



HAL
open science

Rôle de NRAS et PTEN au cours de la mélanomagenèse

Christine Longvert

► **To cite this version:**

Christine Longvert. Rôle de NRAS et PTEN au cours de la mélanomagenèse. Sciences agricoles. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. NNT : 2012PA05T047 . tel-00787304

HAL Id: tel-00787304

<https://theses.hal.science/tel-00787304>

Submitted on 11 Feb 2013

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

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

**UNIVERSITE PARIS 5 – RENE DESCARTES
FACULTE DE MEDECINE**

**ECOLE DOCTORALE GC2ID
Génétique, Cellules, Immunologie, Infectiologie, Développement**

Thèse de Doctorat
Pour obtenir le grade de
DOCTEUR EN SCIENCE DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES
Discipline: Biologie cellulaire et moléculaire

Présentée par

CHRISTINE LONGVERT

Le 25 Septembre 2012

Thèse dirigée par Mr le Dr Lionel LARUE

ROLE DE NRAS ET PTEN AU COURS DE LA MELANOMAGENESE

Dr. Alexandre BENMERAH
Dr. Alain SARASIN
Dr. Salem CHOUAIB
Pr. Philippe SAIAG
Dr. Lionel LARUE

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de Thèse

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	2
REMERCIEMENTS	4
TABLE DES ILLUSTRATIONS	5
LISTE DES ABREVIATIONS	6
RESUME	7
INTRODUCTION	8
I- LA PEAU, LE MELANOCYTE ET SON ENVIRONNEMENT	8
I.1. Composition de la peau	8
I.2. Les mélanocytes cutanés	10
II- PROLIFERATION MELANOCYTAIRE BENIGNE: LES NAEVUS	13
II.1. Epidémiologie	13
II.2. Aspect clinique	13
II.3. Aspect histologique et cellulaire	14
II.4. Risque de transformation	15
II.5. Aspect moléculaire	15
III- TRANSFORMATION DES MELANOCYTES : LE MELANOME	16
III.1. Epidémiologie	16
III.2. Facteurs de risque environnementaux : les ultraviolets	17
III.3. Facteurs de risque génétiques	19
III.4. Diagnostic.....	20
III.5. Pronostic.....	24
III.6. Traitement	25
III.7. La mélanomagenèse : initiation et progression	26
III.8. Aspects génétiques et moléculaires de la mélanomagenèse.....	30
IV- LA VOIE DE SIGNALISATION MAPK	37
IV.1. Famille RAF	40
IV.2. Famille RAS	45
V- LA VOIE PI3K	47
VI. LES TRAITEMENTS CIBLES	50
PROJET	53
RESULTATS : ARTICLE	55
DISCUSSION	88

PERSPECTIVES	93
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	96
ANNEXES	109
Article 2.....	109
Modèles murins de mélanomes cutanés. Importance du fond génétique	109
Article 3.....	114
BRAF : Biologie et Fonction	114

REMERCIEMENTS

Au Docteur Lionel LARUE, mon directeur de thèse. Merci pour m'avoir accueillie au sein de ton laboratoire, pour m'avoir initiée (lourde tâche) aux modèles murins et à la recherche fondamentale, pour ta disponibilité, et pour t'être adapté à mes contraintes hospitalières. Ces 5 années m'ont permis d'apprendre énormément. Merci également pour ta franchise et ta rigueur, même si cela a donné lieu à quelques moments difficiles...

Aux Docteurs Alain SARASIN et Salem CHOUAIB pour avoir accepté d'être rapporteurs, d'avoir pris le temps de lire et de corriger ce travail. Je remercie tout particulièrement Alain SARASIN qui a été un "parrain" de thèse disponible lorsque j'en ai eu besoin, et pour les discussions que nous avons eues.

Au Professeur Philippe SAIAG pour la confiance qu'il m'accorde depuis plusieurs années, et pour son soutien permanent.

Au Docteur Alexandre BENMERAH pour avoir accepté de présider ce jury.

A Gwendoline. Sans toi cette thèse n'aurait pu aboutir...Merci pour ton travail, tes compétences, ta fiabilité, ta gentillesse et ta bonne humeur !

Je voudrais remercier l'ensemble des membres de l'équipe pour vos conseils scientifiques, vos encouragements, votre sympathie. Grâce à vous j'ai passé 5 années dans une super ambiance ! Merci à Delphine, Irina, Sophie, Isabel, Mélanie, Florian, Jacky, Alejandro, Laura, Stuart, Véronique, Maria, Alain, Noura, Christophe, Elodie, Yveline, Helena, Flavie, Laurence...

Merci au Cancéropôle Ile de France et à l'INCA qui ont financé mes 4 années de thèse.

Merci aux Docteurs Ute ZIMMERMANN et Thierry CLERICI pour leur compétence et leur disponibilité.

Merci beaucoup à mes parents pour votre présence, votre soutien sans faille.

Merci à Gautier (et Lucien !) pour m'avoir supportée et encouragée pendant ces années de thèse!

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Représentation schématique de la structure de la peau en trois dimensions.	8
Figure 2. L'unité épidermique de mélanisation au sein de l'épiderme.	11
Figure 3. Voies de synthèse de la mélanine.	12
Figure 4. Photographie du dos de deux patients présentant un syndrome des naevus atypiques.	14
Figure 5. Photographie clinique et histologique d'un mélanome à extension superficielle.	22
Figure 6. Photographie clinique et histologique d'un mélanome nodulaire.	22
Figure 7. Photographie de différentes formes cliniques de mélanome.	23
Tableau 1. Prédications de survie en fonction du stade AJCC.	24
Figure 8. Représentation schématique des différentes étapes de progression tumorale du mélanome.	27
Figure 9. Deux hypothèses de progression tumorale.	29
Figure 10. Activation de la voie NF- κ B par BRAF muté.	31
Figure 11. La voie Wnt/ β -caténine.	32
Figure 12. Contrôle du cycle cellulaire.	34
Figure 13. Les voies de signalisation impliquées dans le mélanome.	35
Tableau 2. Modifications génétiques et épigénétiques les plus connues dans le mélanome humain cutané, classées par fréquence.	36
Figure 14. La voie MAPK.	38
Figure 15. Fréquence des mutations de BRAF, NRAS et KIT dans les quatre groupes de mélanome.	39
Figure 16. Structure schématique de BRAF.	41
Figure 17. Inhibiteur de BRAF et dimérisation.	43
Figure 18. La voie PI3K.	49
Figure 19. Différents modèles d'interaction génétique.	50
Figure 20. Les hypothèses des mécanismes d'échappement à la sénescence dans les mélanomes NRAS-PTEN.	91

LISTE DES ABREVIATIONS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
AKT	Thymoma viral proto-oncogene 1
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ASIP	Agouti Signaling Protein
BCL2	B-cell leukemia/lymphoma 2
CCN	Cellules de la Crête Neurale
CDK	Cyclin-dependant Kinase
CREB	cAMP Responsive Element Binding
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-associated antigen 4
Dct	Dopachrome Tautomérase
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
eIF4B	Eukaryotic translation initiation factor 4B
EMT	Epithelial-Mesenchyme Transition
ERK	Extracellular signal-regulated Kinase
FKHR	Forkhead transcription factors
FLT3	Fms-related tyrosine kinase-3
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MART1	Melanoma-associated antigen recognized by T cells
MC1R	Melanocortin Receptor 1
MDM2	Murine double minute 2
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MITF	Microphthalmia-associated Transcription Factor
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
mTORC1/2	Mammalian Target of Rapamycin Complex 1/2
PDCD4	Programmed cell death protein 4
PDK	Phosphoinositide Dependent Kinase
PDGFR	Platelet-derived Growth Factor Receptor
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIK3CA	α catalytic subunit of PI3K
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
pRB	protéine du rétinoblastome
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RGP	Radial Growth Phase
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
SAHF	Senescence-associated heterochromatin foci
TYR	Tyrosinase
TRP	Tyrosinase-related protein
UV	Ultra-Violet
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VGP	Vertical Growth Phase
WNT	Wingless-related MMTV Integration site

RESUME

La mélanomagenèse est un processus complexe sous-tendu par des mécanismes cellulaires et moléculaires variés. L'ensemble de ces mécanismes moléculaires est impliqué dans les réseaux moléculaires permettant une signalisation coordonnée au sein de la cellule. De nombreuses publications montrent que les voies de signalisation MAPK et PI3K/AKT ont un rôle important dans la mélanomagenèse. NRAS et BRAF sont des oncogènes de la voie MAPK mutés respectivement dans 20% et 50% des mélanomes. PTEN est un gène suppresseur de tumeur inhibant la voie PI3K/AKT, dont la perte est souvent associée aux mutations de BRAF. Le traitement récent des mélanomes métastatiques avec les inhibiteurs spécifiques de BRAF^{V600E} donne des résultats exceptionnels, mais ces résultats sont limités aux patients dont le mélanome est porteur de la mutation BRAF^{V600E}, et il existe naturellement des échappements thérapeutiques, parfois lié à l'apparition de mutations NRAS. Nous avons choisi d'étudier le rôle de NRAS et de PTEN, qui sont des protéines majeures des voies MAPK et PI3K. Le but de ce travail est d'évaluer la coopération de NRAS et PTEN au cours de la mélanomagenèse. L'expression de PTEN est fréquemment altérée au cours du mélanome, mais le rôle de PTEN est mal connu. Au cours de ce travail, nous décrivons pour la première fois une mutation de NRAS concomitante à une perte de PTEN dans des prélèvements humains de mélanome et dans des lignées cellulaires humaines. Afin de comprendre l'effet de cette double mutation sur la mélanomagenèse, nous avons étudié des souris transgéniques avec expression d'une forme oncogénique de NRAS et/ou inactivation de PTEN dans le lignage mélanocytaire. L'inactivation isolée de PTEN n'a aucun effet sur la mélanomagenèse. En revanche, en association avec la mutation oncogénique de NRAS, la perte de PTEN accélère le développement des mélanomes, en réduisant le temps de latence et en provoquant l'apparition de métastases plus nombreuses en comparaison aux mélanomes présentant uniquement la mutation oncogénique de NRAS. Nous avons également démontré que la perte de PTEN induit un échappement au phénomène de sénescence. En conclusion, l'inactivation de PTEN coopère avec les mutations de NRAS pour l'initiation et la progression des mélanomes.

INTRODUCTION

I- LA PEAU, LE MELANOCYTE ET SON ENVIRONNEMENT

I.1. Composition de la peau

La peau est un organe complexe constitué de l'association de tissus d'origines embryologiques différentes, à l'interface entre le milieu interne de l'organisme et l'environnement. Elle est constituée de trois couches superposées de la profondeur vers la surface du corps : (i) un tissu adipeux, l'hypoderme, (ii) un tissu conjonctif, le derme (couche épaisse) et (iii) un épithélium de revêtement, l'épiderme (Figure 1).

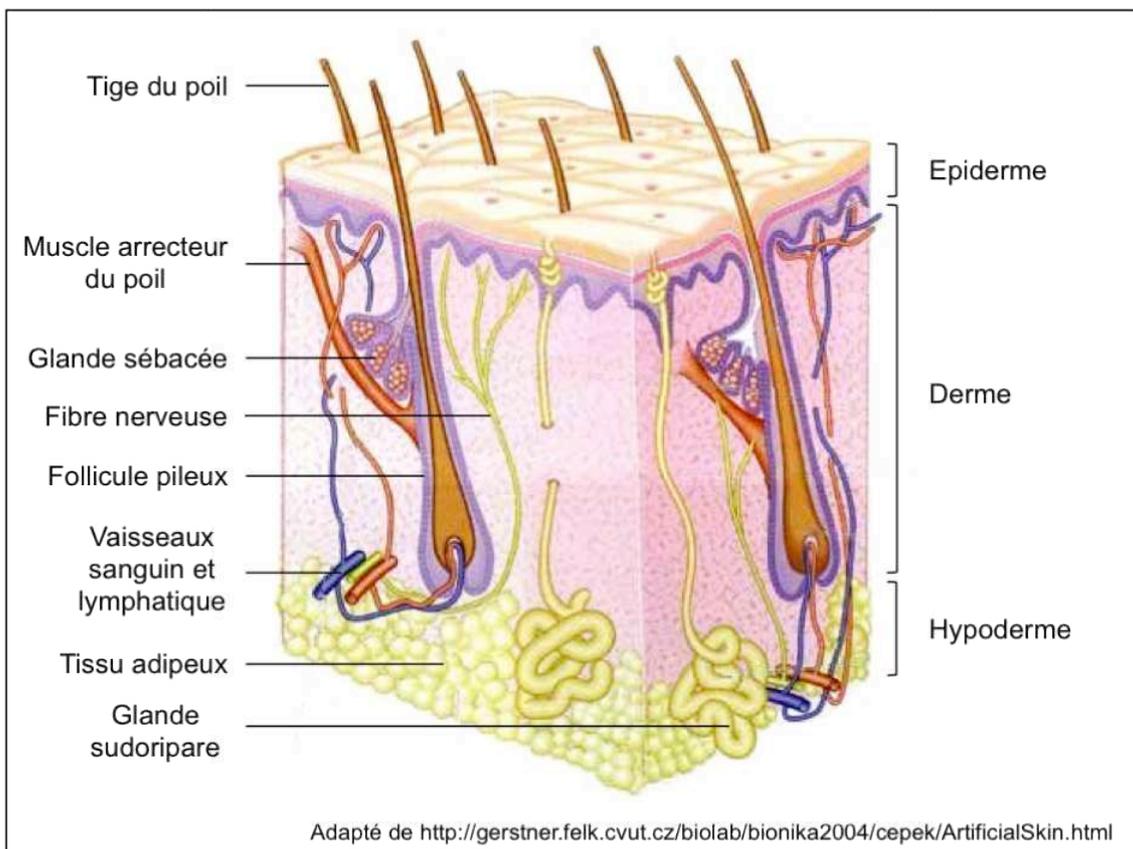


Figure 1. Représentation schématique de la structure de la peau en trois dimensions.

