. J. Kim, H. J. Jee, A. J. Kim, Y. S. Bae, S. S. Bae and J. Yun (2009). "Akt2, but not Akt1, is required for cell survival by inhibiting activation of JNK and p38 after UV irradiation." Oncogene **28**(9): 1241-1247.

King, F. W., J. Skeen, N. Hay and E. Shtivelman (2004). "Inhibition of Chk1 by activated PKB/Akt." Cell Cycle **3**(5): 634-637.

Knebel, A., H. J. Rahmsdorf, A. Ullrich and P. Herrlich (1996). "Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents." EMBO J **15**(19): 5314-5325.

Knezevic, D., W. Zhang, P. J. Rochette and D. E. Brash (2007). "Bcl-2 is the target of a UV-inducible apoptosis switch and a node for UV signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(27): 11286-11291.

Kohn, A. D., S. A. Summers, M. J. Birnbaum and R. A. Roth (1996). "Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation." J Biol Chem **271**(49): 31372-31378.

Konishi, H., H. Matsuzaki, M. Tanaka, Y. Takemura, S. Kuroda, Y. Ono and U. Kikkawa (1997). "Activation of protein kinase B (Akt/RAC-protein kinase) by cellular stress and its association with heat shock protein Hsp27." FEBS Lett **410**(2-3): 493-498.

Kuluncsics, Z., D. Perdiz, E. Brulay, B. Muel and E. Sage (1999). "Wavelength dependence of ultraviolet-induced DNA damage distribution: involvement of direct or indirect mechanisms and possible artefacts." J Photochem Photobiol B **49**(1): 71-80.

Kumagai, A., J. Lee, H. Y. Yoo and W. G. Dunphy (2006). "TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex." Cell **124**(5): 943-955.

Kumar, R., S. Angelini, K. Czene, I. Sauroja, M. Hahka-Kemppinen, S. Pyrhonen and K. Hemminki (2003). "BRAF mutations in metastatic melanoma: a possible association with clinical outcome." Clin Cancer Res **9**(9): 3362-3368.

Kuo, Y. C., K. Y. Huang, C. H. Yang, Y. S. Yang, W. Y. Lee and C. W. Chiang (2008). "Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55alpha regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt." J Biol Chem **283**(4): 1882-1892.

Lai, K., N. Di Girolamo, R. M. Conway, M. J. Jager and M. C. Madigan (2007). "The effect of ultraviolet radiation on choroidal melanocytes and melanoma cell lines: cell survival and matrix metalloproteinase production." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **245**(5): 715-724.

Latonen, L., Y. Taya and M. Laiho (2001). "UV-radiation induces dose-dependent regulation of p53 response and modulates p53-HDM2 interaction in human fibroblasts." Oncogene **20**(46): 6784-6793.

Lee, J. H., J. W. Choi and Y. S. Kim (2011). "Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis." Br J Dermatol **164**(4): 776-784.

Lee, J. W., Y. H. Soung, S. Y. Kim, W. S. Park, S. W. Nam, W. S. Min, S. H. Kim, J. Y. Lee, N. J. Yoo and S. H. Lee (2005). "Mutational analysis of the ARAF gene in human cancers." APMIS **113**(1): 54-57.

Lehmann, A. R. (2003). "DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy." Biochimie **85**(11): 1101-1111.

Li, D. M. and H. Sun (1997). "TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta." Cancer Res **57**(11): 2124-2129.

Li, J., C. Yen, D. Liaw, K. Podsypanina, S. Bose, S. I. Wang, J. Puc, C. Miliaresis, L. Rodgers, R. McCombie, S. H. Bigner, B. C. Giovanella, M. Ittmann, B. Tycko, H. Hibshoosh, M. H. Wigler and R. Parsons (1997). "PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer." Science **275**(5308): 1943-1947.

Li, Y., D. Dowbenko and L. A. Lasky (2002). "AKT/PKB phosphorylation of p21Cip/WAF1 enhances protein stability of p21Cip/WAF1 and promotes cell survival." J Biol Chem **277**(13): 11352-11361.

Lindahl, T. (1993). "Instability and decay of the primary structure of DNA." Nature **362**(6422): 709-715.

Lindahl, T. and D. E. Barnes (2000). "Repair of endogenous DNA damage." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **65**: 127-133.

Liu, Q., S. Guntuku, X. S. Cui, S. Matsuoka, D. Cortez, K. Tamai, G. Luo, S. Carattini-Rivera, F. DeMayo, A. Bradley, L. A. Donehower and S. J. Elledge (2000). "Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint." Genes Dev **14**(12): 1448-1459.

Liu, Q., T. Sasaki, I. Kozieradzki, A. Wakeham, A. Itie, D. J. Dumont and J. M. Penninger (1999). "SHIP is a negative regulator of growth factor receptor-mediated PKB/Akt activation and myeloid cell survival." Genes Dev **13**(7): 786-791.

