



Université de Montréal

**Réparation par excision de nucléotides des dommages induits par rayons  
ultraviolets dans les mélanomes humains**

par

Vincent Rajotte

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 générale

Août 2011

© Vincent Rajotte, 2011

Université de Montréal

Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé :

Réparation par excision de nucléotides des dommages induits par rayons ultraviolets  
dans les mélanomes humains

présenté par :

Vincent Rajotte

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Anne-Marie Mes-Masson  
président-rapporteur

Dr Elliot Drobetsky  
directeur de recherche

Dr Francis Rodier  
membre du jury

## Résumé

Les mélanomes malins (MM) constituent le deuxième type de cancer le plus fréquent chez les jeunes adultes canadiens (entre 20 et 44 ans) ainsi qu'un des rares cancers dont l'incidence augmente annuellement. À moins que les MM ne soient excisés à temps par chirurgie, les chances de survie des patients sont pratiquement nulles puisque ce type de tumeur est très réfractaire aux traitements conventionnels. Il est bien connu que l'exposition aux rayons ultraviolets (UV), induisant des photoproduits génotoxiques, est une déterminante majeure dans l'acquisition de MM. À cet effet, la réparation par excision de nucléotides (NER) est la ligne de défense principale contre le développement des mélanomes puisqu'elle est la voie de réparation prépondérante en ce qui a trait aux dits photoproduits. Malgré cela, la contribution potentielle de défauts de la NER au développement des MM dans la population normale n'est toujours pas bien établie. Notre laboratoire a précédemment développé une méthode basée sur la cytométrie de flux qui permet de mesurer la NER en fonction du cycle cellulaire. Cette méthode a déjà mise en évidence qu'une déficience de l'activité de la protéine ATR peut mener à une déficience de la NER exclusive à la phase S dans des fibroblastes humains. Pareillement, nous avons démontré que plusieurs lignées cellulaires cancéreuses modèles comportent une déficience en NER en phase S, suggérant qu'une telle déficience puisse caractériser certains types de cancers. Nous avons voulu savoir si une déficience en NER en phase S pouvait être associée à une proportion significative de mélanomes et si le tout pouvait être attribuable à une diminution de l'activité d'ATR. Nos objectifs ont donc été de : (i) mesurer l'efficacité de la NER en fonction du cycle cellulaire dans les MM en comparaison avec les mélanocytes primaires, (ii) vérifier si le

niveau d'activité d'ATR corrèle avec l'efficacité de la NER en phase S dans les lignées de MM et (iii) voir si un gène fréquemment muté dans les mélanomes (tels PTEN et BRAF) pouvait coopérer avec ATR pour réguler la NER en phase S dans les mélanomes. Nous avons démontré que 13 lignées de MM sur 16 ont une capacité grandement diminuée à réparer les photoproduits induits par UV spécifiquement en phase S. De plus, cette déficience corrèle fortement avec une réduction de l'activation d'ATR et, dans plusieurs lignées de MM, avec une phosphorylation d'Akt plus importante. L'utilisation d'ARN interférent ou d'un inhibiteur du suppresseur de tumeurs PTEN, a permis, en plus d'augmenter la phosphorylation d'Akt, de réduire la réparation des photoproduits et l'activation d'ATR dans les cellules en phase S. En addition, (i) l'expression ectopique de la protéine PTEN sauvage dans des lignées déficientes en PTEN (mais pas d'une protéine PTEN sans activité phosphatase) ou (ii) l'inhibition pharmacologique d'Akt a permis d'augmenter la réparation en phase S ainsi que l'activation d'ATR. En somme, cette étude démontre qu'une signalisation d'ATR dépendante de PTEN/Akt amenant à une réparation déficiente des photoproduits génomiques causés par les UV en phase S peut être déterminante dans le développement des mélanomes induits par UV.

Mots clés : Mélanomes malins, cancer, UV, réparation par excision de nucléotides, phase S, ATR, PTEN, PI3K, Akt.

## **Abstract**

Malignant melanoma (MM) is the second most frequent neoplasia among young Canadian adults (aged 20-44); moreover the incidence of this disease continues to rise annually at an alarming rate. Unless primary melanoma is diagnosed early and promptly resected the patient prognosis is dismal since this deadly tumour type metastasizes extremely aggressively and is highly refractory to conventional treatment protocols. It is well established that exposure to UV light, and subsequent induction of genotoxic DNA photoproducts, is a primary determinant in the initiation of MM. Furthermore nucleotide excision repair (NER) clearly represents a critical frontline defence against MM because it is the only human pathway designed to remove the aforementioned DNA photoproducts. Despite this, the potential contribution of NER defects to sporadic MM development in the general population has remained unclear. Our laboratory previously developed a novel flow cytometry-based assay to evaluate the efficiency of NER as a function of cell cycle. This method was employed to demonstrate that functional ATR kinase is strictly required for NER during S phase in primary human fibroblasts. Intriguingly we also reported that many model tumour cell lines are deficient in NER uniquely in S phase populations, raising the possibility that such a defect might be characteristic of certain types of cancers. We therefore hypothesized that a significant proportion of human MM cell lines may exhibit reduced NER capacity specifically during S phase, and that this in turn might be attributable to reduced ATR signaling. To test this hypothesis, three major specific aims were proposed: (i) To measure the efficiency of NER as a function of cell cycle among a panel of human MM cell lines and in primary melanocytes; (ii) To investigate whether any correlation exists between

NER status and ATR activity during S phase in human MM cell lines; (iii) To investigate whether frequently mutated genes in melanoma (eg., PTEN, BRAF) might cooperate with ATR to regulate S phase-specific NER in MM cell lines. We were able to demonstrate that, in fact, 13/16 MM cell lines display remarkably diminished capacity to remove UV-induced DNA photoproducts specifically during S phase. Furthermore this defect correlates strongly with reduced activation of ATR kinase and, for a majority of MM, higher Akt phosphorylation levels. RNAi-mediated knockdown of the PTEN tumour suppressor, while stimulating Akt phosphorylation as expected, also engenders reductions in both photoproducts repair and ATR activation in S phase cells. In addition, (i) ectopic expression in *PTEN*-null strains of wild type PTEN but not of PTEN variants deficient in phosphatase activity, or (ii) pharmacological inhibition of Akt, significantly rescue S phase-specific repair as well as ATR activation. Our data indicate that reduced PTEN/Akt-dependent ATR signaling leading to defective repair of UV DNA photoproducts uniquely during S phase may represent an heretofore unrecognized major determinant in sunlight-induced melanoma development.

Key words : Malignant melanoma, cancer, UV, S phase, nucleotide excision repair, ATR, PTEN, PI3K, Akt.

## Table des matières

Résumé .....	iii
Abstract .....	v
Table des matières .....	vii
Liste des figures .....	ix
Liste des sigles et abréviations .....	x
Remerciements .....	xiv
Introduction 1 : Les lésions génomiques .....	1
Les différents types de dommages à l'ADN .....	1
Les voies de réparation des dommages à l'ADN .....	9
Les maladies génétiques en lien avec la NER .....	15
Les réponses cellulaires aux dommages à l'ADN via ATR et ATM .....	17
La tolérance aux dommages à l'ADN via la synthèse de translésion .....	23
La GG-NER en fonction du cycle cellulaire .....	25
Introduction 2 : Les mélanomes malins .....	27
Les gènes de susceptibilité dans les mélanomes .....	31
Les mutations acquises dans les mélanomes .....	33
Les mélanomes et la NER .....	41
Hypothèses et objectifs .....	43
Matériel et méthodes .....	45
Résultats .....	53
Préambule .....	53
La capacité de GG-NER dans les mélanocytes primaires .....	54
La capacité de GG-NER dans les mélanomes malins .....	55
L'induction de la phosphorylation de H2AX .....	58
L'expression de PTEN et la phosphorylation d'Akt dans les MM .....	61
L'inhibition de PTEN dans diverses lignées SPR+ .....	63
La restauration de PTEN augmente l'efficacité de la SPR .....	66
Le rôle de la phosphorylation d'Akt et de l'activité phosphatase de PTEN .....	71



Discussion .....	75
Rappel du projet .....	75
La déficience de la GG-NER en phase S.....	77
La corrélation entre l'efficacité de la GG-NER en phase S et l'induction de $\gamma$ H2AX	79
L'effet de PTEN sur l'activation d'ATR et la GG-NER.....	83
L'importance de l'activité phosphatase de PTEN sur la modulation d'Akt.....	85
Conclusion.....	87
Limites de l'étude.....	90
Expériences futures .....	92
Bibliographie.....	94
Annexe 1 .....	xvi

## Liste des figures

Figure 1. Structures des photoproduits majeurs induits par UV dans l'ADN

Figure 2. Mécanismes de la réparation par excision de nucléotides

Figure 3. Les voies de signalisation PI3K et MAPK dans les mélanomes

Figure 4. Capacité de GG-NER en fonction du cycle cellulaire dans des lignées de mélanocytes primaires humains

Figure 5. Capacité de GG-NER en fonction du cycle cellulaire dans des lignées de mélanomes malins humains.

Figure 6. Induction relative de  $\gamma$ H2AX lors de la phase S

Figure 7. La phosphorylation d'Akt et l'expression de PTEN dans les lignées de mélanomes

Figure 8. L'inhibition de PTEN dans des lignées SPR+

Figure 9. L'expression de PTEN dans des lignées SPR- et PTEN-

Figure 10. Le rôle de l'activité phosphatase de PTEN sur la GG-NER et l'induction de  $\gamma$ H2AX

## Liste des sigles et abréviations

6-4PPs 6-4 photoproduits

ADN Acide désoxyribonucléique

ARNi ARN interférent

ATM Ataxia telangiectasia mutated

ATR Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein

ATRIP ATR-interacting protein

ATP Adénosine tri-phosphate

BER Réparation par excision de bases

BRCA1 Breast cancer susceptibility gene products

BSA Albumine de sérum bovin

cAMP Adénosine monophosphate cyclique

CDK Kinase cycline dépendante

CDKN2A Inhibiteur de kinase cycline-dépendante 2A

CPDs Dimères de cyclobutane pyrimidique

CS Syndrome de Cockayne

CS(A/B) Protéines du syndrome de Cockayne, groupe de complémentation A ou B

DNA-PKcs Catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase

DSBs Bris double brin (génomiques)

DSBR Réparation de bris double brin

FAK Kinase d'adhésion focale

FBS Sérum bovin fœtal

GG-NER Réparation par excision de nucléotides génomique globale

hTERT Transcriptase inverse de la télomérase humaine

HR Recombinaison homologue

IR Rayon ionisant

MAPK Mitogen-activated protein kinase

MDM2 Murine double minute

MM Mélanomes malins

MMR « Mismatch repair »

MRN Complexe composé de Mre11, Rad50 et Nbs1

MSHR Récepteur de l'hormone mélanotrope

NER Réparation par excision de nucléotides

PAF Paraformaldéhyde

PBS Tampon phosphate salin

PCNA Proliferating cell nuclear antigen

PI Iodure de propidium

PI3K Phospho-inositide-3-kinase

PIP2 Phosphatidyl-inositol 3,4-biphosphate

PIP3 Phosphatidyl-inositol 3,4,5-triphosphate

PTEN Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10

Rad51 Radiation sensitive 51

Ras Protéines « Rat sarcoma »

RB Rétinoblastome

ROS Dérivés réactifs de l'oxygène

RPA Protéine de réplication A

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

Src Protéines « Sarcoma »

SSBs Bris simple brin (génomiques)

TC-NER Réparation par excision de nucléotides liée à la transcription

TFIIH Facteur de transcription IIIH

TLS Synthèse de translésion

TOPBP1 DNA topoisomerase 2-binding protein 1

UV Ultraviolet(s)

XP Xeroderma pigmentosum

$\mu\text{g}$  Microgramme

$\mu\text{M}$  Micromolaire

*Les hommes, in universali, jugent plutôt aux yeux qu'aux mains,  
car chacun peut voir facilement, mais comprendre bien peu.  
(Machiavel, Le Prince)*

## Remerciements

En premier lieu, il est important de souligner l'apport du Dr Elliot Drobetsky à ce projet. En effet, en plus d'avoir eu la gentillesse d'accepter de diriger ma maîtrise, il m'a confié un projet que j'ai, même s'il a trait de manière particulièrement répétitive à la phase S et à ATR, énormément à cœur. J'ai spécialement aimé son ouverture d'esprit lorsque je voulais faire valoir certains points et crois que cette attitude, en plus de sa vivacité d'esprit, a permis d'amener le projet à nombre de conclusions très intéressantes. Aussi, il me faut le remercier pour les nombreux « Timbits » apportés de manière assez régulière au laboratoire, en ayant pour seul reproche que ceux au chocolat étaient souvent en trop petit nombre.

Pareillement, l'apport des autres membres du laboratoire n'est pas négligeable. Yannick et Raphaël, que j'ai très peu connus, m'ont initialement aidé à acquérir des techniques et m'ont donné des conseils qui m'auront été utiles tout au long de ma maîtrise. Par la suite, Maxime, qui est parti un an après que je ne commence, a énormément contribué à la construction de mes connaissances scientifiques de par son intelligence et sa perspicacité. Aussi, Annie a beaucoup aidé à l'avancement de ce projet de par son dévouement et ses idées apportées. Ces derniers faits sont sans compter qu'elle est de bonne humeur pratiquement en tout temps et qu'elle aura eu la gentillesse de tolérer ma très légère déficience en rangement. La plus récente acquisition du laboratoire, François, m'a aidé dans la connaissance de nouvelles techniques et semble être un scientifique excellent. J'espère qu'il s'amusera comme un jeune dans le domaine des sciences pour les années à venir.

J'aimerais remercier, sur une base plus générale, tous les individus de l'Université de Montréal que j'ai côtoyés durant mon parcours et qui m'ont permis de mieux connaître et apprécier la biologie moléculaire. Je remercie aussi la fondation de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont et le programme de biologie moléculaire pour leur aide financière. Aux membres du jury, je vous remercie de prendre un peu de votre temps, étant bien conscient que c'est une denrée rare entre les demandes de bourse, la gestion de laboratoire, les conférences, l'enseignement, les divers comités et j'en passe.

Je me dois de faire une parenthèse à une personne partageant un grand pan de ma vie, Valérie. Son support, sa patience (relative aux périodes mensuelles) et toutes les qualités grandioses qui définissent sa personne ont été d'une grande aide dans cette expérience.

Finalement, ceux qui ont sans aucun doute le plus contribué à ce que vous lirez sont mes parents. En effet, ils ont non seulement été capables de tolérer ma sœur et moi, mais nous ont supportés dans toutes nos entreprises et cheminements respectifs. Ils auront su être un exemple que je tenterai un jour d'incarner, bien qu'il sera difficile d'en être le pâle reflet. Quoi qu'en disent les ministres de l'éducation, il n'est présentement pas si aisé pour un étudiant de se lancer dans des études sans aide parentale, et encore moins lorsque les frais de scolarité doublent sur cinq ans... Le fait d'être éduqué dans un domaine d'intérêt à l'abri des soucis liés aux besoins primaires est un des plus beaux dons qu'on ne puisse recevoir, et je ne remercierai jamais assez mes paternels pour cela.

J'espère que toute personne s'attardant à ce mémoire ne sera pas déçue du temps investi, bonne lecture.



# **Introduction 1 : Les lésions génomiques**

## **Les différents types de dommages à l'ADN**

De nos jours, deux réalités majeures touchent notre société de plein fouet: le cancer et le vieillissement. En ce qui a trait au cancer, 45% des hommes et 40% des femmes en seront atteints au cours de leur vie alors qu'un homme sur 3,5 et une femme sur 4,2 devraient en décéder (Société canadienne du cancer, 2011). Concernant le vieillissement, 14,1% de la population canadienne en 2010 était âgée de 65 ans et plus et il est prévu que ce pourcentage augmentera à 23,7% en 2036 (Canada, 2010). Le cancer et le vieillissement sont intrinsèquement reliés, une hausse marquée des chances d'avoir le cancer étant constatée à partir de la cinquantaine et de la soixantaine (Société canadienne du cancer, 2011). Avec de telles données, il ne fait aucun doute qu'il est pertinent pour la recherche scientifique de tendre vers une diminution de la fréquence du cancer ainsi qu'à une meilleure qualité de vie des gens de l'âge d'or. Or, les dommages à l'ADN sont associés à une vaste gamme de réalités touchant les humains et ont, entre autres, de très puissants liens avec le cancer et le vieillissement (Hoeijmakers, 2009; Kong, et al., 2011).

Lorsqu'il y a des dommages à l'ADN, ceci résulte en trois scénarios potentiels: (i) la réparation immédiate de la lésion, (ii) une survie malgré les dommages ou (iii) l'élimination de la cellule (Vinson & Hales, 2002).

Pour ce qui est de la réparation des lésions génomiques exempte d'erreur, elle serait grandement souhaitable sur le plan individuel, amoindrissant les risques de

maladies génétiques acquises. Or, si une réparation parfaite de tous les dommages génomiques avait lieu chez chacun des individus d'une population, peut-être qu'une évolution génétique n'aurait plus lieu. Nous avons été dotés par la nature d'un patrimoine génétique vulnérable et dépendant d'une multitude de voies de réparation, et il n'est pas improbable que cette option ait été jugée meilleure qu'un bagage génomique intouchable et inflexible (Friedberg, et al., 2006).

Concernant la survie potentielle de cellules dont les dommages n'ont pas été réparés ou l'ont été de manière aberrante, cela peut mener à diverses mutations. Ainsi, si un gène suppresseur de tumeurs en vient à être moins efficace et/ou un oncogène à être plus actif, cela mène au développement d'un cancer (Friedberg, et al., 2006). D'autres scénarios sont aussi envisageables, soit la sénescence cellulaire, l'apparition de diverses maladies d'origine génétiques, une mutation sans conséquence majeure et, très rarement, une mutation bénéfique (Vinson & Hales, 2002).

En ce qui a trait à la sénescence, il s'agirait, avec l'apoptose, du principal déterminant amenant au vieillissement, ce dernier terme pouvant aussi être défini par l'accumulation de dommages moléculaires, cellulaires, organiques et tissulaires à travers le temps (Seviour & Lin, 2010). Pour ce qui est de la sénescence, elle peut être caractérisée par un arrêt permanent du cycle et de la croissance cellulaires, cet arrêt résistant aux facteurs de croissance et aux autres signaux induisant normalement la prolifération (Sikora, et al., 2011). Aussi, deux formes différentes de sénescence ont jusqu'ici été identifiées, toutes deux ayant un lien avec la réponse aux dommages à l'ADN. Premièrement, la sénescence répllicative est le fruit d'un raccourcissement progressif des télomères à force de réplifications cellulaires. Jusqu'ici, plusieurs protéines

majeures dans la réparation des dommages à l'ADN, telles p53 (Campisi, 2005; Qian & Chen, 2010), ATM (Smith, et al., 2010) et BRCA1 (Cao, et al., 2003), ont été associées avec une telle forme de sénescence. Si la sénescence cellulaire induite par p53 a été reliée à une diminution de la tumorigenèse (Feldser & Greider, 2007), la délétion d'ATM et une forme mutée de BRCA1 (engendrant toutes deux un accroissement de la sénescence) ont été associées à une augmentation des risques de contracter un cancer (Cao, et al., 2003; Smith, et al., 2010). Or, dans tous ces cas de sénescence cellulaire, des symptômes reliés à un vieillissement prématuré ont pu être constatés (Seviour & Lin, 2010). Le second type de sénescence cellulaire est celui induit par la surexpression d'oncogènes et consiste en la restriction de la progression de tumeurs bénignes; un tel processus active lui aussi la voie de réponse aux dommages à l'ADN (Courtois-Cox, et al., 2008).

En dernier lieu, il est important de souligner que l'accumulation de dommages à l'ADN peut aussi mener à l'apoptose. Ainsi, il a été observé que, dans des souris où p53 (protéine ayant un rôle pro-apoptotique reconnu) était activé de manière constitutive et offrait une protection accrue contre le cancer, un vieillissement accéléré par une diminution de la masse de plusieurs tissus était observé (Tyner, et al., 2002). En conclusion, il faut constater que les cellules doivent trouver un équilibre entre la mort cellulaire et la survie avec mutations en réponse à des dommages génomiques ne pouvant être réparés, à savoir ce qui est le mieux pour l'organisme.

## **Les agents de dommage à l'ADN**

Il existe deux différentes sortes d'agents dommageables à l'ADN, soit les endogènes et les exogènes (ou environnementaux).

Parmi les agents endogènes se trouvent surtout des agents hydrolytiques et des réactions d'oxygénation résultant du milieu immédiat dans lequel baigne l'ADN (eau, oxygène réactif, etc.). Ainsi, parmi ces agents endogènes, il est possible de retrouver les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) engendrés par des processus métaboliques ayant rapport à la respiration (Davies, 1999). Il est d'ailleurs particulièrement bien vu par les temps actuels de se nourrir d'aliments dits antioxydants en vue de pallier à de tels composés (Finley, et al., 2011). Mis à part les ROS, il est possible d'ajouter aux dommages endogènes ceux relevant d'erreurs de la réplication génomique suite à l'incorporation d'une mauvaise base ou de précurseurs de nucléotides endommagés (Kornberg & Baker, 1992; Pavlov, et al., 1994).

Quant aux agents de dommages à l'ADN environnementaux, ils incluent des agents physiques et chimiques normalement générés à l'extérieur de la cellule. Ainsi, il est primordial de faire allusion aux rayons ionisants (IR), qui ont un effet direct de par leur absorption immédiate, ionisant ainsi les bases et les sucres (Ward, 1988), et un effet indirect lorsque l'ADN réagit avec des agents réactifs formés par l'eau ou diverses molécules irradiées (Goodhead, 1989). Plusieurs agents chimiques se retrouvant dans l'environnement sont eux aussi nocifs, à savoir les agents alkylants tel le chlorométhane, étant surtout émis par la combustion de biomasse (Crutzen & Andreae, 1990), les agents de réticulation (ou « cross-link »), des composés tels le benzo[ $\alpha$ ]pyrène (provenant de la

fumée de cigarette) (Alexandrov, et al., 2010), les aflatoxines (présentes dans certaines sources de glucides contaminées) (Gursoy-Yuzugullu, et al., 2011), certains métabolites d'hormones (telles celles des œstrogènes) (Liu, et al., 2002) ainsi qu'une multitude d'autres éléments.

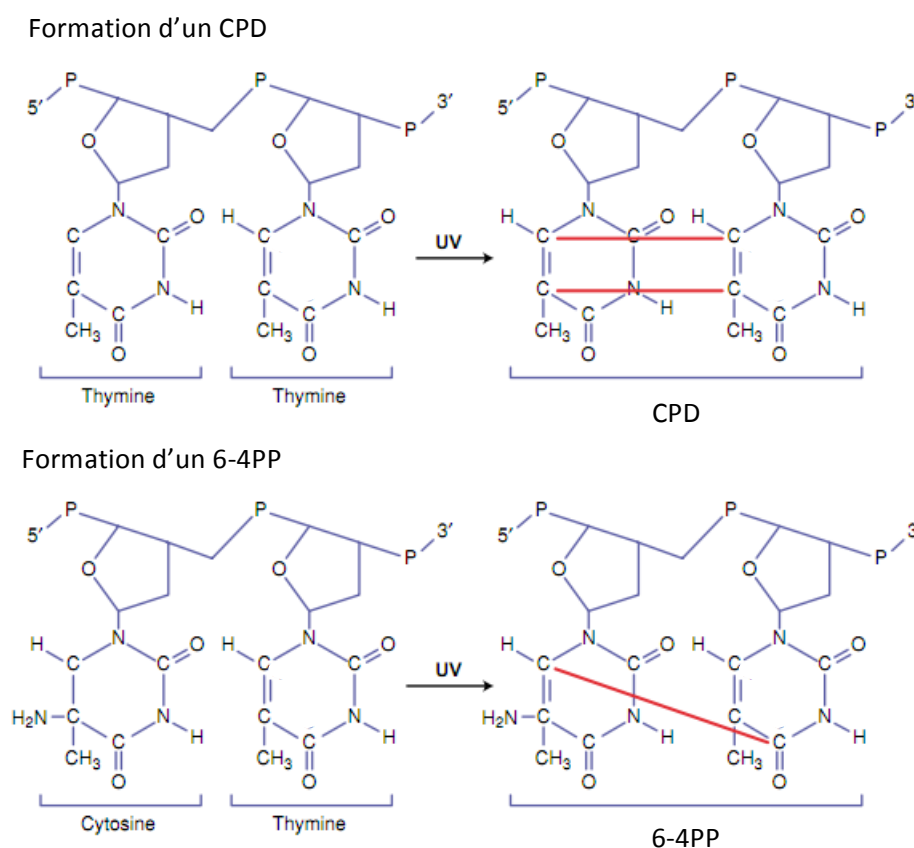
Les rayons ultraviolets (UV) sont une autre source environnementale majeure de dommages génétiques. Les rayons UV sont divisés en 3 types en fonction de leurs longueurs d'onde: les UVA (310 à 400 nm), les UVB (280 à 320 nm) et les UVC (100 à 280 nm). Pratiquement aucun rayon d'en deçà de 300 nm ne traverse la couche d'ozone et la longueur d'onde d'absorption optimale pour l'ADN se situe à 260 nm (Schuch & Menck, 2010). Or, les rayons UV causent tous des dommages à l'ADN, mais à des degrés d'intensité différents. Ainsi, les rayons UVC, auxquels les humains ne sont vraisemblablement pas beaucoup exposés, sont malgré tout très pertinents sur le plan expérimental puisque les lampes germicides (254 nm) affectent très peu les protéines et sont plus efficaces que les UVA et les UVB en ce qui a trait à endommager l'ADN pour un temps donné, tout en engendrant généralement les mêmes lésions (Setlow, 1974).

### **Les différents types de lésions à l'ADN**

Les agents décrits plus haut endommagent notre patrimoine héréditaire en engendrant plusieurs types de lésions, dont les photoproduits, les bris simple brin (SSBs) ainsi que les bris double brin (DSBs).

Ainsi, l'exposition aux rayons UV n'est pas sans conséquence; une journée au soleil peut induire à elle seule un total de  $10^5$  photoproduits génomiques par kératinocyte (Hoeijmakers, 2009). Les photoproduits les plus fréquemment engendrés

par les rayons UV consistent en des liens covalents entre des pyrimidines adjacentes se traduisant par des doubles liens entre leurs carbones 5 et 6 respectifs (Batista, et al., 2009; Wang, 1965). Cette structure est communément nommée dimère de cyclobutane pyrimidique ou CPD (voir figure 1). Il existe des CPDs formés à partir de thymines (à près de 70%) ou de cytidines ou d'une cytidine et d'une thymine (Mitchell, et al., 1992). Le second adduit génomique le plus fréquemment causé par les UV est le 6-4 photoproduit (6-4PP) et se définit par un lien entre le carbone 6 d'une pyrimidine et le carbone 4 d'une pyrimidine adjacente en 3' (Taylor, et al., 1988) (voir figure 1).



**Figure 1. Structures des photoproduits majeurs induits par UV dans l'ADN.**

Adapté de **Matsumura, Y., & Ananthaswamy, H. N. (2002)**. Short-term and long-term cellular and molecular events following UV irradiation of skin: implications for molecular medicine. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. **4** 1-22.

Les pyrimidines impliquées dans les 6-4PPs peuvent être des thymines ou des cytidines ou une thymine et une cytidine (Kim, et al., 1995). Les ratios variant un peu dans la littérature, il est accepté qu'il y a entre trois et dix fois davantage de CPDs que de 6-4PPs produits par les UV, tout dépendamment des conditions (Koehler & Hanawalt, 1996; Mitchell, 1988). Aussi, les 6-4PPs engendreraient une déformation beaucoup plus importante de l'ADN (44°) que les CPDs (9°) (Kim, et al., 1995). Il est fondamental de souligner que la formation de tels photoproduits amène à un blocage de la réplication et de la transcription; la machinerie cellulaire nécessaire à ces processus n'ayant plus accès aux sites endommagés (Costa, et al., 2003).

En ce qui concerne les SSBs, ils sont, en majorité, créés par des attaques de radicaux libres tels les ROS (Caldecott, 2004). Ces types de dommages représentent aussi la majeure partie de ceux engendrés par, entre autres, des radiations ionisantes et des agents alkylants (Thompson & West, 2000). Quant aux DSBs, ils représentent l'une des lésions les plus toxiques faites à l'ADN et se définissent par un bris simultané de l'infrastructure de phosphates sur deux brins d'ADN complémentaires (Hiom, 2010). Ils sont entre autres produits suite à une exposition à des IR, à des agents produisant des radicaux libres (telles la bléomycine et la tirapazamine) et à des agents empêchant la re-ligation de l'ADN (tels les etoposides et la doxorubicine) (Ohnishi, et al., 2009). De même, ils peuvent être le fruit d'une erreur du processus de réplication ou d'une réplication en bonne et due forme d'un SSB (Hiom, 2010). Selon plusieurs articles, les DSBs seraient la lésion par excellence pour générer des aberrations chromosomiques puisqu'ils sont très prompts à causer la perte d'information génétique (Iliakis, et al., 2007; Kinner, et al., 2008; Pfeiffer, et al., 2000). En addition, les photoproduits

mentionnés peuvent eux aussi produire des DSBs. La formation de ces DSBs induits par UV serait principalement faite dans les cellules en réplication (ou phase S) en raison de l'affaissement de fourches de réplication bloquées (Roos & Kaina, 2006). L'hypothèse selon laquelle les photoproduits non réparés soient « transformés » en DSBs est supportée par le fait que des cellules déficientes en réparation par excision de nucléotides (NER), voie majeure de réparation des photoproduits, produisent davantage de DSBs après exposition aux UV (Batista, et al., 2009).



## Les voies de réparation des dommages à l'ADN

Puisque la fréquence des lésions au niveau de l'ADN se mesure, en moyenne chez les humains, à hauteur de  $10^4$  par cellule par jour, il est primordial pour notre organisme d'avoir des systèmes de réparation de l'ADN efficaces et d'une bonne fidélité (Lindahl, 1993). Ainsi, notre organisme s'est doté de cinq voies de réparation de l'ADN différentes : le renversement direct des dommages, la réparation par excision de base (BER), la réparation de mésappariement ou « mismatch repair » (MMR), la réparation de bris double brin (DSBR) et la NER (Sandovici, et al., 2002).

D'abord, le seul mécanisme connu chez l'être humain ayant trait au renversement direct des dommages est l'action d'une méthyltransférase génomique sur les O<sup>6</sup>-méthylguanines (dommages causés par des agents alkylants) (Verbeek, et al., 2008). Brièvement, la protéine métyltransférase catalyse le transfert d'un groupement méthyl des adduits d'O<sup>6</sup>-méthylguanines de l'ADN double brins à une de ses cystéines (Zhong, et al., 2010). Après coup, la méthyltransférase alkylée va être dégradée par ubiquitination (Guza, et al., 2009).

Ensuite, concernant la BER, il s'agit probablement de la voie de réparation la plus utilisée dans la nature et elle est surtout employée suite à l'action d'agents endogènes dommageables à l'ADN (Friedberg, et al., 2006). Elle consiste premièrement en l'action d'une ADN glycosylase, qui catalyse l'hydrolyse des liens N-glycosyliques liant certaines bases aberrantes au squelette désoxyribose-phosphate. Après que la base aberrante soit excisée, le site abasique en résultant est corrigé par l'action d'une

endonucléase apurinique/apyrimidinique (AP), d'une ADN polymérase et, enfin, d'une ADN ligase (Seeberg, et al., 1995).

La MMR, quant à elle, joue un rôle prépondérant dans la réparation des séquences mal appariées lors de la réplication de l'ADN, les mésappariements n'étant pas toujours exclus de l'action d'ADN polymérase (Mukherjee, et al., 2010). À cet effet, si la réplication est jugée comme un processus de haute fidélité (une mutation pour  $10^9$  à  $10^{10}$  paires de bases répliquées), cela est en bonne partie dû à la MMR, sans laquelle ce taux d'erreur se multiplierait par 50 à 1000 fois (Hsieh & Yamane, 2008). Le système de la MMR comprend les familles MutS, MutL et MutH. La protéine homodimérique MutS reconnaît le mésappariement, se lie à l'ADN et forme un complexe de réparation actif. Après la reconnaissance par MutS, MutL va aider au recrutement et à l'activation de MutH, qui est une endonucléase qui permettra ensuite l'excision du mésappariement et la resynthèse du brin (Mukherjee, et al., 2010).