Représentation des trois couches de la peau : l'hypoderme, le derme et l'épiderme. Dans l'hypoderme se trouvent des vaisseaux sanguins et lymphatiques, les glandes sudoripares et du tissu adipeux. Le derme est la couche la plus épaisse et contient des vaisseaux sanguins et lymphatiques, des nerfs, les follicules pileux et les glandes sébacées. L'épiderme est la couche la plus superficielle. Il est pluri-stratifié et contient des terminaisons nerveuses.

L'**hypoderme** constitue la couche la plus profonde de la peau. C'est un tissu conjonctif lâche, richement vascularisé avec plus ou moins de tissu adipeux. Il contient les glandes sudoripares. L'hypoderme permet la régulation de la température du corps, il amortit les chocs et protège les organes profonds des blessures.

Le **derme** est un tissu conjonctif dense et irrégulier constitué majoritairement de fibroblastes. C'est la couche la plus épaisse de la peau. Le derme contient de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques, des nerfs et des terminaisons nerveuses sensibles. C'est aussi au niveau du derme que se trouvent les glandes sébacées. Le derme assure à la fois la résistance et l'élasticité de la peau.

L'**épiderme**, ou couche superficielle, est un épithélium malpighien pluristratifié kératinisant auquel sont associées des annexes, follicules sébacés et glandes sudoripares. Il est constitué en majorité de cellules épithéliales d'origine ectodermique, les kératinocytes. Les autres cellules résidant dans l'épiderme sont les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel. Les kératinocytes subissent une évolution morphologique permanente de la profondeur vers la surface de l'épiderme, en quatre couches superposées : la couche basale, correspondant au compartiment germinatif, puis les couches épineuse, granuleuse et cornée correspondant aux compartiments de différenciation où les kératinocytes subissent des transformations progressives, pour finalement constituer les cornéocytes qui desquament à la surface de la peau. Les cellules de Langerhans sont des cellules dendritiques dérivant des cellules souches hématopoïétiques situées dans la moelle osseuse. Ces cellules sont présentes dans tous les épithéliums pavimenteux stratifiés des mammifères. Les cellules de Langerhans initient et propagent les réponses immunes dirigées contre les antigènes appliqués sur la peau. Elles sont capables d'ingérer des particules étrangères, y compris des micro-organismes. Après avoir capté l'antigène, les cellules de Langerhans activées quittent l'épiderme et gagnent les ganglions lymphatiques satellites où elles présentent les déterminants antigéniques aux lymphocytes T. Les cellules de Merkel sont situées, de façon dispersée, dans la couche germinative, entre les kératinocytes basaux, au contact d'une terminaison nerveuse libre. Leurs fonctions sont mal connues : elles interviennent dans la mécanoréception, mais les interactions avec les autres cellules épidermiques restent à étudier.

I.2. Les mélanocytes cutanés

La couleur de la peau, des cheveux et des poils résulte de la production d'un polymère, la mélanine, sécrétée par les mélanocytes. Ces cellules sont situées dans la couche basale de l'épiderme et dans le bulbe des follicules pileux.

Embryogenèse du système pigmentaire

Les précurseurs des mélanocytes sont les mélanoblastes, cellules dérivées de la crête neurale. Les cellules de la crête neurale (CCN) constituent une population transitoire de cellules progénitrices pluripotentes qui vont générer des lignages cellulaires variés. Les CCN sont présentes sous forme de précurseurs de type épithélial qui ne possèdent pas de capacités migratoires, nommées CCN pré-migratoires. Au moment de la fusion du tube neural, les CCN subissent une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) qui leur permet d'acquérir ces capacités. Les précurseurs des mélanocytes peuvent se différencier à partir des CCN à tous les niveaux de l'axe antéro-postérieur (céphalique, vagal, tronc et lombosacré).

Au niveau tronc, les mélanoblastes empruntent un trajet différent et cheminent selon une voie dorsolatérale entre l'ectoderme et le dermomyotome. Dès la huitième semaine de vie embryonnaire chez l'homme, ils vont pénétrer, migrer et proliférer dans le mésenchyme sous-épidermique, puis coloniser l'épiderme et les follicules pileux. Ils se différencient alors rapidement en mélanocytes matures, avec apparition d'expansions cytoplasmiques appelées dendrites et début de synthèse des mélanines. Au niveau céphalique et vagal, en empruntant des voies de migration identiques, des mélanoblastes vont aussi coloniser certaines structures oculaires (choroïde, stroma ciliaire et irien), auditives (organe vestibulaire, stria vasculaire du canal cochléaire), cardiaque et nerveuses (leptoméninges).

Localisation des mélanocytes cutanés

Chez les mammifères, le système mélanocytaire comporte deux compartiments principaux, l'un épidermique et l'autre folliculaire. Un troisième compartiment extracutané est très peu important et correspond entre autre aux mélanocytes des muqueuses, semi-muqueuses et des yeux.

Chez l'homme, le compartiment épidermique est largement prédominant. Les mélanocytes sont localisés dans l'assise basale de l'épiderme, à intervalle régulier, avec en moyenne un mélanocyte tous les 10 à 15 kératinocytes basaux. Les mélanocytes émettent des dendrites

leur permettant de rentrer en contact avec 30 à 40 kératinocytes. Cet ensemble constitue l'unité épidermique de mélanisation (figure 2).

Quant aux mélanocytes du compartiment folliculaire, ils siègent au niveau de l'infundibulum de la paroi de la tige pileuse et dans la partie supérieure du bulbe pileux au contact du sommet de la papille dermique.

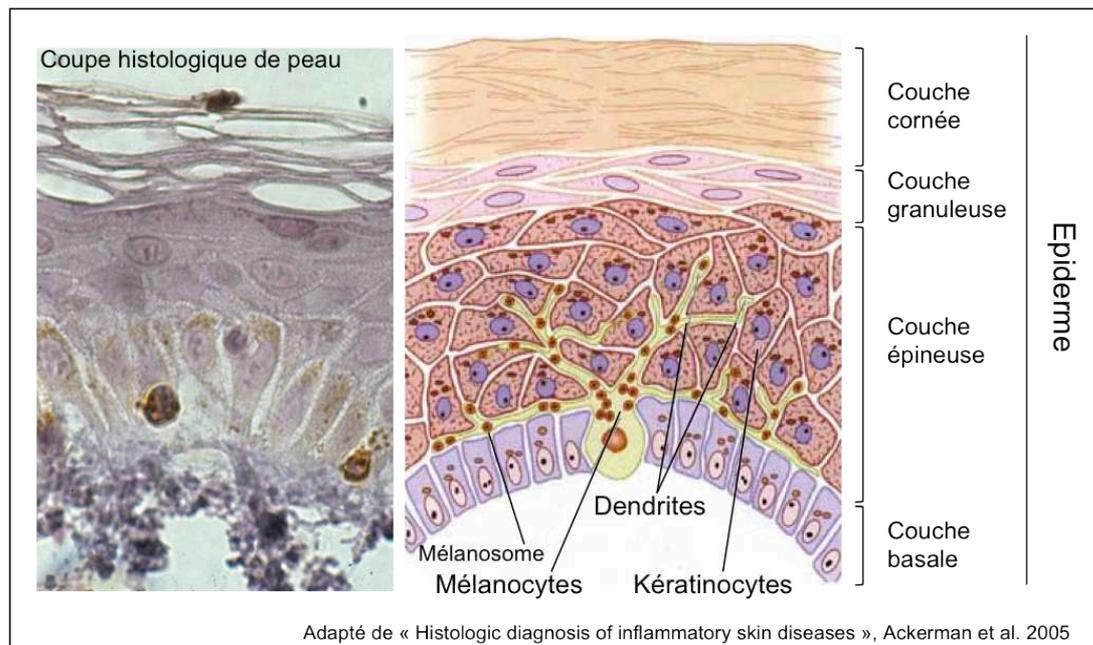


Figure 2. L'unité épidermique de mélanisation au sein de l'épiderme.

Représentation des quatre couches de l'épiderme: la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée. Le mélanocyte est situé à la jonction entre le derme et l'épiderme. Ses dendrites s'insinuent entre les kératinocytes adjacents pour transférer les mélanosomes, vésicules contenant la mélanine.

Fonction des mélanocytes

Les mélanocytes sont des cellules dendritiques produisant la mélanine, pigment naturel de la peau. La mélanine est en grande partie responsable de la couleur de la peau et des phanères et joue un rôle important dans la protection des cellules de la peau contre les rayons ultraviolets. Au cours de la mélanogenèse, deux pigments mélaniques sont synthétisés: l'eumélanine, de couleur marron-noir et la phéomélanine, de couleur jaune-orangé. L'eumélanine est la seule qui protège efficacement les cellules contre les rayons ultraviolets. Plusieurs enzymes interviennent dans la mélanogenèse; les mieux caractérisées sont la tyrosinase, la TRP-1 (TYRP1) et la TRP-2 (ou DCT). La tyrosinase, essentielle, intervient dans les premières étapes de la synthèse de ce pigment. En effet, la tyrosinase hydroxyle la tyrosine en dopa puis l'oxyde en dopaquinone. Cette dernière se

polymérise spontanément en eumélanine. TRP-1 et TRP-2 interviennent dans la régulation fine de la synthèse de l'eumélanine à partir de la dopaquinone. La phéomélanine est un dérivé produit à partir de dopaquinone et de cystéine (Figure 3). La synthèse des mélanines s'effectue au niveau d'organites cytoplasmiques, les mélanosomes, vésicules apparentées aux lysosomes. Les mélanosomes sont transportés vers l'extrémité des dendrites mélanocytaires et sont ensuite transférés aux kératinocytes, où ils sont digérés et leur contenu dispersé.

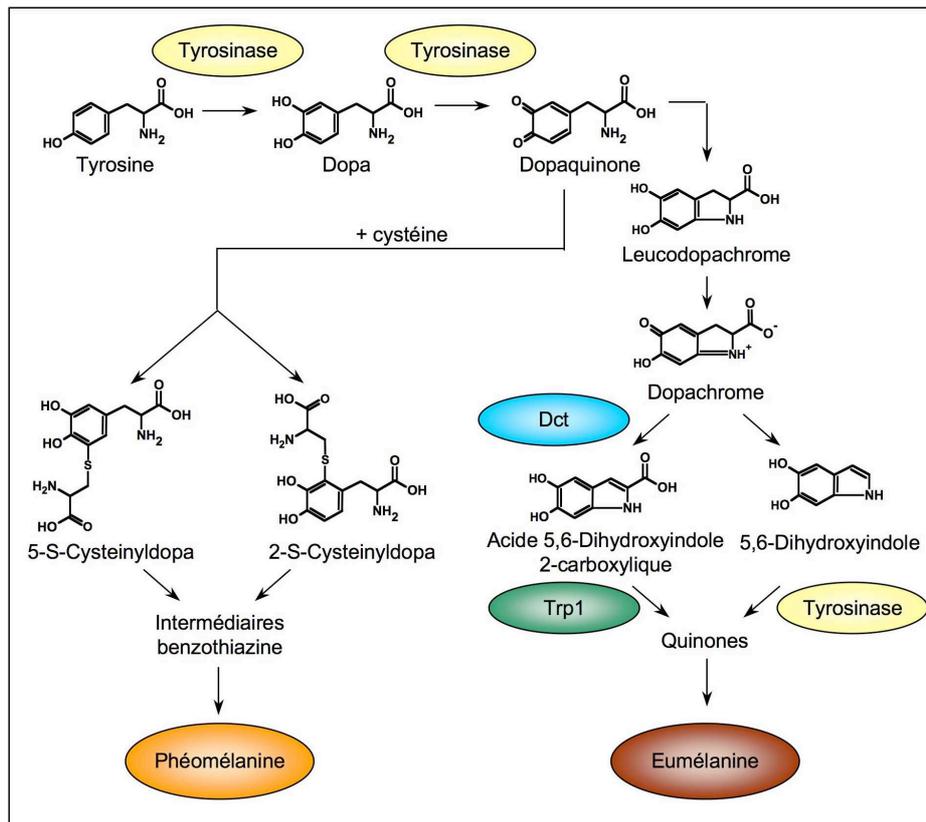


Figure 3. Voies de synthèse de la mélanine.

Représentation des voies de synthèse de l'eumélanine et de la phéomélanine : les enzymes nécessaires à la synthèse de la mélanine sont la Tyrosinase, Dct et Trp1. La Tyrosinase est impliquée dans les deux premières étapes de la voie de synthèse. Dct et Trp1 sont impliquées dans les dernières étapes de synthèse de l'eumélanine.

II- PROLIFERATION MELANOCYTAIRE BENIGNE: LES NAEVUS

Le terme naevus désigne toute hyperplasie circonscrite bénigne de mélanocytes dans la peau. La grande majorité des naevus sont acquis après la naissance.

II.1. Epidémiologie

Les naevus communs acquis surviennent progressivement chez tous les individus. Ils commencent à apparaître dès l'âge de 4 à 5 ans et croissent en nombre et en taille pour atteindre un plateau vers la quatrième décennie (20 à 30 naevus en moyenne). Leur nombre diminue ensuite avec le vieillissement. Les principaux facteurs de risque de naevus semblent communs à ceux du mélanome : phototype clair, influence génétique (Wachsmuth et al. 2001), exposition solaire dans l'enfance (Wachsmuth et al. 2005) (Bauer et al. 2005), immunodépression. Un nombre élevé de naevus est un facteur de risque majeur de mélanome. Le risque de développer un mélanome à l'âge adulte est jusqu'à 7 fois plus important pour les personnes ayant une centaine de naevus communs sur l'ensemble du corps, en comparaison de ceux qui en ont moins de 15 (Gandini et al. 2005a).