Liu, W. F., S. S. Yu, G. J. Chen and Y. Z. Li (2006). "DNA damage checkpoint, damage repair, and genome stability." Yi Chuan Xue Bao **33**(5): 381-390.

Lowe, S. W., E. M. Schmitt, S. W. Smith, B. A. Osborne and T. Jacks (1993). "p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes." Nature **362**(6423): 847-849.

Lowy, D. R. and B. M. Willumsen (1993). "Function and regulation of ras." Annu Rev Biochem **62**: 851-891.

Maddika, S., S. R. Ande, E. Wiehceh, L. L. Hansen, S. Wesselborg and M. Los (2008). "Akt-mediated phosphorylation of CDK2 regulates its dual role in cell cycle progression and apoptosis." J Cell Sci **121**(Pt 7): 979-988.

Madhunapantula, S. V. and G. P. Robertson (2009). "The PTEN-AKT3 signaling cascade as a therapeutic target in melanoma." Pigment Cell Melanoma Res **22**(4): 400-419.

Madson, J. G., D. T. Lynch, J. Svoboda, R. Ophardt, J. Yanagida, S. K. Putta, A. Bowles, C. S. Trempus, R. W. Tennant and L. A. Hansen (2009). "ErbB2 suppresses DNA damage-induced checkpoint activation and UV-induced mouse skin tumorigenesis." Am J Pathol **174**(6): 2357-2366.

Maehama, T. and J. E. Dixon (1998). "The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate." J Biol Chem **273**(22): 13375-13378.

Manning, B. D. and L. C. Cantley (2007). "AKT/PKB signaling: navigating downstream." Cell **129**(7): 1261-1274.

Maya, R., M. Balass, S. T. Kim, D. Shkedy, J. F. Leal, O. Shifman, M. Moas, T. Buschmann, Z. Ronai, Y. Shiloh, M. B. Kastan, E. Katzir and M. Oren (2001). "ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage." Genes Dev **15**(9): 1067-1077.

McKinnon, P. J. and K. W. Caldecott (2007). "DNA strand break repair and human genetic disease." Annu Rev Genomics Hum Genet **8**: 37-55.

Meunier, J. R., A. Sarasin and L. Marrot (2002). "Photogenotoxicity of mammalian cells: a review of the different assays for in vitro testing." Photochem Photobiol **75**(5): 437-447.

Mihara, M., S. Erster, A. Zaika, O. Petrenko, T. Chittenden, P. Pancoska and U. M. Moll (2003). "p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria." Mol Cell **11**(3): 577-590.

Milagre, C., N. Dhomen, F. C. Geyer, R. Hayward, M. Lambros, J. S. Reis-Filho and R. Marais (2010). "A mouse model of melanoma driven by oncogenic KRAS." Cancer Res **70**(13): 5549-5557.

Ming, M., L. Feng, C. R. Shea, K. Soltani, B. Zhao, W. Han, R. C. Smart, C. S. Trempus and Y. Y. He (2011). "PTEN positively regulates UVB-induced DNA damage repair." Cancer Res **71**(15): 5287-5295.

Ming, M., W. Han, J. Maddox, K. Soltani, C. R. Shea, D. M. Freeman and Y. Y. He (2010). "UVB-induced ERK/AKT-dependent PTEN suppression promotes survival of epidermal keratinocytes." Oncogene **29**(4): 492-502.

Mitchell, D. L. (1988). "The relative cytotoxicity of (6-4) photoproducts and cyclobutane dimers in mammalian cells." Photochem Photobiol **48**(1): 51-57.

Mitchell, D. L., J. E. Cleaver, M. P. Lowery and R. R. Hewitt (1995). "Induction and repair of (6-4) photoproducts in normal human and xeroderma pigmentosum variant cells during the cell cycle." Mutat Res **337**(3): 161-167.

Mitchell, D. L. and R. S. Nairn (1989). "The biology of the (6-4) photoproduct." Photochem Photobiol **49**(6): 805-819.

Moan, J., A. Dahlback and R. B. Setlow (1999). "Epidemiological support for an hypothesis for melanoma induction indicating a role for UVA radiation." Photochem Photobiol **70**(2): 243-247.

Mouawad, R., M. Sebert, J. Michels, J. Bloch, J. P. Spano and D. Khayat (2010). "Treatment for metastatic malignant melanoma: old drugs and new strategies." Crit Rev Oncol Hematol **74**(1): 27-39.

Moule, S. K., G. I. Welsh, N. J. Edgell, E. J. Foulstone, C. G. Proud and R. M. Denton (1997). "Regulation of protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 by insulin and beta-adrenergic agonists in rat epididymal fat cells. Activation of protein kinase B by wortmannin-sensitive and -insensitive mechanisms." J Biol Chem **272**(12): 7713-7719.