Quatrièmement, en ce qui touche à la DSBR, elle se divise en deux mécanismes différents chez les eucaryotes, soit la recombinaison homologue (HR) et la jonction non-homologue de terminaisons (NHEJ) (Shrivastav, et al., 2008). La NHEJ est une voie utilisée pour tout le spectre du cycle cellulaire (et représentant la majeure partie de la réparation des DSBs) qui implique une liaison des terminaisons de l'ADN avec un processus minimal au site de jonction des terminaisons (Lieber, 2008). La NHEJ est initiée par la reconnaissance et la liaison des terminaisons de l'ADN par les protéines Ku70 et Ku80, suivies du recrutement de la sous-unité catalytique de la protéine kinase de l'ADN (DNA-PKcs) (O'Driscoll & Jeggo, 2006). Le complexe Ku/DNA-PKcs va ensuite recruter la ligase IV, qui va compléter la réparation (Grawunder, et al., 1997). Ce

processus n'est pas sans erreur; il implique de rejoindre ce qu'il reste de deux terminaisons d'ADN et tolère la perte ou l'addition de nucléosides au site de jonction (Lieber, 2008). La HR, quant à elle, n'est utile que pour la réparation des DSBs associés à la réplication et a donc principalement lieu en fin de la phase S et en G2, utilisant une séquence homologue en guise de modèle pour réparer l'ADN (Kass & Jasin, 2010). Puisqu'elle se base sur un brin d'ADN déjà existant, cette réparation est beaucoup plus prompte à conserver l'ADN intact (Shrivastav, et al., 2008). Chez l'humain, les premières étapes (reconnaissance et section des terminaisons d'ADN) de ce type de réparation s'effectuent via quatre nucléases, MRN (MRE-11-RAD50-NBS1), Exo1, Dna2 et Sac2, de même qu'une hélicase, BLM (Mimitou & Symington, 2009). Après coup, l'ADN simple brin (ssDNA) en résultant est lié par la protéine de réplication A (RPA), qui est ensuite remplacée par Rad51 avec l'assistance de différents facteurs (San Filippo, et al., 2008). Rad51 permet ensuite le pairage avec une région comportant de l'ADN simple brin correspondant, ce qui sera suivi d'une synthèse en fonction dudit brin (Mimitou & Symington, 2009).

### **La réparation par excision de nucléotides**

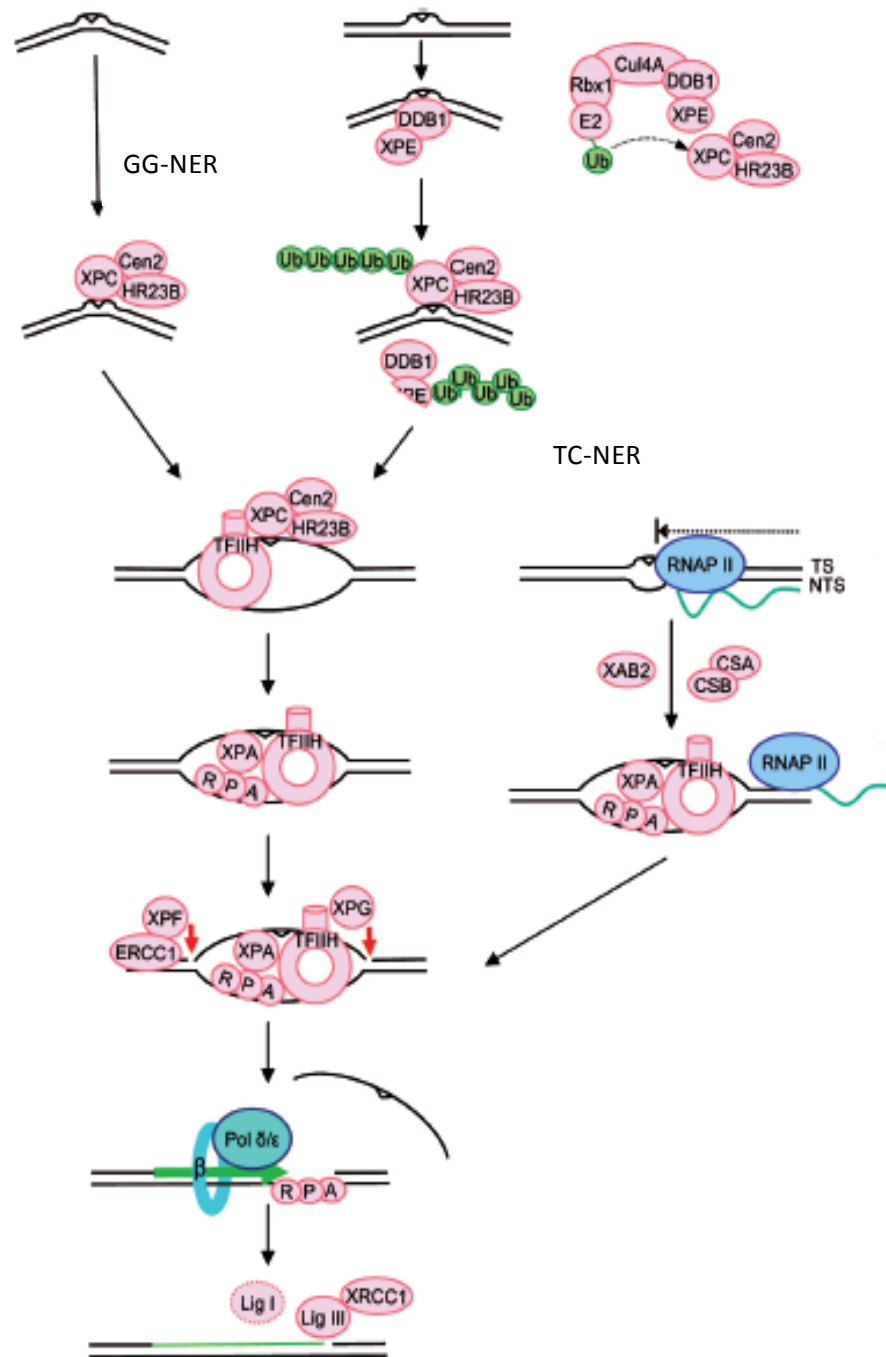
La NER est le mécanisme de réparation d'ADN étant sans doute le plus polyvalent par sa capacité à réparer une multitude de lésions (de Boer & Hoeijmakers, 2000). En effet, cette voie est capable de réparer une pléthore d'anormalités génomiques, à condition qu'il y ait formation d'adduits volumineux amenant une distorsion et une modification chimique de l'ADN (Buschta-Hedayat, et al., 1999). Ainsi, la NER peut être utilisée pour la maintenance du patrimoine héréditaire après exposition aux UV (réparation des photoproduits), à des adduits chimiques ainsi qu'à

quelques formes de dommages oxydatifs (de Boer & Hoeijmakers, 2000). Cette voie moléculaire se divise en deux types différents : la NER globale (GG-NER) et la NER transcriptionnelle (TC-NER). La GG-NER a été baptisée de la sorte en raison qu'elle répare les lésions sur l'ensemble du génome (incluant les régions non codantes, les gènes silencieux ainsi que les parties non transcrites de brins actifs). La TC-NER, de son côté, est une voie spécialisée opérant sur les lésions engendrées sur les brins d'ADN transcrits de gènes exprimés (Friedberg, 1996).

Chez l'humain, il fait généralement consensus que la GG-NER (voir figure 2) commence par la reconnaissance des lésions à l'ADN à l'aide du complexe XPC-HR23B-Cen2 (Araki, et al., 2001). En parallèle à cela, certaines lésions causant moins de distorsion de l'ADN (tels les CPDs) peuvent être reconnues par le complexe de liaison de dommages à l'ADN ou DDB; ce complexe va aussi permettre la polyubiquitination de XPC et XPE (Sugasawa, et al., 2005; Takedachi, et al., 2010). L'ubiquitination de XPC va ensuite augmenter son affinité pour l'ADN, alors que l'ubiquitination de XPE va mener à sa propre dégradation (Sugasawa, 2010). Une fois XPC lié à l'ADN via une des deux voies de reconnaissance, le facteur de transcription IIIH (TFIIH) est ensuite recruté et permet l'ouverture d'une « bulle de dénaturation » alentour de la lésion. Deux sous-unités de TFIIH ayant une action d'hélicase, XPB et XPD, sont nécessaires au déroulement du brin d'ADN aux alentours de la lésion par une réaction dépendante de leur activité ATPase (Oksenyich & Coin, 2010). Après l'ouverture de l'ADN par TFIIH, l'ADN simple brin (ssDNA) va amener la liaison de la protéine RPA, qui sera suivie par le recrutement de XPA (qui serait nécessaire pour confirmer la présence d'une lésion et/ou pour identifier le brin endommagé) (Sugasawa,

et al., 1998). Le complexe RPA-XPA va ensuite permettre de mobiliser et d'activer l'endonucléase ERCC1-XPF (Tsodikov, et al., 2007) en 5' de la lésion et la fin de la bulle de dénaturation (à la jonction d'ADN simple brin en ADN double brin) va amener l'endonucléase XPG à couper en 3'(O'Donovan, et al., 1994). Une fois le brin aberrant excisé, la synthèse d'un nouveau brin se fait à l'aide de la polymérase delta ou de la polymérase epsilon, de RPA et de PCNA (Shivji, et al., 1992). Le tout est alors scellé par l'ADN ligase III et, à un moindre degré, par l'ADN ligase I dans les cellules en réplication (Moser, et al., 2007).

Pour ce qui est de la TC-NER (voir figure 2), elle est initiée par le blocage de l'ARN polymérase II à une lésion sur une région transcrite d'un gène (Mu & Sancar, 1997). Ensuite, les enzymes CSA, CSB et XAB2 sont nécessaires au recrutement de XPA-RPA et TFIIH, passant ainsi par une voie autre que la reconnaissance par XPC et DDB nécessaire dans la GG-NER (Henning, et al., 1995). Une fois XPA-RPA et TFIIH recrutés, la réparation s'effectue pareillement à la GG-NER.



**Figure 2. Mécanismes de la réparation par excision de nucléotides**

Adapté de Nospikel, T. (2009). DNA Repair in Mammalian Cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(6), 994-1009. doi:10.1007/s00018-009-8737-y

## **Les maladies génétiques en lien avec la NER**

Plusieurs maladies étant causées par une déficience dans certaines étapes de la NER ont été jusqu'à ce jour identifiées. Parmi les plus connues se trouvent Xeroderma pigmentosum (XP), le syndrome de Cockayne (CS) de même que la trichothiodystrophie (TTD) (Nospikel, 2009).

La maladie XP peut se résumer à une sensibilité extrême aux rayons solaires. En effet, l'exposition au soleil des personnes atteintes d'une telle maladie mène à des altérations dégénératives des régions de la peau ainsi qu'aux yeux (de Boer & Hoeijmakers, 2000). L'âge moyen de l'apparition des premiers symptômes est de deux ans et les chances de développer un cancer de la peau augmentent de 1000 fois chez les patients XP (Kraemer, 1997). Par ailleurs, de tels individus sont victimes de différents types de cancer dits « internes » (non reliés aux UV) à une fréquence multipliée par 10 à 20 fois avant l'âge de vingt ans versus la moyenne de la population (Kraemer, et al., 1984). En ce qui a trait aux causes de ladite affection, elles ont rapport à des mutations dans différentes protéines impliquées dans la NER (dont XPA, XPB, XPD, XPF et XPG) (Bootsma, et al., 1998) de même que XPV (polymérase eta) (Hentosh, et al., 2011). Or, il y a beaucoup d'hétérogénéité en ce qui touche à l'ampleur de la déficience en NER; cela dépendant du type de mutation et du rôle de la protéine mutée. Ainsi, les patients XP-C, dont la TC-NER est toujours effective, ont généralement une sensibilité moindre aux UV que les patients XP-A et XP-D qui sont affectés dans tous les types de NER (Bootsma, et al., 1998). Cette maladie a permis de faire la première association entre le cancer et une déficience en réparation de l'ADN (Cleaver, 1968).

Le syndrome de Cockayne est une maladie très différente du Xeroderma pigmentosum. Cette maladie est causée par des mutations des protéines CSA et/ou CSB les rendant moins actives; handicapant la TC-NER du même coup (Leng, et al., 2008). Les patients en étant atteints, incapables de réparer l'ADN de régions transcrites, sont surtout diagnostiqués selon leurs symptômes qui se résument à une croissance retardée et aberrante, une photosensibilité supérieure à la normale ainsi que des troubles neurodéveloppementaux et neurologiques (Nospikel, 2009). Ce syndrome n'est pas relié à une fréquence accrue des cancers (Cleaver & Revet, 2008), bien que de tels patients n'aient peut-être pas la longévité pour en développer, l'âge moyen de décès y étant associé se chiffrant à 12,5 années (Nance & Berry, 1992).

La TTD est une maladie rare et dont les symptômes cliniques sont très hétérogènes et nombreux (de Boer & Hoeijmakers, 2000). Généralement, on y associe, entre autres, une photosensibilité, de l'ichtyose (desquamation continue de la peau), des cheveux cassants, un retard intellectuel, une vulnérabilité aux infections, une fertilité diminuée ainsi qu'une petite taille (Lambert, et al., 2010). Au niveau moléculaire, cela se traduit par une mutation dans une des sous-unités de TFIIH suivante : TTD-A (Kainov, et al., 2008), XPB ou XPD (Hashimoto & Egly, 2009). Puisque TFIIH opère dans la transcription et dans la NER, il est complexe de délimiter la cause de chaque symptôme et il semble que la NER ne soit que ralentie, et non complètement abolie, chez ces patients (Fuss & Tainer, 2011; Theil, et al., 2011).



## **Les réponses cellulaires aux dommages à l'ADN via ATR et ATM**

Les PIKKs (« phosphatidylinositol 3-kinase-like kinases ») ATM (« ataxia telangiectasia mutated ») et ATR (« ATM and rad3-related ») activent un réseau de signalisation complexe en réponse à diverses formes de dommages à l'ADN. ATM est surtout activé suite à la formation de DSBs (Lavin & Shiloh, 1997). De son côté, ATR est activé par des agents inhibant la réplication, tels que les rayons UV et l'hydroxyurée (bloquant la synthèse de précurseurs de nucléotides) de même que par les régions d'ADN simple brin aux fourches de réplifications bloquées (O'Driscoll, et al., 2004). Il existe deux syndromes reliés à une défectuosité de ces protéines chez l'homme. Premièrement, la maladie A-T (ataxia telangiectasia) ayant inspiré le nom de la protéine ATM (Savitsky, et al., 1995), est associée à une sensibilité accrue aux IR, à une neurodégénérescence, à de l'instabilité chromosomique, à l'infertilité, à des troubles immunitaires ainsi qu'au développement de cancers (Eyfjord & Bodvarsdottir, 2005; Xu, et al., 1996). Aussi, le syndrome de Seckel, consistant en une mutation d'ATR ou à la voie de signalisation afférente, se traduit par un retard de croissance et une microcéphalie sévère (Kerzendorfer & O'Driscoll, 2009). En outre, ATR est essentiel à la viabilité chez la souris (Brown & Baltimore, 2000) et chez l'homme (Cortez, et al., 2001), alors qu'ATM n'y est pas indispensable (Hurley & Bunz, 2007). Les paragraphes subséquents se rapporteront aux voies d'activation de ces kinases, de même qu'à quelques protéines majeures phosphorylées par ces dernières. Or, ce ne sera qu'un aperçu étant donné que les substrats de ces kinases seraient plus de 700 (Matsuoka, et al., 2007).

## ATR

ATR est recruté aux régions comportant de l'ADN simple brin (formées lors de la réplication et lors de la réparation de l'ADN). Ce recrutement se fait tout d'abord avec l'aide de la protéine RPA, qui a une affinité innée pour la ssDNA (Vassin, et al., 2009). Suite à cela, le complexe ATR-ATRIP (ATRIP pour « ATR-interacting protein ») sera recruté grâce à la liaison entre RPA et ATRIP (Ball, et al., 2005). ATRIP est d'ailleurs essentiel à toutes les fonctions connues d'ATR. En effet, ATRIP joue un rôle dans la stabilisation, la localisation ainsi que l'activation d'ATR (Nam & Cortez, 2011). Après coup, la protéine TOPBP1, elle-même recrutée par le complexe 9-1-1, va permettre l'activation d'ATR via une interaction directe avec ATRIP (Kumagai, Lee, et al., 2006). L'activité générale d'ATR est fortement reliée à la réplication; des cellules déficientes en ATR ne pouvant progresser en phase S (Hurley & Bunz, 2007; Petermann & Caldecott, 2006). Une telle situation d'arrêt ou « stase en phase S » a été auparavant seulement remarquée après avoir incubé des cellules sur une longue période de temps en présence d'inhibiteurs de réplication de l'ADN (Borel, et al., 2002). Après le retrait de tels inhibiteurs, il a été démontré qu'une telle « stase en phase S » peut être maintenue dans des cellules déficientes en ATR, mais non lorsque cette voie est fonctionnelle, sous-entendant un rôle majeur d'ATR pour relancer la réplication (Hurley, et al., 2006).

ATR étant une kinase, elle va phosphoryler un nombre majeur de protéines. Parmi celles-ci, la protéine Chk1 est fondamentale puisqu'elle est, tout comme ATR, nécessaire à la viabilité (Liu, et al., 2000). Chk1 est phosphorylé aux sites sérine 317 et sérine 345 par ATR (Chen & Sanchez, 2004) après exposition aux rayons UV ou à l'hydroxyurée (Liu, et al., 2000). Chk1 phosphoryle Cdc25A et Cdc25C, ce qui mène à

la dégradation de la première protéine et au confinement dans le cytoplasme de la seconde (Peng, et al., 1997; Syljuasen, et al., 2005). Les phosphatases Cdc25 étant ainsi inactivées, cela empêche l'activation des CDKs (kinases cyclines dépendantes) et amène à un arrêt du cycle cellulaire (Lam & Rosen, 2004).

ATR a, tel qu'auparavant, beaucoup d'autres cibles. Ainsi, XPA, lorsqu'il est phosphorylé par ATR, va migrer au noyau et jouer un rôle dans la NER (du moins pour la réparation des CPDs) (Shell, et al., 2009). Pareillement, la phosphorylation de RPA2 (ou RPA34, puisqu'il s'agit de la deuxième plus grosse sous-unité de RPA dont le poids moléculaire est de 34 kDa), bien que ne jouant pas sur l'affinité de XPA, permettrait à RPA de lier plus spécifiquement l'ADN simple brin que l'ADN double brin, augmentant son efficacité en cas de dommages en phase S (Oakley, et al., 2003). Une telle phosphorylation a aussi été vue comme nécessaire à l'arrêt de la réplication après exposition aux rayons UV (Olson, et al., 2006). En addition, FANCD2 est aussi une cible d'ATR, et sa phosphorylation mènerait à une plus grande capacité à réparer les dommages croisés interbrins (Pichierri & Rosselli, 2004).

## **ATM**

En ce qui a trait à l'activation d'ATM, elle a lieu après l'induction de DSBs (après exposition aux IR par exemple) et se résume par son autophosphorylation à la sérine 1981, son recrutement à la chromatine et sa conversion de sa forme dimérique à sa forme monomérique (Bakkenist & Kastan, 2003). Plusieurs protéines sont nécessaires à l'activation maximale d'ATM, incluant hSSB1, qui va aller lier l'ADN endommagé en toute phase (Richard, et al., 2008) et le complexe MRN (composé de Mre11, Rad50 et Nbs1) (Uziel, et al., 2003).

Chk2 est sans doute la kinase par excellence étant activée par ATM. La phosphorylation de Chk2 amène, tout comme Chk1, à la phosphorylation de Cdc25A et de Cdc25c (Donzelli & Draetta, 2003). Chk2 ne serait nécessaire qu'à une induction du point de contrôle G1/S (Takai, et al., 2002).

Chk1 va lui aussi être activé par ATM après exposition aux IR. Aussi, bien que l'abrogation de Chk1 amène une réduction des points de contrôle en phases S et G2/M, la phosphorylation par ATM n'y serait pour rien (Gatei, et al., 2003).

Tout comme Chk1 (bien que son rôle via ATM semble moins bien défini), plusieurs autres protéines sont phosphorylées par ATM et ATR, suggérant que ce ne soient pas deux voies parallèles, mais qu'elles soient inter reliées. De même, ATR serait nécessaire à la réponse d'ATM suite à l'exposition aux IR, sous-entendant une dépendance d'ATM envers ATR (Adams, et al., 2010; Hurley, et al., 2006). H2AX est phosphorylé par ATM et ATR, et a possiblement des rôles différents en fonction des types de dommages. À cet effet, suite à sa phosphorylation par ATM,  $\gamma$ H2AX (forme phosphorylée de H2AX) va, en parallèle avec Nbs1, agir comme signal de recrutement au site de la lésion (DSB) de même qu'augmenter l'activation d'ATM en tant que tel (Reinhardt & Yaffe, 2009). Le site de phosphorylation par excellence de H2AX par ATM et ATR est vraisemblablement le même, soit la serine 139 (Rogakou, et al., 1998). Le rôle de  $\gamma$ H2AX dans la réponse aux rayons UV (et la phosphorylation par ATR en résultant) est encore l'objet de bien des interrogations. Jusqu'ici, il a cependant été démontré qu'une lignée déficiente en H2AX avait une survie et un niveau de phosphorylation de Chk1 diminués après exposition à cet agent (Revet, et al., 2011). Dans le cadre de cette étude, il est important de souligner que l'induction de  $\gamma$ H2AX

après exposition aux rayons UV est majoritairement en phase S et est dépendante d'ATR dans les premières heures suivant l'exposition aux rayons UVC (Hanasoge & Ljungman, 2007; Ward & Chen, 2001), jusqu'à ce que l'affaissement de fourches de réplication crée des DSBs et qu'ATM prenne le relais (de Feraudy, et al., 2010; Yajima, et al., 2009).

Une autre protéine régulée par ATR et ATM et étant d'une importance majeure dans le développement de plusieurs cancers, à commencer celui du sein, est BRCA1 (« breast cancer susceptibility gene products »). En effet, BRCA1 est phosphorylé aux sites Ser1423 et Ser1524 par ATR après exposition aux UV et par ATM après exposition aux IR (Gatei, et al., 2001). De même, ATR se localiserait aux mêmes endroits que BRCA1 dans les noyaux de cellules en phase S (Gatei, et al., 2001). Les porteurs d'une mutation dans le gène codant pour cette protéine ont 20 fois plus de chance de développer un cancer du sein avant l'âge de 70 ans que le reste de la population (Feng, et al., 2004). Bien que tous les mécanismes liés à la phosphorylation de BRCA1 ne soient pas bien connus, cette protéine joue un rôle dans la réplication et la réparation de l'ADN, les points de contrôle du cycle cellulaire, la transcription, le remodelage de la chromatine et l'apoptose (Kerr & Ashworth, 2001; Venkitaraman, 2002).

De même, un gène suppresseur de tumeurs majeur, p53, est phosphorylé par ATM et ATR en Ser15 (Sancar, et al., 2004) ainsi que par Chk1 et Chk2 en Ser20 (Shieh, et al., 2000). Cette phosphorylation, conjointement à celle de Mdm2 à la sérine 395 par ATM (Maya, et al., 2001) et à la sérine 407 par ATR (Shinozaki, et al., 2003), réduirait la dégradation de p53, permettant à cette dernière protéine d'assurer, entre

autres, un arrêt cellulaire en G1/S (via l'induction de la transcription de p21), de même que sa fonction pro-apoptotique (Zhang & Xiong, 2001). Il est aussi important de noter que p53 est nécessaire à la NER en ce qui a trait à la réparation des CPDs, mais ne semble pas jouer de rôle dans la réparation des 6-4PPs (Auclair, et al., 2008; Besaratinia, et al., 2005; Navaraj, et al., 2005; Stubbert, et al., 2007). Il a de même été observé que le recrutement de XPB serait dépendant de p53 (Chang, et al., 2008).

## **La tolérance aux dommages à l'ADN via la synthèse de translésion**

Tel que dit auparavant, les lésions bloquent l'action des ADN polymérase de réplication, engendrant un blocage de la fourche de réplication. Un mécanisme additionnel permet à la cellule de passer à travers et de tolérer les blocages induits de la sorte; il consiste en un groupe d'ADN polymérase capables d'utiliser de l'ADN endommagé en guise de patron. Ce groupe, appelé les polymérase de translésion, est cependant beaucoup plus empreint à engendrer des erreurs dans le patrimoine génétique (Green & Lehmann, 2005). L'action de ces polymérase, appelée synthèse de translésion (TLS), semble à la fois nécessaire et non souhaitable, c'est-à-dire qu'il est connu qu'elle est une source majeure d'instabilité génomique (McCulloch & Kunkel, 2008), mais qu'elle est aussi protectrice contre différentes sortes de cancer après des dommages génomiques, comme le démontrent les patients atteints d'une forme de XP (XP-V) où la polymérase de TLS pol $\eta$  (eta) est déficiente (Cleaver, 1972).

L'activation des TLS polymérase se fait principalement via l'action de PCNA (Haracska, et al., 2005; Haracska, et al., 2001). En effet, le changement de polymérase (passant d'une polymérase de réplication n'étant plus apte à avancer à des polymérase de TLS) s'initierait par la mono-ubiquitination de PCNA en K164 (Andersen, et al., 2008). PCNA ubiquitiné mènerait à une interaction physique directe entre cette protéine et les polymérase de TLS, alors qu'une telle interaction n'est pas détectable lorsque PCNA n'est pas ubiquitiné (Kannouche & Lehmann, 2004).

Chez l'humain, quatre polymérase de la famille-Y (celles-ci étant toutes liées à la TLS) existent : pol $\eta$ , pol $\kappa$  (kappa), hRev1 et pol $\iota$  (iota) (Green & Lehmann, 2005).

La polymérase  $\kappa$ , quant à elle, ne semble pas apte à concrétiser la TLS en présence de photoproduits issus des UV (Green & Lehmann, 2005), mais est capable d'outrepasser les adduits causés par le benzo[a]pyrène (Suzuki, et al., 2002).

En ce qui concerne hRev1, son rôle n'est pas très bien défini. Il a été proposé que cette protéine jouerait un rôle dans une potentielle alternance entre les polymérases de TLS puisqu'elle lie pol $\eta$ , pol $\iota$  et pol $\kappa$  (Ohashi, et al., 2004; Simpson & Sale, 2003). Pareillement, des cellules déficientes en cette polymérase sont sensibles aux UV et déficientes dans la maturation génétique des immunoglobulines (Simpson & Sale, 2003).

Pol $\iota$  est un paralogue (gène issu de plusieurs copies ayant évoluées différemment) de pol $\eta$  (Ohkumo, et al., 2006). Cependant, ses fonctions sont passablement différentes. En effet, cette polymérase ne serait pas capable de faire de la TLS par elle-même, pouvant seulement compléter le travail de TLS polymérases partenaires (Johnson, et al., 2000), et une déficience en cette polymérase n'amène pas de stérilité, de sensibilité aux rayons UV accrue ou de déficience du système immunitaire chez la souris (McDonald, et al., 2003).

Il a été démontré que pol $\eta$  joue un rôle dans la réparation des dommages induisant des adduits volumineux (suite à exposition aux UV par exemple) (Cruet-Hennequart, et al., 2010). Cette polymérase, étant d'une fidélité médiocre lorsqu'elle copie de l'ADN intact, amène très peu d'erreurs lorsqu'elle fait de la TLS aux sites de CPDs et de 6-4PPs (Carty, et al., 2003; Thakur, et al., 2001).



## La GG-NER en fonction du cycle cellulaire

Dans le cadre de ce document, il est capital de souligner que notre laboratoire a développé une technique permettant d'évaluer la GG-NER des CPDs et des 6-4PPs en fonction du cycle cellulaire (Auclair, et al., 2008). En effet, rares sont les études touchant à la NER qui avaient réellement pris en compte le cycle cellulaire avant la mise en place d'une telle méthode. Cette technique mise principalement sur la capacité d'analyser individuellement les cellules d'une vaste population associée à la cytométrie de flux (Auclair, et al., 2008).

Grâce à un tel protocole, il a été découvert que la réparation des 6-4PPs ainsi que celle des CPDs en phase S requiert la protéine ATR. Dans le même article, il a été démontré que la réparation des 6-4PPs est indépendante de p53 et d'ATM, bien que p53 soit requis pour la réparation des CPDs dans des cellules en phase G1 (Auclair, et al., 2008).

Une publication plus récente du même groupe a permis d'identifier polη comme elle aussi responsable de la réparation des 6-4PPs et des CPDs en phase S du cycle cellulaire (Auclair, et al., 2010). Dans cet article, il a été démontré que la réparation des CPDs se faisait plus rapidement à  $5\text{J/m}^2$  qu'à  $15\text{J/m}^2$ , suggérant un effet dépendant de la dose. De même, l'arrêt de la réplication via un agent pharmacologique (aphidicoline) rétablit en partie la réparation des 6-4PPs en phase S dans les cellules XP-V (déficientes en polη) (Auclair, et al., 2010).

Finalement, trois de sept lignées modèles de différents cancers démontraient elles aussi une déficience de la NER en phase S six heures après avoir été exposées à

25J/m<sup>2</sup> d'UVC (Auclair, et al., 2008). De tels résultats suggèrent qu'une telle déficience puisse s'appliquer à plusieurs types de cancers.

## **Introduction 2 : Les mélanomes malins**

Au Canada, il est estimé qu'il y aura 74 100 nouveaux cas de cancer de la peau autres que le mélanome pour l'année 2011 seulement (Société canadienne du cancer, 2011). De plus, d'après l'Organisation des Nations unies, les cas de cancer de la peau risquent de doubler entre 2000 et 2015 dans la population à peau blanche (Cardinal, 2007). Le cancer de la peau est le type de cancer le plus souvent diagnostiqué chez les Canadiens, mais il ne se traduit que très rarement par des décès. Or, lorsqu'il y a formation de tumeurs malignes dérivées de mélanocytes, ce qui se traduit habituellement par l'apparition d'une tâche noirâtre, le cancer de la peau engendré est nommé mélanome et, puisqu'il est beaucoup plus mortel (alors qu'ils représentent moins de 10% des cancers de la peau, ils sont responsables de plus de 75% des décès de ce type de cancer), fait l'objet d'un recensement de manière indépendante (Société canadienne du cancer, 2011). En 2011, 5 500 nouveaux cas de mélanomes ont été estimés, en faisant le huitième cancer le plus fréquent au Canada (Société canadienne du cancer, 2011). Dans le même pays, les mélanomes représentent le type de cancer dont la fréquence s'accroît le plus rapidement (1,6% annuellement) (Association canadienne de dermatologie, 2009; Mouawad, et al., 2010).

Le principal facteur de risque de développer des mélanomes malins (MM) dans la population à peau blanche est sans aucun doute l'exposition aux rayons UV (Kricger, et al., 2007). Tel que décrit précédemment, les rayons UVC sont complètement absorbés par la couche d'ozone, alors que les UVA et, dans une certaine mesure, les UVB peuvent traverser cette dernière. Or, bien que les UVA représenteraient 95% des rayons

solaires reçus contre 5% pour les UVB, les rayons UVB sont les plus dommageables à l'ADN (El Ghissassi, et al., 2009). Il est cependant encore l'objet de controverses à savoir lesquels des UVA ou des UVB jouent le plus grand rôle dans la mélanogénèse (De Fabo, et al., 2004; Wang, et al., 2001). Un consensus semble néanmoins émaner : les UVA et UVB sont tous deux des causes de cette néoplasie (Garland, et al., 2003; Moan, et al., 1999). Les mélanomes sont surtout causés par l'exposition aux rayons solaires en bas âge; il semble alors y avoir une chance majorée que les mélanocytes aient le temps de d'accumuler un nombre adéquat de mutations oncogéniques (Rass & Reichrath, 2008). La sensibilisation des jeunes à cette réalité est cruciale, d'autant plus que 25% de l'exposition aux rayons solaires d'un humain aurait lieu avant l'âge de 18 ans (Balk, et al., 2011). Concernant les salons de bronzage, il a été démontré que les personnes en ayant fait l'utilisation avant l'âge de 30 ans avaient 75% davantage de chances de développer ce type de cancer que le reste de la population (The International Agency for Research on Cancer Working Group on artificial ultraviolet & skin, 2007).