II.2. Aspect clinique

Il existe de nombreuses formes cliniques de naevus. Les naevus banals sont des macules, papules ou nodules de couleur chair à noire, de forme arrondie ou ovale. Ils sont retrouvés sur tout le tégument, mais plus rarement sur le cuir chevelu, les paumes, les plantes et les muqueuses. De plus, il existe des naevus atypiques, présents chez 2 à 5% des adultes caucasiens, qui sont irréguliers en forme et en couleur. Malgré cette diversité, le diagnostic clinique de naevus est souvent évident. Dans les cas douteux, le dermatologue s'aide de la dermoscopie : il s'agit d'une loupe associée à une source lumineuse qui permet l'examen de la lésion pigmentée en augmentant la transparence de l'épiderme, soit par immersion, soit par éclairage en lumière polarisée (rendant ainsi la couche cornée translucide). Trois méta-analyses ont démontré son intérêt pour le dépistage du mélanome (Bafounta et al. 2001) (Kittler et al. 2002) (Vestergaard et al. 2008). Par ailleurs, la plupart du temps, chez un individu donné, l'ensemble des naevus a un profil commun. On parle de syndrome des naevus atypiques lorsqu'un individu a plus de 50 naevus atypiques de plus de 5 mm (figure 4). Le suivi clinique de ces patients est difficile, car les critères classiques

ABCD (voir définition chapitre III.3) ne permettent pas une distinction franche avec le mélanome. Dans ces cas là, le suivi photographique et par vidéodermoscopie (enregistrement numérique des images de dermoscopie) est très utile. En effet, seule la stabilité clinique de ces naevus est en faveur de leur bénignité.



Figure 4. Photographie du dos de deux patients présentant un syndrome des naevus atypiques.

Ces naevus ont des caractéristiques cliniques proches des mélanomes. Le suivi régulier avec comparaison des photographies et des images de vidéodermoscopie est nécessaire tous les six à douze mois.

II.3. Aspect histologique et cellulaire

Les naevus sont des tumeurs mélanocytaires bénignes caractérisées par une prolifération de mélanocytes à proximité de la jonction dermoépidermique, avec un regroupement en amas ou en thèque qui les différencient des mélanocytes normaux. Les mélanocytes naeviques sont des cellules rondes ou fusiformes.

Il existe trois types de naevus, en fonction de la localisation des thèques. Lorsqu'elles sont situées dans la partie basale de l'épiderme et au niveau de la jonction dermoépidermique, on parle de naevus jonctionnel. Pour les naevus dermiques, les thèques sont situées dans le derme. Enfin, les naevus composés ou mixtes résultent de l'association des deux types. La composante jonctionnelle, très marquée chez l'enfant, diminue voire disparaît au cours du vieillissement.

II.4. Risque de transformation

La transformation des naevus communs en mélanome est possible, mais reste un événement exceptionnel. La croissance initiale des naevus est suivie par une phase de stabilisation et une perte de toute activité de prolifération, et très peu d'entre eux se transforment en mélanome. Le risque de transformation des naevus congénitaux de petite taille (inférieure à 1,5 cm) et de taille moyenne ($\geq 1,5$ cm) est comparable à celui des naevus communs, alors que les naevus congénitaux géants (diamètre supérieur à 20 cm) ont un risque de transformation estimé entre 5 et 20% (Tannous et al. 2005) (Lyon 2010), (Kinsler et al. 2009). La plupart des mélanomes développés sur naevus congénitaux géants surviennent chez des enfants dans les dix premières années de vie. Ces mélanomes débutent fréquemment dans le derme profond ou les tissus sous cutanés et se présentent cliniquement comme un nodule sous-cutané, rendant ainsi le diagnostic clinique difficile sur ces naevus très étendus (Marghoob et al. 2006).

II.5. Aspect moléculaire

Les mutations activatrices de BRAF sont présentes dans un grand nombre de naevus atypiques (52-80%) et de naevus communs (73-82%), alors que les mutations de NRAS sont bien moins fréquentes (6%) (Davies et al. 2002; Pollock et al. 2003; Uribe et al. 2003; Poynter et al. 2006). Une même personne peut avoir de façon simultanée des naevus mutés ou non (Loewe et al. 2004), ou encore des naevus mutés BRAF et d'autres mutés NRAS (Kumar et al. 2004), ainsi que des cellules naeviques « BRAF sauvage » coexistant avec des cellules mutées BRAF^{V600E} au sein du même naevus (Lin et al. 2009).

La prolifération entraînée par BRAF semble provoquer une sénescence des mélanocytes, c'est-à-dire un arrêt du cycle cellulaire notamment par l'induction de la protéine p16^{INK4A} (codée par le locus CDKN2A). L'expression de cette protéine, ainsi que celle du marqueur de la sénescence, la SA- β -galactosidase, s'observe dans les naevus (Gray-Schopfer et al. 2006) (Michaloglou et al. 2005). Cela suggère donc qu'un naevus correspond à une tumeur bénigne clonale, qui prolifère temporairement sous l'effet de l'activation de BRAF, puis dont la croissance tumorale s'arrête par sénescence (Michaloglou et al. 2008).

Les naevus congénitaux de petite taille ont le même profil moléculaire que les naevus communs. Cependant, dans les naevus congénitaux de taille moyenne, BRAF n'est muté que dans 30% des cas, alors que NRAS est muté dans 45% des cas. Dans les naevus congénitaux géants, NRAS est encore plus souvent muté (75 à 80% des cas), alors que les

mutations de BRAF deviennent plus rares (13% des cas) (Bauer et al. 2007) (Dessars et al. 2009). Ceci suggère que les mutations de NRAS exercent des signaux de croissance plus forts (par activation des voies MAPK et PI3K) que les mutations de BRAF (qui n'activent que la voie MAPK), augmentant ainsi la croissance des naevus (Ichii-Nakato et al. 2006).

L'impact de ces anomalies moléculaires sur la transformation en mélanome n'est pas clair. En effet, ce risque n'est pas démontré pour les naevus congénitaux de petite et de moyenne taille. Très récemment, le rôle de SOX10 au cours de la formation des naevus congénitaux géants et de leur transformation en mélanome a été démontré (Shakhova et al. 2012). SOX10 est un facteur de transcription impliqué dans la formation des mélanocytes à partir de la crête neurale et pourrait ainsi représenter une nouvelle cible thérapeutique moléculaire.

III- TRANSFORMATION DES MELANOCYTES : LE MELANOME

III.1. Epidémiologie

Il existe trois principaux types de cancers de la peau: le carcinome baso-cellulaire, le carcinome spino-cellulaire et le mélanome. 2 à 3 millions de nouveaux cas de cancers de la peau sont diagnostiqués chaque année dans le monde, dont 132 000 mélanomes (Organisation Mondiale de la Santé, 2007). 80% des mélanomes cutanés proviennent d'Amérique du Nord, d'Europe, de Nouvelle-Zélande et d'Australie, son incidence étant plus élevée dans les populations caucasiennes que dans les populations noires ou asiatiques (Wu et al.). En Union Européenne, son incidence est de 11,2 pour 100 000 et son taux de mortalité est de 2,1 pour 100 000 (Observatoire Européen du Cancer, 2008). Le taux de mortalité a tendance à stagner alors que l'incidence continue à augmenter (elle a doublé au cours des vingt dernières années), traduisant l'amélioration du dépistage précoce. Aux Etats-Unis, en 2012, le nombre estimé de nouveaux cas est de 76250, (soit un risque de 1 pour 36 pour les hommes et 1 pour 55 chez les femmes d'avoir un mélanome au cours de la vie), avec un nombre estimé de 9180 décès (Siegel et al.). En comparaison, l'incidence du mélanome en 2001 était de 47 700 nouveaux cas. Touchant tous les âges, c'est un des cancers les plus fréquents chez le jeune adulte. Bien que ne représentant que 4% des cancers de la peau, le mélanome est responsable de 80% des décès dus à un cancer cutané dans le monde (Kuphal and Bosserhoff 2009). De plus, s'ils ne constituent qu'une faible part de la mortalité par cancer (1-3%), les mélanomes sont parmi les 3 types de tumeurs, avec les tumeurs de l'œsophage et du foie, dont l'incidence a augmenté au cours des dernières années chez l'homme (Belot et al. 2008) (Jemal et al. 2009). Les métastases apparaissent chez 10 à 15% des patients. Le pronostic de ces patients est très sombre, avec

une médiane de 6 à 9 mois, et un taux de survie à 3 ans de 10 à 15% (Balch et al. 2009) (Korn et al. 2008). Pendant de nombreuses années, le traitement des patients a été très décevant : pas de traitement adjuvant efficace après chirurgie des stades I-III, pas de bénéfice sur la survie des chimiothérapies classiques au stade IV. Le développement récent de l'immunothérapie et des thérapies ciblées a modifié de façon spectaculaire le pronostic de ces patients. Cela sera développé plus loin dans l'introduction (chapitre VI).

III.2. Facteurs de risque environnementaux : les ultraviolets

Rôle des UV naturels

En 2009, l'IARC (International Agency for Research on Cancer) a classé tous les types de rayonnements UV (UVA, UVB, UVC) ainsi que les appareils de bronzage comme carcinogènes de classe 1 (« cancérogène certain ») pour l'homme (El Ghissassi et al. 2009). Les rayons UV sont classés dans trois catégories en fonction de leur longueur d'onde : les UVA (320-400 nm), les UVB (290-320 nm) et les UVC (200-290 nm). Les UVC sont complètement absorbés par la couche d'ozone stratosphérique et n'arrivent donc pas à la surface de la terre, à la différence des UVA et des UVB. Les UV provoquent deux types de lésions sur l'ADN : les dimères de pyrimidines et les adduits pyrimidine (6-4) pyrimidone. Les dimères de pyrimidines sont les plus abondants et les moins bien réparés.

Le rôle de l'exposition solaire dans l'apparition des carcinomes cutanés est bien établi. En effet, dans les carcinomes basocellulaires et épidermoïdes, les dimères de pyrimidines induits par les UV sont retrouvés dans de nombreux gènes, et en particulier sur le gène suppresseur de tumeur p53 (Melnikova and Ananthaswamy 2005).

Quant au mélanome, l'exposition solaire dans sa globalité apparaît comme un facteur de risque (risque relatif de 1,34). Le rôle des UV y est cependant complexe et moins bien compris. Ainsi, les mutations des oncogènes NRAS et BRAF ne présentent pas de signature UV, à la différence de certaines mutations de CDKN2A, p53 et PTEN (Hocker and Tsao 2007). Par ailleurs, les mutations de p53 ne sont retrouvées que dans de rares mélanomes, et il s'agit d'évènements tardifs non impliqués dans l'initiation tumorale. Malgré ces constatations, plusieurs arguments plaident pour un rôle des UV, et en particulier des dimères de pyrimidines :

- Le séquençage du génome complet et de l'exome a retrouvé de nombreuses mutations UV-induites dans des mélanomes et des lignées cellulaires (Wei et al. 2011) (Pleasant et al. 2010).

- Les patients atteints de xeroderma pigmentosum présentent une extrême sensibilité aux rayonnements UV et ont une augmentation du risque de mélanome supérieur à 2000 (Bradford et al. 2011). Ces patients ont des cellules déficientes dans le système de réparation de l'ADN par excision de nucléotides, qui est le mécanisme majeur d'élimination des dimères de thymidine. Leurs mélanomes sont plutôt de type lentigo malin de Dubreuilh (comme sur les zones photo-exposées des patients âgés), et des mutations de p53 sont retrouvées dans 60% des cas (Spatz et al. 2001). Plus récemment, des mutations UV-induites ont été rapportées sur le gène PTEN au cours de mélanome chez ces patients (Wang et al. 2009).

Par ailleurs, les UV induisent une immunosuppression et une inflammation, coopérant ainsi avec les mutations de l'ADN à l'initiation et à la progression des mélanomes.

Rôle des UV artificiels

Les lampes UV des installations de bronzage en France délivrent principalement des UVA, afin de limiter l'effet « coup de soleil » essentiellement lié aux UVB. Malheureusement, les données récentes montrent que les altérations de l'ADN des cellules de la peau, qui sont à l'origine des cancers cutanés, apparaissent pour des doses de rayonnement UVB inférieures à celles déclenchant un coup de soleil. De plus, les UVA sont également responsables de l'apparition de dimères pyrimidiques. Ainsi, lors d'une séance dans une cabine, aucune sensation de chaleur n'est ressentie par l'utilisateur, alors que celle-ci correspond à une exposition de même durée au soleil de midi sur une plage des zones subtropicales sans protection solaire. Par ailleurs, la pigmentation induite par ce bronzage en cabine n'est pas associée à un épaissement de l'épiderme (lié aux UVB), expliquant ainsi l'absence totale d'effet protecteur (l'idée de « préparer la peau au soleil » est donc complètement fautive) (Gaillot-de Saintignon 2012). L'augmentation du risque lié à l'utilisation de lampes artificielles d'UV (cabine de bronzage) a été montrée (risque relatif 1,15) (Lazovich et al.) (Zhang et al. 2012). En France, cette pratique serait responsable de 100 à 350 nouveaux mélanomes par an (Boniol 2012). Ce risque est d'autant plus élevé que la première exposition survient avant l'âge de 35 ans (risque relatif 1,75) (IARC 2006). Ainsi, les cabines à UV vont être progressivement interdites au Brésil et dans l'Etat de Nouvelle Galle du Sud en Australie (Gandini et al. 2011).

Rôle du type d'exposition

Plusieurs auteurs ont cherché à déterminer le rôle du type d'exposition (intermittente ou chronique), ainsi que celui des coups de soleil. L'exposition solaire intermittente et les antécédents de coups de soleil confèrent respectivement un risque de 1,61 et 2,03 (Gandini et al. 2005b) (Dennis et al. 2008). Les mélanomes survenant chez les patients plus jeunes sont principalement localisés sur le tronc et les membres (exposition solaire intermittente), alors que chez les patients de plus de 65 ans, les mélanomes sont plus fréquents sur la tête et le cou (exposition solaire chronique).