Murphy, M. E., J. I. Leu and D. L. George (2004). "p53 moves to mitochondria: a turn on the path to apoptosis." Cell Cycle **3**(7): 836-839.

Naegeli, H. (1994). "Roadblocks and detours during DNA replication: mechanisms of mutagenesis in mammalian cells." Bioessays **16**(8): 557-564.

Nakazawa, H., D. English, P. L. Randell, K. Nakazawa, N. Martel, B. K. Armstrong and H. Yamasaki (1994). "UV and skin cancer: specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(1): 360-364.

Nazarian, R., H. Shi, Q. Wang, X. Kong, R. C. Koya, H. Lee, Z. Chen, M. K. Lee, N. Attar, H. Sazegar, T. Chodon, S. F. Nelson, G. McArthur, J. A. Sosman, A. Ribas and R. S. Lo (2010). "Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation." Nature **468**(7326): 973-977.

Negrini, S., V. G. Gorgoulis and T. D. Halazonetis (2010). "Genomic instability--an evolving hallmark of cancer." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(3): 220-228.



Nelson, A. A. and H. Tsao (2009). "Melanoma and genetics." Clin Dermatol **27**(1): 46-52.

Nicholson, K. M. and N. G. Anderson (2002). "The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy." Cell Signal **14**(5): 381-395.

Nishimura, S. (2002). "Involvement of mammalian OGG1(MMH) in excision of the 8-hydroxyguanine residue in DNA." Free Radic Biol Med **32**(9): 813-821.

Ogawa, E., R. Okuyama, S. Ikawa, H. Nagoshi, T. Egawa, A. Kurihara, M. Yabuki, H. Tagami, M. Obinata and S. Aiba (2008). "p51/p63 Inhibits ultraviolet B-induced apoptosis via Akt activation." Oncogene **27**(6): 848-856.

Ohashi, E., Y. Takeishi, S. Ueda and T. Tsurimoto (2014). "Interaction between Rad9-Hus1-Rad1 and TopBP1 activates ATR-ATRIP and promotes TopBP1 recruitment to sites of UV-damage." DNA Repair (Amst) **21**: 1-11.

Ohnishi, T., E. Mori and A. Takahashi (2009). "DNA double-strand breaks: their production, recognition, and repair in eukaryotes." Mutat Res **669**(1-2): 8-12.

Olivier, M., R. Eeles, M. Hollstein, M. A. Khan, C. C. Harris and P. Hainaut (2002). "The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users." Hum Mutat **19**(6): 607-614.

Olsen, C. M., H. J. Carroll and D. C. Whiteman (2010). "Familial melanoma: a meta-analysis and estimates of attributable fraction." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **19**(1): 65-73.

Omholt, K., D. Krockel, U. Ringborg and J. Hansson (2006). "Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma." Melanoma Res **16**(2): 197-200.

Oren, M. (2003). "Decision making by p53: life, death and cancer." Cell Death Differ **10**(4): 431-442.

- Osaki, M., M. Oshimura and H. Ito (2004). "PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer." Apoptosis **9**(6): 667-676.
- Osterlind, A., M. A. Tucker, B. J. Stone and O. M. Jensen (1988). "The Danish case-control study of cutaneous malignant melanoma. II. Importance of UV-light exposure." Int J Cancer **42**(3): 319-324.
- Palmer, J. S., D. L. Duffy, N. F. Box, J. F. Aitken, L. E. O'Gorman, A. C. Green, N. K. Hayward, N. G. Martin and R. A. Sturm (2000). "Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype?" Am J Hum Genet **66**(1): 176-186.
- Pattison, D. I. and M. J. Davies (2006). "Actions of ultraviolet light on cellular structures." EXS(96): 131-157.
- Pavlov, Y. I., D. T. Minnick, S. Izuta and T. A. Kunkel (1994). "DNA replication fidelity with 8-oxodeoxyguanosine triphosphate." Biochemistry **33**(15): 4695-4701.
- Pedram, A., M. Razandi, A. J. Evinger, E. Lee and E. R. Levin (2009). "Estrogen inhibits ATR signaling to cell cycle checkpoints and DNA repair." Mol Biol Cell **20**(14): 3374-3389.
- Pfeiffer, P. (1998). "The mutagenic potential of DNA double-strand break repair." Toxicol Lett **96-97**: 119-129.
- Plo, I., C. Laulier, L. Gauthier, F. Lebrun, F. Calvo and B. S. Lopez (2008). "AKT1 inhibits homologous recombination by inducing cytoplasmic retention of BRCA1 and RAD51." Cancer Res **68**(22): 9404-9412.
- Pollock, P. M., U. L. Harper, K. S. Hansen, L. M. Yudt, M. Stark, C. M. Robbins, T. Y. Moses, G. Hostetter, U. Wagner, J. Kakareka, G. Salem, T. Pohida, P. Heenan, P. Duray, O.