Tout comme pour les autres cancers, un diagnostic précoce est d'importance capitale. En fait, les diagnostics sont aujourd'hui posés de plus en plus tôt et l'excision par chirurgie permet d'enrayer à de très hauts pourcentages les mélanomes non invasifs, ce qui fait que les chances de survivre à un mélanome ont généralement augmenté (Kasper, et al., 2007; Mouawad, et al., 2010). Cependant, lorsque la chirurgie n'est plus une solution, le mélanome avancé est associé à une longévité médiocre (2 à 8 mois après le diagnostic) et avec un faible 5% de patients survivant plus de cinq ans après leur diagnostic (Jemal, et al., 2008). En effet, les meilleurs agents chimiothérapeutiques pour traiter les mélanomes semblent être la dacarbazine et le fotemustine avec respectivement

15-25% et 20-25% de réponse initiale, ce qui reste très bas et se traduit malgré tout souvent par une rechute (Hill, et al., 1979; Jacquillat, et al., 1990).

En ce qui a trait aux types de mélanomes, ils ont souvent été divisés en quatre catégories principales (bien qu'il y en ait d'autres). Ainsi, les mélanomes superficiels extensifs se définiraient par une tumeur ayant une longue phase d'extension horizontale intraépidermique (1 à 5 ans) et seraient les plus communs (environ 70% des cas) (Odom, et al., 2000). Les mélanomes de Dubreuilh (ou « lentigo-maligna melanoma ») sont aussi des mélanomes intraépidermiques, mais avec une très longue phase d'extension superficielle (souvent entre 10 et 15 ans), étant présents sur des régions visiblement endommagées par les rayons UV (manque d'élasticité de la peau plus marquée) et dont la couleur et les contours ne sont pas homogènes (Porras & Cockerell, 1997). Aussi, les mélanomes nodulaires, représentant 10 à 15% des mélanomes dans la population caucasienne, sont des nodules dermaux ne présentant pas de croissance horizontale visible, il est ainsi très difficile à diagnostiquer (McGovern, et al., 1973; Porras & Cockerell, 1997). La quatrième classe se nomme mélanomes lentigineux des extrémités et est caractérisée par son apparition, comme son nom l'indique, au niveau des extrémités (paume des mains, plante des pieds, pourtour ou lit de l'ongle) (Forman, et al., 2008; Hsieh, et al., 2009). Ce dernier type de mélanome est le plus fréquent dans la population à peau foncée alors qu'il représente moins de 5% des cas de mélanomes dans la population caucasienne (Coleman, et al., 1980). Finalement, plusieurs scientifiques croient que le fait de classer les mélanomes selon des groupes est inapproprié puisqu'il n'y a rien de véritablement tangible les reliant au plan moléculaire; selon eux, chaque

mélanome devrait être, s'il ne peut plus être excisé par chirurgie, traité de manière spécifique (Ackerman, 1980; Forman, et al., 2008; Hurt, 2008).

## Les gènes de susceptibilité dans les mélanomes

Le gène *CDKN2A* (inhibiteur de kinase cycline-dépendante 2A) est un gène d'une grande importance dans la prédisposition et dans la pathogenèse des mélanomes (Bisio, et al., 2010; Palmieri, et al., 2009). Ce gène encode deux protéines, p16<sup>CDKN2A</sup> et p14<sup>CDKN2A</sup> (via l'utilisation d'exons différents) (Quelle, et al., 1995). La protéine p16<sup>CDKN2A</sup> inhibe l'activité du complexe CDK4 dont la fonction est de stimuler la progression du cycle cellulaire via la phosphorylation de la protéine RB (rétinoblastome) (Nelson & Tsao, 2009). La phosphorylation de RB permet entre autres l'action du facteur de transcription E2F stimulant la synthèse de protéines nécessaires à la division (Harbour & Dean, 2000). La protéine p14<sup>CDKN2A</sup>, quant à elle, stabilise p53 en interagissant avec MDM2 qui promeut la dégradation de p53 par ubiquitination (Stott, et al., 1998).

*CDKN2A* a été désigné comme un gène de susceptibilité à haute pénétrance en ce qui a trait aux mélanomes (Goldstein, et al., 2005) et le degré de pénétrance est influencé par l'exposition aux rayons UV (Chaudru, et al., 2004). En effet, des mutations de *CDKN2A* sont retrouvées chez 20 à 50% des familles empreintes à avoir des mélanomes, familles auxquelles il est bien évidemment conseillé de ne pas trop prendre de bains de soleil (Bisio, et al., 2010). Malheureusement pour la recherche de traitements, les mutations dans ce gène ne sont présentes que dans 0,2 à 2% des cas de mélanomes de forme sporadique, ce qui n'en fait pas une cible prioritaire (Begg, et al., 2005; Orlow, et al., 2007).

Le second gène de susceptibilité aux mélanomes est celui codant pour CDK4 qui, tel que dit précédemment, interagit avec p16<sup>CDKN2A</sup>. Cependant, bien qu'une mutation dans celui-ci ait, comme pour *CDKN2A*, une haute pénétrance, moins de 18 familles porteuses d'une telle mutation ont été identifiées (Meyle & Guldberg, 2009).



## Les mutations acquises dans les mélanomes

La progression pour passer d'un mélanocyte normal et fonctionnel à un mélanome métastatique est le résultat d'une combinaison de sur/sous régulations de diverses protéines impliquées dans une multitude de voies moléculaires. Aussi, cette transformation graduelle est probablement l'effet d'une accumulation séquentielle d'altérations génétiques et moléculaires (Wolchok & Saenger, 2007). Or, lesdites altérations sont encore très peu connues, touchant à plusieurs gènes et voies métaboliques (Palmieri, et al., 2009). Voici un aperçu des modifications dans les deux voies connues comme capitales dans les MM à ce jour : les MAPK (« mitogen-activated protein kinases ») et PI3K (« phospho-inositide-3-kinase »).

### MAPK

Chez les mammifères, trois gènes *RAF* hautement conservés sont connus : *ARAF*, *BRAF* et *CRAF*. Toutes les protéines codées par ces gènes sont aptes à activer la voie des MAPK (Kumagai, Namba, et al., 2006; Pritchard, et al., 1995). Or, des mutations dans *ARAF* et *CRAF* sont rares dans les cancers, alors que celles touchant à *BRAF* sont communes (Emuss, et al., 2005; Lee, et al., 2005). Cela s'expliquerait en partie à ce que l'activation oncogénique de *ARAF* et *CRAF* nécessite la coexistence de deux mutations alors que l'activation oncogénique de *BRAF* n'en nécessite qu'une (Beeram, et al., 2005). En effet, l'activité de BRAF est complètement inductible par Ras (abréviation de « Rat sarcoma »), alors que l'activation d'ARAF et CRAF est faite par Ras et par Src (abréviation de « sarcoma ») et est nécessaire sur deux sites différents (Beeram, et al., 2005; Marais, et al., 1997). Aussi, la mutation dans *BRAF* est, dans environ 90% des cas, une substitution de la valine en position 600 avec un acide

glutamique (V600E) (Davies, et al., 2002). Pour ce qui a trait plus spécifiquement aux mélanomes, *BRAF* y est d'une importance majeure, étant muté dans environ 50% des cas (Palmieri, et al., 2007).

En activant la voie des MAPK, la sur-activation de BRAF mène à une croissance aberrante des mélanomes en surexprimant la cycline D1 (importante au passage de la phase G1 à la phase S) et en supprimant p27<sup>KIP1</sup>, une protéine inhibant normalement les CDKs (Fedorenko, et al., 2011). En parallèle, BRAF aurait un rôle anti-apoptotique en induisant la dégradation par le protéasome de la protéine BIM par la phosphorylation de cette dernière (Cartlidge, et al., 2008). La capacité des mélanomes à être invasifs a aussi été attribuée à une augmentation de l'expression du récepteur de l'intégrine  $\beta 3$  (importante dans l'adhésion au collagène dermique), le tout étant causé par une sur-activation de la voie des MAPKs (Smalley, 2003).

Le gène codant pour le récepteur de l'hormone mélanotrope (MSHR), *MC1R*, agit plus en aval dans la voie de BRAF en régulant les niveaux intracellulaires de cAMP (adénosine monophosphate cyclique) (Beaumont, et al., 2007). Ce gène est extrêmement polymorphique dans les populations caucasiennes, étant l'un des piliers génétiques déterminant la pigmentation de la peau (Scherer & Kumar, 2010). Des variations de ce gène ont été associées à des risques accrus de contracter des mélanomes et le rôle de BRAF dans les mélanomes pourrait, en partie, s'expliquer par un effet sur MSHR (Raimondi, et al., 2008).

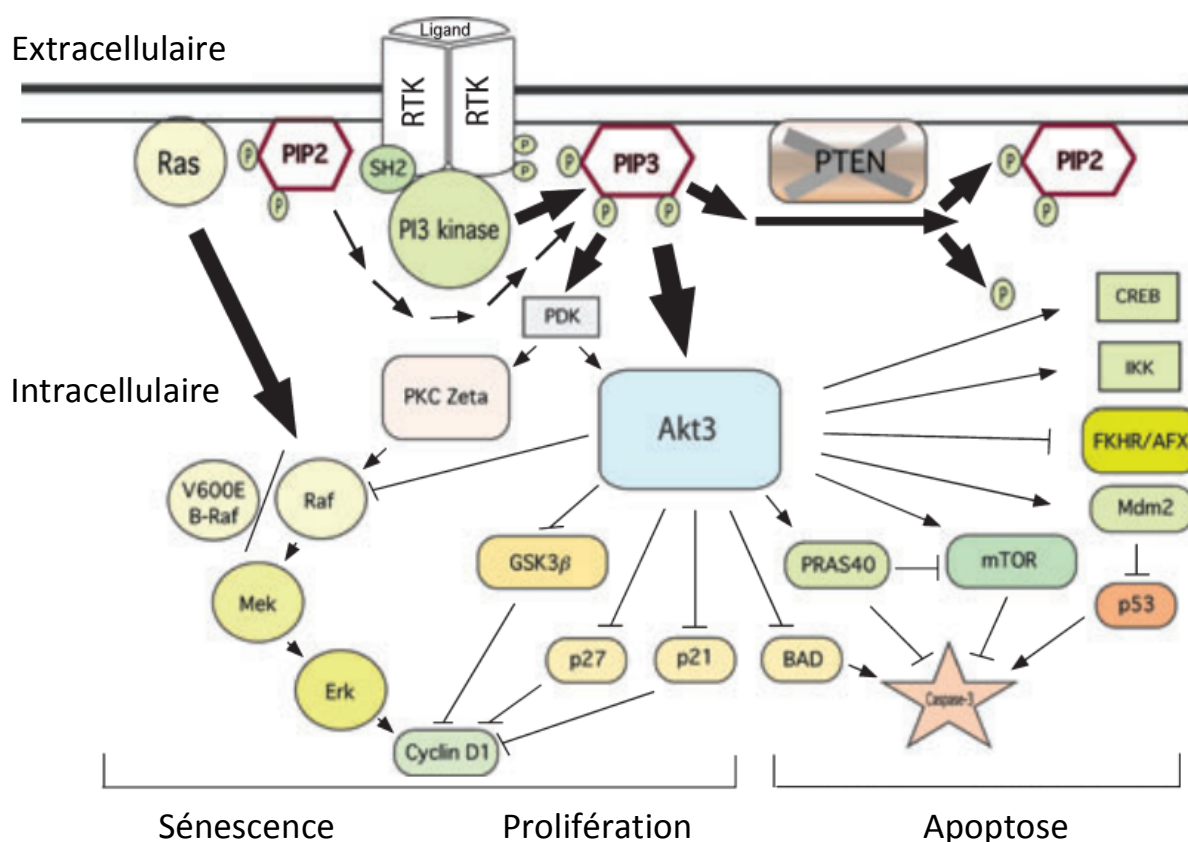
*NRAS*, un gène muté dans approximativement 15% des mélanomes cutanés, active lui aussi (en amont de BRAF) la voie des MAPK (Curtin, et al., 2005). Puisque

*NRAS* et *BRAF* ont une fonction oncogénique redondante, les mélanomes ont très rarement des mutations concomitantes dans ces deux gènes (Sensi, et al., 2006).

Une prévalence élevée de la forme oncogénique de *BRAF* a été rapportée dans les formes avancées de mélanomes (généralement lorsqu'il y a croissance verticale) et pas ou très peu lorsqu'il y a uniquement croissance horizontale; cela tend à démontrer que *BRAF* n'est pas un acteur majeur dans le développement initial de la tumeur (Dong, et al., 2003; Greene, et al., 2009). De plus, les mutations de *BRAF* sont rares dans les mélanomes reliés à une exposition prolongée aux rayons UV alors qu'elles sont fréquentes dans ceux de régions non exposées de manière chronique (Rivers, 2004). Ces résultats semblent indiquer que la protéine *BRAF* est importante pour la progression tardive de la maladie, mais qu'elle n'est pas nécessaire à l'accumulation de mutations dues à une exposition aux rayons UV (Palmieri, et al., 2009).

Finalement, puisque les mutations de *BRAF* touchent un pourcentage majeur de mélanomes, il est certain qu'il s'agit d'une cible thérapeutique intéressante (Shepherd, et al., 2010). Ainsi, de nombreux essais cliniques consistant à utiliser des inhibiteurs de *BRAF* sur des patients ayant une mutation en V600E ont lieu en ce moment (Hong & Hong, 2011). Or, il y a plusieurs problèmes liés à l'utilisation de ces inhibiteurs. Ainsi, tous les inhibiteurs de *BRAF* évalués jusqu'ici induisaient une croissance de lésions spinocellulaires devant être enlevées par chirurgie tout au long du traitement; il semblerait donc que l'inhibiteur ait un effet diamétralement opposé à ce qui est anticipé au niveau des cellules non transformées (Bollag, et al., 2010; Flaherty, et al., 2010). Aussi, si la réponse initiale à l'inhibiteur est souvent excellente, touchant un bon pourcentage de patients (par exemple, 77% pour le GSK2118436) et engendrant une

certaine régression des tumeurs, il faut généralement de 8 à 12 mois pour que la tumeur développe une résistance et qu'elle prolifère à nouveau (Fedorenko, et al., 2011; Hersey, et al., 2011; Hong & Hong, 2011).



**Figure 3. Les voies de signalisation PI3K et MAPK dans les mélanomes**

Adapté de Madhupantula, S. V., & Robertson, G. P. (2009). The PTEN-AKT3 signaling cascade as a therapeutic target in melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 22(4), 400-419. doi:10.1111/j.1755-148X.2009.00585.x

## PI3K

Une des protéines clés de la voie PI3K dans les mélanomes (voir figure 3) est la protéine PTEN (« phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 »). Il s'agit d'un suppresseur de tumeurs majeur dont les rôles sont, entre autres, de réguler la division, la migration et l'expansion cellulaires ainsi que l'apoptose (Li, et al., 1997; Yamada & Araki, 2001). PTEN a au moins deux fonctions biochimiques : une action de

protéine-phosphatase et une autre de lipide-phosphatase. Son activité protéine-phosphatase se résume principalement à la déphosphorylation de FAK ou kinase d'adhésion focale (régulant l'adhésion, l'expansion et la migration cellulaires) (Tamura, et al., 1999) ainsi qu'à inhiber partiellement la voie MAPK (Li & Ross, 2007). Or, c'est généralement l'activité de lipide-phosphatase qui est considérée comme la fonction majeure de cette protéine (Waite & Eng, 2002). Ce rôle consiste à enlever un groupement phosphate à PIP3 (phosphatidyl-inositol 3,4,5-triphosphate), empêchant ainsi PIP3 de phosphoryler des protéines effectrices (Madhunapantula & Robertson, 2009). Parmi ces protéines effectrices, la plus étudiée est sans aucun doute Akt. Ainsi, l'inactivation de PTEN amène à un degré de phosphorylation majeur d'Akt, ce qui est souvent caractéristique des cancers (Dahia, et al., 1999).

Bien que les mutations de PTEN soient assez rares (entre 10 et 20%) dans les mélanomes primaires (Tsao, et al., 1998; Yin & Shen, 2008), l'activité de PTEN est très souvent compromise dans les mélanomes. En effet, la perte du chromosome 10, qui contient le gène *PTEN*, a été rapporté dans plusieurs cancers, dont dans 30-60% des mélanomes non reliés à l'hérédité (Stahl, et al., 2003). De plus, un mécanisme efficace pour contrer l'expression d'un gène, soit la méthylation des promoteurs de PTEN, s'élève à 60% des mélanomes cutanés dans une expérience ayant eu recours à un échantillonnage de 200 patients (Lahtz, et al., 2009). Aussi, si les études mutationnelles et épigénétiques sont considérées globalement, l'inactivation fonctionnelle de PTEN est probablement impliquée dans 77% des mélanomes non-familiaux (Böni, et al., 1998; Saida, 2001; Zhou, et al., 2000).

Mais PTEN n'est pas le seul acteur dans la voie des PI3K à être dérégulé dans les mélanomes. À cet effet, des mutations dans le gène codant pour PIK3 amenant une activation constitutive d'Akt sont assez rares, mais non négligeables (5% des cas de mélanomes) (Omholt, et al., 2006).

De même, Akt semble contribuer à cette voie d'une manière particulière. La famille des protéines Akt est constituée de trois kinases, Akt1, Akt2 et Akt3. Ces isoformes partagent plus de 80% d'homologie au niveau de leurs acides aminés (Testa & Bellacosa, 2001). Aussi, Akt1 et Akt2 sont généralement exprimés de manière ubiquitaire dans tous les tissus normaux, comparativement à Akt3 dont l'expression est plus spécifique (Bellacosa, et al., 2004; Brazil, et al., 2002). Or, l'expression d'un isoforme d'Akt ne semble pas nécessairement liée à l'activité de ce dernier, cela dépendant davantage des divers signaux intracellulaires (Stahl, et al., 2004; Testa & Bellacosa, 2001). Ainsi, la forme Akt3 est sans aucun doute la forme la plus activée dans les mélanomes et une augmentation de cette activation semble aller de pair avec le développement de la tumeur (Stahl, et al., 2004). Corollairement, l'activité d'Akt3 se multiplie par 60-70% dans des mélanomes (en comparaison des mélanocytes) (Dhawan, et al., 2002; Stahl, et al., 2004). La raison expliquant pourquoi Akt3 et non les autres isoformes sont davantage activés dans les mélanomes n'est cependant pas encore connue à ce jour (Madhunapantula & Robertson, 2009). Il a aussi été découvert qu'entre 40 et 60% des mélanomes avaient une copie additionnelle du locus Akt3 (Palmieri, et al., 2009) alors qu'aucun gain de copie d'Akt1 et Akt2 n'a encore été répertorié (Bastian, et al., 1998). Finalement, il existe aussi une mutation d'Akt3 assez rare (4%

des mélanomes) qui active cette protéine de manière constitutionnelle, étant recrutée à la membrane indépendamment de PI3K (Davies, et al., 2008).

Même s'il y a une préférence pour l'activation d'Akt3 dans les mélanomes, les substrats des différents isoformes d'Akt semblent être les mêmes (Madhunapantula & Robertson, 2009). L'activation d'Akt peut se faire via deux sites de phosphorylation, soit la thréonine 305 ainsi que la sérine 472. Or, pour qu'Akt soit activé de manière maximale (pouvant concrétiser toutes ses fonctions connues), il doit être phosphorylé à la sérine 472 (Alessi, et al., 1996). Les cibles d'Akt sont nombreuses et il ne sera ici allusion qu'à quelques-unes de celles-ci. D'abord, un des rôles majeur d'Akt phosphorylé est d'aller contrer l'apoptose. Ainsi, BAD (protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2) (Datta, et al., 1999), la caspase-9 (Cardone, et al., 1998) et MDM2 (Gottlieb, et al., 2002; Mayo & Donner, 2001) seront inactivées par Akt. I $\kappa$ B, lorsque phosphorylé par Akt, est dégradé, permettant ainsi à NF- $\kappa$ B d'aller activer des gènes pro-survie (Dhawan, et al., 2002). En addition, Akt augmente l'activité des télomérases en allant phosphoryler hTERT (transcriptase inverse de la télomérase humaine) (Kang, et al., 1999). De plus, Rac1, une GTPase de la famille Rho contrôlant entre autres la croissance cellulaire et la réorganisation du cytosquelette, est aussi une cible d'Akt (Kwon, et al., 2000; Ridley, 2006). En outre, Akt phosphoryle GSK3 $\alpha$  et GSK3 $\beta$ , ce qui inhibe leur activité et promeut la prolifération cellulaire en stabilisant la cycline D1.

Bien que présente dans les mélanomes malins, une activation d'Akt a aussi souvent été détectée dans des nævus bénins (grains de beauté) de même que dans des mélanomes primaires (Slipicevic, et al., 2005). Pareillement, PTEN est généralement perdu tôt dans le développement des mélanomes, supportant l'hypothèse qu'il joue un

rôle de l'initiation jusqu'à la forme de métastase (Madhunapantula & Robertson, 2009). Ces deux derniers faits portent à croire qu'inhiber la voie PI3K pourrait avoir un potentiel curatif. En parallèle à cela, une expression ectopique de la protéine PTEN a inhibé l'invasion et induit l'apoptose dans des mélanomes (Stahl, et al., 2003; Stewart, et al., 2002). Ainsi, des inhibiteurs de la voie PI3K (dont des inhibiteurs de la phosphorylation d'Akt) commencent aujourd'hui à voir le jour. Les objectifs de tels inhibiteurs est d'induire l'apoptose et la régression de la cellule et/ou de rendre la cellule plus sensible à divers agents chimiothérapeutiques (Hollander, et al., 2011). Aussi, bien que les tests ne soient pas aussi avancés que ceux des inhibiteurs de BRAF, les résultats semblent prometteurs. Un inhibiteur allostérique d'Akt, MK2206 (ou MK-2206), apparaît particulièrement efficace (bien qu'il ne soit qu'en phase II clinique) (Hirai, et al., 2010; Hollander, et al., 2011).

Finalement, certains mélanomes traités avec un inhibiteur de BRAF sont résistants s'ils ont initialement ou développent au cours du traitement une déficience en PTEN (Paraiso, et al., 2011; Xing, et al., 2011). D'ailleurs, PTEN et Akt sont de plus en plus considérés comme des cibles thérapeutiques communes incontournables, bien qu'il faille bien doser les risques d'influencer des voies influençant un aussi grand nombre de réactions physiologiques (Jiang & Liu, 2009; Madhunapantula & Robertson, 2009; Paraiso, et al., 2011).



## Les mélanomes et la NER

Il est tentant de penser que les mélanomes, dont l'incidence est principalement reliée à l'exposition aux rayons UV, pourraient développer une déficience en NER (étant la voie de réparation principale des lésions causées par les rayons UV) au cours de leur transformation (Fernandez, et al., 2011). Ce lien irait de pair avec le fait que les patients atteints de la maladie XP sont fortement empreints au développement de ce type de néoplasie (Udayakumar & Tsao, 2009). Cependant, la majorité des articles scientifiques jusqu'ici publiés n'ont pas trouvé de déficience en NER dans les mélanomes (Fernandez, et al., 2011; Gaddameedhi, et al., 2010; Xu, et al., 2000). Or, les auteurs d'un article ayant jugé qu'il n'y avait pas de différence entre l'efficacité de la NER des mélanomes et des mélanocytes ont tout de même souligné qu'il s'agissait là d'un paradoxe (Fernandez, et al., 2011). En guise de contradiction à ces résultats, un laboratoire, se basant sur un échantillonnage de 312 patients atteints de MM et de 324 individus dépourvus de cancer, a découvert que la capacité de réparation de l'ADN était un peu, mais significativement, moindre dans les mélanomes que dans les mélanocytes après leur exposition aux rayons UV (Wei, et al., 2003). Il est aussi important de souligner qu'aucun des groupes ici cité n'a analysé la capacité de la NER des mélanomes en fonction du cycle cellulaire.

Il est aussi possible de se pencher sur de potentielles mutations dans les MM à savoir si elles ont un effet sur la NER ou non. Ainsi, la voie des MAPK ne semble pas impliquée dans la réparation des 6-4PPs et des CPDs selon des recherches ayant eu lieu précédemment dans notre laboratoire (Rouget, et al., 2008) et ce, dans toutes les phases du cycle cellulaire (résultats non publiés). Aussi, des mélanomes comportant des

mutations connues des gènes *BRAF* et *RAS* ont été jugés comme n'ayant pas de déficience en NER (bien que le cycle cellulaire n'était pas ici pris en considération) (Gaddameedhi, et al., 2010). De même, *BRAF* étant peu enclin à jouer un rôle dans le développement initial des mélanomes (Greene, et al., 2009) et n'apparaissant que rarement dans des régions exposées de manière chronique au soleil (Rivers, 2004), il s'expliquerait difficilement qu'il influe sur la NER.

Quant à *PTEN* et *Akt*, la chose est assez floue en ce qui touche à la NER. En effet, l'activation d'*Akt* mènerait à la phosphorylation et à la monoubiquitination de *Chk1* et ainsi à sa séquestration dans le cytoplasme (Puc, et al., 2005), à de l'instabilité génomique, à des bris double brin et, ultimement, au cancer (Puc & Parsons, 2005; Yin & Shen, 2008). Or, il n'est pas encore connu si *Chk1* joue un rôle dans la NER et, sachant qu'il s'agit d'un substrat d'*ATR* qui lui, régule la NER, ce n'est pas complètement impossible (Auclair, et al., 2008). En parallèle, *Akt* a été démontré comme phosphorylant *TopBP1* *in vitro* et *in vivo* au site Ser1159, empêchant probablement *TopBP1* d'aller activer *ATR* (le domaine d'activation d'*ATR* se situant entre les résidus 978 et 1286 de *TopBP1*), ce qui pourrait potentiellement nuire à la NER (Liu, et al., 2006; Pedram, et al., 2009).

## Hypothèses et objectifs

Nous suggérons qu'une proportion significative de lignées de mélanomes malins présente une déficience de la GG-NER en phase S et que cela soit une caractéristique les différenciant des lignées de mélanocytes primaires. Cette déficience serait imputable à une diminution de l'activité de la kinase ATR. De plus, nous proposons qu'un ou plusieurs gène(s) souvent muté(s) et/ou dont l'expression est fréquemment perturbée dans les MM puisse jouer un rôle dans la GG-NER en phase S par son rôle de régulateur sur ATR.

Afin de vérifier de telles hypothèses, nos objectifs sont les subséquents:

- Mesurer l'efficacité de la GG-NER en fonction du cycle cellulaire dans différentes lignées de mélanomes malins et de mélanocytes primaires en utilisant la technique par cytométrie de flux développée dans notre laboratoire.
- Développer une technique adéquate et utiliser cette dernière dans le but de mesurer l'induction de la phosphorylation de H2AX dans les différentes lignées de mélanomes après exposition aux UV.
- Vérifier si le niveau d'induction de la phosphorylation de H2AX corrèle avec l'efficacité de la GG-NER en phase S.
- Vérifier, à l'aide des résultats antérieurs, si le statut d'une ou plusieurs protéines dont l'action est fréquemment perturbée dans les mélanomes peut corrélérer avec la capacité de la GG-NER en phase S.

- Si une ou plusieurs protéines potentielles sont identifiées, effectuer des expériences à savoir si la restauration d'un statut normal dans une lignée mutante ou l'inverse dans une lignée dont l'activité de ladite protéine est normale peut influencer la capacité de la GG-NER et l'induction de la phosphorylation de  $\gamma$ H2AX (à l'aide des techniques de cytométrie de flux citées plus haut).

# Matériel et méthodes

## Culture cellulaire :

Les cellules de mélanomes de la collection Wistar et de mélanocytes primaires ont été obtenues de l'Institut Coriell. Les lignées de mélanomes ont été cultivées dans du milieu EMEM (Wisent) enrichi de 15% FBS (sérum de veau fœtal), de L-glutamine, de vitamines, d'acides aminés essentiels et non essentiels et d'antibiotiques (Invitrogen). Les lignées de mélanocytes primaires ont été cultivées dans du milieu 254 (Invitrogen) auquel était ajouté le supplément pour croissance de mélanocytes humains ou HMGS (Invitrogen) et des antibiotiques. Les cellules F02-98 et 1BR ont été gracieusement données par le Dr. P. Jeggo (University of Sussex) et cultivées dans le même milieu que les mélanomes. Les cellules PT67 ont été obtenues de Clontech et cultivées dans du DMEM (Invitrogen) supplémenté avec 10% de FBS et des antibiotiques (Invitrogen).

Finalement, la lignée de cancer du sein MDA-MB-468 et les cellules HeLa ont été aimablement fournies par le Dr. El Bachir Affar (Université de Montréal). La lignée de cellules MDA-MB-468 a été cultivée dans un milieu  $\frac{1}{2}$  Ham's F12 et  $\frac{1}{2}$  EMEM (Invitrogen), le tout supplémenté avec 15% de FBS et des antibiotiques (Invitrogen) alors que les cellules HeLa ont été cultivées dans du DMEM (Invitrogen) auquel 10% de FBS et des antibiotiques (Invitrogen) ont été ajoutés. Toutes les lignées ont été incubées à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **Conditions d'irradiation**

Les cellules ont été trypsinisées, puis transférées sur des pétris de 60mm le jour avant l'irradiation en vue d'obtenir environ 750 000 cellules (pour la mesure de la GG-NER) ou 1 000 000 cellules (pour la mesure de l'induction de  $\gamma$ H2AX) par pétri le lendemain. Les cellules ont ensuite été rincées une fois avec du PBS (tampon phosphate salin), puis ont été exposées à une dose de 15 J/m<sup>2</sup> et à une fluence de 0,1 J/m<sup>2</sup>/s (soit pour 2 minutes 30 secondes) à l'aide d'une lame germicide (254 nm) Philips G25T8.

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

Suite à l'irradiation des cellules, le PBS les recouvrant a été enlevé et remplacé par du milieu et le pétri a été incubé à 37°C pour le temps correspondant. Après l'incubation, les cellules ont été rincées avec du PBS puis trypsinisées. Les cellules ainsi détachées ont été recueillies dans 1 mL de PBS. Suite à cela, 3 mL d'éthanol anhydre froid ont été ajoutés aux cellules en suspension et le tout a été placé à -20°C pour un minimum de 12 heures. Pour contrôles, certaines cellules n'ont pas été irradiées afin de connaître le bruit de fond des anticorps alors que d'autres ont été trypsinisées tout de suite après irradiation pour quantifier la fluorescence maximale lorsqu'aucun dommage n'est réparé.

Après l'incubation à -20°C, les cellules ont été resuspendues dans une solution aqueuse comportant 0,2N d'acide chlorhydrique et 0,5% de Triton-X-100 pour une période de 5 minutes en vue de perméabiliser les membranes. Après avoir rincé une fois avec du PBS, les cellules ont été resuspendues dans 0,5 mL d'une solution de PBS avec 100  $\mu$ g/mL d'ARNase A pendant 45 minutes à 37°C. Ensuite, les cellules ont été

rincées avec du PBS-TB (PBS comportant 1% d'albumine de sérum de bovin et 0,25% de Tween-20) et resuspendues dans 0,35 mL d'une solution de PBS-TB contenant des anticorps anti-6-4PP murins (Kamiya Biomedical) dilués 1/1000 pour 1 heure 30 minutes à température ambiante. Subséquemment, les cellules ont été rincées avec du PBS-TB et resuspendues dans 0,35 mL d'une solution de PBS-TB contenant des anticorps anti-souris liés au FITC (Sigma) dilués 1/200 pour 1 heure sans être exposées à la lumière et à température pièce. Après un dernier rinçage au PBS, les cellules ont été resuspendues dans 0,35 mL d'une solution de PBS à laquelle ont été ajoutés 5 g/mL d'iodure de propidium (PI; Molecular Probe) avant d'être incubées à température pièce pendant 30 minutes. Toutes les centrifugations entre les resuspensions avaient lieu à approximativement 500g. Les cellules ont ensuite été analysées par cytométrie de flux dans un appareil FACScan ou FACSCalibur (BD).