III.3. Facteurs de risque génétiques

Prédisposition familiale

On estime qu'environ 18 à 55% des mélanomes sont liés à une prédisposition génétique (Shekar et al. 2009). En cas d'antécédent familial de mélanome, le risque de développer un mélanome est alors doublé (Gandini et al. 2005c). Deux gènes majeurs de susceptibilité ont été identifiés dans les mélanomes familiaux: CDKN2A et CDK4 (Hussussian et al. 1994) (Zuo et al. 1996). CDKN2A code pour 2 protéines, p16 (voie pRb) et p14ARF (voie p53). CDK4 est également directement impliquée dans la régulation du cycle cellulaire. Les mutations CDKN2A sont présentes chez 10% des familles avec 2 cas de mélanome, et chez 30 à 40% des familles avec 3 mélanomes ou plus. La pénétrance est d'environ 70% (de Snoo and Hayward 2005). Les mutations de CDK4 sont plus rares (Goldstein et al. 2006). Ces deux gènes expliquent donc moins de la moitié des mélanomes familiaux, mais augmentent le risque de mélanome. D'autres gènes de susceptibilité ont été identifiés, dont les mutations confèrent un risque beaucoup plus faible qui constituent des gènes de prédisposition dans des formes sporadiques lorsqu'ils sont associés entre eux et/ou à des facteurs environnementaux forts. Ainsi, certains variants MC1R sont associés au sur risque de mélanome (Raimondi et al. 2008), ainsi que d'autres gènes également impliqué dans la pigmentation tels que ASIP, TYR, TYRP1.

Les naevus

A l'échelon individuel, un grand nombre de naevus communs confère un risque relatif de 1,5 pour les patients ayant 16 à 40 naevus, et un risque relatif de 7 pour les patients ayant 101 à 120 naevus (Gandini et al. 2005a).

Le risque de développer un mélanome est 10 fois plus élevé chez les patients ayant au moins 5 naevus atypiques (Gandini et al. 2005a).

Le phototype

Le phototype est le phénotype en rapport avec la sensibilité de la peau au soleil. Les différents phototypes sont définis en utilisant la classification de Fitzpatrick (Fitzpatrick 1988). Les individus de phototype clair I et II (peau claire ne bronzant pas, yeux bleus, cheveux blonds ou roux, éphélides) sont plus à risque de mélanome que ceux de phototype IV et V.

III.4. Diagnostic

Diagnostic clinique

La plupart des mélanomes naissent *de novo*, en peau saine. Le diagnostic de mélanome est suspecté cliniquement lorsqu'une lésion pigmentée a les critères classiques ABCDE :

Asymétrique (A)

Bords (B) irréguliers

Couleur (C) inhomogène (brun, noir, rosé, marron, dépigmentée)

Diamètre (D) supérieur à 6 mm

Evolution (E) récente (modification en taille, forme, couleur)

Diagnostic histologique

Le diagnostic doit être confirmé par l'exérèse de la lésion et l'examen histologique.

La première partie de l'analyse histologique consiste à confirmer la nature mélanocytaire de la lésion, ce qui est facile en présence de pigment mélanique ou d'une prolifération mélanocytaire de disposition typique (lentigineuse ou thécale). En cas de difficulté (lésion achromique), l'utilisation des marqueurs immunohistochimiques mélanocytaires (protéine S100, anticorps monoclonal HMB45, anti-MART-1) va aider au diagnostic.

La deuxième partie consiste à affirmer la malignité de la lésion à partir de critères architecturaux (désordre architectural dans la disposition lentigineuse ou thécale ; migration des mélanocytes vers la surface de l'épithélium) et cytologiques (atypies nucléocytoplasmiques, images mitotiques).

L'examen histologique permet également d'évaluer le niveau d'invasion de la tumeur en profondeur (niveau de Clark), de mesurer son épaisseur (indice de Breslow) de noter la présence ou non d'une ulcération et d'évaluer l'index mitotique. Ces éléments morphologiques représentent les facteurs pronostiques de la classification AJCC (American Joint Committee on Cancer) (Balch et al. 2009) et sont utilisés pour guider la prise en charge thérapeutique.

Les mélanomes se développent selon une phase de croissance horizontale et/ou verticale. Les mélanomes in situ et au stade précoce présentent uniquement une phase de croissance horizontale. Les autres mélanomes présentent uniquement une phase de croissance verticale. Les mélanomes restants vont présenter les deux phases. La phase de croissance horizontale représente le stade initial du développement du mélanome et est caractérisée par une croissance intraépidermique ou microinvasive. La phase de croissance verticale correspond à un stade plus agressif, avec un potentiel métastatique plus important.

La classification histologique des mélanomes est fonction de l'architecture de la composante intraépidermique latérale (pagétoïde ou lentigineuse) de la tumeur et du type cutané (zone de dommages actiniques, peau acrale, peau normale). Il existe 4 types anatomocliniques de mélanome (figures 5, 6, 7) :

- Le mélanome à extension superficielle représente 60 à 70% des mélanomes. Il se situe le plus souvent sur les membres inférieurs chez la femme et dans le dos chez l'homme. La phase de croissance horizontale précède en général la phase de croissance verticale de plusieurs mois. L'image histologique montre une composante intraépidermique latérale pagétoïde (migration intraépidermique de cellules isolées ou en amas comme dans la maladie de Paget du sein). La partie intra-épidermique se poursuit latéralement à plus de trois crêtes épidermiques au delà de la zone invasive.
- Le mélanome nodulaire représente 10 à 20% des mélanomes. Cliniquement, il correspond à un nodule tumoral, pas toujours pigmenté et sa croissance est rapide. Il s'agit d'une forme très agressive, son développement est d'emblée vertical. Histologiquement, il n'y a pas de composante tumorale intra-épidermique de part et d'autre de la prolifération dermique.
- Le mélanome de Dubreuilh (ou lentigo malin de Dubreuilh) représente 5 à 10% des mélanomes, principalement chez le sujet âgé, et est situé sur les zones photoexposées, visage, décolleté, bras. Il est de croissance lente et peut être de

grande taille. Histologiquement, il est caractérisé par une composante latérale intraépidermique lentigineuse (mélanocytes atypiques isolés ou groupés en thèques le long de l'assise basale de l'épiderme) dans un contexte de dommages actiniques sévères. Ces derniers se traduisent histologiquement par une modification du collagène du derme superficiel. Les dommages actiniques sont le reflet de l'exposition solaire chronique.

- Le mélanome acrolentigineux (2 à 10% des mélanomes) est situé uniquement en zone acrale (paumes, plantes et doigts), il est de croissance lente. Histologiquement, il présente une architecture latérale lentigineuse.

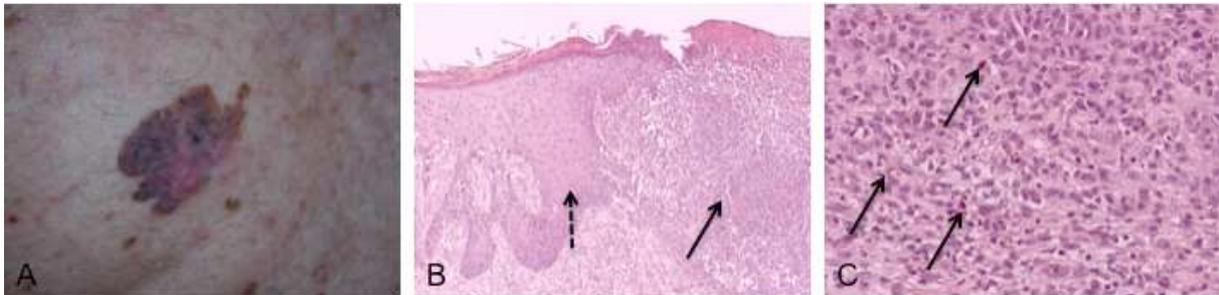


Figure 5. Photographie clinique et histologique d'un mélanome à extension superficielle.

(A) Mélanome présternal chez un homme de 87 ans. (B) Prolifération mélanocytaire du revêtement épidermique (flèche pointillée) et du derme superficiel (flèche pleine). La partie intra-épidermique déborde latéralement la composante dermique (grossissement X50). (C) Les cellules tumorales sont pléomorphes : certaines sont de petite taille arrondies ou ovoïdes, d'autres sont plus volumineuses. Les cytoplasmes sont parfois pigmentés de mélanine (flèches pleines) (grossissement x200).

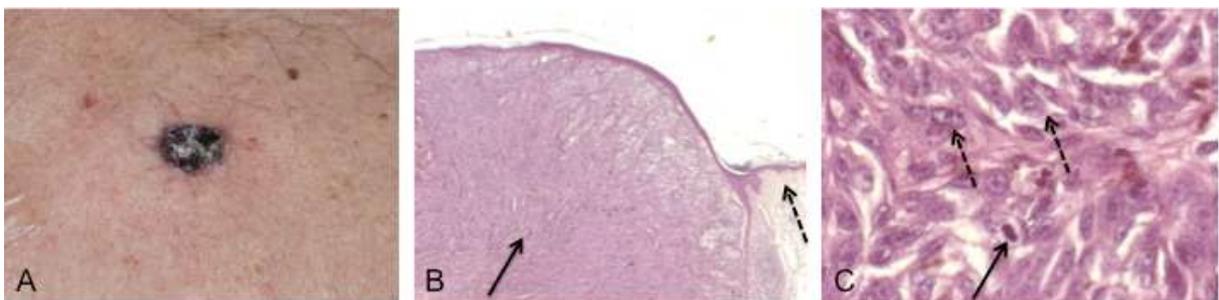


Figure 6. Photographie clinique et histologique d'un mélanome nodulaire.

(A) Mélanome thoracique chez un homme de 76 ans. (B) Prolifération mélanocytaire du derme superficiel et réticulaire (flèche pleine), refoulant et amincissant l'épiderme sus-jacent. Ce dernier héberge quelques amas mélanocytaires localisés à ses couches profondes et ne débordant pas la partie dermique de la lésion (flèche pointillée) (grossissement X12,5). (C) Les cellules tumorales sont ovoïdes ou fusiformes et possèdent des noyaux nettement atypiques, nucléolés (flèche pointillée) ; il existe des mitoses (flèche pleine) ; on retrouve du pigment mélanique (flèches pleines) (grossissement x400).



Figure 7. Photographie de différentes formes cliniques de mélanome.

(A) Mélanome de Dubreuilh chez une femme de 93 ans. (B) Mélanome acrolentigineux chez un patient de 50 ans (C) Mélanome achromique chez un patient de 52 ans. Le diagnostic clinique est difficile. L'analyse histologique montre une prolifération de cellules tumorales ; la nature mélanocytaire de la lésion est affirmée par la positivité des marqueurs immunohistochimiques mélanocytaires.

III.5. Pronostic

Tous paramètres confondus, le taux de survie entre 5 et 10 ans se situe entre 74% et 86%. Après exérèse chirurgicale, les récives peuvent être locorégionales ou à distance (métastases viscérales). La probabilité de survenue de métastases varie selon un certain nombre de critères relatifs au mélanome primitif (stades I et II) que sont l'indice de Breslow (il existe une corrélation quasi linéaire entre épaisseur et mortalité), le niveau d'invasion de Clark, l'existence d'une ulcération (facteur péjoratif), l'index mitotique.

Le statut du ganglion sentinelle est également un facteur pronostique indépendant. Le risque de récive est plus faible chez les patients dont le ganglion sentinelle est négatif.

Au stade ganglionnaire régional (stade III), le pronostic est fonction du caractère micro- ou macroscopique de l'atteinte, du nombre de ganglions atteints, et de l'existence ou non d'une ulcération de la tumeur primitive.

Au stade métastatique à distance (stade IV), la médiane de survie se situe entre 6 et 9 mois. Le taux de survie à 5 ans est très dépendant du stade de la maladie au moment du diagnostic. Il est de 92% pour les mélanomes stade I (breslow<1mm), de 67% pour les mélanomes stade II (1<breslow<4mm), de 50% pour les mélanomes stade III (métastases ganglionnaires) et de 10% pour les mélanomes stade IV (métastases à distance) (Balch et al. 2001).