Kallioniemi, N. K. Hayward, J. M. Trent and P. S. Meltzer (2003). "High frequency of BRAF mutations in nevi." Nat Genet **33**(1): 19-20.

Pollock, P. M., G. J. Walker, J. M. Glendening, T. Que Noy, N. C. Bloch, J. W. Fountain and N. K. Hayward (2002). "PTEN inactivation is rare in melanoma tumours but occurs frequently in melanoma cell lines." Melanoma Res **12**(6): 565-575.

Poynter, J. N., J. T. Elder, D. R. Fullen, R. P. Nair, M. S. Soengas, T. M. Johnson, B. Redman, N. E. Thomas and S. B. Gruber (2006). "BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi." Melanoma Res **16**(4): 267-273.

Prickett, T. D., N. S. Agrawal, X. Wei, K. E. Yates, J. C. Lin, J. R. Wunderlich, J. C. Cronin, P. Cruz, S. A. Rosenberg and Y. Samuels (2009). "Analysis of the tyrosine kinase in melanoma reveals recurrent mutations in ERBB4." Nat Genet **41**(10): 1127-1132.

Puc, J., M. Keniry, H. S. Li, T. K. Pandita, A. D. Choudhury, L. Memeo, M. Mansukhani, V. V. Murty, Z. Gaciong, S. E. Meek, H. Piwnica-Worms, H. Hibshoosh and R. Parsons (2005). "Lack of PTEN sequesters CHK1 and initiates genetic instability." Cancer Cell **7**(2): 193-204.

Purdue, M. P., L. E. Freeman, W. F. Anderson and M. A. Tucker (2008). "Recent trends in incidence of cutaneous melanoma among US Caucasian young adults." J Invest Dermatol **128**(12): 2905-2908.

Ravanat, J. L., T. Douki and J. Cadet (2001). "Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components." J Photochem Photobiol B **63**(1-3): 88-102.

Resjo, S., O. Goransson, L. Harndahl, S. Zolnierowicz, V. Manganiello and E. Degerman (2002). "Protein phosphatase 2A is the main phosphatase involved in the regulation of protein kinase B in rat adipocytes." Cell Signal **14**(3): 231-238.

Rink, S. M., R. Lipman, S. C. Alley, P. B. Hopkins and M. Tomasz (1996). "Bending of DNA by the mitomycin C-induced, GpG intrastrand cross-link." Chem Res Toxicol **9**(2): 382-389.

Robertson, G. P. (2005). "Functional and therapeutic significance of Akt deregulation in malignant melanoma." Cancer Metastasis Rev **24**(2): 273-285.

Robertson, G. P., F. B. Furnari, M. E. Miele, M. J. Glendening, D. R. Welch, J. W. Fountain, T. G. Lugo, H. J. Huang and W. K. Cavenee (1998). "In vitro loss of heterozygosity targets the PTEN/MMAC1 gene in melanoma." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(16): 9418-9423.

Romashkova, J. A. and S. S. Makarov (1999). "NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling." Nature **401**(6748): 86-90.

Rouget, R., Y. Auclair, M. Loignon, B. Affar el and E. A. Drobetsky (2008). "A sensitive flow cytometry-based nucleotide excision repair assay unexpectedly reveals that mitogen-activated protein kinase signaling does not regulate the removal of UV-induced DNA damage in human cells." J Biol Chem **283**(9): 5533-5541.

Rubbi, C. P. and J. Milner (2003). "p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage." EMBO J **22**(4): 975-986.

Ruggeri, B. A., L. Huang, M. Wood, J. Q. Cheng and J. R. Testa (1998). "Amplification and overexpression of the AKT2 oncogene in a subset of human pancreatic ductal adenocarcinomas." Mol Carcinog **21**(2): 81-86.

Sachsenmaier, C., A. Radler-Pohl, R. Zinck, A. Nordheim, P. Herrlich and H. J. Rahmsdorf (1994). "Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response." Cell **78**(6): 963-972.

Samuels, Y., Z. Wang, A. Bardelli, N. Silliman, J. Ptak, S. Szabo, H. Yan, A. Gazdar, S. M. Powell, G. J. Riggins, J. K. Willson, S. Markowitz, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and V. E.

Velculescu (2004). "High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers." Science **304**(5670): 554.

Sanchez, Y., C. Wong, R. S. Thoma, R. Richman, Z. Wu, H. Piwnica-Worms and S. J. Elledge (1997). "Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25." Science **277**(5331): 1497-1501.

Santi, S. A. and H. Lee (2010). "The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations." Am J Physiol Cell Physiol **298**(3): C580-591.

Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, S. M. Ali and D. M. Sabatini (2005). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." Science **307**(5712): 1098-1101.

Schuch, A. P. and C. F. Menck (2010). "The genotoxic effects of DNA lesions induced by artificial UV-radiation and sunlight." J Photochem Photobiol B **99**(3): 111-116.