Le traitement des résultats obtenus s'est ensuite fait à l'aide du logiciel FlowJo, permettant de différencier les cellules selon le cycle cellulaire (PI) et l'intensité du signal reflétant la quantité de 6-4PPs. Le pourcentage de réparation des 6-4PPs en fonction du cycle cellulaire a été obtenu en soustrayant l'intensité du bruit de fond (cellules non irradiées) des intensités de fluorescence obtenues pour chaque condition et en mettant le tout en rapport avec l'intensité de fluorescence des cellules irradiées et trypsinisées sur-le-champ (0h d'incubation). Ainsi, pour résumer le tout sous forme de formule : % de réparation =  $\% [(I.F._{0h} - I.F._{\text{Bruit de fond}}) - (I.F._{UV} - I.F._{\text{Bruit de fond}})] / (I.F._{0h} - I.F._{\text{Bruit de fond}})$ . où « I.F. » correspond à l'intensité de fluorescence, « 0h », au contrôle trypsinisé immédiatement après exposition aux UV et « UV », à l'échantillon irradié et recueilli au temps voulu. Pour obtenir le pourcentage de 6-4PPs résiduels, le

pourcentage de réparation était soustrait à 100%. Toutes les mesures d'intensité représentaient une moyenne géométrique de triplicatas constituant des expériences indépendantes.

### **Détection de l'induction de $\gamma$ H2AX**

Suite à l'irradiation des cellules, le PBS les recouvrant a été enlevé et remplacé par du milieu et le pétri a été incubé pendant 1 heure à 37°C. Après l'incubation, les cellules ont été rincées avec du PBS puis ont été trypsinisées. Les cellules ainsi détachées ont été recueillies dans 3 mL de solution de PBS auxquels était ajouté 0.5 mg/mL d'inhibiteur de trypsine à base de soya (Invitrogen). Après un lavage au PBS, les cellules étaient resuspendues dans 3 mL d'une solution aqueuse froide à base de PBS comportant 1% de formaldéhyde et incubées pendant 15 minutes sur glace. Suite à un lavage au PBS, les cellules étaient resuspendues dans 3 mL d'une solution froide d'éthanol 75% et le tout a été placé à -20°C pour un minimum de 2 heures et un maximum de deux semaines. Pour contrôles, certaines cellules n'ont pas été irradiées afin de mesurer le niveau basal de phosphorylation de H2AX.

Après l'incubation à -20°C, les cellules ont été lavées avec une solution PBS-Triton-BSA (0,25% Triton-X-100 et 1% BSA dans du PBS) et resuspendues dans 0,2 mL d'une solution de PBS-Triton-BSA comportant des anticorps anti- $\gamma$ H2AX phospho S139 murins (Millipore) dilués 1/200; les cellules ont alors été incubées à 4°C pour environ douze heures. Suivant cela, les cellules ont été rincées avec du PBS-Triton-BSA et resuspendues dans une solution de PBS-Triton-BSA contenant des anticorps anti-souris liés au FITC (Sigma) dilués 1/100 pour 1 heure sans exposition à la lumière et à



température pièce. Après un ultime rinçage au PBS, les cellules ont été resuspendues dans 0,35 mL d'une solution de PBS à laquelle ont été ajoutés 5 g/mL de PI (Molecular Probe) ainsi que 100 µg/mL d'ARNase A avant d'être incubées à température pièce pendant 30 minutes. Toutes les centrifugations entre les resuspensions avaient lieu à environ 500g. Les cellules ont ensuite été analysées par cytométrie de flux dans un appareil FACScan ou FACSCalibur (BD).

Le traitement des résultats obtenus s'est ensuite fait à l'aide du logiciel FlowJo, permettant de différencier les cellules selon le cycle cellulaire (PI) et l'intensité du signal reflétant la phosphorylation de H2AX. L'induction de la phosphorylation de H2AX en phase S a été obtenue en divisant l'intensité de fluorescence des cellules irradiées par l'intensité de fluorescence des cellules non irradiées. Pour illustrer le tout sous forme de formule : Induction relative de fluorescence =  $I.F_{\text{irradié}} / I.F_{\text{non irradié}}$  où « I.F. » correspond à l'intensité de fluorescence, « irradié », à l'échantillon exposé aux UV et « non irradié », à l'échantillon non irradié. Toutes les mesures d'intensité représentaient une moyenne géométrique de triplicatas constituant des expériences indépendantes.

#### **Extraction et détection de protéines (immunobuvardages) :**

Avant d'extraire les protéines pour mesurer les niveaux constitutifs de phosphorylation d'Akt, les cellules étaient préalablement cultivées dans un milieu sans sérum pour 24 heures. Les extractions protéiques ont été faites en trypsinisant (et en rinçant avec du milieu, suivi de PBS) ou en grattant les cellules d'intérêt, en les resuspendant dans une solution de RIPA contenant un inhibiteur de protéases (Sigma),

100 mM NaF, 0,5 mM vanadate de sodium, 1 mM PMSF et 1 mM phosphate  $\beta$ -glycérol afin d'inhiber l'activité des phosphatases et en incubant le tout 15 minutes sur glace. Après coup, les échantillons étaient soniqués, centrifugés à vitesse maximale (plus de 15 000 g) et le surnageant était recueilli. La concentration protéique des échantillons a été mesurée via un kit BCA (Pierce) ainsi qu'un lecteur de microplaques Biotek Elx808. Les anticorps primaires utilisés étaient un anti-PTEN de lapin (Cell signaling) 1/1000, un anti-P-Akt de lapin (Cell signaling) 1/1000 ainsi qu'un anti-actine C-11 de chèvre (Santa Cruz Biotechnology) 1/1000. Les anticorps secondaires utilisés (Santa Cruz Biotechnology) étaient un anti-lapin et un anti-chèvre (1/5000). Le kit de détection ECL Plus (Amersham), un appareil Fujifilm LAS-4000 ou ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare) de même que le logiciel GIMP ont enfin permis d'analyser les immunobuvardages.

#### **Transfection d'ARN interférent :**

La veille de la transfection (minimum 18 heures avant), les cellules étaient trypsinisées et ensemencées dans 2,5 mL de milieu sans antibiotique sur des pétris de 60 mm en vue d'obtenir 50-75% de confluence le lendemain. Le jour de la transfection, 10  $\mu$ L de TransIT-TKO (Mirus) étaient ajoutés à 0,5 mL d'Opti-MEM (Invitrogen) et le tout était incubé pendant 5 minutes à température pièce. Ensuite, 100 nM d'ARN interférent (ARNi) Smartpool ou d'ARNi contrôle (Dharmacon) étaient ajoutés à la solution, ce qui était suivi d'une incubation de 15 minutes à température ambiante le temps que les complexes se forment. Ce mélange était par la suite ajouté dans le pétri d'intérêt et s'ensuivait une incubation de 24 heures à 37°C. Après ces 24 heures, une

seconde transfection avait lieu et, 48 heures après cette dernière, les cellules étaient utilisées pour les expériences voulues.

### **Production de rétrovirus et infection de cellules cibles :**

Les cellules PT67 ont été trypsinisées et ensemencées dans 2,5 mL de milieu sans antibiotique à environ 60% de confluence la veille de la transfection. Le jour de la transfection, 25  $\mu$ L de lipofectamine et 10 $\mu$ g d'un des plasmides pBabe-puro (PTEN, PTEN C124S, PTEN G129E, vecteur vide; Addgene) ont été ajoutés à 0,5 mL d'Opti-MEM. Cette solution a été incubée 25 minutes à température pièce et ensuite ajoutée aux cellules. 24 heures après la transfection, les cellules PT67 ont été trypsinisées, ensemencées 1/20 et sélectionnée avec de la puromycine (2 $\mu$ g/mL). 1 à 2 semaines après le début de sélection, soit quand elles atteignaient 80-90% de confluence, le surnageant des cellules PT67 transfectées était recueilli et filtré à l'aide d'une membrane de PVDF de 0,45  $\mu$ m (afin d'éliminer les débris cellulaires) et était ensuite ajouté aux cellules à infectées en présence de 6  $\mu$ g/mL de polybrène. Les cellules MDA-MB-468 et WM3248 ont été sélectionnées 24 heures suivant l'infection avec respectivement 0,25 et 0,5  $\mu$ g/mL de puromycine pour générer des lignées stables.

### **Inhibiteurs pharmaceutiques :**

L'inhibiteur de PTEN bpV(phen) a été obtenu d'Alexis biochemicals (maintenant Enzo Life Sciences) et l'inhibiteur de P-Akt MK2206 a été obtenu de Selleck Chemicals. Les traitements avec ces produits nécessitaient d'être ajoutés au milieu dénué d'antibiotiques respectivement 30 minutes et 2 heures avant l'irradiation ou l'extraction protéique et étaient maintenus dans le milieu pendant l'incubation post-

irradiation. Les concentrations testées ont été situées entre 1 et 10  $\mu\text{M}$  pour le bpV(phen) et entre 0,01 et 10  $\mu\text{M}$  pour le MK2206. Puisque ces composés sont solubles dans du DMSO, les contrôles ont été incubés en présence de la même quantité de ce solvant et pour la même période de temps dans un milieu sans antibiotique.

# **Résultats**

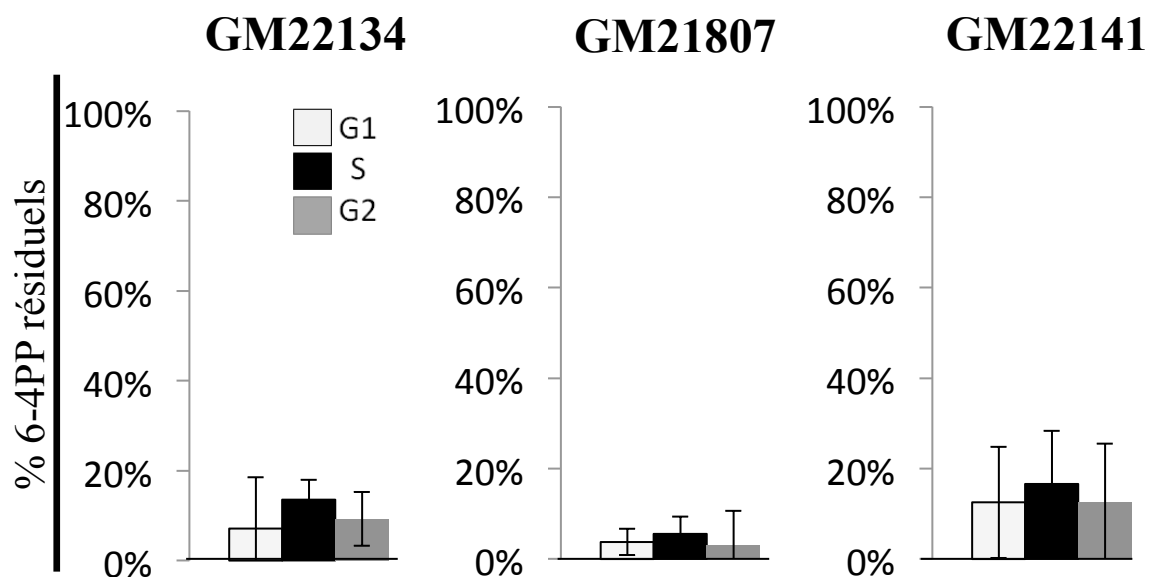
## **Préambule**

Les lignées de mélanomes obtenues dans le cadre des expériences subséquentes proviennent de la collection de lignées Wistar. Ces lignées ont été passablement bien caractérisées lors de leur isolation de même que dans divers articles en ayant fait l'utilisation. D'ailleurs, un résumé des informations disponibles ayant trait à l'âge et au sexe du donneur, au site d'isolation, à la pathologie de même qu'aux statuts de BRAF, Ras et PTEN peut être consulté en Annexe 1.

## La capacité de GG-NER dans les mélanocytes primaires

Trois lignées de mélanocytes primaires ont été analysées en ce qui a trait à leur capacité à réparer les 6-4PPs suite à une irradiation aux UVC. Cette capacité a été caractérisée selon le cycle cellulaire à l'aide d'une méthode développée dans notre laboratoire (Auclair, et al., 2008) (voir matériel et méthodes).

Généralement, les profils de réparation des trois lignées semblent assez homogènes. En effet, malgré l'incertitude importante liée aux résultats pour la lignée GM22141 (la phase S étant associée à  $16,6 \pm 12,6\%$  de dommages restant), les lignées réparent presque complètement les 6-4PPs 6 heures après exposition aux UV et ce, en toute les phases. Aussi, aucune phase n'a un degré de réparation significativement différent que celui d'une autre et ce, dans toutes les lignées. Bref, cela tend à démontrer que les mélanocytes primaires n'ont aucun défaut de réparation des 6-4PPs.



**Figure 4. Capacité de GG-NER en fonction du cycle cellulaire dans des lignées de mélanocytes primaires humains.** Les résultats indiqués représentent le pourcentage de 6-4PPs n'étant pas réparés 6 heures après exposition à  $15\text{J/m}^2$  d'UVC dans trois lignées différentes de mélanocytes primaires.

## **La capacité de GG-NER dans les mélanomes malins**

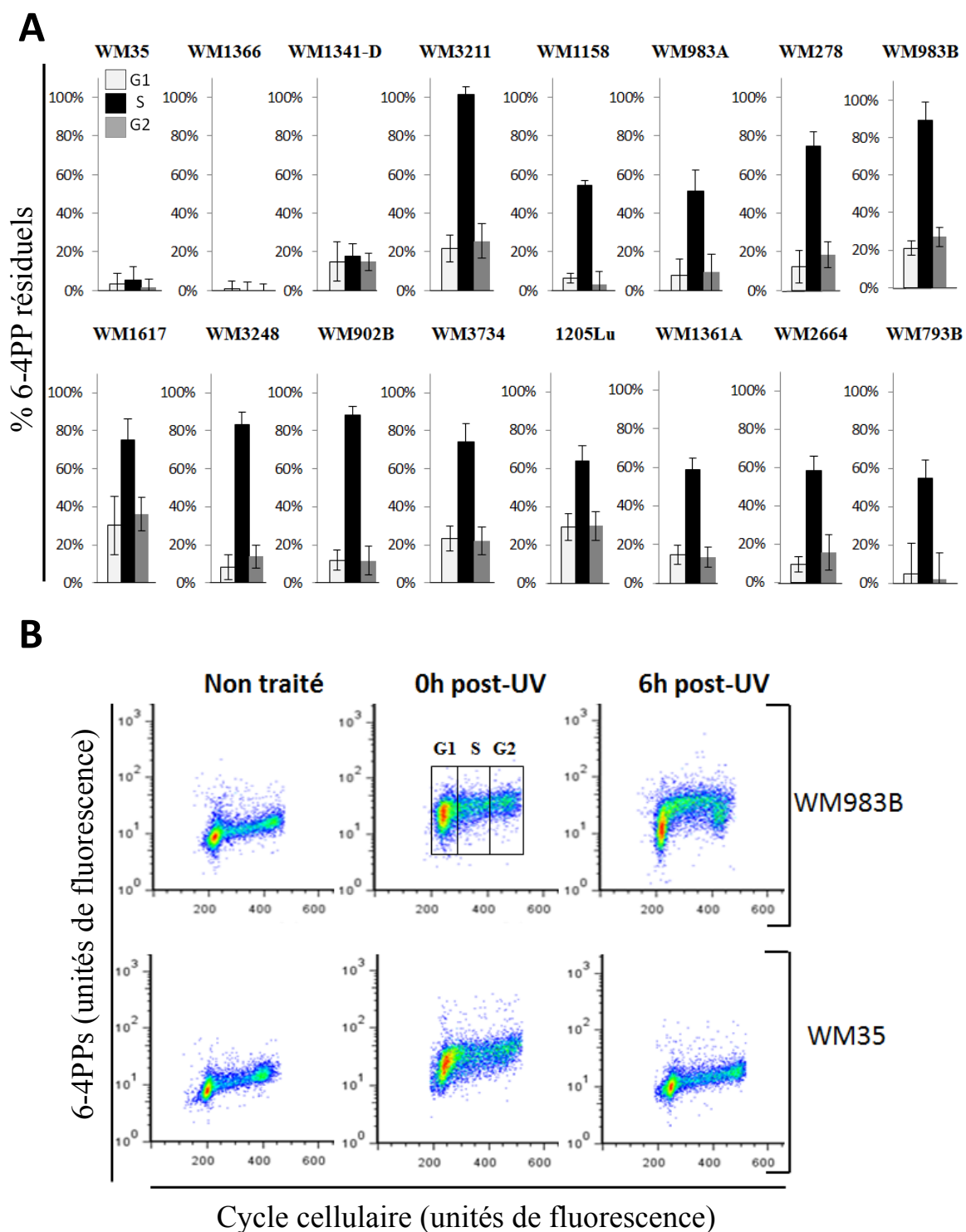
En utilisant le même procédé que celui utilisé pour les mélanocytes (voir page précédente et matériel et méthodes), il a été possible de déterminer la quantité de 6-4PPs résiduels 6 heures après exposition à  $15\text{J}/\text{m}^2$  UVC pour les MM.

Au premier abord, il est indubitable que les lignées de mélanomes ont des différences marquées entre elles en ce qui a trait à la capacité de réparation des 6-4PPs, particulièrement en phase S (voir figure 5 A). Ainsi, les lignées WM35, WM1355 et WM1341-D sont très aptes à réparer les lésions ici concernées dans toutes les phases du cycle cellulaire. Pour les autres lignées, elles sont, à divers degrés, significativement ( $p < 0,05$ ) toutes déficientes en réparation en phase S en comparaison avec la réparation ayant lieu en G1 et G2. Aussi, elles ont généralement plus de 50% de 6-4PPs n'étant pas réparés en phase S 6 heures après exposition aux UV. Quelques lignées ont même une réparation des 6-4PPs en phase S presque totalement abolie (c'est le cas de WM3211, WM3248, WM902B et WM983B, qui ont plus de 80% de dommages résiduels). Quelques lignées ayant une déficience en phase S ont une réparation plus lente (versus la moyenne des trois lignées réparant) en phases G1 et G2, mais elles ont malgré tout une capacité de réparation importante (elles réparent toutes entre 55 et 100% de leurs dommages dans ces deux phases).

En bref, une majorité (13 sur 16) des lignées de mélanomes traitées comporte une déficience de GG-NER en phase S (elles seront appelées lignées SPR-) et une minorité répare adéquatement les dommages en toute phase du cycle cellulaire (ces lignées seront appelées SPR+). Ainsi, une déficience spécifique de GG-NER en phase S

semble être caractéristique d'une majorité de MM. Les profils obtenus à la cytométrie de flux (figure 5B) démontrent bien un tel schisme entre la phase S et les autres phases dans une des lignées SPR- (WM983B) alors que les niveaux de réparation sont semblables pour tout le cycle cellulaire dans la lignée SPR+ WM35. Ainsi, la GG-NER en phase S semble un phénomène distinct de la GG-NER ayant lieu en phases G1 et G2 dans les mélanomes.





**Figure 5. Capacité de GG-NER en fonction du cycle cellulaire dans des lignées de mélanomes malins humains.** A. Les résultats indiqués représentent le pourcentage de 6-4PPs n'étant pas réparés 6 heures après exposition à  $15\text{J/m}^2$  d'UVC dans seize lignées différentes de mélanomes. B. Profils de cytométrie de flux types d'une lignée ne réparant pas les 6-4PPs en phase S (WM983B) et d'une autre réparant ces lésions (WM35) après exposition à  $15\text{J/m}^2$  d'UVC ou sans traitement. À titre indicatif, des rectangles délimitant chacune des phases du cycle cellulaire ont été ajoutés sur le nuage de points représentant la lignée WM983B immédiatement après exposition aux UV (0h post-UV).

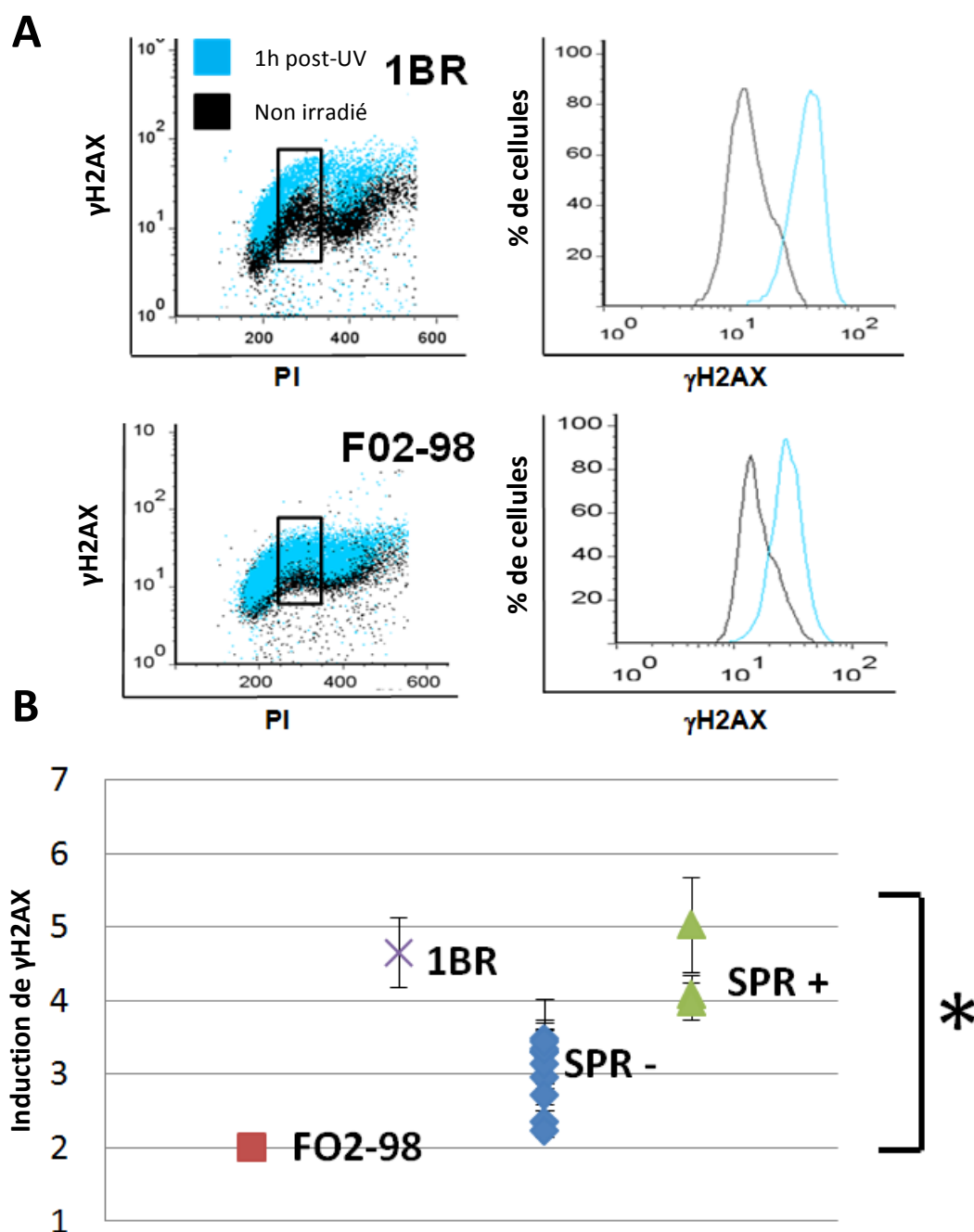
## **L'induction de la phosphorylation de H2AX**

Puisqu'un article émanant de notre laboratoire a démontré qu'une déficience en ATR engendre une déficience de la GG-NER en phase S (Auclair, et al., 2008), nous avons voulu mesurer l'activation de cette kinase dans les mélanomes à savoir s'il y avait un lien avec la déficience en réparation en phase S. En se basant en partie sur le protocole utilisé dans notre laboratoire pour la mesure des 6-4PPs (Auclair, et al., 2008) de même que sur la littérature (Hanasoge & Ljungman, 2007), nous avons développé une technique pour mesurer la phosphorylation de H2AX en fonction du cycle cellulaire en utilisant la technologie de la cytométrie de flux (voir matériel et méthodes pour davantage de détails). De manière grossière, l'induction de la phosphorylation de H2AX était mesurée par la comparaison entre des échantillons non irradiés et des échantillons ayant eu le temps de récupérer 1 heure après avoir été exposés aux UV. Le but ultime de cette méthode est de mesurer l'activation d'ATR par voie indirecte puisque l'induction de  $\gamma$ H2AX en est un bon rapporteur à court terme après exposition aux UV.

Ainsi, puisqu'il s'agit d'une technique nouvellement développée, des essais sur deux lignées contrôles ont été faits. À cet effet, l'induction relative d'une lignée de fibroblastes provenant d'un patient atteint de la maladie de Seckel (F02-98, dont l'activité d'ATR est déficiente) a été comparée à celle d'une lignée de fibroblastes dont l'activité d'ATR n'est pas perturbée (1BR) (O'Driscoll, et al., 2003). Tel qu'attendu, cette expérience a démontré que les cellules F02-98 ont une induction beaucoup moins prononcée (par plus de deux fois de différence) que les cellules 1BR (voir figure 6A et 6B), le tout allant en concordance avec la littérature (Hanasoge & Ljungman, 2007).

Par ailleurs, afin de vérifier s'il y avait une différence entre les lignées de mélanomes SPR- et SPR+ en ce qui a trait à l'activation d'ATR après exposition aux rayons UV, la technique de mesure de la phosphorylation de H2AX a été utilisée sur 10 mélanomes SPR- ainsi que sur les 3 mélanomes SPR+. Les résultats (voir figure 6B) montrent que les lignées SPR-, considérées dans leur ensemble, induisent significativement moins de phosphorylation de H2AX en phase S 1 heure après exposition aux rayons UV que les lignées SPR+ (elles aussi considérées dans leur ensemble). Aussi, les lignées SPR+ présentent un niveau semblable d'induction à celui des cellules 1BR, qui réparent les 6-4PPs en phase S de manière efficace (Auclair, et al., 2008). Du côté des lignées SPR-, l'expérience a pu mettre en relief une induction de  $\gamma$ H2AX en phase S se situant entre celles des cellules F02-98 et 1BR, sous-entendant que ces lignées SPR- ne sont pas aussi déficientes dans l'activation d'ATR que les cellules provenant d'un patient atteint du syndrome de Seckel, mais qu'elles sont tout de même moins efficaces que les cellules 1BR à cet effet.

En bref, s'il est considéré que l'induction de  $\gamma$ H2AX ici testée reflète bien l'activité d'ATR, les mélanomes déficients en GG-NER en phase S semblent être déficients dans l'activation de la protéine ATR en comparaison avec des mélanomes et des fibroblastes ayant une GG-NER très fonctionnelle en toute phase.



**Figure 6. Induction relative de  $\gamma$ H2AX lors de la phase S.** **A.** Nuage de points à deux variables représentant l'induction relative (échantillon irradié versus non irradié) de  $\gamma$ H2AX (S139) en fonction du cycle cellulaire 1 heure après exposition  $15\text{J/m}^2$  d'UVC dans une lignée ATR+ (1BR) et une lignée exprimant une kinase ATR peu fonctionnelle (F02-98). Les cellules de la phase S ayant été considérées dans les courbes à la droite de la figure sont encadrées dans les nuages de points. Ces courbes représentent le pourcentage de cellules en fonction des unités de fluorescence associées à  $\gamma$ H2AX. **B.** Représentation graphique de l'induction relative de  $\gamma$ H2AX en phase S 1 heure après exposition à  $15\text{J/m}^2$  d'UVC dans les lignées F02-98 et 1BR, 10 lignées SPR- et 3 SPR+. Les lignées SPR- sont (de bas en haut) WM3211, WM3734, WM983B, WM1617, WM3248, WM902B, WM1361A, WM278, WM2664 et WM983A alors que les lignées SPR+ sont (de bas en haut) WM1341-D, WM35 et WM1366. \*,  $p < 0.05$  associée à un test T de Student en ce qui a trait à la différence de l'induction de  $\gamma$ H2AX moyenne en phase S des lignées SPR- versus celles des lignées SPR+.

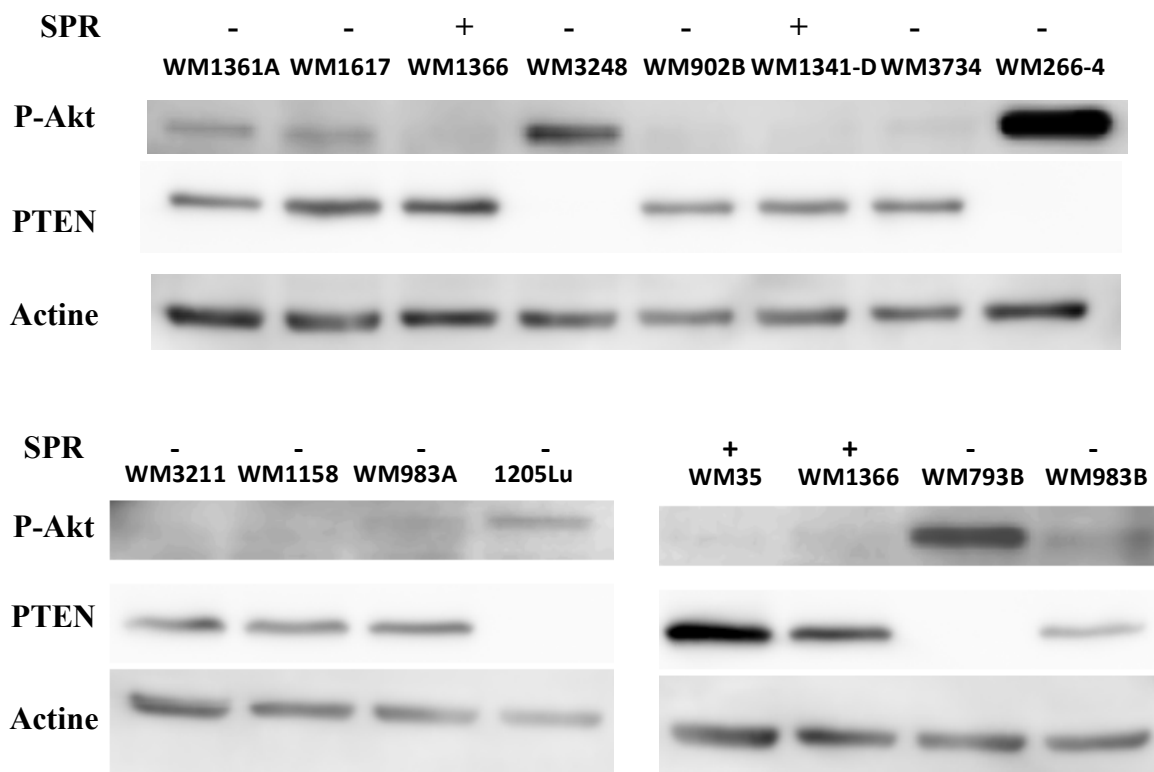
## **L'expression de PTEN et la phosphorylation d'Akt dans les MM**

Après analyse des statuts de différents gènes fréquemment mutés dans les lignées de MM utilisées (voir l'Annexe 1) et étant donné le potentiel d'Akt à jouer sur l'activation d'ATR via TopBP1 (Liu, et al., 2006; Pedram, et al., 2009), nous avons voulu savoir si le statut de PTEN pouvait être reliée à la GG-NER en phase S. Ainsi, 12 lignées SPR- ainsi que les 3 lignées SPR+ ont été analysées par immunobuvardage (voir matériel et méthodes) afin de connaître leur niveau de phosphorylation d'Akt de même que leur niveau d'expression de PTEN. En ce qui a trait à la phosphorylation d'Akt, les anticorps étaient spécifiques à la phosphorylation de la sérine 472. Le but de l'expérience était principalement de voir s'il y avait une corrélation entre le fait qu'une lignée répare ou non les 6-4PPs en phase S et le statut de la voie PI3K.