Pathologic Stage	TNM	Thickness (mm)	Ulceration	No. + Nodes	Nodal Size	Distant Metastasis	No. of Patients	Survival ± SE			
								1-Year	2-Year	5-Year	10-Year
IA	T1a	1	No	0	-	-	4,510	99.7 ± 0.1	99.0 ± 0.2	95.3 ± 0.4	87.9 ± 1.0
IB	T1b	1	Yes or level IV, V	0	-	-	1,380	99.8 ± 0.1	98.7 ± 0.3	90.9 ± 1.0	83.1 ± 1.5
	T2a	1.01-2.0		0	-	-	3,285	99.5 ± 0.1	97.3 ± 0.3	89.0 ± 0.7	79.2 ± 1.1
IIA	T2b	1.01-2.0	Yes	0	-	-	958	98.2 ± 0.5	92.9 ± 0.9	77.4 ± 1.7	64.4 ± 2.2
	T3a	2.01-4.0	No	0	-	-	1,717	98.7 ± 0.3	94.3 ± 0.6	78.7 ± 1.2	63.8 ± 1.7
IIB	T3b	2.01-4.0	Yes	0	-	-	1,523	95.1 ± 0.6	84.8 ± 1.0	63.0 ± 1.5	50.8 ± 1.7
	T4a	> 4.0	No	0	-	-	563	94.8 ± 1.0	88.6 ± 1.5	67.4 ± 2.4	53.9 ± 3.3
IIC	T4b	> 4.0	Yes	0	-	-	978	89.9 ± 1.0	70.7 ± 1.6	45.1 ± 1.9	32.3 ± 2.1
IIIA	N1a	Any	No	1	Micro	-	252	95.9 ± 1.3	88.0 ± 2.3	69.5 ± 3.7	63.0 ± 4.4
	N2a	Any	No	2-3	Micro	-	130	93.0 ± 2.4	82.7 ± 3.8	63.3 ± 5.6	56.9 ± 6.8
IIIB	N1a	Any	Yes	1	Micro	-	217	93.3 ± 1.8	75.0 ± 3.2	52.8 ± 4.1	37.8 ± 4.8
	N2a	Any	Yes	2-3	Micro	-	111	92.0 ± 2.7	81.0 ± 4.1	49.6 ± 5.7	35.9 ± 7.2
	N1b	Any	No	1	Macro	-	122	88.5 ± 2.9	78.5 ± 3.7	59.0 ± 4.8	47.7 ± 5.8
	N2b	Any	No	2-3	Macro	-	93	76.8 ± 4.4	65.6 ± 5.0	46.3 ± 5.5	39.2 ± 5.8
IIIC	N1b	Any	Yes	1	Macro	-	98	77.9 ± 4.3	54.2 ± 5.2	29.0 ± 5.1	24.4 ± 5.3
	N2b	Any	Yes	2-3	Macro	-	109	74.3 ± 4.3	44.1 ± 4.9	24.0 ± 4.4	15.0 ± 3.9
	N3	Any	Any	4	Micro/macro	-	396	71.0 ± 2.4	49.8 ± 2.7	26.7 ± 2.5	18.4 ± 2.5
IV	M1a	Any	Any	Any	Any	Skin, SQ	179	59.3 ± 3.7	36.7 ± 3.6	18.8 ± 3.0	15.7 ± 2.9
	M1b	Any	Any	Any	Any	Lung	186	57.0 ± 3.7	23.1 ± 3.2	6.7 ± 2.0	2.5 ± 1.5
	M1c	Any	Any	Any	Any	Other Visceral	793	40.6 ± 1.8	23.6 ± 1.5	9.5 ± 1.1	6.0 ± 0.9
Total							17,600				

Tableau 1. Prédications de survie en fonction du stade AJCC.

Taux de survie en fonction de la classification TNM et des différents stades (Pathologic Stage : stade pathologique ; Thickness : épaisseur ; No. + Nodes : nombre de ganglions

envahis ; Nodal Size : taille de la métastase ganglionnaire ; Distant metastasis : métastases à distance). D'après Balch et al, J Clin Oncol 2001.

III.6. Traitement

Le traitement du mélanome primitif (stades I et II) consiste en une exérèse chirurgicale élargie. Le traitement chirurgical est le seul traitement potentiellement curatif du mélanome.

L'interféron-alpha est le seul traitement adjuvant du mélanome ayant une autorisation de mise sur le marché en France, pour les patients à haut risque de récurrence, atteints d'un mélanome ayant un Breslow supérieur à 1,5 mm sans atteinte ganglionnaire. Ce traitement améliore la survie sans récurrence, mais aucun bénéfice en terme de survie globale n'a été mis en évidence.

Au stade de métastases locorégionales ganglionnaires, le traitement est également chirurgical lorsqu'il est possible.

En cas de métastases viscérales, le traitement par chimiothérapie a longtemps représenté la seule alternative thérapeutique proposée aux patients. Plusieurs molécules sont disponibles : la dacarbazine (chimiothérapie de référence), la fotémustine, les nitroso-urées (BCNU, CCNU), les alcaloïdes de la pervenche (vindésine) et le cisplatine utilisés en monothérapie avec des taux de réponse de 10 à 20%, dont de très rares réponses complètes (Eggermont and Kirkwood 2004). L'utilisation de polychimiothérapies, beaucoup plus toxiques, n'a pas montré de bénéfice. Aucune de ces chimiothérapies n'a montré d'augmentation de la survie.

Au cours de ces dernières années, des avancées spectaculaires ont été faites, permettant le développement de thérapies ciblées (thème faisant l'objet d'un chapitre détaillé développé plus loin dans l'introduction) ou de traitement immunomodulateur tel que les anticorps monoclonaux anti-CTLA-4 (ipilimumab et tremelimumab), anti-PD-1 et anti-PD-L1. Le CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4) est un homologue du CD28, exprimé à la surface des lymphocytes T activés capable de réduire l'activation de ces derniers. L'utilisation d'anticorps anti-CTLA-4 est destinée à favoriser l'immunité anti-tumorale en augmentant l'activation et la prolifération des lymphocytes T. Deux études randomisées ont récemment montré une amélioration de la survie globale pour 15 à 20% des patients métastatiques (Hodi et al.) (Robert et al.). Le récepteur PD-1 (Programmed cell death 1) est exprimé à la surface des lymphocytes T ; ce récepteur a deux ligands, le PD-L1 et PD-L2, qui sont exprimés par les cellules stromales et de mélanome. L'interaction du récepteur avec un de ses ligands inhibe la réponse immunitaire et représente ainsi un important mécanisme d'échappement tumoral. Deux études de phase 1 évaluant les anticorps anti-PD-1 (Topalian et al. 2012) et anti-PD-L1 (Brahmer et al. 2012) ont été récemment publiées : les

résultats sont prometteurs avec des taux de réponse de 28% avec l'anticorps anti-PD-1 et de 17% avec l'anti-PD-L1. Certaines réponses sont prolongées et la tolérance paraît meilleure qu'avec l'ipilimumab.

III.7. La mélanomagenèse : initiation et progression

La transformation tumorale est définie comme un processus à plusieurs étapes impliquant des mutations génétiques conduisant à des altérations dans la physiologie de la cellule. Une tumeur est ainsi considérée comme : auto-suffisante en matière de signal de croissance, insensible aux signaux antiprolifératifs, capable d'échapper à la mort cellulaire programmée (apoptose), possédant un potentiel réplicatif illimité, capable de soutenir l'angiogenèse, l'invasion tissulaire et la métastase, capable d'adapter son métabolisme cellulaire et d'échapper à l'immunosurveillance (Hanahan and Weinberg). En matière de progression tumorale du mélanome, un modèle basé sur des observations cliniques et histopathologiques a été établi. Appelé modèle de Clark, il décrit les différentes étapes de la transformation maligne d'un mélanocyte en mélanome (Clark et al. 1984). Selon ce modèle, la première étape est une prolifération des mélanocytes normaux conduisant au développement d'un naevus bénin. Lors de la deuxième étape, une prolifération aberrante à partir soit d'un naevus pré-existant, soit d'une nouvelle localisation, conduit au naevus dysplasique qui présente une atypie structurale. La phase de croissance horizontale (RGP) représente l'extension intra-épidermique du mélanome, résultant de sa prolifération. Puis, la phase de croissance verticale (VGP) conduit à l'extension des cellules de mélanome au-delà de la membrane basale de l'épiderme et à leur croissance dans le derme afin de former des nodules expansifs. Finalement, les cellules tumorales acquièrent un potentiel métastatique. Les métastases se développent par le détachement de cellules de mélanome depuis la tumeur primaire qui vont migrer à travers le stroma environnant puis les vaisseaux sanguins et lymphatiques pour coloniser à distance d'autres organes (figure 8).

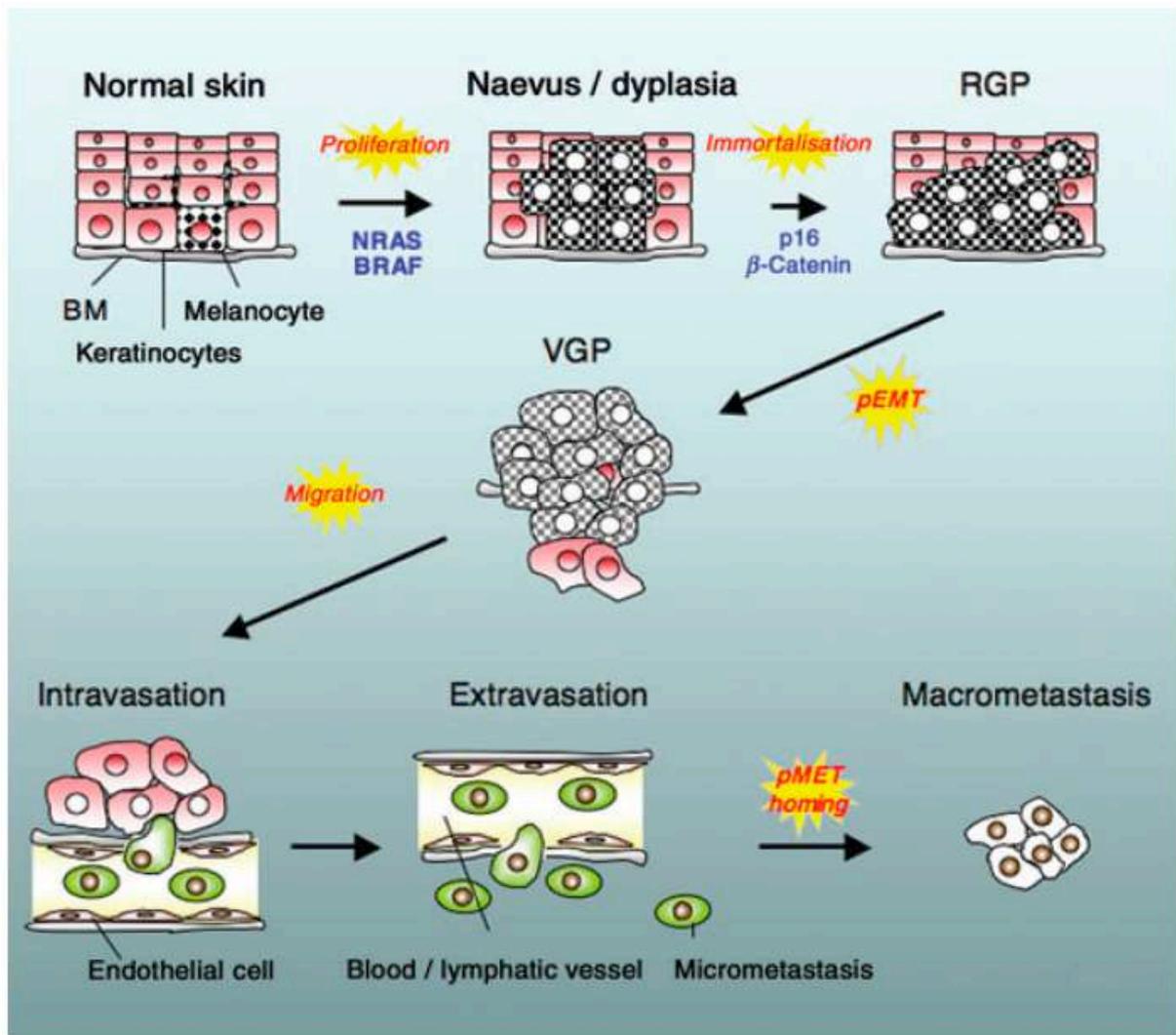


Figure 8. Représentation schématique des différentes étapes de progression tumorale du mélanome.

Mécanismes cellulaires associés à l'activation d'oncogènes (NRAS, BRAF et β-caténine) et à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur (p16). pEMT, transition pseudo-épithélio-mésenchymateuse ; BM : membrane basale. D'après Larue et Beermann, Pigment Cell Res 2007.

Il a récemment été montré que de nombreux mélanomes apparaissent *de novo* alors que d'autres apparaissent à partir de naevus pré existants (Rivers 2004). Ainsi, le modèle de progression tumorale selon Clark n'est pas applicable pour ces mélanomes *de novo*. Michaloglou et al (Michaloglou et al. 2008) suggèrent que la première étape est un événement non encore identifié, qui permet aux mélanocytes d'échapper aux phénomènes de sénescence. En effet, l'état sénescence correspond à un arrêt irréversible du cycle cellulaire. Cet état est caractérisé par l'absence de réponse aux facteurs de croissance, une activité métabolique soutenue et des modifications de la morphologie cellulaire (Chen 2000). La sénescence est provoquée par différents mécanismes : raccourcissement des télomères,

surrégulation du locus CDKN2A (codant pour p16^{INK4a} et p14^{ARF}) et accumulation de lésions ADN. Les phénomènes de sénescence sont fortement associés aux stades précancéreux, et sont absents des tumeurs malignes (collado, cell cycle2005). En effet, les premières observations de cellules tumorales sénescents ont été faites au cours d'adénomes pulmonaires, de tumeurs intracanalaires pancréatiques, de néoplasies intraprostatiques, et de naevus. La sénescence était absente des cancers correspondant, soit respectivement les adénocarcinomes pulmonaires, pancréatiques, prostatiques et les mélanomes. La sénescence correspond donc à un mécanisme suppresseur de tumeur.

Cette première étape d'échappement aux phénomènes de sénescence pourrait collaborer avec l'inactivation de p16^{INK4A}-Rb (par délétion, mutation ou méthylation du promoteur de CDKN2A, amplification de CCDN1 ou CDK4, ou mutation de Rb (Bennett 2008). Ainsi, l'acquisition de mutation proliférative BRAF^{V600E} après ce premier événement pourrait empêcher les phénomènes de sénescence. C'est pourquoi l'ordre d'apparition des modifications génétiques somatiques pourrait déterminer l'origine naevique ou de novo du mélanome (figure 9).

D'un point de vue clinique, les mélanome sur naevus pré-existant sont plus souvent situés sur le tronc, sont associés à un nombre élevé de naevus, alors que les mélanomes *de novo* surviennent préférentiellement sur la zone tête et cou de patients plus âgés, en association avec de l'élastose solaire. Ces constatations renforcent l'hypothèse de deux voies de mélanomagenèse : l'une caractérisée par l'association d'un grand nombre de naevus et l'autre par l'exposition chronique au soleil (Purdue et al. 2005) (Whiteman et al. 2006) (Whiteman et al. 2003).