Schumacher, B., G. A. Garinis and J. H. Hoeijmakers (2008). "Age to survive: DNA damage and aging." Trends Genet **24**(2): 77-85.

Sekulic, A., C. C. Hudson, J. L. Homme, P. Yin, D. M. Otterness, L. M. Karnitz and R. T. Abraham (2000). "A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells." Cancer Res **60**(13): 3504-3513.

Serrano, M., G. J. Hannon and D. Beach (1993). "A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4." Nature **366**(6456): 704-707.

Seviour, E. G. and S. Y. Lin (2010). "The DNA damage response: Balancing the scale between cancer and ageing." Aging (Albany NY) **2**(12): 900-907.

Shao, Y. and A. E. Aplin (2010). "Akt3-mediated resistance to apoptosis in B-RAF-targeted melanoma cells." Cancer Res **70**(16): 6670-6681.

Sharma, A., A. K. Sharma, S. V. Madhunapantula, D. Desai, S. J. Huh, P. Mosca, S. Amin and G. P. Robertson (2009). "Targeting Akt3 signaling in malignant melanoma using isoselenocyanates." Clin Cancer Res **15**(5): 1674-1685.

She, Q. B., N. Chen and Z. Dong (2000). "ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation." J Biol Chem **275**(27): 20444-20449.

Shechter, D., V. Costanzo and J. Gautier (2004). "Regulation of DNA replication by ATR: signaling in response to DNA intermediates." DNA Repair (Amst) **3**(8-9): 901-908.

Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." Genes Dev **13**(12): 1501-1512.

Shiloh, Y. (2003). "ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity." Nat Rev Cancer **3**(3): 155-168.

Shin, I., F. M. Yakes, F. Rojo, N. Y. Shin, A. V. Bakin, J. Baselga and C. L. Arteaga (2002). "PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization." Nat Med **8**(10): 1145-1152.

Shinozaki, T., A. Nota, Y. Taya and K. Okamoto (2003). "Functional role of Mdm2 phosphorylation by ATR in attenuation of p53 nuclear export." Oncogene **22**(55): 8870-8880.

Sinha, R. P. and D. P. Hader (2002). "UV-induced DNA damage and repair: a review." Photochem Photobiol Sci **1**(4): 225-236.

Sinnberg, T., K. Lasithiotakis, H. Niessner, B. Schitteck, K. T. Flaherty, D. Kulms, E. Maczey, M. Campos, J. Gogel, C. Garbe and F. Meier (2009). "Inhibition of PI3K-AKT-mTOR signaling sensitizes melanoma cells to cisplatin and temozolomide." J Invest Dermatol **129**(6): 1500-1515.

Staal, S. P. (1987). "Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(14): 5034-5037.

Stahl, J. M., M. Cheung, A. Sharma, N. R. Trivedi, S. Shanmugam and G. P. Robertson (2003). "Loss of PTEN promotes tumor development in malignant melanoma." Cancer Res **63**(11): 2881-2890.

Stahl, J. M., A. Sharma, M. Cheung, M. Zimmerman, J. Q. Cheng, M. W. Bosenberg, M. Kester, L. Sandirasegarane and G. P. Robertson (2004). "Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma." Cancer Res **64**(19): 7002-7010.

Stambolic, V., A. Suzuki, J. L. de la Pompa, G. M. Brothers, C. Mirtsos, T. Sasaki, J. Ruland, J. M. Penninger, D. P. Siderovski and T. W. Mak (1998). "Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN." Cell **95**(1): 29-39.

Steck, P. A., M. A. Pershouse, S. A. Jasser, W. K. Yung, H. Lin, A. H. Ligon, L. A. Langford, M. L. Baumgard, T. Hattier, T. Davis, C. Frye, R. Hu, B. Swedlund, D. H. Teng and S. V. Tavtigian (1997). "Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers." Nat Genet **15**(4): 356-362.

Stewart, N., G. G. Hicks, F. Paraskevas and M. Mowat (1995). "Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53." Oncogene **10**(1): 109-115.

Stiff, T., S. A. Walker, K. Cerosaletti, A. A. Goodarzi, E. Petermann, P. Concannon, M. O'Driscoll and P. A. Jeggo (2006). "ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling." EMBO J **25**(24): 5775-5782.

Stone, M. P., Y. J. Cho, H. Huang, H. Y. Kim, I. D. Kozekov, A. Kozekova, H. Wang, I. G. Minko, R. S. Lloyd, T. M. Harris and C. J. Rizzo (2008). "Interstrand DNA cross-links induced by alpha,beta-unsaturated aldehydes derived from lipid peroxidation and environmental sources." Acc Chem Res **41**(7): 793-804.