En premier lieu, l'immunobuvardage (voir figure 7) a mis en évidence la déficience en PTEN déjà connue dans la littérature (voir l'Annexe 1) dans les lignées WM793B, WM1205Lu, WM266-4 et WM3248 qui ont, par conséquent, des niveaux de phosphorylation d'Akt assez élevés. Il est important de souligner que l'expression de PTEN ne signifie pas nécessairement que la protéine est fonctionnelle; l'activité étant plutôt rapportée par le niveau de phosphorylation d'Akt. Ainsi, toutes les lignées SPR + (WM35, WM1366 et WM1341-D) expriment une protéine PTEN qui semble fonctionnelle en raison des niveaux de phosphorylation constitutifs d'Akt qui sont très bas pour les trois lignées. Dans les lignées SPR- autres que les quatre nommées en début de paragraphe, les résultats ne sont pas aussi clairs. La lignée WM983B a un signal associé à PTEN moins intense que celui des deux lignées SPR+ (WM35 et WM1366) présentes sur la même membrane et un niveau de phosphorylation d'Akt supérieur, mais

ce même niveau d'Akt phosphorylé est de beaucoup moindre à celui de WM793B. Aussi, les lignées WM1361 et WM1617, même si elles n'ont pas de déficience en ce qui concerne l'expression de PTEN, ont un niveau de phosphorylation d'Akt supérieur aux lignées SPR+. Ainsi, les lignées WM983B, WM1361 et WM1617 semblent généralement avoir une voie PI3K plus active que celles des lignées SPR+. Pour les autres lignées, malgré que les résultats ne soient pas facilement interprétables, quelques-unes d'entre elles ont un niveau de phosphorylation d'Akt semblable à celui des lignées SPR+; sous-entendant que PTEN y soit fonctionnel.

Finalement, il apparaît qu'une déficience en réparation des 6-4PPs puisse être reliée à un phénomène autre que la phosphorylation d'Akt étant donné les quelques lignées SPR- qui ont un niveau constitutif comparable aux lignées SPR+. Aussi, il n'est pas possible de conclure qu'une déficience en PTEN amène nécessairement à un phénotype SPR-, mais rien de va dans le sens contraire. En effet, les lignées SPR+ ont ici été exclusivement associées avec une protéine PTEN fonctionnelle alors que des lignées SPR- ont été (pour au moins 7 lignées sur 12) associées à une déficience de cette même protéine ou du moins à un niveau constitutif élevé de phosphorylation d'Akt.



**Figure 7. La phosphorylation d'Akt et l'expression de PTEN dans les lignées de mélanomes.** Immunobuvardage montrant le niveau de phosphorylation d'Akt (S472) et le niveau d'expression de PTEN dans 15 lignées de mélanomes différentes. Les lignées ont aussi été identifiées en fonction de leur statut de GG-NER en phase S (SPR) où « + » correspond à une réparation efficace et « - », à une déficience.

## **L'inhibition de PTEN dans diverses lignées SPR+**

Afin de vérifier si l'inhibition de PTEN peut mener à une déficience en GG-NER, nous avons utilisé l'inhibiteur de PTEN bpV(phen) sur la lignée de mélanocytes GM22134 ainsi que par ARNi (Smartpool) visant PTEN sur deux lignées réparant adéquatement les 6-4PPs en toutes phases: WM35 et HeLa.

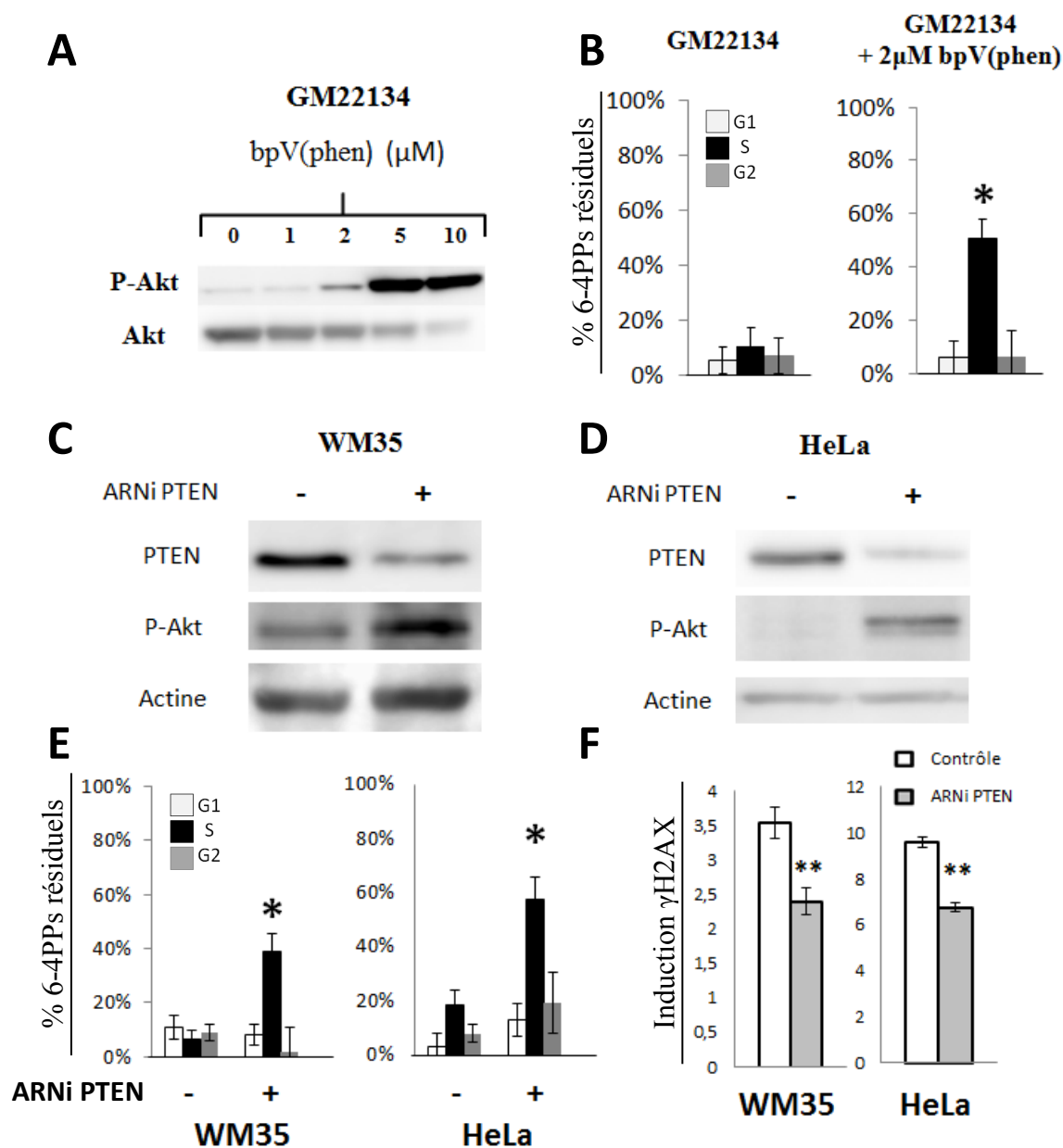
En premier lieu, l'utilisation de bpV(phen) sur la lignée de mélanocytes primaires GM22134 est justifiable de par ce que cette lignée ne semblait pas avoir une diminution de l'expression de PTEN suite aux traitements à l'ARNi et qu'il était important pour notre groupe de savoir si une diminution de l'activité de PTEN pouvait affecter la GG-NER dans une lignée non cancéreuse. Ainsi, après avoir exposé la lignée GM22134 à différentes concentrations de l'inhibiteur (voir figure 8A), il a été décidé que la réparation des 6-4PPs allait être mesurée en présence de 2 $\mu$ M d'inhibiteur. En effet, cette concentration induit la phosphorylation d'Akt et utiliser 5 $\mu$ M d'inhibiteurs ou davantage est cytotoxique selon les tests de croissance faits dans notre laboratoire (résultats non montrés) de même que la littérature (Lai, et al., 2007). L'expérience mesurant la GG-NER sur la lignée GM22134 avec ou sans bpV(phen) (figure 8B) a permis de constater que la présence du bpV(phen) induit une déficience de la réparation des 6-4PPs en phase S comparativement aux phases G1 et G2. Aussi, un tel phénomène n'est pas constaté lorsque la lignée est dans du milieu exempt de cet inhibiteur (figures 4 et 8B).

Ensuite, afin de valider les résultats obtenus avec le bpV(phen) et de jouir d'un effet plus spécifique (puisque le bpV(phen) n'est pas que relié à l'inhibition de PTEN



(Band, et al., 1997)), les lignées WM35 et Hela ont été transfectées avec un ARNi de PTEN (figure 8C,D,E et F). Des immunobuvardages ont d'abord été effectués, démontrant que la transfection des ARNi induisait bel et bien une sous-expression de PTEN et une augmentation de la phosphorylation d'Akt (voir figures 8C et D). Avec les mêmes cellules transfectées, des expériences ont été faites pour connaître si les ARNi utilisés influençaient la GG-NER en phase S de même que l'induction de  $\gamma$ H2AX via les méthodes de cytométrie de flux précédemment expliquées. Pour ce qui est de la GG-NER, les deux lignées, une fois PTEN sous-exprimé, ont démontré une déficience en réparation des 6-4PPs en phase S en comparaison avec les phases G1 et G2 alors qu'aucune différence significative n'a été remarquée entre les différentes phases des lignées traitées avec un ARNi contrôle (voir figure 8E). De même, concernant l'induction de  $\gamma$ H2AX en phase S, celle-ci a été diminuée de manière significative pour les cellules traitées avec de l'ARNi de PTEN versus celles traitées avec un ARNi contrôle (voir figure 8F). Fait notable, l'induction de  $\gamma$ H2AX dans les cellules HeLa est très importante en comparaison avec celle de la lignée WM35. Une telle induction avait d'ailleurs déjà été répertoriée dans la littérature (Halicka, et al., 2005).

Finalement, les résultats ici obtenus soutiennent que l'inhibition de PTEN peut engendrer une déficience de la GG-NER en phase S dans des cellules étant normalement aptes à réparer les 6-4PPs en toute phase. Par ailleurs, l'inhibition de PTEN semble mener à une baisse significative de l'induction de  $\gamma$ H2AX, et donc à une diminution de l'activité d'ATR.



**Figure 8. L'inhibition de PTEN dans des lignées SPR+.** A. Immunobuvardage représentant l'induction de la phosphorylation d'Akt (S472) à différentes concentrations de bpV(phen) sur la lignée de mélanocytes primaires GM22134 B. Les résultats indiqués représentent le pourcentage de 6-4PPs n'étant pas réparés 6 heures après exposition à  $15\text{J}/\text{m}^2$  d'UVC dans la lignée GM22134 en présence ou non de  $2\mu\text{M}$  de bpV(phen). C. Immunobuvardage représentant l'effet d'un ARNi de PTEN sur l'expression de PTEN et la phosphorylation d'Akt (S472) dans la lignée de mélanome WM35. D. Idem qu'en C, mais appliqué à la lignée HeLa. E. Pourcentages de 6-4PPs n'étant pas réparés 6 heures après exposition à  $15\text{J}/\text{m}^2$  d'UVC en fonction du cycle cellulaire dans les lignées WM35 et HeLa en présence ou non d'ARNi de PTEN. F. Représentation graphique de l'induction relative de  $\gamma\text{H2AX}$  (S139) en phase S 1 heure après exposition à  $15\text{J}/\text{m}^2$  d'UVC dans les lignées WM35 et HeLa avec ou sans ARNi PTEN. \*,  $p < 0.05$  associée à un test T de Student à savoir si la quantité de 6-4PPs résiduels en phase S est significativement différente des phases G1 et G2 pour une même lignée. \*\*,  $p < 0.05$  associée à un test T de Student en ce qui a trait à la différence de l'induction de  $\gamma\text{H2AX}$  moyenne en phase S pour une lignée en fonction qu'elle soit traitée avec des ARNi ou non.

## **La restauration de PTEN augmente l'efficacité de la SPR**

Après avoir démontré que l'inhibition de PTEN peut diminuer la réparation des 6-4PPs en phase S ainsi que l'activation d'ATR, il a été jugé pertinent, en guise de contrôle, de s'adonner à une opération inversement équivalente. Ainsi, afin de vérifier si une lignée SPR- n'exprimant pas PTEN peut, si PTEN est réintroduit, restaurer une partie de sa capacité de GG-NER en phase S et avoir un effet sur la phosphorylation de  $\gamma$ H2AX, des expériences impliquant l'expression d'une protéine fonctionnelle par une infection de rétrovirus pBABE-puro (Addgene) ont été orchestrées sur deux lignées SPR+. Celles-ci sont la lignée de mélanomes WM3248 de même qu'une lignée du cancer du sein dont le statut PTEN- est largement connu dans la littérature, MDA-MB-468 (Jang, et al., 2010; Qingyong, et al., 2006). En guise de contrôle, ces lignées ont été infectées en parallèle avec des rétrovirus pBABE-puro ne codant pour aucune protéine (voir matériel et méthodes). Dans tous les cas, un immunobuvardage a été effectué pour s'assurer de l'efficacité de l'infection. Nous avons ensuite mesuré la capacité en GG-NER et l'induction de  $\gamma$ H2AX à l'aide des techniques de cytométrie de flux précédemment mentionnées.

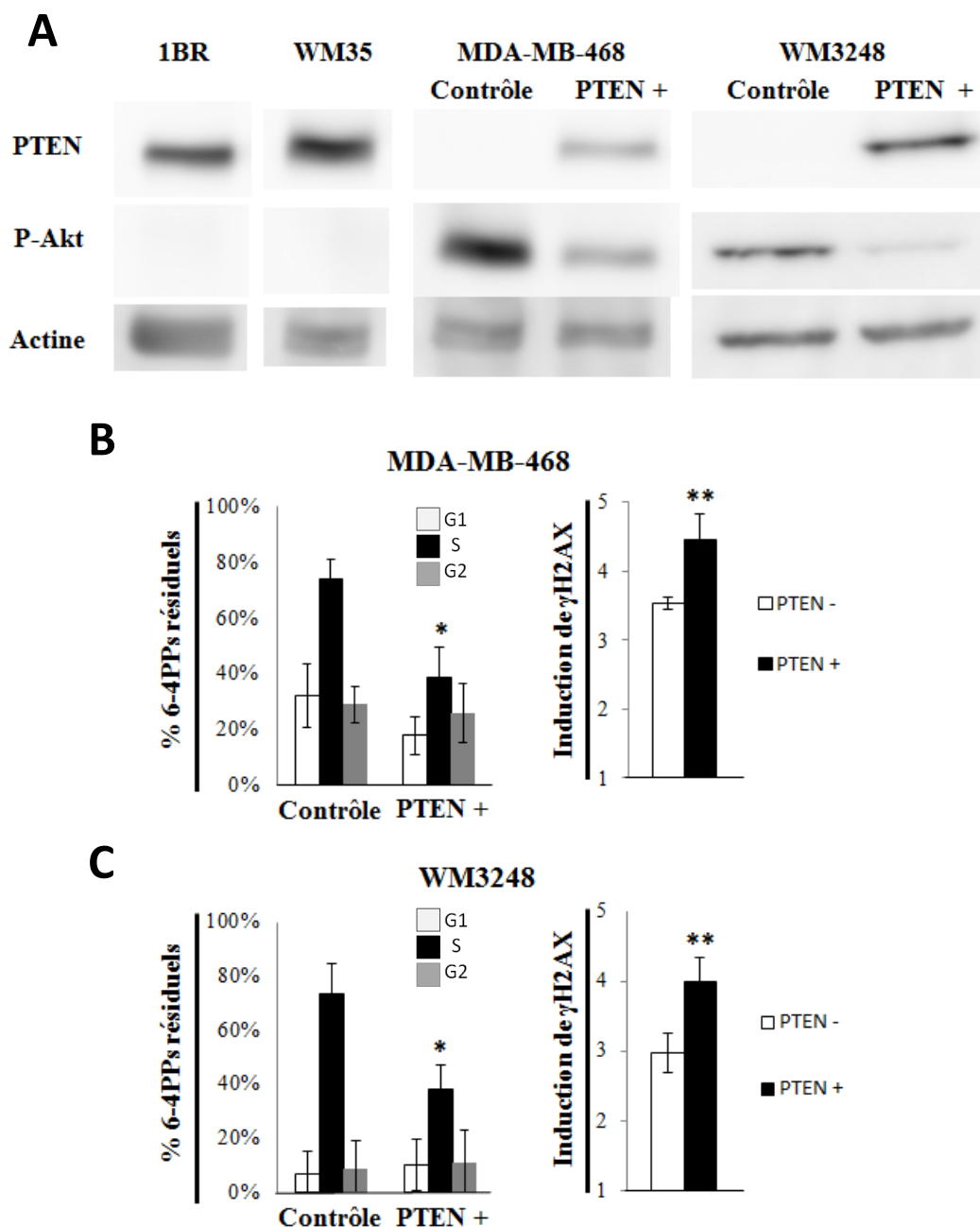
Premièrement, l'immunobuvardage (figure 9A) permet d'affirmer que les lignées MDA-MB-468 et WM3248 contrôles n'expriment pas PTEN à un degré détectable. Concernant WM3248, il est normal que PTEN ne soit pas détecté puisque, tel que décrit dans l'Annexe 1, cette lignée exprime une protéine PTEN non fonctionnelle ayant un codon stop à la lysine 144 (Coriell institute, 2009) alors que l'anticorps ici utilisé (voir matériel et méthodes) se lie à l'extrémité C-terminale. Chose indubitable, les niveaux de phosphorylation d'Akt dans ces deux lignées sont normalement très élevés comparés à

ceux de 1BR et WM35, dont la protéine PTEN est fonctionnelle. Aussi, l'immunobuvardage démontre que l'infection visant à exprimer une protéine PTEN fonctionnelle dans les deux lignées PTEN- a été fructueuse étant donné que PTEN est détectable et permet de diminuer la phosphorylation d'Akt. Néanmoins, il est important de souligner que l'expression de PTEN n'est pas aussi forte et que la phosphorylation d'Akt, pas aussi faible en comparaison avec celles des lignées 1BR et WM35. Ainsi, il est possible d'avancer que l'infection avec des rétrovirus permettant l'expression de PTEN s'est soldée par une restauration partielle de cette protéine et de son activité.

La lignée MDA-MB-468, une fois l'efficacité de l'infection prouvée par immunobuvardage, a été soumise à un test de GG-NER et d'induction de  $\gamma$ H2AX. Concernant la réparation des 6-4PPs (voir figure 9B à gauche), il s'est avéré qu'elle était normalement (avec un vecteur vide) excessivement déficiente en phase S ( $73,82 \pm 7,22\%$  de dommages résiduels). Aussi, l'expression de PTEN dans cette lignée a permis d'augmenter la réparation des 6-4PPs en phase S de manière significative ( $p < 0,05$ ), bien que cette réparation ne soit malgré tout pas totale ( $38,46 \pm 10,89\%$ ) six heures après irradiation. De même, l'induction de la phosphorylation de H2AX a été augmentée de manière significative lorsque PTEN était exprimé comparativement à la lignée MDA-MB-468 contrôle (figure 9B à droite).

Tout comme pour MDA-MB-468, l'expression de PTEN dans la lignée SPR-WM3248 augmente significativement sa réparation des 6-4PPs en phase S de même que l'induction de  $\gamma$ H2AX après exposition à  $15\text{J/m}^2$  d'UVC (voir figure 9C). Il est d'autant plus intéressant de mentionner que l'induction de  $\gamma$ H2AX dans cette lignée, une fois devenue PTEN+, devient comparable à celles des lignées SPR+ (voir figure 6B).

Enfin, que la lignée MDA-MB-468 ait normalement (avec un vecteur contrôle) une déficience en réparation des 6-4PPs en phase S tend à démontrer qu'un tel phénotype (SPR-) peut aussi être associé au cancer du sein. En outre, le rétablissement partiel de la GG-NER et de l'induction de la phosphorylation de H2AX en phase S par l'action de PTEN suggèrent que la relation PTEN/GG-NER/ATR ne soit pas unique aux mélanomes. Quant à WM3248, le fait que l'ajout d'un PTEN fonctionnel amène là aussi à une plus grande réparation des 6-4PPs en phase S ainsi qu'à une augmentation de l'activité d'ATR (rapportée par  $\gamma$ H2AX) vient confirmer, avec les résultats obtenus par l'inhibition de PTEN dans des lignées SPR+, que PTEN semble jouer un rôle dans la GG-NER et l'activation d'ATR dans les mélanomes.



**Figure 9. L'expression de PTEN dans des lignées SPR- et PTEN-.** A. Immunobuvardage représentant l'expression de PTEN et le niveau de phosphorylation d'Akt (S472) constitutifs pour les lignées 1BR et WM35, de même que pour les lignées MDA-MB-468 et WM3248 avec (+) ou sans infection (-) d'un rétrovirus exprimant PTEN. B. Les résultats indiqués représentent le pourcentage de 6-4PPs n'étant pas réparés 6 heures après exposition à 15J/m<sup>2</sup> d'UVC (gauche) ainsi que l'induction relative de  $\gamma$ H2AX (S139) 1 heure après exposition à 15J/m<sup>2</sup> d'UVC (droite) pour la lignée MDA-MB-468 infectée avec un rétrovirus contrôle ou amenant à exprimer PTEN. C. Idem qu'en B, mais appliqué à la lignée WM3248 infectée avec un rétrovirus contrôle ou amenant à exprimer PTEN. \*, p<0.05 associée à un test T de Student à savoir si la quantité de 6-4PPs résiduels en phase S est significativement différente lorsque PTEN est exprimé ou non pour une même lignée. \*\*, p<0.05 associée à un test T de Student en ce qui a trait à la différence de l'induction de  $\gamma$ H2AX moyenne en phase S pour une lignée en fonction qu'elle exprime PTEN ou pas.

## **Le rôle de la phosphorylation d'Akt et de l'activité phosphatase de PTEN**

Ensuivant la logique que PTEN semble réguler la GG-NER en phase S et l'activation d'ATR, il est pertinent de savoir si cela est dû à la capacité de PTEN à influencer la phosphorylation d'Akt, à son action plus généralisée de phosphatase ou à un mode d'action autre. Pour atteindre un tel but, un inhibiteur pharmacologique de la phosphorylation d'Akt présentement en phase clinique II (Hollander, et al., 2011), le MK2206, a été utilisé (voir matériel et méthodes) afin de savoir si l'unique inhibition d'Akt pouvait augmenter l'efficacité de la GG-NER en phase S dans une lignée de mélanomes SPR-/PTEN- (WM3248). Aussi, afin de voir si l'action plus générale de PTEN en tant que phosphatase (n'impliquant pas que la déphosphorylation de PIP3) est en cause dans les phénomènes remarqués, la lignée MDA-MB-468 a été infectée avec des rétrovirus pBABE-puro permettant l'expression d'une protéine PTEN sans activité phosphatase (voir matériel et méthodes). En effet, il a déjà été caractérisé que la mutation C124S amenait à une déficience de l'action lipide et protéine-phosphatase de PTEN alors que la mutation G129E amenait seulement à une déficience de l'activité lipide-phosphatase de ladite protéine (Fan, et al., 2009; Park, et al., 2002; Weng, et al., 2001). Des immunobuvardages ont été faits afin de déterminer la concentration de MK2206 à utiliser ainsi que de s'assurer que l'expression de PTEN dans les lignées infectées ne se traduisait pas par une activité phosphatase.

En premier lieu, l'immunobuvardage (figure 10A) tend à démontrer que le MK2206 accomplit bel et bien son rôle premier, soit inhiber la phosphorylation d'Akt.

En effet, dès l'utilisation de 0,01  $\mu\text{M}$  d'inhibiteur, le niveau de la phosphorylation de la protéine est plus bas qu'en l'absence du composé. Aussi, 0,5  $\mu\text{M}$  d'inhibiteur a été utilisé pour la mesure des 6-4PPs puisque nous avons jugé que cette concentration engendrait une inhibition efficace et que cette dernière n'allait pas ou très peu augmenter avec davantage de MK2206.

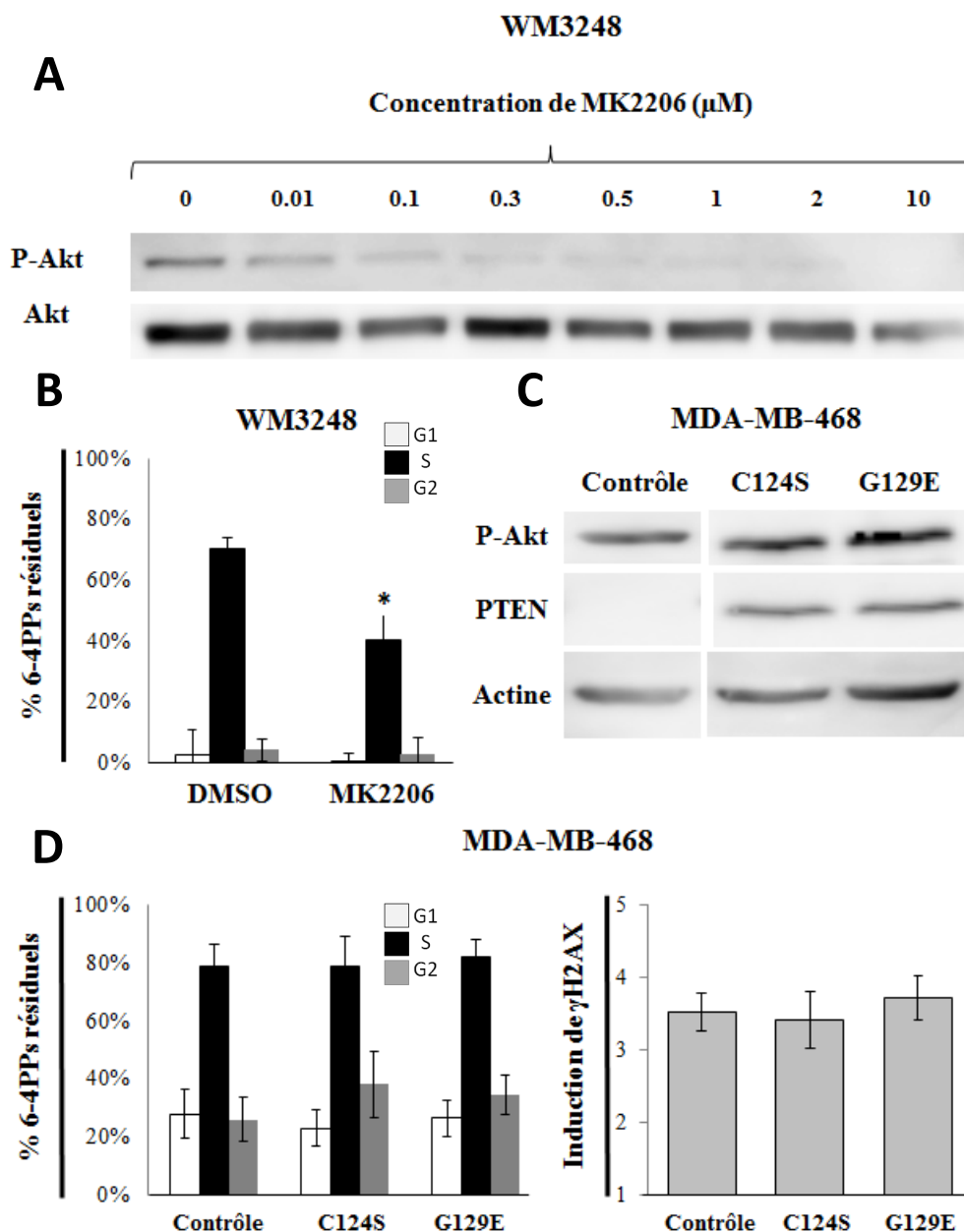
Ainsi, une fois que 0,5  $\mu\text{M}$  de MK2206 ou que du DMSO ait été ajouté aux cellules WM3248, il a été possible de remarquer que, tout comme avec la réexpression de PTEN, l'inhibition de la phosphorylation d'Akt permet une diminution significative, bien que modérée (de  $71,43 \pm 3,70\%$  à  $40,28 \pm 8,26\%$  de 6-4PPs résiduels, soit  $p < 0,05$ ) de la déficience de la réparation des 6-4PPs en phase S (figure 10B).

L'immunobuvardage représenté à la figure 10C tend à démontrer que l'infection par les rétrovirus contenant des vecteurs contrôle, PTEN C124S et PTEN G129E a été réussie. En effet, la lignée MDA-MB-468 contrôle, comme vue en figure 9A, n'exprime pas PTEN et a une forte phosphorylation d'Akt. De plus, les cellules MDA-MB-468 PTEN C124S et PTEN G129E expriment une protéine PTEN n'apparaissant pas avoir une activité phosphatase fonctionnelle étant donné leur niveau de P-Akt semblable à celui du contrôle.

La réparation des 6-4PPs (figure 10D à gauche) dans la lignée MDA-MB-468 n'a pas été affectée de manière significative, et ce en toute phase, par l'expression d'une protéine PTEN sans activité phosphatase (C124S et G129E) en comparaison avec le contrôle. Il en est de même pour l'induction de  $\gamma\text{H2AX}$  en phase S qui ne semble pas influencée par la protéine mutante induite (figure 10D à droite).



En dernier lieu, le MK2206 peut bel et bien inhiber la phosphorylation d'Akt dans les mélanomes et l'utilisation de ce composé sur une lignée de mélanomes n'exprimant plus PTEN et comportant une déficience en GG-NER en phase S permet d'amoinrir cette défaillance. Aussi, l'activité lipide-phosphatase de PTEN (inerte dans les mutants C124S et G129E) semble indispensable au rôle de cette protéine dans la GG-NER en phase S de même que dans l'activation d'ATR



**Figure 10. Le rôle de l'activité phosphatase de PTEN sur la GG-NER et l'induction de  $\gamma\text{H2AX}$ .** **A.** Immunobuvardage représentant l'induction de la phosphorylation d'Akt (S472) à différentes concentrations de MK2206 sur la lignée de mélanomes WM3248 **B.** Pourcentages de 6-4PPs résiduels en fonction de la phase cellulaire 6 heures après exposition à  $15\text{J}/\text{m}^2$  d'UVC dans la lignée WM3248 sans (DMSO) ou avec MK2206 ( $0,5\ \mu\text{M}$ ). \*,  $p < 0.05$  associée à un test T de Student à savoir si la quantité de 6-4PPs résiduels en phase S est significativement différente lorsqu'une même lignée est en présence ou non de MK2206. **C.** Immunobuvardage représentant l'expression de PTEN et le niveau de phosphorylation d'Akt (S472) constitutifs pour la lignée MDA-MB-468 infectée avec un rétrovirus contrôle ou permettant l'expression d'une protéine PTEN sans activité phosphatase (mutée en C124S ou G129E). **D.** Les résultats indiqués représentent le pourcentage de 6-4PPs n'étant pas réparés 6 heures après exposition à  $15\text{J}/\text{m}^2$  d'UVC (à gauche) ainsi que l'induction relative de  $\gamma\text{H2AX}$  (S139) 1 heure après exposition à  $15\text{J}/\text{m}^2$  d'UVC (à droite) pour la lignée MDA-MB-468 infectée avec un rétrovirus contrôle ou amenant à exprimer PTEN muté en C124S ou G129E.

# Discussion

## Rappel du projet

Les mélanomes représentent un danger énorme pour la vie des individus s'ils ne sont pas excisés avant leur phase de croissance verticale (Laga & Murphy, 2010). En effet, la réponse aux agents chimiothérapeutiques est très rare malgré que la recherche s'y s'affaire depuis maintes années (Jemal, et al., 2008; Mouawad, et al., 2010).