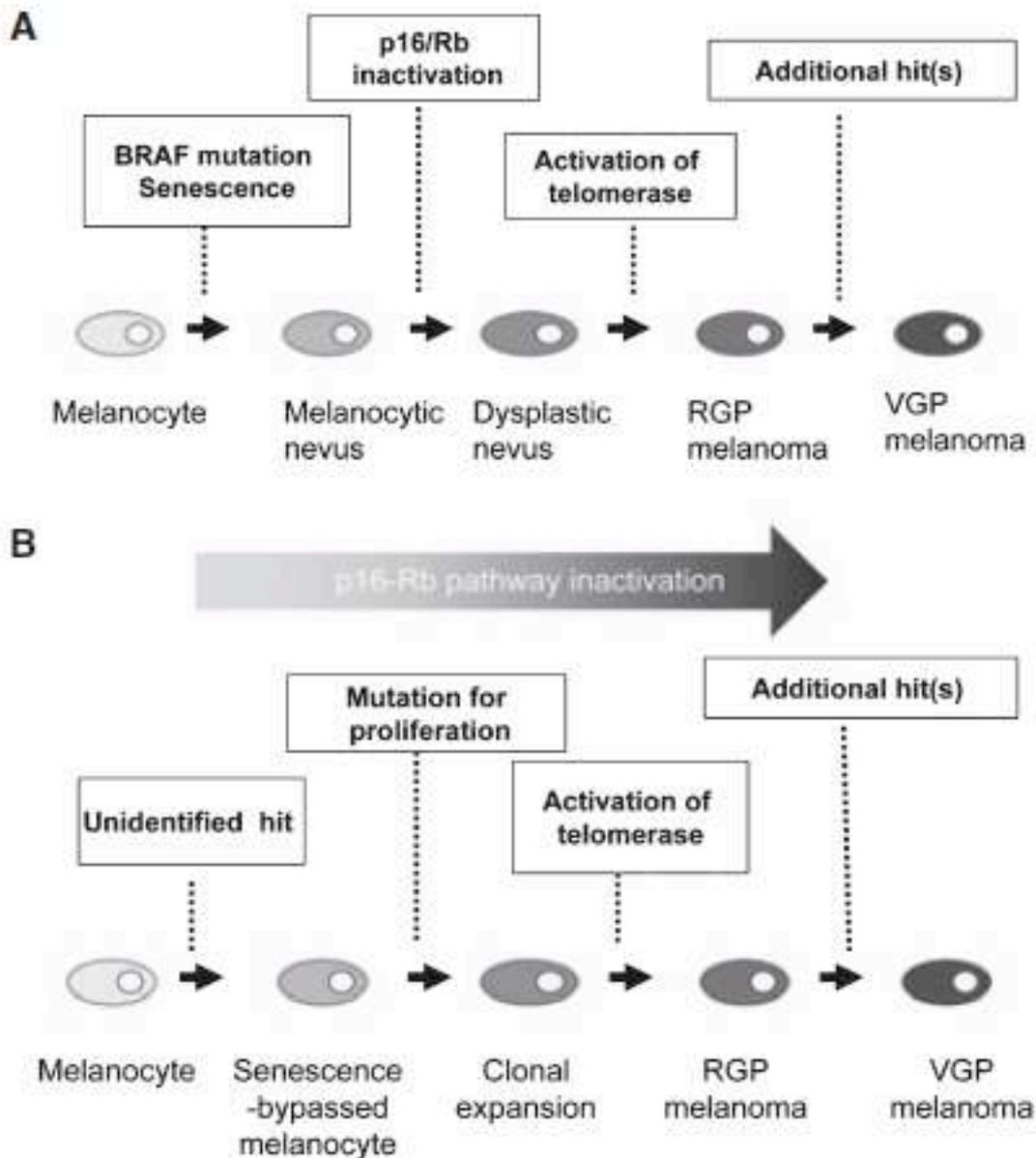


Figure 9. Deux hypothèses de progression tumorale.

(A) Progression tumorale selon le modèle de Clark, du naevus au mélanome. La prolifération est liée à la mutation de BRAF, puis l'inactivation de la voie $p16^{INK4A}$ -Rb permet aux mélanocytes d'échapper aux phénomènes de sénescence. (B) Progression tumorale de novo : la première étape est un événement génétique permettant l'échappement aux mécanismes de sénescence (perte de $p16^{INK4A}$, éventuellement associée à d'autres altérations génétiques). L'acquisition secondaire d'une mutation de BRAF sur ce mélanocyte empêche l'entrée en sénescence. Dans les deux cas (A) et (B), d'autres altérations génétiques sont ensuite nécessaires à la transformation complète. D'après Takata et al, *Pigment Cell Res* 2010

III.8. Aspects génétiques et moléculaires de la mélanomagenèse

Depuis plusieurs années, un grand nombre d'altérations moléculaires dans les cellules de mélanome ont été mises en évidence. Ces données sont principalement issues de l'étude par hybridation génomique comparative. Tous les mélanomes n'ont pas pour origine les mêmes événements, mais un certain nombre d'altérations génétiques somatiques ont été trouvées. La survenue d'un mélanome est le résultat de changements complexes dans les différentes voies de signalisation pouvant affecter le contrôle de la croissance, le métabolisme, la motilité ou encore la capacité à échapper à l'apoptose. En amont de ces voies de signalisation, les mutations, méthylations ou autres modifications de certains gènes sont donc impliquées et vont induire des modifications dans la régulation de ces voies. Certaines de ces voies (ou molécules), impliquées dans le mélanome, sont détaillées ci-après.

- Les voies MAPK et PI3K. Ces deux voies seront détaillées plus loin dans l'introduction (chapitres IV et V).
- La voie NF- κ B. Certains signaux de survie cellulaires proviennent de la voie NF- κ B : cette voie est activée via les kinases IKK (I κ B kinase). L'hétérodimère protéique NF- κ B interagit normalement avec la protéine inhibitrice I κ B α et est maintenu inactif dans le cytoplasme. IKK provoque la phosphorylation et la dégradation de la protéine I κ B α au niveau du protéasome, libérant la protéine NF- κ B qui peut se transloquer du cytoplasme vers le noyau. La fonction de facteur de transcription de cette protéine est alors activée, permettant la transcription de gènes impliqués dans des mécanismes anti-apoptotiques, proliférants et métastatiques. Les mutations oncogéniques de BRAF activent cette voie de signalisation par activation de IKK (Liu et al. 2007) (figure 10).

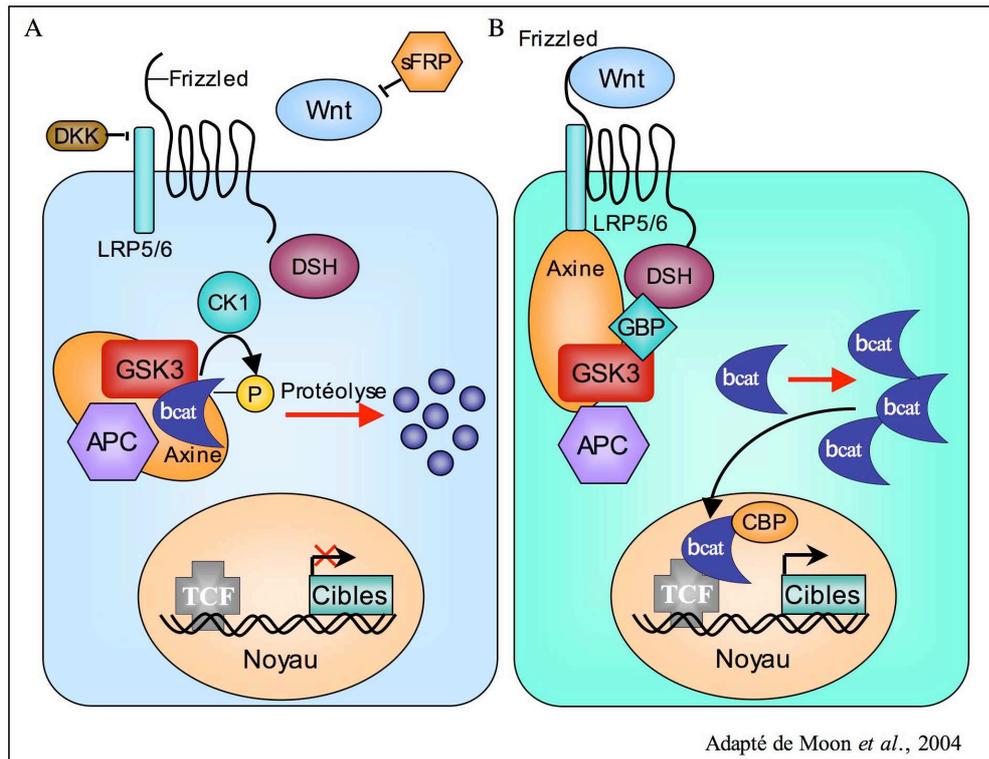


Figure 11. La voie Wnt/β-caténine.

(A) En absence de ligand Wnt, β-caténine est dégradée et les gènes cibles sont maintenus silencieux.

(B) En présence de Wnt actif, GSK3 est inhibée et la dégradation de β-caténine est diminuée. Le complexe Tcf/β-caténine active les gènes cibles de la voie.

- **MITF.** MITF est un facteur de transcription capable de réguler à la fois deux mécanismes antagonistes : la différenciation et la prolifération cellulaires (Carreira et al. 2006). De plus, MITF peut, selon la dose et l'environnement, soit induire soit réprimer la prolifération cellulaire. Son rôle est également complexe dans le mélanome cutané puisqu'une amplification du gène MITF-M est retrouvée dans 10% des mélanomes primitifs et dans 21% des mélanomes métastatiques (Garraway et al. 2005), induisant sa surexpression. Cependant son expression est perdue dans 20% des mélanomes. Le niveau d'expression de MITF doit être maintenu à un niveau intermédiaire pour participer à la mélanomagenèse. En effet, une expression élevée de MITF diminue la prolifération des cellules de mélanome, même en cas de mutation BRAF (Wellbrock and Marais 2005). Ainsi, des niveaux trop élevés ou trop faibles de MITF sont associés à l'arrêt du cycle cellulaire, à la différenciation et à l'apoptose. Il a été montré que MITF était amplifié dans 10 à 16% de mélanomes métastatiques mutés BRAF. Les mécanismes régulant les niveaux optimaux de MITF permettant la prolifération sont inconnus.

- Le contrôle du cycle cellulaire (figure 12). L'échappement aux mécanismes de contrôle du cycle cellulaire est essentiel pour la progression tumorale. Dans une cellule normale, la prolifération est contrôlée par des kinases dépendantes de cyclines (CDKs), activées par des kinases et inhibées par des protéines telles que p16^{INK4a} et p21. La phase de transition G1/S est contrôlée par les couples cyclineE/CDK2 et cyclineD/CDK4. La progression du cycle cellulaire survient avec la phosphorylation inactivant pRb (protéine du rétinoblastome). L'inactivation de pRb empêche son interaction avec le facteur de transcription E2F. La forme libre d'E2F se lie ainsi à l'ADN au niveau des promoteurs des gènes nécessaires à l'entrée en phase S. La voie pRb est donc fondamentale pour assurer le contrôle du cycle cellulaire. La protéine p16^{INK4a}, produite à partir du locus CDKN2A, est un inhibiteur des kinases cycline-dépendantes CDK4 et CDK6, et empêche l'entrée en phase S en maintenant l'état non phosphorylé de pRB. Le locus CDKN2A est fréquemment affecté dans les mélanomes (Bennett 2008), entraînant une inactivation de p16^{INK4a} et la prolifération. Des mutations dans les gènes CDK4 et RB1 ont également été retrouvées, bien que plus rares (Bennett 2008). Le locus CDKN2A code également pour la protéine p14^{ARF} qui active le médiateur de sénescence p53, via l'inactivation de MDM2. La protéine p53 agit via l'inhibiteur de cycle cellulaire p21^{CIP1}. Cependant, TP53 (gène codant pour p53) n'est que peu fréquemment muté dans les mélanomes (9% des cas) (Bennett 2008), ce qui peut s'expliquer par la mutation fréquente du locus CDKN2A, entraînant l'inhibition de p14^{ARF} et donc celle de p53. Il semble que l'échappement de la sénescence par p53 n'est pas lié à une mutation ou une perte de p53 mais à d'autres mécanismes. Ainsi, on note l'absence d'expression de p21^{CIP1} dans la plupart des mélanomes, alors même que p53 est exprimée. Une des hypothèses est une amplification des gènes Tbx2 et Tbx3 qui réprimerait p21^{CIP1} et p14^{ARF} permettant l'échappement de la sénescence. Des mutations du gène Stk11/Lkb pourraient également empêcher l'activation de p21^{CIP1} par p53 (Bennett 2008). Enfin, une augmentation d'activité télomérase a également été rapportée dans le mélanome, participant à l'échappement de la sénescence (Gray-Schopfer et al. 2006).