Sutherland, B. M., P. V. Bennett, O. Sidorkina and J. Laval (2000). "Clustered damages and total lesions induced in DNA by ionizing radiation: oxidized bases and strand breaks." Biochemistry **39**(27): 8026-8031.

Suzuki, A., J. L. de la Pompa, V. Stambolic, A. J. Elia, T. Sasaki, I. del Barco Barrantes, A. Ho, A. Wakeham, A. Itie, W. Khoo, M. Fukumoto and T. W. Mak (1998). "High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice." Curr Biol **8**(21): 1169-1178.

Svejstrup, J. Q. (2002). "Mechanisms of transcription-coupled DNA repair." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(1): 21-29.

Takeuchi, H., T. Kanematsu, Y. Misumi, F. Sakane, H. Konishi, U. Kikkawa, Y. Watanabe, M. Katan and M. Hirata (1997). "Distinct specificity in the binding of inositol phosphates by pleckstrin homology domains of pleckstrin, RAC-protein kinase, diacylglycerol kinase and a new 130 kDa protein." Biochim Biophys Acta **1359**(3): 275-285.

Tamura, M., J. Gu, K. Matsumoto, S. Aota, R. Parsons and K. M. Yamada (1998). "Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN." Science **280**(5369): 1614-1617.

Tee, A. R., D. C. Fingar, B. D. Manning, D. J. Kwiatkowski, L. C. Cantley and J. Blenis (2002). "Tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products function together to inhibit



mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated downstream signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(21): 13571-13576.

Thornton, T. M. and M. Rincon (2009). "Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival." Int J Biol Sci **5**(1): 44-51.

Tibbetts, R. S., K. M. Brumbaugh, J. M. Williams, J. N. Sarkaria, W. A. Cliby, S. Y. Shieh, Y. Taya, C. Prives and R. T. Abraham (1999). "A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53." Genes Dev **13**(2): 152-157.

Tornaletti, S. (2005). "Transcription arrest at DNA damage sites." Mutat Res **577**(1-2): 131-145.

Toulany, M., R. Kehlbach, U. Florczak, A. Sak, S. Wang, J. Chen, M. Lobrich and H. P. Rodemann (2008). "Targeting of AKT1 enhances radiation toxicity of human tumor cells by inhibiting DNA-PKcs-dependent DNA double-strand break repair." Mol Cancer Ther **7**(7): 1772-1781.

Trahey, M. and F. McCormick (1987). "A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants." Science **238**(4826): 542-545.

Tran, M. A., R. Gowda, A. Sharma, E. J. Park, J. Adair, M. Kester, N. B. Smith and G. P. Robertson (2008). "Targeting V600EB-Raf and Akt3 using nanoliposomal-small interfering RNA inhibits cutaneous melanocytic lesion development." Cancer Res **68**(18): 7638-7649.

Tsao, H., V. Goel, H. Wu, G. Yang and F. G. Haluska (2004). "Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma." J Invest Dermatol **122**(2): 337-341.

Tsao, H., X. Zhang, K. Fowlkes and F. G. Haluska (2000). "Relative reciprocity of NRAS and PTEN/MMAC1 alterations in cutaneous melanoma cell lines." Cancer Res **60**(7): 1800-1804.

Tschopp, O., Z. Z. Yang, D. Brodbeck, B. A. Dummler, M. Hemmings-Mieszczak, T. Watanabe, T. Michaelis, J. Frahm and B. A. Hemmings (2005). "Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis." Development **132**(13): 2943-2954.

Tzivion, G., M. Dobson and G. Ramakrishnan (2011). "FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins." Biochim Biophys Acta **1813**(11): 1938-1945.

Ullrich, A. and J. Schlessinger (1990). "Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity." Cell **61**(2): 203-212.

Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic and M. Mazur (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." Chem Biol Interact **160**(1): 1-40.

van Hoffen, A., J. Venema, R. Meschini, A. A. van Zeeland and L. H. Mullenders (1995). "Transcription-coupled repair removes both cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts with equal efficiency and in a sequential way from transcribed DNA in xeroderma pigmentosum group C fibroblasts." EMBO J **14**(2): 360-367.

Vanhaesebroeck, B. and D. R. Alessi (2000). "The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB." Biochem J **346 Pt 3**: 561-576.

Villanueva, J., A. Vultur, J. T. Lee, R. Somasundaram, M. Fukunaga-Kalabis, A. K. Cipolla, B. Wubbenhorst, X. Xu, P. A. Gimotty, D. Kee, A. E. Santiago-Walker, R. Letrero, K. D'Andrea, A. Pushparajan, J. E. Hayden, K. D. Brown, S. Laquerre, G. A. McArthur, J. A. Sosman, K. L. Nathanson and M. Herlyn (2010). "Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K." Cancer Cell **18**(6): 683-695.