Bien que la littérature actuelle n'ait pas à ce jour démontré hors de tout doute qu'une déficience en NER existait dans les mélanomes (Fernandez, et al., 2011; Gaddameedhi, et al., 2010; Xu, et al., 2000), l'association serait cependant logique; impliquant cette voie primordiale à la réparation des photoproduits causés par les rayons UV et l'exposition au soleil (Fernandez, et al., 2011). Aussi, aucune étude n'ayant encore utilisé de technique considérant les différentes phases du cycle cellulaire séparément, nous avons voulu déterminer si les mélanomes pouvaient être déficients en GG-NER en phase S à l'aide d'une technique précédemment développée dans notre laboratoire (Auclair, et al., 2008).

Une faible activité de la kinase ATR pouvant être la cause d'une déficience de la GG-NER en phase S (Auclair, et al., 2008), nous avons tenté de déterminer si l'activité d'ATR pouvait être inhibée dans des mélanomes SPR- en mesurant l'induction de  $\gamma$ H2AX.

Aussi, la protéine PTEN, fortement compromise dans les mélanomes (Madhunapantula & Robertson, 2009), régule la phosphorylation d'Akt. La

phosphorylation de cette dernière protéine a été associée à une séquestration de Chk1 dans le cytoplasme (Puc, et al., 2005) de même qu'à une diminution de la liaison entre TopBP1 et ATR (Pedram, et al., 2009), compromettant potentiellement l'activation d'ATR. Ainsi, nous avons aussi voulu déterminer si PTEN avait un rôle dans l'activation d'ATR et dans la GG-NER en phase S dans les mélanomes.

## **La déficience de la GG-NER en phase S**

Il peut être sujet d'interrogation que de constater qu'une majorité de mélanomes comporte une déficience en GG-NER (figure 5A) en phase S alors que cela ne semble pas être le cas pour les mélanocytes primaires (figure 4). En effet, il est possible de se demander si une cellule maligne peut tirer avantage d'une telle déficience.

Puisqu'il a été démontré qu'un dysfonctionnement en NER en toute phase joue un rôle dans le cancer, et que cette voie a même mené à la première association entre une déficience de la réparation de l'ADN et le cancer (Cleaver, 1968), il est tout à fait possible que la déficience en phase S ici remarquée engendre elle aussi une hausse de l'instabilité génomique et, par conséquent, des mutations. D'ailleurs, le syndrome de Seckel (relié à ATR) et la maladie XPV (déficience en pol  $\eta$ ), bien que pouvant être différents des mélanomes au niveau de la signalisation moléculaire, amènent à une déficience en GG-NER en phase S (Auclair, et al., 2008; Auclair, et al., 2010) et à une augmentation de l'instabilité génomique (Brown & Baltimore, 2000; Dworaczek & Xiao, 2007).

Une étude récente a démontré que différents niveaux d'efficacité de NER existent dans la population normale et qu'ils concordent significativement avec l'historique familial ayant trait au cancer (Slyskova, et al., 2011). Il en est peut-être de même pour les cellules déficientes en NER en phase S. Bref, qu'une déficience de la GG-NER en phase S prédispose certains individus au cancer et/ou qu'elle soit reliée à un quelconque stade du développement d'une tumeur (ce qui est soutenu par le fait que les lignées de mélanocytes primaires réparaient bien les dommages en toutes phases

alors que ce n'était généralement pas le cas pour les lignées de mélanomes) pourrait servir de base pour juger de l'évolution du cancer et ainsi permettre de mieux encadrer des patients face à ce fléau. Or, rien n'a encore été prouvé à cet effet et il est certain que la déficience en GG-NER en phase S se doit d'être mieux caractérisée.

## **La corrélation entre l'efficacité de la GG-NER en phase S et l'induction de $\gamma$ H2AX**

Tel que dit précédemment, en raison que la diminution de l'activité d'ATR amène à une déficience de la capacité de réparation des 6-4PPs en phase S (Auclair, et al., 2008), nous avons mesuré l'activation d'ATR par une méthode quantifiant l'induction de la phosphorylation de H2AX à savoir s'il y avait une corrélation à faire avec le statut SPR. Aussi, comme indiqué dans les figures 6A et B, cette méthode a démontré que l'induction de  $\gamma$ H2AX, étant beaucoup plus faible dans la lignée F02-98 que dans la lignée 1BR, est dépendante d'ATR 1 heure après exposition aux rayons UV. En ce qui a trait aux mélanomes, une différence significative de l'induction de  $\gamma$ H2AX a été remarquée entre les lignées réparant adéquatement les dommages en phases S et celles comportant une déficience dans une telle réparation (figure 6B).

Un élément constaté étant certainement d'intérêt est l'existence d'un juste milieu entre les niveaux d'induction de  $\gamma$ H2AX d'une lignée fortement déficiente en ATR (F02-98) et de lignées dont ATR est fonctionnel (1BR et possiblement les 3 lignées SPR+) chez les lignées de mélanomes SPR-. Ainsi, il y a place à se demander quel niveau d'activité d'ATR est le plus propice au développement des cellules cancéreuses.

D'abord, il est connu qu'une déficience totale en ATR amène à une mort cellulaire (Cimprich & Cortez, 2008). Aussi, il a été remarqué que la délétion de p53 ne promeut aucunement la genèse de tumeurs, mais est très toxique dans des souris atteintes du syndrome de Seckel lié à ATR (Murga, et al., 2009). Ces derniers points laissent sous-entendre qu'une déficience complète ou très grande (comme le syndrome

de Seckel) en ATR n'est pas une option intéressante pour une tumeur. À l'autre bout du spectre, une voie ATR entièrement fonctionnelle contrerait l'action d'oncogènes activés, amenant ces cellules à la sénescence même s'il y a absence de bris génomiques (Bartkova, et al., 2006; Di Micco, et al., 2011; Toledo, et al., 2008), ce qui n'est encore une fois pas souhaitable pour une cellule cancéreuse.

Ainsi, peut-être qu'une activité de la voie ATR se trouvant à mi-chemin entre une fonctionnalité et une carence totales permettrait aux cellules cancéreuses d'échapper en partie à la mort cellulaire et à la sénescence par une gestion dosée du stress réplicatif. Une telle proposition a déjà été amenée par un groupe de scientifiques (López-Contreras & Fernandez-Capetillo, 2010). En effet, il est possible que le stress réplicatif soit trop grand en absence d'ATR et augmente encore davantage en présence d'un oncogène, ce qui se traduirait par une réponse sous forme de mort cellulaire. Or, le stress réplicatif, lorsqu'il est augmenté par un oncogène en présence d'ATR fonctionnel, pourrait induire une réponse d'ATR tellement importante que celle-ci mènerait les cellules à un arrêt réplicatif. Une activité partielle d'ATR pourrait permettre de modérer un peu l'action d'un oncogène sur le stress réplicatif, et cela sans mener à la sénescence. Il est probable que ce soit la meilleure option d'un point de vue oncogénique et que c'est ce phénomène qui a été observé dans une majorité des lignées de mélanomes SPR-.

Aussi, il est possible que la déficience ici remarquée dans l'activation de la protéine ATR des lignées SPR- amène à, tout comme pour les cellules de Seckel, une déficience de la GG-NER en phase S. À cet effet, il se peut que la NER soit un mécanisme dépendant de la cascade de phosphorylation d'ATR. Il est important de souligner que les protéines XPA (Wu, et al., 2006), RPA (Oakley, et al., 2003; Vassin,



et al., 2009) et XPC (Matsuoka, et al., 2007) qui sont toutes des protéines importantes dans la NER, sont phosphorylées par l'action d'ATR. Une mutation du site de phosphorylation de XPA dépendant d'ATR a même été associée à une déficience en GG-NER (Shell, et al., 2009). La protéine RPA est importante dans la liaison de l'ADN simple brin et ce rôle est probablement plus prépondérant en phase S, où les fourches de réplication peuvent être bloquées par, entre autres, les photoproduits. La phosphorylation de cette protéine par ATR joue ainsi peut-être un rôle dans le relais ou la balance entre la NER (où RPA lie XPA) et la stabilisation de la fourche par la kinase ATR (où RPA lie ATRIP) en engendrant un changement d'affinité pour certaines protéines. Que la protéine RPA soit impliquée dans ces deux phénomènes en phase S alors qu'elle ne serait impliquée que dans la NER en phases G1 et G2 pourrait expliquer qu'une déficience en NER puisse être exclusive à la phase S. Le mécanisme qui lie l'activité d'ATR à la GG-NER en phase S reste cependant à élucider et il est d'ici là possible d'émettre moult hypothèses.

Par ailleurs, la kinase ATR est impliquée dans la stabilisation des fourches de réplication (Chanoux, et al., 2009). Or, lorsque ces fourches ne sont pas bien stabilisées, elles s'affaissent et engendrent des DSBs (Costanzo, et al., 2003; McNeely, et al., 2010). Les DSBs étant une forme de lésions dont la réparation est très propice à engendrer des mutations (Hiom, 2010), il n'est pas impossible qu'une activation partielle d'ATR permette la formation de davantage de DSBs et résulte ainsi en de plus grandes probabilités de mutations.

Il n'y a pas énormément de publications faisant allusion à un potentiel lien entre une mutation dans la protéine ATR et les mélanomes. Néanmoins, une étude ayant

investiguée la chose n'a conclu à aucune mutation d'ATR dans 20 lignées de mélanomes (Mironov, et al., 1999). Ainsi, bien que le niveau d'expression d'ATR n'ait pas été adressé, il est possible que le problème lié à l'activation d'ATR soit ici dû à une anomalie des signaux moléculaires situés en amont. Il faudrait donc voir si des protéines liées à l'activation de cette cascade de phosphorylations telles celles du complexe 9-1-1, TopBP1, RPA ou ATRIP peuvent être elles-mêmes mutées (ce qui n'a jamais été associé aux mélanomes), sous-exprimées ou influencées par des dérégulations de protéines les contrôlant (ce qui pourrait s'appliquer à la voie PI3K).

## **L'effet de PTEN sur l'activation d'ATR et la GG-NER**

L'utilisation de l'inhibiteur de PTEN bpV(phen) sur une lignée de mélanocytes primaires de même que celle d'ARNi de PTEN sur les cellules HeLa et WM35 (voir figure 8) ont souligné qu'une déficience de cette protéine tend à diminuer la GG-NER en phase S et l'activation de  $\gamma$ H2AX pour la même phase. À cet effet, l'expression d'une protéine PTEN fonctionnelle dans les lignées SPR- et PTEN- WM3248 et MDA-MB-468 (voir figure 9) a permis une augmentation significative de la GG-NER et de l'induction de  $\gamma$ H2AX, confirmant les résultats précédemment obtenus. De même, un immunobuvardage a démontré clairement qu'au moins 5 des 12 lignées SPR- testées sous-expriment PTEN et qu'au moins 7 de ces 12 ont une voie PI3K suractivée alors qu'aucune déficience en PTEN ou de phosphorylation importante d'Akt n'ait été reliée aux mélanomes SPR+ (voir figure 7). Cela vient encore une fois confirmer les résultats obtenus, en plus de présumer qu'un bon pourcentage de lignées de mélanomes pourrait être concerné par le phénomène remarqué. À cet effet, il est estimé qu'environ 77% des mélanomes humains non reliés aux antécédents familiaux seraient affectés par une fonction déficiente de PTEN (Madhunapantula & Robertson, 2009).

PTEN est un suppresseur de tumeurs dont l'activité est couramment réduite dans divers cancers (cancer de la prostate, glioblastome, cancer du sein, cancer colorectal, cancer de la thyroïde, cancer du rein, lymphomes, ovariens, etc.) (Chu & Tarnawski, 2004). La déficience en PTEN est tellement importante qu'elle est l'objet de la recherche de biomarqueurs pour ces types de cancers (Cima, et al., 2011). Or, il est aussi intéressant de constater qu'une altération de PTEN est souvent associée au début de la

tumorigenèse (Koul, 2008; Lindgren, et al., 2011; Nogueira, et al., 2010; Wang, et al., 2006).

Les rôles de PTEN liés à l'activation d'ATR et à la NER sont nouveaux dans la littérature et pourraient en partie expliquer le rôle majeur de l'inhibition de cet important suppresseur de tumeurs dans le développement des mélanomes. En effet, une déficience en NER pourrait se traduire par plus de mutations, et une activité partielle d'ATR, par une modulation optimale du stress réplicatif, une augmentation des DSBs et conséquemment, une majoration des mutations. Aussi, la NER est considérée comme impliquée dans la voie de réparation des DSBs, des protéines comme XPA et RPA y ayant été associées (Zhang, et al., 2009). Il n'est donc pas impossible que des rôles synergétiques existent entre ATR et la NER pour normalement minimiser la quantité de DSBs. Si un ou plusieurs des énoncés ci-haut s'avère(nt) véridique(s), PTEN pourrait, via son action sur ATR et la GG-NER, hautement favoriser l'apparition de mutations accroissant l'agressivité de mélanomes suite à l'exposition à différents agents mutagéniques, dont les rayons solaires.

Sur une base plus large, il serait logique de penser qu'une déficience de PTEN permette une cascade parfaite d'un point de vue oncogénique, amenant une augmentation de la vitesse de réplication, une réponse atténuée au stress réplicatif, une hausse de la quantité de DSBs, une déficience de la NER, une diminution de l'apoptose, une dérégulation de l'adhésion cellulaire, etc. Que l'action d'un tel suppresseur de tumeurs soit inhibée dans le développement initial des mélanomes peut être expliqué par à peu près tous les rôles cités précédemment.

## **L'importance de l'activité phosphatase de PTEN sur la modulation d'Akt**

PTEN est une protéine ayant plusieurs fonctions, et son rôle le plus souvent associé à la tumorigenèse est son activité lipide-phosphatase qui permet, entre autres, d'enlever un groupement phosphate à PIP3 et ainsi d'inhiber la phosphorylation d'Akt. L'utilisation d'un inhibiteur de la phosphorylation d'Akt (MK2206) et l'emploi de lignées SPR- exprimant une protéine PTEN dénuée d'activité lipide-phosphatase (G129E) ou protéine lipide-phosphatase (C124S) ont amené à la conclusion que l'activité lipide-phosphatase de PTEN sur la régulation d'Akt est d'une importance majeure dans le contrôle de la GG-NER et de l'activation d'ATR dans les cellules MDA-MB-468 (voir figure 10).

Au niveau des potentiels mécanismes contrôlés par la phosphorylation d'Akt, il est important de citer la phosphorylation de TopBP1 et de Chk1. La phosphorylation de TopBP1 sur son site de liaison et d'activation d'ATR (Liu, et al., 2006; Pedram, et al., 2009) expliquerait bien certainement la diminution de l'activité d'ATR rapportée par l'induction de  $\gamma$ H2AX. D'un autre côté, la phosphorylation de Chk1 et sa séquestration dans le cytoplasme pourraient jouer un rôle dans la promotion de l'instabilité génomique et à la formation de DSBs (Li, et al., 2009; Puc & Parsons, 2005) et peut-être (cela n'a jamais été vérifié) influencer la GG-NER en phase S. Néanmoins, la phosphorylation de Chk1 ne saurait probablement pas expliquer la déficience remarquée en activation d'ATR étant donné que Chk1 est un des substrats de cette kinase et qu'il n'est donc pas situé en amont de l'activation d'ATR comme l'est TopBP1. Bref, il semble très probable

que les déficiences en GG-NER et en activation d'ATR soient dues à la phosphorylation de TopBP1 par Akt, bien que Chk1 pourrait lui aussi jouer un rôle. De même, Akt a une pléthore d'autres cibles connues et inconnues qui pourraient sans doute causer entièrement ou partiellement les phénomènes ici remarqués. Il faudrait peut-être considérer qu'Akt3, qui est fortement phosphorylé dans les mélanomes en comparaison avec les deux autres isoformes d'Akt (Stahl, et al., 2004), pourrait, bien que ce n'ait jamais été découvert jusqu'ici, avoir une affinité plus grande pour phosphoryler des protéines modulant la GG-NER, voie logiquement importante dans les mélanomes.

Il est intéressant d'un point de vue thérapeutique de constater que l'effet de PTEN sur la GG-NER et l'induction de  $\gamma$ H2AX soit en bonne partie, sinon en totalité, relié à sa capacité de modérer la cascade de phosphorylations d'Akt. Abaisser ou maintenir la phosphorylation d'Akt à un niveau non oncogénique pourrait être utile dans le cadre de traitements préventifs ou visant à empêcher les mélanomes de développer une résistance à un autre inhibiteur (tel celui de BRAF). Aussi, Akt est une protéine dont l'action est plus aisément contrôlable que PTEN de par le simple fait qu'il faille inhiber le premier et restaurer le second. En effet, si PTEN avait une capacité à réguler la GG-NER de manière indépendante à Akt, peut-être aurait-il fallu que des cures potentielles se tournent vers une thérapie génique visant à la réexpression de cette protéine, ce qui n'est pas chose simple. Or, des inhibiteurs de phosphorylation d'Akt semblent être la solution optimale, puisque cela se traduit par une facilitation de leur fabrication et de leur administration (le MK2206 peut être pris oralement par exemple) (Lindsley, 2010).

## Conclusion

Somme toute, alors que nous avons testé 3 lignées de mélanocytes primaires, celles-ci se sont toutes montrées aptes à réparer les 6-4PPs et ce, en toute phase (voir figure 4). De tels résultats suggèrent que les mélanocytes primaires ne sont généralement pas caractérisés par une déficience en GG-NER. Parallèlement, sur 16 lignées de mélanomes testées, 13 ont démontré une déficience marquée de la GG-NER en phase S (avec plus de 50% de 6-4PPs non réparés 6 heures après irradiation) alors que seulement 3 ont démontré une réparation efficace (voir figure 5). Dans l'ensemble, de telles données supportent qu'une majorité de mélanomes va acquérir, au cours de son développement, une déficience en GG-NER en phase S.

En addition, 10 lignées SPR- et les 3 lignées SPR+ de mélanomes ont été soumises à un test d'induction de  $\gamma$ H2AX en phase S pour mesurer l'activation de la kinase ATR, une forte inhibition d'ATR ayant déjà été reliée à une déficience en GG-NER en phase S (Auclair, et al., 2008). Une diminution significative de l'induction de la phosphorylation de H2AX a été observée dans les lignées SPR- en comparaison avec les lignées SPR+ (voir figure 6). Or, l'induction moyenne des lignées de mélanomes SPR- était tout de même plus importante que celle remarquée dans les cellules F02-98, comportant une déficience majeure en ATR (O'Driscoll, et al., 2003). Ainsi, de tels résultats sous-entendent qu'un niveau d'activité partiel d'ATR (ni normal, ni très faible) peut définir une majorité de lignées de mélanomes et corrélérer à leur déficience en GG-NER en phase S.

Après avoir utilisé les lignées de mélanomes pour un immunobuvardage (figure 7), les lignées SPR- ont souvent été caractérisées par une sous-expression de la protéine PTEN (5 sur 12 lignées) de même qu'une phosphorylation de la protéine Akt supérieure aux cellules donc l'activité de la protéine PTEN est connue comme fonctionnelle (au moins 7 sur 12 lignées). D'autre part, aucune des 3 lignées de mélanomes SPR+ n'a été définie comme sous-exprimant PTEN ou ayant une phosphorylation marquée d'Akt. Ainsi, il semblerait qu'une activité déficiente de la protéine PTEN puisse être associée, sans être une condition sine qua non, aux lignées de mélanomes SPR- et rien n'indique qu'un tel état de fait puisse caractériser une lignée SPR+.

Afin de voir si une liaison existait entre la protéine PTEN, la déficience en GG-NER en phase S et l'activation diminuée d'ATR, l'action de PTEN a été réduite par l'usage d'un inhibiteur pharmacologique et l'utilisation d'ARNi dans des lignées SPR+. Ces lignées, une fois PTEN inhibé, comportaient une déficience en GG-NER en phase S et une baisse de l'induction de  $\gamma$ H2AX étant toutes deux significatives (voir figure 8). Inversement, une protéine PTEN fonctionnelle a été insérée dans des lignées SPR-/PTEN-, ce qui s'est traduit par une augmentation de l'efficacité de la GG-NER en phase S de même qu'une augmentation de l'induction de la phosphorylation de H2AX (voir figure 9). Ces observations suggèrent que PTEN a un rôle important dans l'obtention d'une déficience en GG-NER en phase S liée à une activation moindre d'ATR.

En dernier lieu, l'emploi d'un inhibiteur de la phosphorylation d'Akt sur une lignée de mélanomes déficients en GG-NER en phase S a significativement amoindri cette déficience, en plus d'induire une phosphorylation de H2AX en phase S plus grande



se rapprochant de celle des lignées SPR+ (voir figure 10). De même, l'expression d'une protéine PTEN dépourvue d'une activité lipide-phosphatase dans une lignée SPR- n'exprimant normalement pas PTEN ne s'est soldée par aucun effet significatif, tant sur la GG-NER que sur l'induction de  $\gamma$ H2AX (voir figure 10). Ces derniers faits portent à croire que l'action de PTEN sur la GG-NER et l'activation d'ATR sont grandement dépendantes de l'activité lipide-phosphatase de PTEN et de sa régulation de la phosphorylation de la protéine Akt.

## Limites de l'étude

Il est aux premiers abords indubitable que la limite majeure de cette étude a trait au nombre de lignées de cellules utilisées. Ainsi, utiliser des lignées hétérogènes, pouvant comporter d'immenses différences sur les plans de la génétique et de la signalisation cellulaire, nécessite un grand échantillon avant d'être significatif. Plus particulièrement, le nombre de lignées de mélanocytes primaires testées, soit 3, est bien trop bas pour généraliser les observations y étant faites à l'ensemble des mélanocytes primaires.

Par ailleurs, le fait que plusieurs lignées soient cultivées dans des milieux différents pourrait amener des réponses cellulaires différentes desquelles il est difficile de tenir compte lors de comparaisons de résultats.

Un autre obstacle majeur est la différence entre les résultats *in vivo* versus les résultats *in vitro*. Ainsi, un inhibiteur de la phosphorylation d'Akt est probablement pertinent pour une bonne partie des lignées de mélanomes, cela ne veut pas dire que l'inhibition d'Akt a le même effet *in vivo*, voire même si l'inhibiteur y est efficace. Pareillement, la déficience en GG-NER en phase S pourrait ne pas s'appliquer à un pourcentage aussi haut dans les mélanomes *in vivo* qu'*in vitro*.

De même, bien que ceci soit en voie d'être fait, nous n'avons pas encore pu tester la GG-NER et l'induction de  $\gamma$ H2AX dans une lignée de mélanomes dans laquelle une protéine PTEN sans activité phosphatase serait exprimée. Ainsi, utiliser la lignée de cancer du sein MDA-MB-468, qui est SPR-/PTEN-, pourrait nous avoir mené à des conclusions ne s'appliquant pas aux mélanomes.

Un élément qui peut aussi porter à réfléchir est la nature du lien entre l'induction de  $\gamma$ H2AX et l'activation d'ATR. Bien qu'il ait été démontré dans la littérature (Hanasoge & Ljungman, 2007; Ward & Chen, 2001) qu'ATR joue un rôle prépondérant dans l'induction de  $\gamma$ H2AX dans les deux premières heures suivant une exposition aux rayons UV (entre 5 et 20J/m<sup>2</sup>), cette méthode a pour obstacle la limite dans le temps où ATM prend le relais comme principale kinase phosphorylant H2AX. Ainsi, il peut être difficile de jauger quelle portion de l'induction de  $\gamma$ H2AX est due au degré d'activation d'ATR aux différents temps après exposition aux rayons UV. À cela s'ajoute que des lignées cellulaires hétérogènes sur lesquelles les rayons UV peuvent engendrer des effets variables ont été utilisées. Ainsi, il aurait ainsi été intéressant de valider le niveau d'activation d'ATR présumé par une autre méthode. La phosphorylation de la kinase CHK1 au site S345, relevant fortement de l'activation d'ATR après UV, aurait pu être utilisée aux fins de cette vérification (Liu, et al., 2000).

Pour dernier point, l'utilisation de l'inhibiteur MK2206, bien qu'ayant un effet marqué sur la phosphorylation d'Akt, a possiblement des effets non spécifiques. Aussi, bien qu'il soit complexe de différencier ce qui émane d'une modification de la phosphorylation d'Akt ou d'un effet non spécifique, un article soutient que le MK2206 influencerait le transport du glucose de manière indépendante à Akt (Tan, et al., 2011). Conclure que la phosphorylation d'Akt joue un rôle principal dans la GG-NER en phase S et l'induction de  $\gamma$ H2AX serait consolidé par l'utilisation de méthodes plus spécifiques telle la transfection d'ARNi visant Akt.

## Expériences futures

Bien que nous sachions qu'une lignée puisse être déficiente en GG-NER en phase S, nous ne savons pas avec certitude ce qui caractérise une telle déficience en comparaison avec une réparation efficace en toutes phases. En effet, il serait intéressant d'utiliser des lignées SPR+ et SPR- pour se pencher sur les questions de l'apoptose (annexine V), de la survie (survie clonogénique), de la fréquence de mutations (essai HPRT) ainsi que de la réplication (mesure de l'élongation de fibres d'ADN par immunofluorescence), et que ces éléments soient l'objet d'une analyse dans des conditions normales et après exposition aux rayons UV pour fins de comparaison.

Aussi, le lien entre l'activation la GG-NER en phase S et l'induction de  $\gamma$ H2AX reste encore flou. Ainsi, il serait intéressant de savoir quel(s) substrat(s) d'ATR, si ce n'est l'activation de la kinase ATR elle-même, est (sont) impliqué(s) dans la GG-NER en phase S. Dans ce contexte, il serait pertinent de voir l'effet d'ARNi de Chk1 ou de lignées exprimant des mutants XPA, RPA ou XPC non phosphorylables par ATR sur la réparation des 6-4PPs.

Les résultats ici obtenus pavent aussi la voie à des expériences visant principalement à expliquer les rapports entre la kinase ATR, la GG-NER et la voie PI3K. Il serait utile de voir si ce lien est dépendant de la phosphorylation de TopBP1 ou de Chk1 par Akt, ou s'il s'agit de toute autre chose. Ainsi, construire des lignées exprimant une protéine TopBP1 ou Chk1 non phosphorylable par Akt et voir si cela a un effet sur l'induction de  $\gamma$ H2AX et la GG-NER serait approprié.

Une réalité spécifique aux mélanomes et qui n'a pas été élucidée à ce jour est la prépondérance de la phosphorylation de l'isoforme Akt3 versus celle des deux autres isoformes d'Akt. Des ARNi spécifiques à chaque isoforme pourraient être utilisés pour vérifier l'influence qu'a chacun des isoformes sur la GG-NER et l'activation d'ATR dans les mélanomes. Si les isoformes n'ont pas un rôle équivalent, il serait bien de vérifier leur affinité respective à phosphoryler TopBP1 et les autres protéines pouvant jouer un rôle sur la NER.

Une fois tous ces phénomènes mieux compris et s'il est alors jugé bon que l'on s'y attarde, il pourrait être pertinent de voir si les résultats ici obtenus peuvent être caractéristiques d'une bonne proportion de patients, pouvant ainsi servir de base pronostique à la réponse à un inhibiteur de la phosphorylation d'Akt. Un tel inhibiteur pourrait être utile dans le cadre d'un traitement préventif de certains patients à risque afin d'empêcher une accumulation de mutations oncogéniques. Aussi, utiliser des inhibiteurs de BRAF en synergie avec des inhibiteurs de la phosphorylation d'Akt sur des individus dont les mélanomes ont des mutations activant les voies MAPK et PI3K pourrait s'avérer curatif. En effet, si la voie PI3K joue un rôle dans la mutagenèse (peut-être via la GG-NER et ATR), il n'est pas inapproprié d'espérer que son inhibition limiterait les cas de résistance au traitement qui sont si fréquents avec l'unique utilisation d'un inhibiteur de BRAF (Fedorenko, et al., 2011; Hersey, et al., 2011; Hong & Hong, 2011).

# Bibliographie

- Ackerman, A. B. (1980).** Malignant melanoma A unifying concept: A unifying concept. *The American Journal of Dermatopathology*, **2**(4), 309-314.
- Adams, B. R., Golding, S. E., Rao, R. R., & Valerie, K. (2010).** Dynamic Dependence on ATR and ATM for Double-Strand Break Repair in Human Embryonic Stem Cells and Neural Descendants. *PLoS ONE*, **5**(4), e10001.
- Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., et al. (1996).** Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO (European Molecular Biology Organization) Journal*, **15**(23), 6541-6551.
- Alexandrov, K., Rojas, M., & Satarug, S. (2010).** The critical DNA damage by benzo(a)pyrene in lung tissues of smokers and approaches to preventing its formation. *Toxicology Letters*, **198**(1), 63-68.
- Andersen, P. L., Xu, F., & Xiao, W. (2008).** Eukaryotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA. *Cell Research*, **18**(1), 162-173.
- Araki, M., Masutani, C., Takemura, M., Uchida, A., Sugawara, K., Kondoh, J., et al. (2001).** Centrosome Protein Centrin 2/Caltractin 1 Is Part of the Xeroderma Pigmentosum Group C Complex That Initiates Global Genome Nucleotide Excision Repair. *Journal of Biological Chemistry*, **276**(22), 18665-18672.
- Association canadienne de dermatologie. (2009).** Mélanome. Repéré le 10 juillet 2011 à <http://www.dermatology.ca/french/sap/melanomainfo/index.html>
- Auclair, Y., Rouget, R., Affar, E. B., & Drobetsky, E. A. (2008).** ATR kinase is required for global genomic nucleotide excision repair exclusively during S phase in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**(46), 17896-17901.
- Auclair, Y., Rouget, R., Belisle, J. M., Costantino, S., & Drobetsky, E. A. (2010).** Requirement for functional DNA polymerase eta in genome-wide repair of UV-induced DNA damage during S phase. *DNA Repair*, **9**(7), 754-764.
- Bakkenist, C. J., & Kastan, M. B. (2003).** DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, **421**(6922), 499-506.
- Balk, S. J., the Council on Environmental, H., & Section on, D. (2011).** Ultraviolet Radiation: A Hazard to Children and Adolescents. *Pediatrics*, **127**(3), e791-e817.
- Ball, H. L., Myers, J. S., & Cortez, D. (2005).** ATRIP Binding to Replication Protein A-Single-stranded DNA Promotes ATR-ATRIP Localization but Is Dispensable for Chk1 Phosphorylation. *Molecular Biology of the Cell*, **16**(5), 2372-2381.
- Band, C. J., Posner, B. I., Dumas, V., & Contreres, J.-O. (1997).** Early Signaling Events Triggered by Peroxovanadium [bpV(phen)] Are Insulin Receptor Kinase (IRK)-Dependent: Specificity of Inhibition of IRK-Associated Protein Tyrosine Phosphatase(s) by bpV(phen). *Molecular Endocrinology*, **11**(13), 1899-1910.
- Bartkova, J., Rezaei, N., Lontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., et al. (2006).** Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*, **444**(7119), 633-637.
- Bastian, B. C., LeBoit, P. E., Hamm, H., Bröcker, E.-B., & Pinkel, D. (1998).** Chromosomal Gains and Losses in Primary Cutaneous Melanomas Detected by Comparative Genomic Hybridization. *Cancer Research*, **58**(10), 2170-2175.