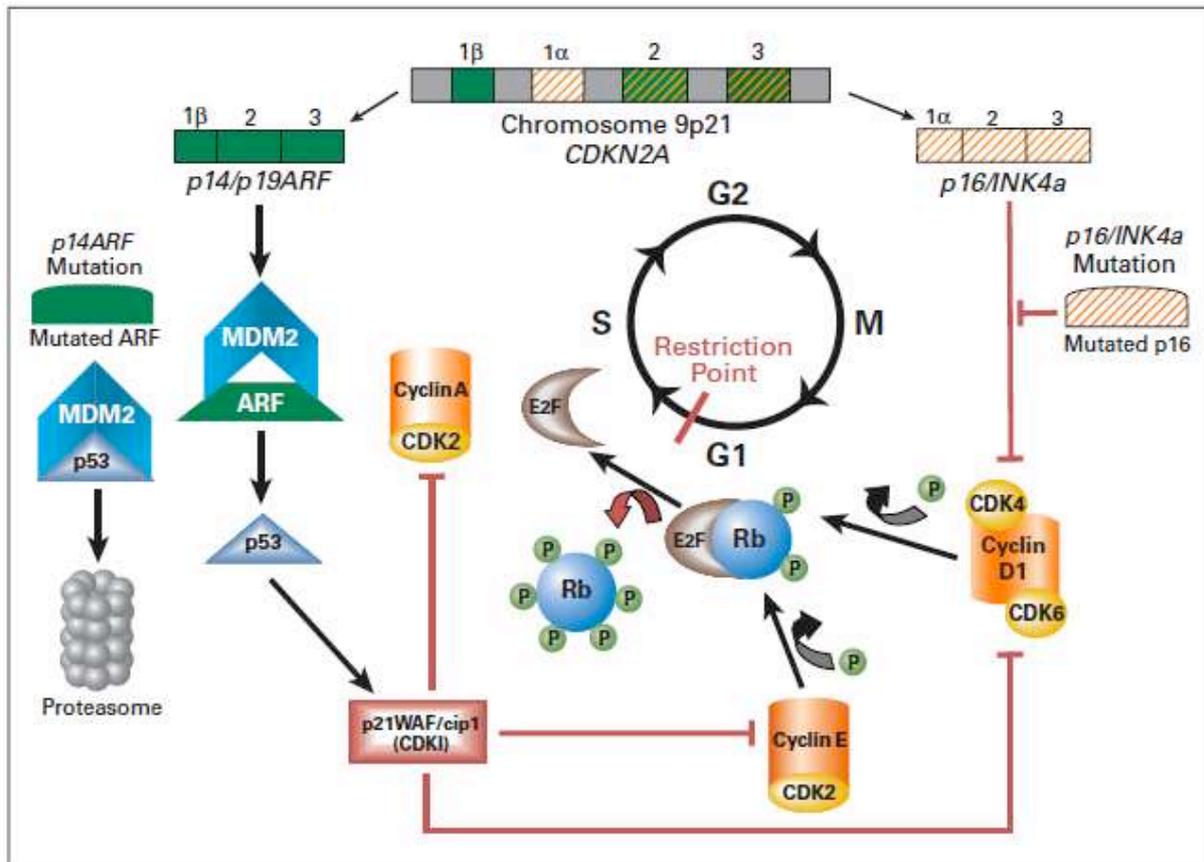


Figure 12. Contrôle du cycle cellulaire.

pRb contrôle le point de restriction G1/S. CDK2/4/6 phosphorylent Rb, dissocient E2F permettant la progression du cycle cellulaire. CDKN2A code pour P16^{INK4A} et P14^{ARF}. P14^{ARF} inhibe MDM2, prévenant ainsi la dégradation de p53 par le protéasome. P16^{INK4A} inhibe le complexe cycline D1/CDK4,6, maintenant la liaison Rb-E2F ce qui bloque le cycle en phase G1. D'après Fecher et al 2008

Finalement, la Figure 13 résume, de façon non exhaustive, les voies de signalisation impliquées dans le mélanome, et le Tableau 2 liste un certain nombre de gènes qui apparaissent comme les plus fréquemment altérés somatiquement dans le mélanome humain sporadique.

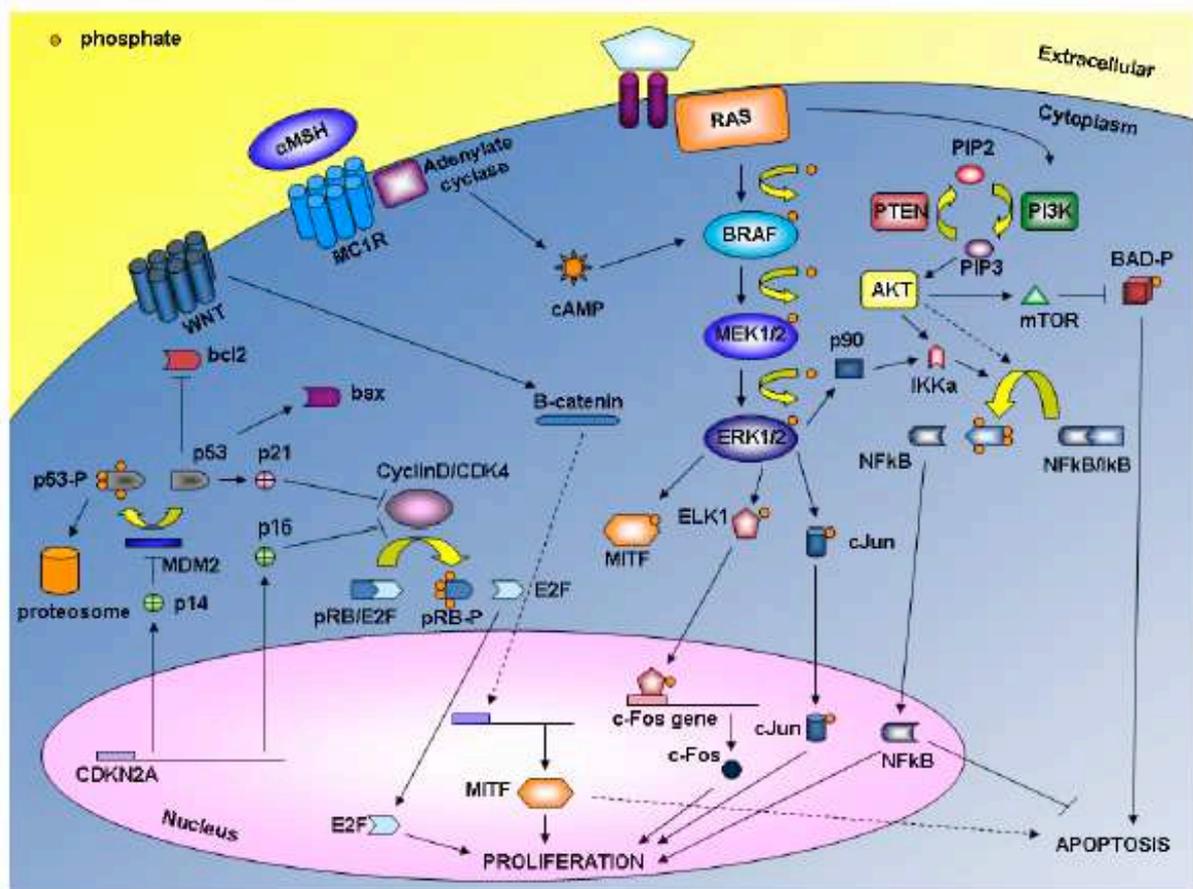


Figure 13. Les voies de signalisation impliquées dans le mélanome.

Les principales voies dérégulées dans le mélanome sont les voies impliquées dans la prolifération, la sénescence, l'apoptose : voie MAPK avec la cascade des protéines RAS-RAF-MEK-ERK, voie PI3K/AKT, pRb, voie P16^{INK4A}, cascade CDKN2A-MDM2-p53, voie Wnt. D'après Palmieri et al, J Transl Med 2009.

Gène	Localisation	Changement	% dans les mélanomes (nb d'échantillons testés)	Provenance des résultats (culture ou pas)	Présent plus tôt dans la progression ?
CDKN2A	9p21	Délétion	50 (119)	Tissu (le pourcentage augmente en culture)	Données connues uniquement pour les mutations: 0% dans les naevi, 12% dans les naevi dysplasiques
		Méthylation	19 (59)		
		Mutation (p16)	9 (760)		
		Total	78		
BRAF	7q34	Mutation Activatrice	47 (2805)	Les 2	51% Naevi bénins
TBX2	17q23	Amplification	43 (46)	Culture	Inconnu
APAF1	12q23	Méthylation	42 (24)	Tissu	Non. Seulement dans les stades avancés
CDKN2B (p15)	9p21	Délétion	36 (74)	Culture	Inconnu
PTEN	10q23	Mutation	17 (501)	Les 2	Inconnu
		Délétion	13 (119)	Culture	
		Total	28		
NRAS	1p13	Mutation Activatrice	21 (2517)	Les 2	21% naevi bénins
APC	5q21-22	Méthylation	16 (94)	Les 2	Inconnu
KIT	4q12	Amplification +/- mutation activatrice	14 (36)	Tissu	Inconnu
MITF	3p14	Amplification	10 (119)	Culture	Inconnu
STK11	19p13	Mutation	10 (144)	Les 2	Inconnu
TP53 (p53)	17p13	Mutation	9 (232)	Tissu	Inconnu
CTNNB1 (β-caténine)	3p22	Mutation Activatrice	6 (408)	Les 2	Inconnu
PTPRD	9p23	Délétion	6 (119)	Culture	Inconnu
RB1	13q14	Mutation	6 (67)	Les 2	Inconnu
MYC	8q24	Amplification	1 – 40	Tissu	Pas dans les naevi. Plutôt dans les stades avancés

Tableau 2. Modifications génétiques et épigénétiques les plus connues dans le mélanome humain cutané, classées par fréquence.

Les gènes ont été inclus dans ce tableau si la fréquence des changements est supérieure à 5%, basé sur l'analyse de plus de 20 échantillons indépendants. Les fréquences et rangs donnés ici doivent être pris comme indicatifs, puisque différentes fréquences ont été rapportées dans différentes études. Les données des mutations (autres que p53) viennent du catalogue "Somatic Mutations in Cancer" (COSMIC), ne sélectionnant que les mélanomes cutanés. D'après Bennett, Pigment Cell Melanoma Res 2008

IV- LA VOIE DE SIGNALISATION MAPK

La voie MAPK régule de façon physiologique la croissance, la survie et la migration cellulaire par transduction de signaux membranaires jusqu'au noyau, via la phosphorylation d'effecteurs. L'activation pathologique de cette voie est un événement fréquent dans de nombreux cancers.

Les signaux extracellulaires activent la voie MAPK en se liant à des récepteurs de tyrosine kinase, puis en activant RAS, une protéine à activité GTPase liée à la membrane. Il y a différents récepteurs de tyrosine kinase qui interagissent avec RAS : EGFR, c-KIT, PDGFR, VEGFR, et FLT3 (figure 14).

Les « RASopathies » sont causées par des mutations germinales des gènes codant pour des protéines impliquées dans la voie RAS/MAPK, provoquant une dérégulation de la voie et des troubles du développement : le syndrome cardio-facio-cutané causé par des mutations germinales de BRAF dans 80% des cas (mutations faux sens hétérogènes incluant, entre autres, Q257R, G596V mais pas V600E), de MEK1 et MEK2 (20%), et très rarement de KRAS ; le syndrome de Noonan (mutation de PTPN11) ; le syndrome de Costello (mutation de HRAS). Le syndrome cardio-facio-cutané ne prédispose pas au cancer, à la différence des deux autres (Rodriguez-Viciano et al. 2006) (Rauen et al.).

Une activation anormale de la voie MAPK est présente dans plus de 80% des mélanomes (Platz et al. 2008) (Fecher et al. 2008). Les mutations activatrices ou amplifications des récepteurs de protéines kinases sont peu fréquentes ; il s'agit d'amplifications ou de rares mutations activatrices de KIT, le récepteur de tyrosine kinase au SCF (stem-cell factor). Les mutations NRAS et BRAF sont mutuellement exclusives. Ces mutations ont été décrites dans différents sous-types de mélanomes (Curtin et al. 2005) (Curtin et al. 2006a), en fonction de la localisation des mélanomes et des dommages actiniques de la peau adjacente, liés à la photoexposition chronique. Quatre groupes de mélanomes ont ainsi été décrits: mélanome sur peau photoexposée chronique, mélanome sur peau photoexposée de façon intermittente, mélanome sur peau avec exposition solaire très faible (zones acrales) et mélanome sur peau avec exposition solaire nulle (zones muqueuses). Les fréquences des mutations des oncogènes BRAF, NRAS et KIT de ces quatre groupes sont variables en fonction des auteurs. Une méta-analyse a récemment été publiée (Lee et al. 2011) : les mutations de BRAF sont plus fréquentes sur peau non photoexposée chronique (exposition solaire intermittente) alors que les mutations de NRAS paraissent plus fréquentes sur peau chroniquement photoexposée (figure 15), mais l'association des mutations de NRAS avec un sous-type histologique ou un mode d'exposition est controversée.

Dans le mélanome, les mutations de NRAS et BRAF sont responsables de l'activation de la voie MAPK. Les mutations de NRAS et BRAF sont mutuellement exclusives, ainsi que les mutations NRAS et PTEN, alors que les mutations concomitantes de BRAF et PTEN sont retrouvées dans environ 20% des cas (Tsao et al. 2004). En effet, BRAF et la voie PI3K (inhibée par PTEN) sont activées en aval de RAS, rendant théoriquement inutile leur mutation en cas d'activation oncogénique de NRAS. A contrario, PTEN et BRAF ne peuvent pas activer mutuellement les 2 voies d'aval, ce qui rend donc nécessaire des mutations concomitantes afin d'activer les 2 voies de signalisation. D'ailleurs, il a été montré que l'oncogène RAS transforme les mélanocytes plus efficacement que l'oncogène BRAF (Wellbrock et al. 2004), probablement par activation de la voie PI3K. Il est donc étonnant que les mutations de BRAF soient plus fréquentes que les mutations NRAS, ceci étant sûrement lié à des pressions biologiques ou génétiques favorisant la progression des mélanomes mutés pour BRAF.