Viniegra, J. G., N. Martinez, P. Modirassari, J. Hernandez Losa, C. Parada Cobo, V. J. Sanchez-Arevalo Lobo, C. I. Aceves Luquero, L. Alvarez-Vallina, S. Ramon y Cajal, J. M. Rojas and R. Sanchez-Prieto (2005). "Full activation of PKB/Akt in response to insulin or ionizing radiation is mediated through ATM." J Biol Chem **280**(6): 4029-4036.

Volker, M., M. J. Mone, P. Karmakar, A. van Hoffen, W. Schul, W. Vermeulen, J. H. Hoeijmakers, R. van Driel, A. A. van Zeeland and L. H. Mullenders (2001). "Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo." Mol Cell **8**(1): 213-224.

Waga, S., G. J. Hannon, D. Beach and B. Stillman (1994). "The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA." Nature **369**(6481): 574-578.

Walter, S. D., W. D. King and L. D. Marrett (1999). "Association of cutaneous malignant melanoma with intermittent exposure to ultraviolet radiation: results of a case-control study in Ontario, Canada." Int J Epidemiol **28**(3): 418-427.

Walter, S. D., L. D. Marrett, L. From, C. Hertzman, H. S. Shannon and P. Roy (1990). "The association of cutaneous malignant melanoma with the use of sunbeds and sunlamps." Am J Epidemiol **131**(2): 232-243.

Wan, P. T., M. J. Garnett, S. M. Roe, S. Lee, D. Niculescu-Duvaz, V. M. Good, C. M. Jones, C. J. Marshall, C. J. Springer, D. Barford and R. Marais (2004). "Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF." Cell **116**(6): 855-867.

Wan, X. and L. J. Helman (2003). "Levels of PTEN protein modulate Akt phosphorylation on serine 473, but not on threonine 308, in IGF-II-overexpressing rhabdomyosarcomas cells." Oncogene **22**(50): 8205-8211.

Wan, Y. S., Z. Q. Wang, Y. Shao, J. J. Voorhees and G. J. Fisher (2001). "Ultraviolet irradiation activates PI 3-kinase/AKT survival pathway via EGF receptors in human skin in vivo." Int J Oncol **18**(3): 461-466.

Wang, H. Q., T. Quan, T. He, T. F. Franke, J. J. Voorhees and G. J. Fisher (2003). "Epidermal growth factor receptor-dependent, NF-kappaB-independent activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway inhibits ultraviolet irradiation-induced caspases-3, -8, and -9 in human keratinocytes." J Biol Chem **278**(46): 45737-45745.

Wang, J. M., J. R. Chao, W. Chen, M. L. Kuo, J. J. Yen and H. F. Yang-Yen (1999). "The antiapoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB." Mol Cell Biol **19**(9): 6195-6206.

Wang, Q. E., C. Han, R. Zhao, G. Wani, Q. Zhu, L. Gong, A. Battu, I. Racoma, N. Sharma and A. A. Wani (2013). "p38 MAPK- and Akt-mediated p300 phosphorylation regulates its degradation to facilitate nucleotide excision repair." Nucleic Acids Res **41**(3): 1722-1733.

Wang, S. Q., R. Setlow, M. Berwick, D. Polsky, A. A. Marghoob, A. W. Kopf and R. S. Bart (2001). "Ultraviolet A and melanoma: a review." J Am Acad Dermatol **44**(5): 837-846.

Ward, J. F. (1988). "DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **35**: 95-125.

Watt, A. J., S. V. Kotsis and K. C. Chung (2004). "Risk of melanoma arising in large congenital melanocytic nevi: a systematic review." Plast Reconstr Surg **113**(7): 1968-1974.

Weinstock, M. A., G. A. Colditz, W. C. Willett, M. J. Stampfer, B. R. Bronstein, M. C. Mihm, Jr. and F. E. Speizer (1989). "Nonfamilial cutaneous melanoma incidence in women associated with sun exposure before 20 years of age." Pediatrics **84**(2): 199-204.

Westerdahl, J., H. Olsson, A. Masback, C. Ingvar, N. Jonsson, L. Brandt, P. E. Jonsson and T. Moller (1994). "Use of sunbeds or sunlamps and malignant melanoma in southern Sweden." Am J Epidemiol **140**(8): 691-699.

Winograd-Katz, S. E. and A. Levitzki (2006). "Cisplatin induces PKB/Akt activation and p38(MAPK) phosphorylation of the EGF receptor." Oncogene **25**(56): 7381-7390.

Wu, S., M. Tan, Y. Hu, J. L. Wang, D. Scheuner and R. J. Kaufman (2004). "Ultraviolet light activates NFkappaB through translational inhibition of IkappaBalpha synthesis." J Biol Chem **279**(33): 34898-34902.

Xia, W., J. S. Chen, X. Zhou, P. R. Sun, D. F. Lee, Y. Liao, B. P. Zhou and M. C. Hung (2004). "Phosphorylation/cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 is associated with HER2/neu overexpression and provides a novel combination predictor for poor prognosis in breast cancer patients." Clin Cancer Res **10**(11): 3815-3824.