- Batista, L. F. Z., Kaina, B., Meneghini, R., & Menck, C. F. M. (2009).** How DNA lesions are turned into powerful killing structures: Insights from UV-induced apoptosis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, **681**(2-3), 197-208.
- Beaumont, K. A., Shekar, S. N., Newton, R. A., James, M. R., Stow, J. L., Duffy, D. L., et al. (2007).** Receptor function, dominant negative activity and phenotype correlations for MC1R variant alleles. *Human Molecular Genetics*, **16**, 2249 - 2260.
- Beeram, M., Patnaik, A., & Rowinsky, E. K. (2005).** Raf: a strategic target for therapeutic development against cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **23**(27), 6771 - 6790.
- Begg, C. B., Orlow, I., Hummer, A. J., Armstrong, B. K., Krickler, A., Marrett, L. D., et al. (2005).** Lifetime Risk of Melanoma in CDKN2A Mutation Carriers in a Population-Based Sample. *Journal of the National Cancer Institute*, **97**(20), 1507-1515.
- Bellacosa, A., Testa, J. R., Moore, R., & Larue, L. (2004).** A Portrait of AKT Kinases: Human Cancer and Animal Models Depict a Family with Strong Individualities. *Cancer Biology & Therapy*, **3**(3), 268-275.
- Besaratinia, A., Synold, T. W., Chen, H.-H., Chang, C., Xi, B., Riggs, A. D., et al. (2005).** DNA lesions induced by UV A1 and B radiation in human cells: Comparative analyses in the overall genome and in the p53 tumor suppressor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**(29), 10058-10063.
- Bisio, A., Nasti, S., Jordan, J. J., Gargiulo, S., Pastorino, L., Provenzani, A., et al. (2010).** Functional analysis of CDKN2A/p16INK4a 5'-UTR variants predisposing to melanoma. *Human Molecular Genetics*, **19**(8), 1479-1491.
- Bollag, G., Hirth, P., Tsai, J., Zhang, J., Ibrahim, P. N., Cho, H., et al. (2010).** Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature*, **467**(7315), 596-599.
- Böni, R., Vortemeyer, A. O., Burg, G., Hofbauer, G., & Zhuang, Z. (1998).** The PTEN tumour suppressor gene and malignant melanoma. *Melanoma Research*, **8**(4), 300-302.
- Bootsma, D., Kraemer, K. H., Cleaver, J. E., & Hoeijmakers, J. H. J. (1998).** Nucleotide excision repair syndromes: xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. Dans B. a. K. In Vogelstein, K.W. (Dir.), *The Genetic Basis of Human Cancer* (pp. 245-274). New York: McGraw-Hill.
- Borel, F., Lacroix, F. B., & Margolis, R. L. (2002).** Prolonged arrest of mammalian cells at the G1/S boundary results in permanent S phase stasis. *Journal of Cell Science*, **115**(14), 2829-2838.
- Brazil, D. P., Park, J., & Hemmings, B. A. (2002).** PKB Binding Proteins: Getting in on the Akt. *Cell*, **111**(3), 293-303.
- Brown, E. J., & Baltimore, D. (2000).** ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes and Development*, **14**(4), 397-402.
- Buschta-Hedayat, N., Buterin, T., Hess, M. T., Missura, M., & Naegeli, H. (1999).** Recognition of nonhybridizing base pairs during nucleotide excision repair of DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**(11), 6090-6095.
- Caldecott, K. W. (2004).** DNA single-strand breaks and neurodegeneration. *DNA Repair*, **3**(8-9), 875-882.
- Campisi, J. (2005).** Senescent Cells, Tumor Suppression, and Organismal Aging: Good Citizens, Bad Neighbors. *Cell*, **120**(4), 513-522.
- Canada, S. (2010).** *Estimations de la population, selon le groupe d'âge et le sexe au 1er juillet, Canada, provinces et territoires, annuel* Ottawa: Statistique Canada. Repéré à <http://www.statcan.gc.ca/pub/91-215-x/91-215-x2011000-fra.pdf>

- Cao, L., Li, W., Kim, S., Brodie, S. G., & Deng, C.-X. (2003). Senescence, aging, and malignant transformation mediated by p53 in mice lacking the Brca1 full-length isoform. *Genes and Development*, *17*(2), 201-213.
- Cardinal, F. (2007, 20 septembre). Les cas de cancers de la peau exploseront d'ici 2015, *La Presse*.
- Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., et al. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, *282*, 1318 - 1321.
- Cartlidge, R. A., Thomas, G. R., Cagnol, S., Jong, K. A., Molton, S. A., Finch, A. J., et al. (2008). Oncogenic BRAFV600E inhibits BIM expression to promote melanoma cell survival. *Pigment Cell & Melanoma Research*, *21*(5), 534-544.
- Carty, M. P., Glynn, M., Maher, M., Smith, T., Yao, J., Dixon, K., et al. (2003). The RAD30 cancer susceptibility gene. *Biochemical Society Transactions*, *31*(1), 252-256.
- Chang, Y.-C., Jan, K.-Y., Cheng, C.-A., Liao, C.-B., & Liu, Y.-C. (2008). Direct involvement of the tumor suppressor p53 in nucleotide excision repair. *DNA Repair*, *7*(5), 751-761.
- Chanoux, R. A., Yin, B., Urtishak, K. A., Asare, A., Bassing, C. H., & Brown, E. J. (2009). ATR and H2AX Cooperate in Maintaining Genome Stability under Replication Stress. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(9), 5994-6003.
- Chaudru, V., Chompret, A., Bressac-de Pailleters, B., Spatz, A., Avri, M. F., & Demenais, F. (2004). Influence of genes, nevi, and sun sensitivity on melanoma risk in a family sample unselected by family history and in melanoma-prone families. *Journal of the National Cancer Institute*, *96*, 785 - 795.
- Chen, Y., & Sanchez, Y. (2004). Chk1 in the DNA damage response: conserved roles from yeasts to mammals. *DNA Repair*, *3*(8-9), 1025-1032.
- Chu, E., & Tarnawski, A. (2004). PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology. *Med Sci Monit*, *10*(10), 235-241.
- Cima, I., Schiess, R., Wild, P., Kaelin, M., Schüffler, P., Lange, V., et al. (2011). Cancer genetics-guided discovery of serum biomarker signatures for diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(8), 3342-3347.
- Cimprich, K. A., & Cortez, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *9*(8), 616-627.
- Cleaver, J. E. (1968). Defective Repair Replication of DNA in Xeroderma Pigmentosum. *Nature*, *218*(5142), 652-656.
- Cleaver, J. E. (1972). Xeroderma pigmentosum: variants with normal DNA repair and normal sensitivity to ultraviolet light. *Journal of Investigative Dermatology*, *58*(3), 124-128.
- Cleaver, J. E., & Revet, I. (2008). Clinical implications of the basic defects in Cockayne syndrome and xeroderma pigmentosum and the DNA lesions responsible for cancer, neurodegeneration and aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, *129*(7-8), 492-497.
- Coleman, W. P., III, Loria, P. R., Reed, R. J., & Kremenz, E. T. (1980). Acral Lentiginous Melanoma. *Archives of Dermatology*, *116*(7), 773-776.
- Coriell institute. (2009). Catalog ID: WC00081. Repéré le 19 juillet 2011 à [http://ccr.coriell.org/Sections/Search/Sample\\_Detail.aspx?Ref=WC00081&PgId=166](http://ccr.coriell.org/Sections/Search/Sample_Detail.aspx?Ref=WC00081&PgId=166)
- Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J., & Elledge, S. J. (2001). ATR and ATRIP: Partners in Checkpoint Signaling. *Science*, *294*(5547), 1713-1716.
- Costa, R. M. A., Chigaças, V., da Silva Galhardo, R., Carvalho, H., & Menck, C. F. M. (2003). The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie*, *85*(11), 1083-1099.



- Costanzo, V., Shechter, D., Lupardus, P. J., Cimprich, K. A., Gottesman, M., & Gautier, J. (2003). An ATR- and Cdc7-Dependent DNA Damage Checkpoint that Inhibits Initiation of DNA Replication. *Molecular Cell*, **11**(1), 203-213.
- Courtois-Cox, S., Jones, S. L., & Cichowski, K. (2008). Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene*, **27**(20), 2801-2809.
- Cruet-Hennequart, S., Gallagher, K., Sokòl, A. M., Villalan, S., Prendergast, Á. M., & Carty, M. P. (2010). DNA Polymerase  $\eta$ , a Key Protein in Translesion Synthesis in Human Cells. Dans H.-P. Nasheuer (Dir.), *Genome Stability and Human Diseases* (Vol. 50, pp. 189-209): Springer Netherlands.
- Crutzen, P. J., & Andreae, M. O. (1990). Biomass Burning in the Tropics: Impact on Atmospheric Chemistry and Biogeochemical Cycles. *Science*, **250**(4988), 1669-1678.
- Curtin, J. A., Fridlyand, J., Kageshita, T., Patel, H. N., Busam, K. J., Kutzner, H., et al. (2005). The Melanoma Molecular Map Project at distinct sets of genetic alterations in melanoma. *New England Journal of Medicine*, **353**, 2135 - 2147.
- Dahia, P. L. M., Aguiar, R. C. T., Alberta, J., Kum, J. B., Caron, S., Sill, H., et al. (1999). PTEN Is Inversely Correlated With the Cell Survival Factor Akt/PKB and Is Inactivated Via Multiple Mechanisms in Haematological Malignancies. *Human Molecular Genetics*, **8**(2), 185-193.
- Datta, S. R., Brunet, A., & Greenberg, M. E. (1999). Cellular survival: A play in three Akts. *Genes and Development*, **13**, 2905 - 2927.
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., et al. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, **417**, 949 - 954.
- Davies, K. J. A. (1999). The Broad Spectrum of Responses to Oxidants in Proliferating Cells: A New Paradigm for Oxidative Stress. *IUBMB Life*, **48**(1), 41-47.
- Davies, M. A., Stemke-Hale, K., Tellez, C., Calderone, T. L., Deng, W., Prieto, V. G., et al. (2008). A novel AKT3 mutation in melanoma tumours and cell lines. *British Journal of Cancer*, **99**(8), 1265-1268.
- de Boer, J., & Hoeijmakers, J. H. J. (2000). Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*, **21**(3), 453-460.
- De Fabo, E. C., Noonan, F. P., Fears, T., & Merlino, G. (2004). Ultraviolet B but not ultraviolet A radiation initiates melanoma. *Cancer Research*, **64**, 6372 - 6376.
- de Feraudy, S., Revet, I., Bezrookove, V., Feeney, L., & Cleaver, J. E. (2010). A minority of foci or pan-nuclear apoptotic staining of  $\gamma$ H2AX in the S phase after UV damage contain DNA double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**(15), 6870-6875.
- Dhawan, P., Singh, A. B., Ellis, D. L., & Richmond, A. (2002). Constitutive Activation of Akt/Protein Kinase B in Melanoma Leads to Up-Regulation of Nuclear Factor- $\kappa$ B and Tumor Progression. *Cancer Research*, **62**(24), 7335-7342.
- Di Micco, R., Sulli, G., Dobreva, M., Liontos, M., Botrugno, O. A., Gargiulo, G., et al. (2011). Interplay between oncogene-induced DNA damage response and heterochromatin in senescence and cancer. *Nature Cell Biology*, **13**(3), 292-302.
- Dong, J., Phelps, R. G., Qiao, R., Yao, S., Benard, O., Ronai, Z., et al. (2003). BRAF oncogenic mutations correlate with progression rather than initiation of human melanoma. *Cancer Research*, **63**(14), 3883 - 3885.
- Donzelli, M., & Draetta, G. F. (2003). Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO (European Molecular Biology Organization) Journal*, **4**(7), 671-677.
- Dworaczek, H., & Xiao, W. (2007). Xeroderma Pigmentosum: A Glimpse into Nucleotide Excision Repair, Genetic Instability, and Cancer. **13**(2), 159-177.

- El Ghissassi, F., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., Bouvard, V., et al. (2009). A review of human carcinogens--Part D: radiation. *The Lancet Oncology*, **10**(8), 751-752.
- Emuss, V., Garnett, M., Mason, C., & Marais, R. (2005). Mutations of C-RAF are rare in human cancer because C-RAF has a low basal kinase activity compared with B-RAF. *Cancer Research*, **65**, 9719 - 9726.
- Eyford, J. E., & Bodvarsdottir, S. K. (2005). Genomic instability and cancer: Networks involved in response to DNA damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **592**(1-2), 18-28.
- Fan, C., He, L., Kapoor, A., Rybak, A., De Melo, J., Cutz, J.-C., et al. (2009). PTEN inhibits BMI1 function independently of its phosphatase activity. *Molecular Cancer*, **8**(1), 98.
- Fedorenko, I. V., Paraiso, K. H. T., & Smalley, K. S. M. (2011). Acquired and intrinsic BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E mutant melanoma. *Biochemical Pharmacology*, **82**(3), 201-209.
- Feldser, D. M., & Greider, C. W. (2007). Short Telomeres Limit Tumor Progression In Vivo by Inducing Senescence. *Cancer Cell*, **11**(5), 461-469.
- Feng, Z., Kachnic, L., Zhang, J., Powell, S. N., & Xia, F. (2004). DNA Damage Induces p53-dependent BRCA1 Nuclear Export. *Journal of Biological Chemistry*, **279**(27), 28574-28584.
- Fernandez, A. A., Garcia, R., Paniker, L., Trono, D., & Mitchell, D. L. (2011). An Experimental Population Study of Nucleotide Excision Repair as a Risk Factor for UVB-induced Melanoma. *Photochemistry and Photobiology*, **87**(2), 335-341.
- Finley, J. W., Kong, A.-N., Hintze, K. J., Jeffery, E. H., Ji, L. L., & Lei, X. G. (2011). Antioxidants in Foods: State of the Science Important to the Food Industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, null-null.
- Flaherty, K. T., Puzanov, I., Kim, K. B., Ribas, A., McArthur, G. A., Sosman, J. A., et al. (2010). Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine*, **363**(9), 809-819.
- Forman, S. B., Ferringer, T. C., Peckham, S. J., Dalton, S. R., Sasaki, G. T., Libow, L. F., et al. (2008). Is superficial spreading melanoma still the most common form of malignant melanoma? *Journal of the American Academy of Dermatology*, **58**(6), 1013-1020.
- Friedberg, E. C. (1996). Relationships Between DNA Repair and Transcription. *Annual Review of Biochemistry*, **65**(1), 15-42.
- Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W., Wood, R. D., Schultz, R. A., & Ellenberger, T. (2006). *DNA Repair and Mutagenesis*. (2<sup>e</sup> éd.). Washington, DC: ASM Press.
- Fuss, J. O., & Tainer, J. A. (2011). XPB and XPD helicases in TFIIH orchestrate DNA duplex opening and damage verification to coordinate repair with transcription and cell cycle via CAK kinase. *DNA Repair, In Press, Corrected Proof*.
- Gaddameedhi, S., Kemp, M. G., Reardon, J. T., Shields, J. M., Smith-Roe, S. L., Kaufmann, W. K., et al. (2010). Similar Nucleotide Excision Repair Capacity in Melanocytes and Melanoma Cells. *Cancer Research*, **70**(12), 4922-4930.
- Garland, C., Garland, F., & Gorham, E. (2003). Epidemiologic evidence for different roles of ultraviolet A and B radiation in melanoma mortality rates. *Annals of Epidemiology*, **13**, 395 - 404.
- Gatei, M., Sloper, K., Sørensen, C., Syljuäsen, R., Falck, J., Hobson, K., et al. (2003). Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent Phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in Response to Ionizing Radiation. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(17), 14806-14811.

- Gatei, M., Zhou, B.-B., Hobson, K., Scott, S., Young, D., & Khanna, K. K. (2001).** Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) Kinase and ATM and Rad3 Related Kinase Mediate Phosphorylation of Brca1 at Distinct and Overlapping Sites. *Journal of Biological Chemistry*, **276**(20), 17276-17280.
- Goldstein, A. M., Landi, M. T., Tsang, S., Fraser, M. C., Munroe, D. J., & Tucker, M. A. (2005).** Association of MC1R Variants and Risk of Melanoma in Melanoma-Prone Families with CDKN2A Mutations. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, **14**(9).
- Goodhead, D. (1989).** The initial physical damage produced by ionizing radiations. *International journal of radiation biology*, **56**(5), 623-634.
- Gottlieb, T. M., Leal, J. F., Seger, R., Taya, Y., & Oren, M. (2002).** Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene*, **21**, 1299 - 1303.
- Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T. E., Mann, M., et al. (1997).** Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature*, **388**(6641), 492-495.
- Green, C. M., & Lehmann, A. R. (2005).** Translesion Synthesis And Errorprone Polymerases. Dans N. Back, I. R. Cohen, D. Kritchovsky, A. Lajtha, R. Paoletti & E. A. Nigg (Dir.), *Genome Instability in Cancer Development* (Vol. 570, pp. 199-223): Springer Netherlands.
- Greene, V. R., Johnson, M. M., Grimm, E. A., & Ellerhorst, J. A. (2009).** Frequencies of NRAS and BRAF mutations increase from the radial to the vertical growth phase in cutaneous melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*, **129**, 1483 - 1488.
- Gursoy-Yuzugullu, O., Yuzugullu, H., Yilmaz, M., & Ozturk, M. (2011).** Aflatoxin genotoxicity is associated with a defective DNA damage response bypassing p53 activation. *Liver International*, **31**(4), 561-571.
- Guza, R., Ma, L., Fang, Q., Pegg, A. E., & Tretyakova, N. (2009).** Cytosine Methylation Effects on the Repair of O6-Methylguanines within CG Dinucleotides. *Journal of Biological Chemistry*, **284**(34), 22601-22610.
- Halicka, H. D., Huang, X., Traganos, F., King, M. A., Dai, W., & Darzynkiewicz, Z. (2005).** Histone H2AX Phosphorylation after Cell Irradiation with UV-B: Relationship to Cell Cycle Phase and Induction of Apoptosis. *Cell Cycle*, **4**(2), 338-344.
- Hanasoge, S., & Ljungman, M. (2007).** H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase. *Carcinogenesis*, **28**(11), 2298-2304.
- Haracska, L., Acharya, N., Unk, I., Johnson, R. E., Hurwitz, J., Prakash, L., et al. (2005).** A Single Domain in Human DNA Polymerase {iota} Mediates Interaction with PCNA: Implications for Translesion DNA Synthesis. *Molecular and Cellular Biology*, **25**(3), 1183-1190.
- Haracska, L., Johnson, R. E., Unk, I., Phillips, B., Hurwitz, J., Prakash, L., et al. (2001).** Physical and Functional Interactions of Human DNA Polymerase {eta} with PCNA. *Molecular and Cellular Biology*, **21**(21), 7199-7206.
- Harbour, J. W., & Dean, D. C. (2000).** The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes and Development*, **14**(19), 2393-2409.
- Hashimoto, S., & Egly, J. M. (2009).** Trichothiodystrophy view from the molecular basis of DNA repair/transcription factor TFIIH. *Human Molecular Genetics*, **18**(R2), R224-R230.
- Henning, K. A., Li, L., Iyer, N., McDaniel, L. D., Reagan, M. S., Legerski, R., et al. (1995).** The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIH. *Cell*, **82**(4), 555-564.

- Hentosh, P., Benjamin, T., Hall, L., Leap, S., Loescher, J., Poyner, E., et al. (2011). Xeroderma pigmentosum variant: Complementary molecular approaches to detect a 13 base pair deletion in the DNA polymerase eta gene. *Experimental and Molecular Pathology*, *91*(2), 528-533.
- Hersey, P., Smalley, K. S. M., Weeraratna, A., Bosenberg, M., Zhang, X. D., Haass, N. K., et al. (2011). Meeting report from the 7th International Melanoma Congress, Sydney, November, 2010. *Pigment Cell & Melanoma Research*, *24*(1), e1-e15.
- Hill, G. J. n., Metter, G. E., Kremenz, E. T., Fletcher, W. S., Golomb, F. M., Ramirez, G., et al. (1979). DTIC and combination therapy for melanoma. II. Escalating schedules of DTIC with BCNU, CCNU, and vincristine. *Cancer Treatment Reports*, *63*(11-12), 1989-1992.
- Hiom, K. (2010). Coping with DNA double strand breaks. *DNA Repair*, *9*(12), 1256-1263.
- Hirai, H., Sootome, H., Nakatsuru, Y., Miyama, K., Taguchi, S., Tsujioka, K., et al. (2010). MK-2206, an Allosteric Akt Inhibitor, Enhances Antitumor Efficacy by Standard Chemotherapeutic Agents or Molecular Targeted Drugs In vitro and In vivo. *Molecular Cancer Therapeutics*, *9*(7), 1956-1967.
- Hoeijmakers, J. H. J. (2009). DNA Damage, Aging, and Cancer. *New England Journal of Medicine*, *361*(15), 1475-1485.
- Hollander, M. C., Blumenthal, G. M., & Dennis, P. A. (2011). PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. *Nature Reviews Cancer*, *11*(4), 289-301.
- Hong, S., & Hong, S. (2011). Overcoming metastatic melanoma with BRAF inhibitors. *Archives of Pharmacal Research*, *34*(5), 699-701.
- Hsieh, P., & Yamane, K. (2008). DNA mismatch repair: Molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, *129*(7-8), 391-407.
- Hsieh, R., Firmiano, A., & Sotto, M. N. (2009). Expression of p16 protein in acral lentiginous melanoma. *International Journal of Dermatology*, *48*(12), 1303-1307.
- Hurley, P. J., & Bunz, F. (2007). ATM and ATR: Components of an Integrated Circuit. *Cell Cycle*, *6*(4), 414-417.
- Hurley, P. J., Wilsker, D., & Bunz, F. (2006). Human cancer cells require ATR for cell cycle progression following exposure to ionizing radiation. *Oncogene*, *26*(18), 2535-2542.
- Hurt, M. A. (2008). Types of melanoma? *Journal of the American Academy of Dermatology*, *58*(6), 1059-1060.
- Iliakis, G., Wu, W., Wang, M., Terzoudi, G., & Pantelias, G. (2007). Backup Pathways of Nonhomologous End Joining May Have a Dominant Role in the Formation of Chromosome Aberrations. Dans G. Obe & Vijayalaxmi (Dir.), *Chromosomal Alterations* (pp. 67-85): Springer Berlin Heidelberg.
- Jacquillat, C., Khayat, D., Banzet, P., Weil, M., Fumoleau, P., Avril, M. F., et al. (1990). Final report of the French multicenter phase II study of the nitrosourea fotemustine in 153 evaluable patients with disseminated malignant melanoma including patients with cerebral metastases. *Cancer*, *66*(9), 1873-1878.
- Jang, K., Kim, M., Seo, H.-S., & Shin, I. (2010). PTEN sensitizes MDA-MB-468 cells to inhibition of MEK/Erk signaling for the blockade of cell proliferation. *Oncology Reports*, *24*(3), 787-793.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., et al. (2008). Cancer Statistics, 2008. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *58*(2), 71-96.
- Jiang, B., & Liu, L. (2009). Chapter 2 PI3K/PTEN Signaling in Angiogenesis and Tumorigenesis. Dans F. V. W. George & K. George (Dir.), *Advances in Cancer Research* (Vol. Volume 102, pp. 19-65): Academic Press.

- Johnson, R. E., Washington, M. T., Haracska, L., Prakash, S., & Prakash, L. (2000).** Eukaryotic polymerases [iota] and [zeta] act sequentially to bypass DNA lesions. *Nature*, **406**(6799), 1015-1019.
- Kainov, D. E., Vitorino, M., Cavarelli, J., Poterszman, A., & Egly, J.-M. (2008).** Structural basis for group A trichothiodystrophy. *Nature Structural & Molecular Biology*, **15**(9), 980-984.
- Kang, S. S., Kwon, T., Kwon, D. Y., & Do, S. I. (1999).** Akt Protein Kinase Enhances Human Telomerase Activity through Phosphorylation of Telomerase Reverse Transcriptase Subunit. *Journal of Biological Chemistry*, **274**(19), 13085-13090.
- Kannouche, P. L., & Lehmann, A. R. (2004).** Ubiquitination of PCNA and the Polymerase Switch in Human Cells. *Cell Cycle*, **3**(8), 1009-1011.
- Kasper, B., D'Hondt, V., Vereecken, P., & Awada, A. (2007).** Novel treatment strategies for malignant melanoma: A new beginning? *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **62**(1), 16-22.
- Kass, E. M., & Jasin, M. (2010).** Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS Letters*, **584**(17), 3703-3708.
- Kerr, P., & Ashworth, A. (2001).** New complexities for BRCA1 and BRCA2. *Current Biology*, **11**(16), R668-R676.
- Kerzendorfer, C., & O'Driscoll, M. (2009).** Human DNA damage response and repair deficiency syndromes: Linking genomic instability and cell cycle checkpoint proficiency. *DNA Repair*, **8**(9), 1139-1152.
- Kim, J.-K., Patel, D., & Choi, B.-S. (1995).** Contrasting structural impacts induced by cis-syn cyclobutane dimer and (6-4) adduct in DNA duplex decamers: implication in mutagenesis and repair activity. *Photochemistry and Photobiology*, **62**(1), 44-50.
- Kinner, A., Wu, W., Staudt, C., & Iliakis, G. (2008).** Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Research*, **36**(17), 5678-5694.
- Koehler, D. R., & Hanawalt, P. C. (1996).** Recruitment of Damaged DNA to the Nuclear Matrix in Hamster Cells Following Ultraviolet Irradiation. *Nucleic Acids Research*, **24**(15), 2877-2884.
- Kong, Y., Cui, H., Ramkumar, C., & Zhang, H. (2011).** Regulation of Senescence in Cancer and Aging. *Journal of Aging Research*, **2011**, 15.
- Kornberg, A., & Baker, T. (1992).** *DNA Replication*. New York, NY: W.H. Freeman and Co.
- Koul, D. (2008).** PTEN Signaling pathways in glioblastoma. *Cancer Biology & Therapy*, **7**(9), 1321-1325.
- Kraemer, K. H. (1997).** Sunlight and skin cancer: Another link revealed. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**(1), 11-14.
- Kraemer, K. H., Lee, M. M., & Scotto, J. (1984).** DNA repair protects against cutaneous and internal neoplasia: evidence from xeroderma pigmentosum. *Carcinogenesis*, **5**(4), 511-514.
- Kricker, A., Armstrong, B., Goumas, C., Litchfield, M., Begg, C., Hummer, A., et al. (2007).** Ambient UV, personal sun exposure and risk of multiple primary melanomas. *Cancer Causes and Control*, **18**(3), 295-304.
- Kumagai, A., Lee, J., Yoo, H. Y., & Dunphy, W. G. (2006).** TopBP1 Activates the ATR-ATRIP Complex. *Cell*, **124**(5), 943-955.
- Kumagai, A., Namba, H., Takakura, S., Inamasu, E., Saenko, V. A., Ohtsuru, A., et al. (2006).** No Evidence of ARAF, CRAF and MET Mutations in BRAFT1799A Negative Human Papillary Thyroid Carcinoma. *Endocrine Journal*, **53**(5), 615-620.

- Kwon, T., Kwon, D. Y., Chun, J., Kim, J. H., & Kang, S. S. (2000).** Akt Protein Kinase Inhibits Rac1-GTP Binding through Phosphorylation at Serine 71 of Rac1. *Journal of Biological Chemistry*, **275**(1), 423-428.
- Laga, A. C., & Murphy, G. F. (2010).** Cellular Heterogeneity in Vertical Growth Phase Melanoma. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, **134**(12), 1750-1757.
- Lahtz, C., Stranzenbach, R., Fiedler, E., Helmbold, P., & Dammann, R. H. (2009).** Methylation of PTEN as a Prognostic Factor in Malignant Melanoma of the Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, **130**(2), 620-622.
- Lai, J. P., Dalton, J. T., & Knoell, D. L. (2007).** Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten (PTEN) as a molecular target in lung epithelial wound repair. *British Journal of Pharmacology*, **152**(8), 1172-1184.
- Lam, M. H., & Rosen, J. M. (2004).** Chk1 versus Cdc25: Chking One's Levels of Cellular Proliferation. *Cell Cycle*, **3**(11), 1355-1357.
- Lambert, W. C., Gagna, C. E., & Lambert, M. W. (2010).** Trichothiodystrophy: Photosensitive, TTD-P, TTD, Tay Syndrome. Dans S. I. Ahmad (Dir.), *Diseases of DNA Repair*. Nottingham, England: Nottingham Trent University.
- Lavin, M. F., & Shiloh, Y. (1997).** The genetic defect in Ataxia-Telangiectasia. *Annual Review of Immunology*, **15**(1), 177-202.
- Lee, J. W., Soung, Y. H., Kim, S. Y., Park, W. S., Nam, S. W., Min, W. S., et al. (2005).** Mutational analysis of the ARAF gene in human cancers. *APMIS*, **113**, 54 - 57.
- Leng, S., Bernauer, A., Stidley, C. A., Picchi, M. A., Sheng, X., Frasco, M. A., et al. (2008).** Association between Common Genetic Variation in Cockayne Syndrome A and B Genes and Nucleotide Excision Repair Capacity among Smokers. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, **17**(8), 2062-2069.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S. I., et al. (1997).** PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, **275**, 1943 - 1947.
- Li, L., Dutra, A., Pak, E., Labrie, J. E., Gerstein, R. M., Pandolfi, P. P., et al. (2009).** EGFRVIII expression and PTEN loss synergistically induce chromosomal instability and glial tumors. *Neuro-oncology*, **11**(1), 9-21.
- Li, L., & Ross, A. H. (2007).** Why is PTEN an important tumor suppressor? *Journal of Cellular Biochemistry*, **102**(6), 1368-1374.
- Lieber, M. R. (2008).** The Mechanism of Human Nonhomologous DNA End Joining. *Journal of Biological Chemistry*, **283**(1), 1-5.
- Lindahl, T. (1993).** Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, **362**(6422), 709-715.
- Lindgren, A. G., Natsuhara, K., Tian, E., Vincent, J. J., Li, X., Jiao, J., et al. (2011).** Loss of Pten Causes Tumor Initiation Following Differentiation of Murine Pluripotent Stem Cells Due to Failed Repression of Nanog. *PLoS ONE*, **6**(1), e16478.
- Lindsley, C. W. (2010).** The Akt/PKB Family of Protein Kinases: A Review of Small Molecule Inhibitors and Progress Towards Target Validation: A 2009 Update. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **10**, 458-477.
- Liu, K., Paik, J. C., Wang, B., Lin, F.-T., & Lin, W.-C. (2006).** Regulation of TopBP1 oligomerization by Akt/PKB for cell survival. *EMBO Journal*, **25**(20), 4795-4807.
- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.-S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., et al. (2000).** Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G2/M DNA damage checkpoint. *Genes and Development*, **14**(12), 1448-1459.