Yajima, H., K. J. Lee, S. Zhang, J. Kobayashi and B. P. Chen (2009). "DNA double-strand break formation upon UV-induced replication stress activates ATM and DNA-PKcs kinases." J Mol Biol **385**(3): 800-810.

Yang, Z. Z., O. Tschopp, N. Di-Poi, E. Bruder, A. Baudry, B. Dummler, W. Wahli and B. A. Hemmings (2005). "Dosage-dependent effects of Akt1/protein kinase Balpha (PKBalpha) and Akt3/PKBgamma on thymus, skin, and cardiovascular and nervous system development in mice." Mol Cell Biol **25**(23): 10407-10418.

Yang, Z. Z., O. Tschopp, M. Hemmings-Mieszczak, J. Feng, D. Brodbeck, E. Perentes and B. A. Hemmings (2003). "Protein kinase B alpha/Akt1 regulates placental development and fetal growth." J Biol Chem **278**(34): 32124-32131.

Yano, S., H. Tokumitsu and T. R. Soderling (1998). "Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway." Nature **396**(6711): 584-587.

Yokoya, A., K. Fuji, N. Shikazono, K. Akamatsu, A. Urushibara and R. Watanabe (2008). "Studies of soft X-ray-induced Auger effect on the induction of DNA damage." Int J Radiat Biol **84**(12): 1069-1081.

Zhang, Q. S., D. A. Maddock, J. P. Chen, S. Heo, C. Chiu, D. Lai, K. Souza, S. Mehta and Y. S. Wan (2001). "Cytokine-induced p38 activation feedback regulates the prolonged activation of AKT cell survival pathway initiated by reactive oxygen species in response to UV irradiation in human keratinocytes." Int J Oncol **19**(5): 1057-1061.

Zhang, X., N. Tang, T. J. Hadden and A. K. Rishi (2011). "Akt, FoxO and regulation of apoptosis." Biochim Biophys Acta **1813**(11): 1978-1986.

Zhao, Q., B. M. Barakat, S. Qin, A. Ray, M. A. El-Mahdy, G. Wani, S. Arafa el, S. N. Mir, Q. E. Wang and A. A. Wani (2008). "The p38 mitogen-activated protein kinase augments nucleotide excision repair by mediating DDB2 degradation and chromatin relaxation." J Biol Chem **283**(47): 32553-32561.

Ziegler, A., D. J. Leffell, S. Kunala, H. W. Sharma, M. Gailani, J. A. Simon, A. J. Halperin, H. P. Baden, P. E. Shapiro, A. E. Bale and et al. (1993). "Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(9): 4216-4220.

Zingg, D., O. Riesterer, D. Fabbro, C. Glanzmann, S. Bodis and M. Pruschy (2004). "Differential activation of the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt survival pathway by ionizing radiation in tumor and primary endothelial cells." Cancer Res **64**(15): 5398-5406.

Zou, L. and S. J. Elledge (2003). "Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes." Science **300**(5625): 1542-1548.

Zuo, L., J. Weger, Q. Yang, A. M. Goldstein, M. A. Tucker, G. J. Walker, N. Hayward and N. C. Dracopoli (1996). "Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma." Nat Genet **12**(1): 97-99.





## Annexe 1

	WM35	WM1366	WM3248
Age	24	79	68
Genre	F	M	M
Stage	stage 1	ND	ND
Site	cuir chevelu / cou	ND	ND
Pathologie	SSM, RGP / VGP	VGP	VGP
BRAF	V600E	WT	V600E
Gène PTEN	Hem Del	WT	K144X
Protéine PTEN	+	+	-
N-Ras	WT	Q16L	WT
CDK4	WT	WT	NA
Références	1, 2, 4	1, 2, 3, 5	1, 2, 3, 5

M : masculin, F : féminin

SSM : mélanome à croissance superficielle, RGP : croissance à phase horizontale,

VGP : croissance à phase verticale

WT : sauvage, Mut : muté

ND : non disponible

Référence:

1. The Wistar Institute

<http://www.wistar.org/lab/meenhard-herlyn-dvm-dsc/page/melanoma-cell-lines-0>

2. Coriell Institute

<http://ccr.coriell.org/Sections/Collections/WISTAR/CellLines.aspx?PgId=572&coll=WC>

3. Polisen, L., et al. (2011). "Deletion of PTENP1 pseudogene in human melanoma." J Invest Dermatol 131(12): 2497-2500.

4. Paraiso, K. H., et al. (2011). "PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression." *Cancer Res* 71(7): 2750-2760.
5. Mills, C. N., et al. (2009). "Expression and function of hypoxia inducible factor-1 alpha in human melanoma under non-hypoxic conditions." *Mol Cancer* 8: 104.