- Liu, X., Yao, J., Pisha, E., Yang, Y., Hua, Y., van Breemen, R. B., et al. (2002). Oxidative DNA Damage Induced by Equine Estrogen Metabolites: Role of Estrogen Receptor  $\alpha$ . *Chemical Research in Toxicology*, **15**(4), 512-519.
- López-Contreras, A. J., & Fernandez-Capetillo, O. (2010). The ATR barrier to replication-born DNA damage. *DNA Repair*, **9**(12), 1249-1255.
- Madhunapantula, S. V., & Robertson, G. P. (2009). The PTEN–AKT3 signaling cascade as a therapeutic target in melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research*, **22**(4), 400-419.
- Marais, R., Light, Y., Paterson, H. F., Mason, C. S., & Marshall, C. J. (1997). Differential Regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by Oncogenic Ras and Tyrosine Kinases. *Journal of Biological Chemistry*, **272**(7), 4378-4383.
- Matsuoka, S., Ballif, B. A., Smogorzewska, A., McDonald, E. R., Hurov, K. E., Luo, J., et al. (2007). ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage. *Science*, **316**(5828), 1160-1166.
- Maya, R., Balass, M., Kim, S.-T., Shkedy, D., Leal, J.-F. M., Shifman, O., et al. (2001). ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes and Development*, **15**(9), 1067-1077.
- Mayo, L. D., & Donner, D. B. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**, 11598 - 11603.
- McCulloch, S. D., & Kunkel, T. A. (2008). The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases. *Cell Research*, **18**(1), 148-161.
- McDonald, J. P., Frank, E. G., Plosky, B. S., Rogozin, I. B., Masutani, C., Hanaoka, F., et al. (2003). 129-derived Strains of Mice Are Deficient in DNA Polymerase  $\epsilon$  and Have Normal Immunoglobulin Hypermutation. *The Journal of Experimental Medicine*, **198**(4), 635-643.
- McGovern, V. J., Mihm, M. C., Bailly, C., Booth, J. C., Clark, W. H., Cochran, A. J., et al. (1973). The classification of malignant melanoma and its histologic reporting. *Cancer*, **32**(6), 1446-1457.
- McNeely, S., Conti, C., Sheikh, T., Patel, H., Zabludoff, S., Pommier, Y. G., et al. (2010). Chk1 inhibition after replicative stress activates a double strand break response mediated by ATM and DNA-dependent protein kinase. *Cell Cycle*, **9**(5), 995-1004.
- Meyle, K., & Guldberg, P. (2009). Genetic risk factors for melanoma. *Human Genetics*, **126**(4), 499-510.
- Mimitou, E. P., & Symington, L. S. (2009). Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. *Trends in Biochemical Sciences*, **34**(5), 264-272.
- Mironov, N., Jansen, L. A. M., Zhu, W. B., Aguelon, A. M., Reguer, G., & Yamasaki, H. (1999). A novel sensitive method to detect frameshift mutations in exonic repeat sequences of cancer-related genes. *Carcinogenesis*, **20**(11), 2189-2192.
- Mitchell, D. L. (1988). The relative cytotoxicity of 6-4 photoproducts and cyclobutane dimers in mammalian cells. *Photochemistry and Photobiology*, **48**(1), 51-57.
- Mitchell, D. L., Jen, J., & Cleaver, J. E. (1992). Sequence specificity of cyclobutane pyrimidine dimers in DNA treated with solar (ultraviolet B) radiation. *Nucleic Acids Research*, **20**(2), 225-229.
- Moan, J., Dahlback, A., & Setlow, R. B. (1999). Epidemiological support for an hypothesis for melanoma induction indicating a role for UVA radiation. *Photochemistry and Photobiology*, **70**, 243 - 247.
- Moser, J., Kool, H., Giakzidis, I., Caldecott, K., Mullenders, L. H. F., & Foustari, M. I. (2007). Sealing of Chromosomal DNA Nicks during Nucleotide Excision Repair Requires XRCC1

- and DNA Ligase III[alpha] in a Cell-Cycle-Specific Manner. *Molecular Cell*, **27**(2), 311-323.
- Mouawad, R., Sebert, M., Michels, J., Bloch, J., Spano, J.-P., & Khayat, D. (2010).** Treatment for metastatic malignant melanoma: Old drugs and new strategies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **74**(1), 27-39.
- Mu, D., & Sancar, A. (1997).** Model for XPC-independent Transcription-coupled Repair of Pyrimidine Dimers in Humans. *Journal of Biological Chemistry*, **272**(12), 7570-7573.
- Mukherjee, S., Ridgeway, A., & Lamb, D. J. (2010).** DNA mismatch repair and infertility. *Current Opinion in Urology*, **20**(6), 525-532.
- Murga, M., Bunting, S., Montana, M. F., Soria, R., Mulero, F., Canamero, M., et al. (2009).** A mouse model of ATR-Seckel shows embryonic replicative stress and accelerated aging. *Nature Genetics*, **41**(8), 891-898.
- Nam, E. A., & Cortez, D. (2011).** ATR signalling: more than meeting at the fork. *Biochemical Journal*, **436**(3), 527-536.
- Nance, M. A., & Berry, S. A. (1992).** Cockayne syndrome: review of 140 cases. *American Journal of Medical Genetics*, **42**(1), 68-84.
- Navaraj, A., Mori, T., & El-Deiry, W. (2005).** Cooperation between BRCA1 and p53 in repair of cyclobutane pyrimidine dimers. *Cancer Biology & Therapy*, **4**(12), 1409-1414.
- Nelson, A. A., & Tsao, H. (2009).** Melanoma and genetics. *Clinics in Dermatology*, **27**(1), 46-52.
- Nogueira, C., Kim, K. H., Sung, H., Paraiso, K. H. T., Dannenberg, J. H., Bosenberg, M., et al. (2010).** Cooperative interactions of PTEN deficiency and RAS activation in melanoma metastasis. *Oncogene*, **29**(47), 6222-6232.
- Nouspikel, T. (2009).** DNA Repair in Mammalian Cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **66**(6), 994-1009.
- O'Donovan, A., Davies, A. A., Moggs, J. G., West, S. C., & Wood, R. D. (1994).** XPG endonuclease makes the 3[prime] incision in human DNA nucleotide excision repair. *Nature*, **371**(6496), 432-435.
- O'Driscoll, M., Gennery, A. R., Seidel, J., Concannon, P., & Jeggo, P. A. (2004).** An overview of three new disorders associated with genetic instability: LIG4 syndrome, RS-SCID and ATR-Seckel syndrome. *DNA Repair*, **3**(8-9), 1227-1235.
- O'Driscoll, M., & Jeggo, P. A. (2006).** The role of double-strand break repair [mdash] insights from human genetics. *Nature Reviews Genetics*, **7**(1), 45-54.
- O'Driscoll, M., Ruiz-Perez, V. L., Woods, C. G., Jeggo, P. A., & Goodship, J. A. (2003).** A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nature Genetics*, **33**(4), 497-501.
- Oakley, G. G., Patrick, S. M., Yao, J., Carty, M. P., Turchi, J. J., & Dixon, K. (2003).** RPA Phosphorylation in Mitosis Alters DNA Binding and Protein-Protein Interactions†. *Biochemistry*, **42**(11), 3255-3264.
- Odom, R., James, W., & Berger, T. (2000).** Melanocytic nevi and neoplasms. Dans B. T. James WD, Elston D (Dir.), *Andrew's Diseases of the Skin: Clinical Dermatology* (9<sup>e</sup> éd., pp. 881-889). Philadelphia: WB Saunders.
- Ohashi, E., Murakumo, Y., Kanjo, N., Akagi, J.-i., Masutani, C., Hanaoka, F., et al. (2004).** Interaction of hREV1 with three human Y-family DNA polymerases. *Genes to Cells*, **9**(6), 523-531.
- Ohkumo, T., Kondo, Y., Yokoi, M., Tsukamoto, T., Yamada, A., Sugimoto, T., et al. (2006).** UV-B Radiation Induces Epithelial Tumors in Mice Lacking DNA Polymerase {eta} and Mesenchymal Tumors in Mice Deficient for DNA Polymerase {iota}. *Molecular and Cellular Biology*, **26**(20), 7696-7706.



- Ohnishi, T., Mori, E., & Takahashi, A. (2009).** DNA double-strand breaks: Their production, recognition, and repair in eukaryotes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **669**(1-2), 8-12.
- Oksenyich, V., & Coin, F. (2010).** The long unwinding road: XPB and XPD helicases in damaged DNA opening. *Cell Cycle*, **9**(1), 90-96.
- Olson, E., Nievera, C. J., Klimovich, V., Fanning, E., & Wu, X. (2006).** RPA2 Is a Direct Downstream Target for ATR to Regulate the S-phase Checkpoint. *Journal of Biological Chemistry*, **281**(51), 39517-39533.
- Omholt, K., Krockel, D., Ringborg, U., & Hansson, J. (2006).** Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma. *Melanoma Research*, **16**, 197 - 200.
- Orlow, I., Begg, C. B., Cotignola, J., Roy, P., Hummer, A. J., Clas, B. A., et al. (2007).** CDKN2A Germline Mutations in Individuals with Cutaneous Malignant Melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*, **127**(5), 1234-1243.
- Palmieri, G., Capone, M., Ascierto, M., Gentilcore, G., Stroncek, D., Casula, M., et al. (2009).** Main roads to melanoma. *Journal of Translational Medicine*, **7**(1), 86.
- Palmieri, G., Casula, M., Sini, M. C., Ascierto, P. A., & Cossu, A. (2007).** Issues affecting molecular staging in the management of patients with melanoma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **11**, 1052 - 1068.
- Paraiso, K. H. T., Xiang, Y., Rebecca, V. W., Abel, E. V., Chen, Y. A., Munko, A. C., et al. (2011).** PTEN Loss Confers BRAF Inhibitor Resistance to Melanoma Cells through the Suppression of BIM Expression. *Cancer Research*, **71**(7), 2750-2760.
- Park, M.-J., Kim, M.-S., Park, I.-C., Kang, H.-S., Yoo, H., Park, S. H., et al. (2002).** PTEN Suppresses Hyaluronic Acid-induced Matrix Metalloproteinase-9 Expression in U87MG Glioblastoma Cells through Focal Adhesion Kinase Dephosphorylation. *Cancer Research*, **62**(21), 6318-6322.
- Pavlov, Y. I., Minnick, D. T., Izuta, S., & Kunkel, T. A. (1994).** DNA Replication Fidelity with 8-Oxodeoxyguanosine Triphosphate. *Biochemistry*, **33**(15), 4695-4701.
- Pedram, A., Razandi, M., Evinger, A. J., Lee, E., & Levin, E. R. (2009).** Estrogen Inhibits ATR Signaling to Cell Cycle Checkpoints and DNA Repair. *Molecular Biology of the Cell*, **20**(14), 3374-3389.
- Peng, C.-Y., Graves, P. R., Thoma, R. S., Wu, Z., Shaw, A. S., & Piwnicka-Worms, H. (1997).** Mitotic and G2 Checkpoint Control: Regulation of 14-3-3 Protein Binding by Phosphorylation of Cdc25C on Serine-216. *Science*, **277**(5331), 1501-1505.
- Petermann, E., & Caldecott, K. W. (2006).** Evidence That the ATR/Chk1 Pathway Maintains Normal Replication Fork Progression during Unperturbed S Phase. *Cell Cycle*, **5**(19), 2203-2209.
- Pfeiffer, P., Goedecke, W., & Obe, G. (2000).** Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis*, **15**(4), 289-302.
- Pichierri, P., & Rosselli, F. (2004).** The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR-CHK1 and ATR-NBS1-FANCD2 pathways. *EMBO Journal*, **23**(5), 1178-1187.
- Porras, B. H., & Cockerell, C. J. (1997).** Cutaneous malignant melanoma: Classification and clinical diagnosis. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, **16**(2), 88-96.
- Pritchard, C. A., Samuels, M. L., Bosch, E., & McMahon, M. (1995).** Conditionally oncogenic forms of the A-Raf and B-Raf protein kinases display different biological and biochemical properties in NIH 3T3 cells. *Molecular and Cellular Biology*, **15**, 6430 - 6442.
- Puc, J., Keniry, M., Li, H. S., Pandita, T. K., Choudhury, A. D., Memeo, L., et al. (2005).** Lack of PTEN sequesters CHK1 and initiates genetic instability. *Cancer Cell*, **7**(2), 193-204.

- Puc, J., & Parsons, R. (2005).** PTEN Loss Inhibits CHK1 to Cause Double Stranded-DNA Breaks in Cells. *Cell Cycle*, **4**(7), 927-929.
- Qian, Y., & Chen, X. (2010).** Tumor suppression by p53: making cells senescent. *Histology and Histopathology*, **25**(5), 515-526.
- Qingyong, C., Chunyou, W., Daoda, C., Jianying, C., Chunfang, J., & Hai, Z. (2006).** Construction and expression of human PTEN tumor suppressor gene recombinant adenovirus vector. *Journal of Huazhong University of Science and Technology -- Medical Sciences --*, **26**(3), 325-328.
- Quelle, D. E., Zindy, F., Ashmun, R. A., & Sherr, C. J. (1995).** Alternative reading frames of INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell*, **83**, 993 - 1000.
- Raimondi, S., Sera, F., Gandini, S., Iodice, S., Caini, S., Maisonneuve, P., et al. (2008).** MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: a meta-analysis. *International Journal of Cancer*, **122**, 2753 - 2760.
- Rass, K., & Reichrath, J. (2008).** UV Damage and DNA Repair in Malignant Melanoma and Nonmelanoma Skin Cancer. Dans J. Reichrath (Dir.), *Sunlight, Vitamin D and Skin Cancer* (Vol. 624, pp. 162-178): Springer New York.
- Reinhardt, H. C., & Yaffe, M. B. (2009).** Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Current Opinion in Cell Biology*, **21**(2), 245-255.
- Revet, I., Feeney, L., Bruguera, S., Wilson, W., Dong, T. K., Oh, D. H., et al. (2011).** Functional relevance of the histone  $\gamma$ H2AX in the response to DNA damaging agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**(21), 8663-8667.
- Richard, D. J., Bolderson, E., Cubeddu, L., Wadsworth, R. I. M., Savage, K., Sharma, G. G., et al. (2008).** Single-stranded DNA-binding protein hSSB1 is critical for genomic stability. *Nature*, **453**(7195), 677-681.
- Ridley, A. J. (2006).** Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends in Cell Biology*, **16**(10), 522-529.
- Rivers, J. K. (2004).** Is there more than one road to melanoma? *The Lancet*, **363**(9410), 728-730.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., & Bonner, W. M. (1998).** DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *Journal of Biological Chemistry*, **273**(10), 5858-5868.
- Roos, W. P., & Kaina, B. (2006).** DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in Molecular Medicine*, **12**(9), 440-450.
- Rouget, R., Auclair, Y., Loignon, M., Affar, E. B., & Drobetsky, E. A. (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. *Journal of Biological Chemistry*, **283**(9), 5533-5541.
- Saida, T. (2001).** Recent advances in melanoma research. *Journal of Dermatological Science*, **26**(1), 1-13.
- San Filippo, J., Sung, P., & Klein, H. (2008).** Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination. *Annual Review of Biochemistry*, **77**(1), 229-257.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K., & Linn, S. (2004).** Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*, **73**(1), 39-85.

- Sandovici, I., Buhusi, M. C., Stoica, O., & Covic, M. (2002).** DNA repair pathways and their involvement in human diseases. *Medical-surgical journal of the Society of Physicians and Naturalists, Iași*, **107**(2), 247-257.
- Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite, L., et al. (1995).** A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science*, **268**(5218), 1749-1753.
- Scherer, D., & Kumar, R. (2010).** Genetics of pigmentation in skin cancer -- A review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, **705**(2), 141-153.
- Schuch, A. P., & Menck, C. F. M. (2010).** The genotoxic effects of DNA lesions induced by artificial UV-radiation and sunlight. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **99**(3), 111-116.
- Seeberg, E., Eide, L., & Bjørås, M. (1995).** The base excision repair pathway. *Trends in Biochemical Sciences*, **20**(10), 391-397.
- Sensi, M., Nicolini, G., Petti, C., Bersani, I., Lozupone, F., Molla, A., et al. (2006).** Mutually exclusive N-RasQ61R and BRAF V600E mutations at the single-cell level in the same human melanoma. *Oncogene*, **25**, 3357 - 3364.
- Setlow, R. B. (1974).** The Wavelengths in Sunlight Effective in Producing Skin Cancer: A Theoretical Analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **71**(9), 3363-3366.
- Seviour, E. G., & Lin, S.-Y. (2010).** The DNA damage response: Balancing the scale between cancer and ageing. *Aging*, **2**(12), 900-907.
- Shell, S. M., Li, Z., Shkriabai, N., Kvaratskhelia, M., Brosey, C., Serrano, M. A., et al. (2009).** Checkpoint Kinase ATR Promotes Nucleotide Excision Repair of UV-induced DNA Damage via Physical Interaction with Xeroderma Pigmentosum Group A. *Journal of Biological Chemistry*, **284**(36), 24213-24222.
- Shepherd, C., Puzanov, I., & Sosman, J. (2010).** B-RAF Inhibitors: An Evolving Role in the Therapy of Malignant Melanoma. *Current Oncology Reports*, **12**(3), 146-152.
- Shieh, S.-Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y., & Prives, C. (2000).** The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes and Development*, **14**(3), 289-300.
- Shinozaki, T., Nota, A., Taya, Y., & Okamoto, K. (2003).** Functional role of Mdm2 phosphorylation by ATR in attenuation of p53 nuclear export. *Oncogene*, **22**(55), 8870-8880.
- Shivji, M. K. K., Kenny, M. K., & Wood, R. D. (1992).** Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell*, **69**(2), 367-374.
- Shrivastav, M., De Haro, L. P., & Nickoloff, J. A. (2008).** Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Research*, **18**(1), 134-147.
- Sikora, E., Arendt, T., Bennett, M., & Narita, M. (2011).** Impact of cellular senescence signature on ageing research. *Ageing Research Reviews*, **10**(1), 146-152.
- Simpson, L. J., & Sale, J. E. (2003).** Rev1 is essential for DNA damage tolerance and non-templated immunoglobulin gene mutation in a vertebrate cell line. *EMBO Journal*, **22**(7), 1654-1664.
- Slipicevic, A., Holm, R., Nguyen, M. T. P., Bøhler, P. J., Davidson, B., & Flørenes, V. A. (2005).** Expression of Activated Akt and PTEN in Malignant Melanomas. *American Journal of Clinical Pathology*, **124**(4), 528-536.
- Slyskova, J., Naccarati, A., Polakova, V., Pardini, B., Vodickova, L., Stetina, R., et al. (2011).** DNA damage and nucleotide excision repair capacity in healthy individuals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, n/a-n/a.

- Smalley, K. S. M. (2003).** A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? *International Journal of Cancer*, **104**(5), 527-532.
- Smith, J., Mun Tho, L., Xu, N., & Gillespie, D. (2010).** The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 Pathways in DNA Damage Signaling and Cancer. Dans F. V. W. George & K. George (Dir.), *Advances in Cancer Research* (Vol. Volume 108, pp. 73-112): Academic Press.
- Société canadienne du cancer (2011).** *Statistiques canadiennes sur le cancer 2011*. Toronto: Société canadienne du cancer.
- Stahl, J. M., Cheung, M., Sharma, A., Trivedi, N. R., Shanmugam, S., & Robertson, G. P. (2003).** Loss of PTEN Promotes Tumor Development in Malignant Melanoma. *Cancer Research*, **63**(11), 2881-2890.
- Stahl, J. M., Sharma, A., Cheung, M., Zimmerman, M., Cheng, J. Q., Bosenberg, M. W., et al. (2004).** Deregulated Akt3 Activity Promotes Development of Malignant Melanoma. *Cancer Research*, **64**(19), 7002-7010.
- Stewart, A. L., Mhashilkar, A. M., Yang, X. H., Suhendan Ekmekcioglu, Yuji Saito, K. S., Schrock, R., et al. (2002).** PI3 kinase blockade by Ad-PTEN inhibits invasion and induces apoptosis in RGP and metastatic melanoma cells. *Molecular Medicine (Cambridge)*, **8**, 451-461.
- Stott, F. J., Bates, S., James, M. C., McConnell, B. B., Starborg, M., Brookes, S., et al. (1998).** The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO Journal*, **17**, 5001 - 5014.
- Stubbert, L. J., Hamill, J. D., Spronck, J. C., Smith, J. M., Becerril, C., & McKay, B. (2007).** DDB2-Independent Role for p53 in the Recovery from Ultraviolet Light-Induced Replication Arrest. *Cell Cycle*, **6**(14), 1730-1740.
- Sugasawa, K. (2010).** Regulation of damage recognition in mammalian global genomic nucleotide excision repair. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **685**(1-2), 29-37.
- Sugasawa, K., Ng, J. M. Y., Masutani, C., Iwai, S., van der Spek, P. J., Eker, A. P. M., et al. (1998).** Xeroderma Pigmentosum Group C Protein Complex Is the Initiator of Global Genome Nucleotide Excision Repair. *Molecular Cell*, **2**(2), 223-232.
- Sugasawa, K., Okuda, Y., Saijo, M., Nishi, R., Matsuda, N., Chu, G., et al. (2005).** UV-Induced Ubiquitylation of XPC Protein Mediated by UV-DDB-Ubiquitin Ligase Complex. *Cell*, **121**(3), 387-400.
- Suzuki, N., Ohashi, E., Kolbanovskiy, A., Geacintov, N. E., Grollman, A. P., Ohmori, H., et al. (2002).** Translesion Synthesis by Human DNA Polymerase  $\kappa$  on a DNA Template Containing a Single Stereoisomer of dG-(+)- or dG(-)-anti-N2-BPDE (7,8-Dihydroxy-anti-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene)<sup>†</sup>. *Biochemistry*, **41**(19), 6100-6106.
- Syljuasen, R. G., Sorensen, C. S., Hansen, L. T., Fugger, K., Lundin, C., Johansson, F., et al. (2005).** Inhibition of Human Chk1 Causes Increased Initiation of DNA Replication, Phosphorylation of ATR Targets, and DNA Breakage. *Molecular and Cellular Biology*, **25**(9), 3553-3562.
- Takai, H., Naka, K., Okada, Y., Watanabe, M., Harada, N., Saito, S. i., et al. (2002).** Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription. *EMBO Journal*, **21**(19), 5195-5205.
- Takedachi, A., Saijo, M., & Tanaka, K. (2010).** DDB2 Complex-Mediated Ubiquitylation around DNA Damage Is Oppositely Regulated by XPC and Ku and Contributes to the Recruitment of XPA. *Molecular and Cellular Biology*, **30**(11), 2708-2723.

- Tamura, M., Gu, J., Takino, T., & Yamada, K. M. (1999).** Tumor Suppressor PTEN Inhibition of Cell Invasion, Migration, and Growth: Differential Involvement of Focal Adhesion Kinase and p130Cas. *Cancer Research*, **59**(2), 442-449.
- Tan, S., Ng, Y., & James, D. E. (2011).** Next-generation Akt inhibitors provide greater specificity: effects on glucose metabolism in adipocytes. *Biochemical Journal*, **435**(2), 539-544.
- Taylor, J. S., Garrett, D. S., & Cohrs, M. P. (1988).** Solution-state structure of the Dewar pyrimidinone photoproduct of thymidyl-(3' .fwdarw. 5')-thymidine. *Biochemistry*, **27**(19), 7206-7215.
- Testa, J. R., & Bellacosa, A. (2001).** AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**(20), 10983-10985.
- Thakur, M., Wernick, M., Collins, C., Limoli, C. L., Crowley, E., & Cleaver, J. E. (2001).** DNA polymerase  $\eta$  undergoes alternative splicing, protects against UV sensitivity and apoptosis, and suppresses Mre11-dependent recombination. *Genes, Chromosomes and Cancer*, **32**(3), 222-235.
- The International Agency for Research on Cancer Working Group on artificial ultraviolet, I., & skin, c. (2007).** The association of use of sunbeds with cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: A systematic review. *International Journal of Cancer*, **120**(5), 1116-1122.
- Theil, A. F., Nonnekens, J., Wijgers, N., Vermeulen, W., & Giglia-Mari, G. (2011).** Slowly progressing Nucleotide Excision Repair in Trichothiodystrophy group A patient fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, MCB.01462-01410.
- Thompson, L. H., & West, M. G. (2000).** XRCC1 keeps DNA from getting stranded. *Mutation Research/DNA Repair*, **459**(1), 1-18.
- Toledo, L. I., Murga, M., Gutierrez-Martinez, P., Soria, R., & Fernandez-Capetillo, O. (2008).** ATR signaling can drive cells into senescence in the absence of DNA breaks. *Genes and Development*, **22**(3), 297-302.
- Tsao, H., Zhang, X., Benoit, E., & Haluska, F. G. (1998).** Identification of PTEN/MMAC1 alterations in uncultured melanomas and melanoma cell lines. *Oncogene*, **16**(26), 3397 - 3402.
- Tsodikov, O. V., Ivanov, D., Orelli, B., Staresinic, L., Shoshani, I., Oberman, R., et al. (2007).** Structural basis for the recruitment of ERCC1-XPF to nucleotide excision repair complexes by XPA. *EMBO Journal*, **26**(22), 4768-4776.
- Tyner, S. D., Venkatachalam, S., Choi, J., Jones, S., Ghebranious, N., Igelmann, H., et al. (2002).** p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature*, **415**(6867), 45-53.
- Udayakumar, D., & Tsao, H. (2009).** Melanoma Genetics: An Update on Risk-Associated Genes. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, **23**(3), 415-429.
- Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., Andegeko, Y., Mittelman, L., & Shiloh, Y. (2003).** Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO Journal*, **22**(20), 5612-5621.
- Vassin, V. M., Anantha, R. W., Sokolova, E., Kanner, S., & Borowiec, J. A. (2009).** Human RPA phosphorylation by ATR stimulates DNA synthesis and prevents ssDNA accumulation during DNA-replication stress. *Journal of Cell Science*, **122**(22), 4070-4080.
- Venkitaraman, A. R. (2002).** Cancer Susceptibility and the Functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*, **108**(2), 171-182.
- Verbeek, B., Southgate, T. D., Gilham, D. E., & Margison, G. P. (2008).** O6-Methylguanine-DNA methyltransferase inactivation and chemotherapy. *British Medical Bulletin*, **85**(1), 17-33.

- Vinson, R. K., & Hales, B. F. (2002). DNA repair during organogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **509**, 79-91.
- Waite, K. A., & Eng, C. (2002). Protean PTEN: Form and Function. *The American Journal of Human Genetics*, **70**(4), 829-844.
- Wang, S., Garcia, A. J., Wu, M., Lawson, D. A., Witte, O. N., & Wu, H. (2006). Pten deletion leads to the expansion of a prostatic stem/progenitor cell subpopulation and tumor initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**(5), 1480-1485.
- Wang, S. Q., Setlow, R., Berwick, M., Polsky, D., Marghoob, A. A., Kopf, A. W., et al. (2001). Ultraviolet A and melanoma: a review. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **44**, 837 - 846.
- Wang, S. Y. (1965). Photochemical reactions of nucleic acid components in frozen solutions. *Fed. Proc.*, **24**(71).
- Ward, I. M., & Chen, J. (2001). Histone H2AX Is Phosphorylated in an ATR-dependent Manner in Response to Replicational Stress. *Journal of Biological Chemistry*, **276**(51), 47759-47762.
- Ward, J. F. (1988). DNA Damage Produced by Ionizing Radiation in Mammalian Cells: Identities, Mechanisms of Formation, and Reparability. Dans E. C. Waldo & M. Kivie (Dir.), *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* (Vol. Volume 35, pp. 95-125): Academic Press.
- Wei, Q., Lee, J. E., Gershenwald, J. E., Ross, M. I., Mansfield, P. F., Strom, S. S., et al. (2003). Repair of UV Light-Induced DNA Damage and Risk of Cutaneous Malignant Melanoma. *Journal of the National Cancer Institute*, **95**(4), 308-315.
- Weng, L.-P., Brown, J. L., & Eng, C. (2001). PTEN coordinates G1 arrest by down-regulating cyclin D1 via its protein phosphatase activity and up-regulating p27 via its lipid phosphatase activity in a breast cancer model. *Human Molecular Genetics*, **10**(6), 599-604.
- Wolchok, J. D., & Saenger, Y. M. (2007). Current topics in melanoma. *Current Opinion in Oncology*, **19**(2), 116-120.
- Wu, X., Shell, S. M., Yang, Z., & Zou, Y. (2006). Phosphorylation of Nucleotide Excision Repair Factor Xeroderma Pigmentosum Group A by Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3-Related-Dependent Checkpoint Pathway Promotes Cell Survival in Response to UV Irradiation. *Cancer Research*, **66**(6), 2997-3005.
- Xing, F., Persaud, Y., Pratilas, C. A., Taylor, B. S., Janakiraman, M., She, Q. B., et al. (2011). Concurrent loss of the PTEN and RB1 tumor suppressors attenuates RAF dependence in melanomas harboring V600EBRAF. *Oncogene*, **1**(12).
- Xu, G., Snellman, E., Bykov, V. J., Jansen, C. T., & Hemminki, K. (2000). Cutaneous Melanoma Patients Have Normal Repair Kinetics of Ultraviolet-Induced DNA Repair in Skin In Situ. *The Journal of investigative dermatology*, **114**(4), 628-631.
- Xu, Y., Ashley, T., Brainerd, E. E., Bronson, R. T., Meyn, M. S., & Baltimore, D. (1996). Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma. *Genes and Development*, **10**(19), 2411-2422.
- Yajima, H., Lee, K.-J., Zhang, S., Kobayashi, J., & Chen, B. P. C. (2009). DNA Double-Strand Break Formation upon UV-Induced Replication Stress Activates ATM and DNA-PKcs Kinases. *Journal of Molecular Biology*, **385**(3), 800-810.
- Yamada, K. M., & Araki, M. (2001). Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *Journal of Cell Science*, **114**(13), 2375-2382.

- Yin, Y., & Shen, W. H. (2008).** PTEN: a new guardian of the genome. *Oncogene*, **27**(41), 5443-5453.
- Zhang, Y., Rohde, L. H., & Honglu, W. (2009).** Involvement of Nucleotide Excision and Mismatch Repair Mechanisms in Double Strand Break Repair. *Current Genomics*, **10**, 250-258.
- Zhang, Y., & Xiong, Y. (2001).** A p53 Amino-Terminal Nuclear Export Signal Inhibited by DNA Damage-Induced Phosphorylation. *Science*, **292**(5523), 1910-1915.
- Zhong, Y., Huang, Y., Huang, Y., Zhang, T., Ma, C., Zhang, S., et al. (2010).** Effects of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) polymorphisms on cancer: a meta-analysis. *Mutagenesis*, **25**(1), 83-95.
- Zhou, X.-P., Gimm, O., Hampel, H., Niemann, T., Walker, M. J., & Eng, C. (2000).** Epigenetic PTEN Silencing in Malignant Melanomas without PTEN Mutation. *The American Journal of Pathology*, **157**(4), 1123-1128.

# Annexe 1

Lignée	Âge (années)	Genre*	Site**	Pathologie**	BRAF	Ras	PTEN
WM3211	74	M	Ganglion lymphatique (métastatique)	Stage 1, RGP/VGP	Wt	Wt	N/D
WM1158	32	M	Abdomen	Stage 3, NM, VGP only	V600E	Wt	N/D
WM983A	54	M	Abdomen	SSM	V600E	Wt	+
WM278	62	F	NM, VGP	Stage 2	V600E	Wt	N/D
WM35	24	F	Fesses	Stage 1, SSM, RGP/VGP	V600E	Wt	+
WM983B	N/D	M	Ganglion lymphatique (métastatique)	N/D	V600E	Wt	N/D
WM1361A	50	M	SSM, RGP/VGP	N/D	V600E	Mut	N/D
WM1617	62	F	Ganglion lymphatique (métastatique)	N/D	V600E	N/D	N/D
WM1366	79	M	N/D	VGP	Wt	Mut	+
WM3248	68	Male	N/D	VGP	V600E	Wt	Mutation en Lys144Ter (K144X)
WM902B	N/D	N/D	SSM, VGP	N/D	V600E	Wt	N/D
WM3734	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
WM1341-D	85	M	LMM, RGP/VGP Avant-bras	N/D	V600R	Wt	+
WM266-4	58	F	Peau de la cuisse	N/D	V600D	Wt	Délétion homozygote (Ex6)
WM1205Lu	37	M	N/D	N/D	V600D	Wt	Délétion hémizygote (W274X, Ex 8)
WM793B	37	M	Sternum	Stage 1, SSM, RGP/VGP	V600E	N/D	Délétion hémizygote (W274X, Ex 8)

\*Genre: "M" correspondant à masculin et "F" correspondant à féminin

\*\*SSM: Mélanome à croissance superficielle, NM: Mélanome ganglionnaire LMM: Mélanome lentigineux malin, RGP: Croissance à phase horizontale, VGP: Croissance à phase verticale. Les stages dans la colonne "pathologie" sont associés au système de classification TNM ("Tumor-node-metastasis").

N/D, Non disponible; Wt, sauvage; Mut, muté

## Références:

1. Alfano RW et al. Mol Can Therapeut. 2008, 7:1218-26.
2. Bhatt KV, et al. Oncogene. 2006, 26:1056-66.
3. Argast GM, et al. Oncogene. 2009, 28:2697-709.
4. Dumaz N, et al. Cancer Res. 2006, 66:9483-91.
5. Coriell Institute for Medical Research Cell Repositories (<http://ccr.coriell.org/>)
6. Haluska, F. G. et al. (2006). Clin Cancer Res 12: 2301s-2307s.
7. Kaplan, F. M., et al., Oncogene, in press, Epub ahead of print.
8. Horst, B., et al. Am J Pathol 2009, 174: 1524-1533.
9. Smalley, K. S. M., et al. Cancer Res, 2008, 68: 5743-5752.
10. Mills, C., S. Joshi, et al. Mol Cancer 2009, 8: 104.
11. Wistar Institute, Meenhard Herlyn Laboratory ([http://www.wistar.org/herlyn/resource\\_VGP.htm](http://www.wistar.org/herlyn/resource_VGP.htm))
12. Primot, A., et al. Pigment Cell & Melanoma Res, 2010, 23:93-102.
13. Paraiso KHT, et al. Cancer Research. 2011, 71(7):2750-60.
14. American Type Culture Collection ([atcc.org](http://atcc.org))