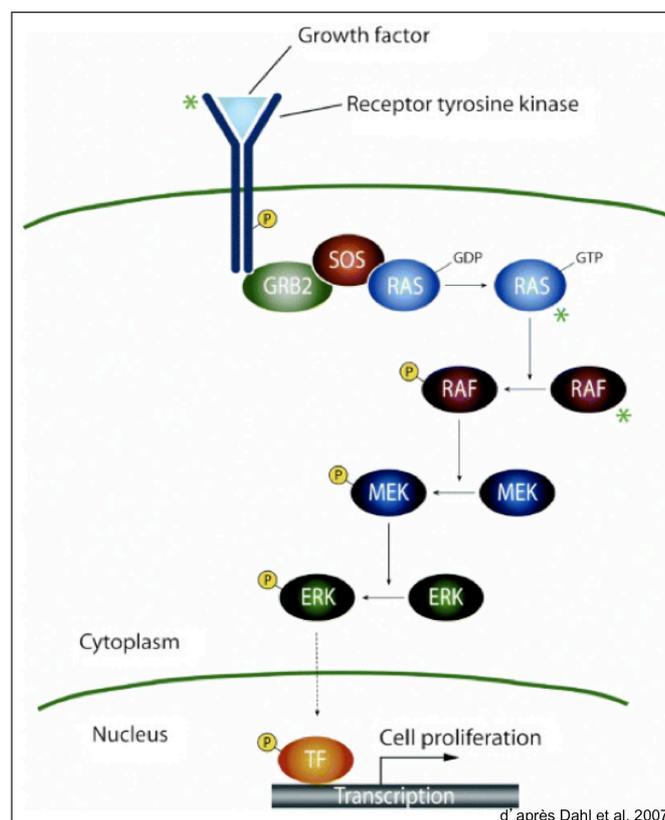


Figure 14. La voie MAPK.

La fixation de facteurs de croissance au récepteur tyrosine kinase provoque son autophosphorylation et le recrutement de RAS. Une fois activé, RAS est impliqué dans une cascade de phosphorylation incluant RAF, MEK et ERK. L'activation de ERK permet sa translocation dans le noyau où elle active un certain nombre de facteurs de transcription importants dans la prolifération cellulaire. Certains composants de cette voie sont des proto-oncogènes tels que NRAS et BRAF, qui sont activés par mutation ou amplification dans le mélanome (indiqués par des astérisques vertes).

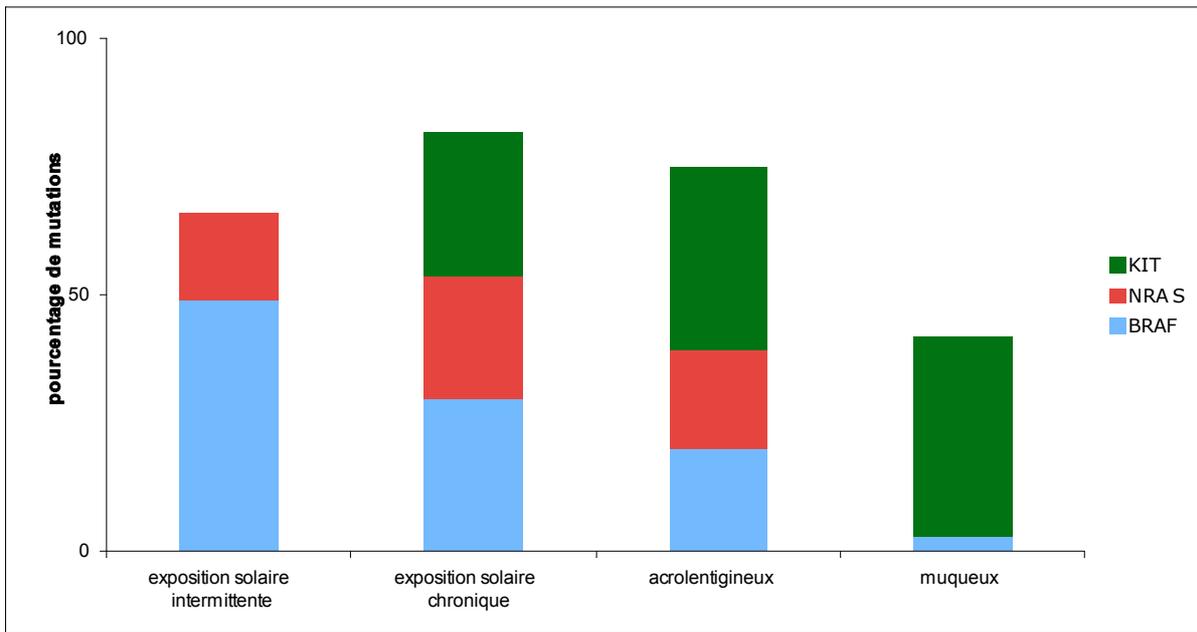


Figure 15. Fréquence des mutations de BRAF, NRAS et KIT dans les quatre groupes de mélanome.

Exposition solaire intermittente : tronc, membres. Exposition solaire chronique : visage. Acrolentiginoux : mélanomes des paumes, plantes, ongles. Adapté de Curtin, J Clin Oncol 2006 et Lee, Br J Dermatol 2011.

IV.1. Famille RAF

Chez l'homme, les sérine/thréonine kinases RAF existent sous trois isoformes, codées par 3 gènes différents : ARAF, BRAF et CRAF. Ces trois kinases ont un domaine de liaison pour la protéine RAS. Leur activation nécessite d'abord l'interaction avec RAS, permettant le recrutement à la membrane et la dimérisation, puis des phosphorylations et des déphosphorylations par des protéines kinases de la famille SRC (d'autres kinases sont également impliquées mais ne sont pas connues). Les protéines RAF sont en amont de la cascade des kinases cytoplasmiques ; une fois activées, elles phosphorylent et activent MEK1 et MEK2, qui à leur tour phosphorylent et activent ERK1 et ERK2. Les cibles des protéines ERK sont très variées : elles peuvent induire l'augmentation de la prolifération et de la survie cellulaire, la protection contre l'apoptose, le remodelage de la matrice extracellulaire et l'angiogenèse. Les mutations de la protéine BRAF sont présentes dans 40 à 60% des mélanomes (Davies et al. 2002). Les protéines ARAF et CRAF n'ont pas été retrouvées mutées dans les mélanomes, probablement en raison de mécanismes d'activation plus complexes (qui nécessitent des phosphorylations additionnelles en dehors du domaine catalytique), expliquant la « préférence » pour BRAF en tant qu'activateur de ERK. Les mutations de BRAF ne sont pas exclusives au mélanome, puisqu'elles se retrouvent dans 7% des cancers humains (Davies et al. 2002) : 10% des cancers colorectaux sont mutés pour BRAF, ainsi que 36 à 53% des cancers papillaires de la thyroïde et 30% des carcinomes ovariens séreux. Ces différents cancers ont également en commun d'autres mutations activatrices de la voie MAP-kinase, survenant de façon mutuellement exclusive (par exemple, pas de mutation KRAS concomitante de BRAF dans les cancers colorectaux).

Les mutations de BRAF

La protéine BRAF est codée par le gène BRAF situé sur le chromosome 7q. Les protéines RAF partagent 3 régions conservées : CR1 et CR2 dans la partie N terminale, CR3 dans la partie C terminale, qui contient le domaine kinase. Les mutations de BRAF sont majoritairement situées sur le segment activateur de l'exon 15 ; d'autres mutations sont retrouvées sur l'exon 11, altérant les résidus glycine du domaine kinase. Il s'agit de mutations acquises, somatiques et non germinales. L'absence de mutation germinale peut être expliquée grâce aux expériences de génétique moléculaire effectuée chez la souris : les mutations de BRAF induisent une létalité embryonnaire (Dhomen et al.).

La mutation la plus fréquente est une mutation ponctuelle localisée au niveau de l'exon 15 (la thymine (T) 1799 a été transformée en adénine A - gTg/gAg), substituant une valine (V) en acide glutamique (E) à la position 600 de la protéine (V600E) (figure 16); cette mutation est retrouvée dans la grande majorité des cancers ayant une forme BRAF mutée (Davies et al. 2002).

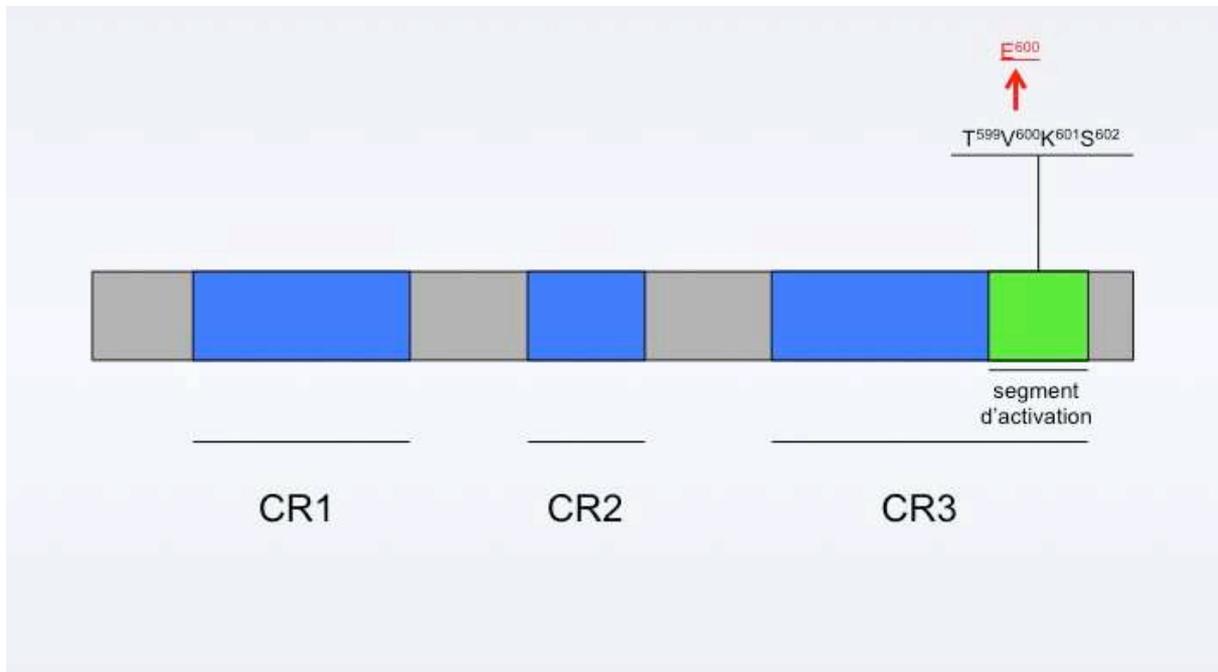


Figure 16. Structure schématique de BRAF.

En bleu: CR1, CR2 et CR3, correspondant aux 3 régions conservées dans toutes les protéines RAF. CR3 correspond au domaine kinase. En vert, le segment d'activation, situé dans CR3. La phosphorylation des résidus Thréonine 599 et Sérine 602 provoque l'activation de BRAF. En rouge, la position de la mutation V600E représentant 85% des mutations de BRAF.

Cette mutation ne porte pas la signature « UV » (ultra-violet) telles les mutations CC/TT ou C/T associées à la formation de dimères de pyrimidine survenant après exposition aux UV. Cette absence de signature « UV » n'est pas réellement surprenante, les cancers thyroïdiens, ovariens ou colorectaux pouvant porter cette mutation sans être exposés aux UV. Les mécanismes d'acquisition de la mutation V600E ne sont pas encore identifiés. La protéine mutée BRAF^{V600E} a une activité kinase 500 fois supérieure à la forme sauvage de BRAF, ce qui stimule la phosphorylation de la protéine ERK et modifie la signalisation cellulaire de manière significative (Davies et al. 2002) (Dhomen et al. 2009). Mis à part la mutation V600E, 75 autres mutations somatiques de BRAF ont été décrites dans les mélanomes humains. Dans les mélanomes mutés pour BRAF, 74-90% sont V600E et 16-29% sont V600K (valine substituée en lysine). L'acide-amino V600 de BRAF est situé dans le domaine d'activation de la kinase, près des résidus T599 et S602 sur lesquels la

phosphorylation provoque l'activité kinase. La mutation V600E pourrait ainsi simuler la phosphorylation de la thréonine T599 et la sérine S602. Une autre des hypothèses du mécanisme d'activation incontrôlée est l'augmentation de l'exposition du segment d'activation lorsqu'un petit acide aminé hydrophobe (valine, V) est remplacé par un résidu hydrophile (acide glutamique, E). Dans l'état normal, la conformation inactive du domaine kinase RAF est cachée dans une poche hydrophobe (wan pt, cell 2004). Il est à noter qu'un petit nombre de mutations ont une activité kinase réduite par rapport à la forme sauvage (G465E, G465V, D593V et G595R), mais de façon surprenante provoquent une activation de la protéine ERK. Le mécanisme moléculaire reste encore inconnu, mais il se pourrait que ces mutations favorisent la formation d'un complexe entre BRAF et CRAF, et induirait l'activation de CRAF (Wan et al. 2004). Ces phénomènes de dimérisation interviennent également dans certains mécanismes de résistance aux inhibiteurs spécifiques de la forme mutée V600E de BRAF. Dans une cellule non mutée, l'activation de RAS entraîne l'homo- ou l'hétérodimérisation de BRAF et CRAF; la liaison du PLX4032 (inhibiteur spécifique de RAF) sur le site catalytique de BRAF ou de CRAF entraîne l'inhibition de la protéine sur laquelle il se fixe mais également l'activation du deuxième partenaire du dimère (mécanisme de transactivation) et la phosphorylation des effecteurs en aval. En présence de BRAF^{V600E}, la formation de dimère n'est pas nécessaire à l'activation des voies d'aval. La liaison du monomère BRAF^{V600E} avec son inhibiteur spécifique, le PLX4032, inhibe l'activité de BRAF, puis de MEK et ERK. Ainsi, l'inefficacité voire l'effet néfaste de l'inhibiteur spécifique est due à la transactivation des dimères de RAF dans les cellules sauvages (Poulikakos et al.) (Heidorn et al.) (figure 17).

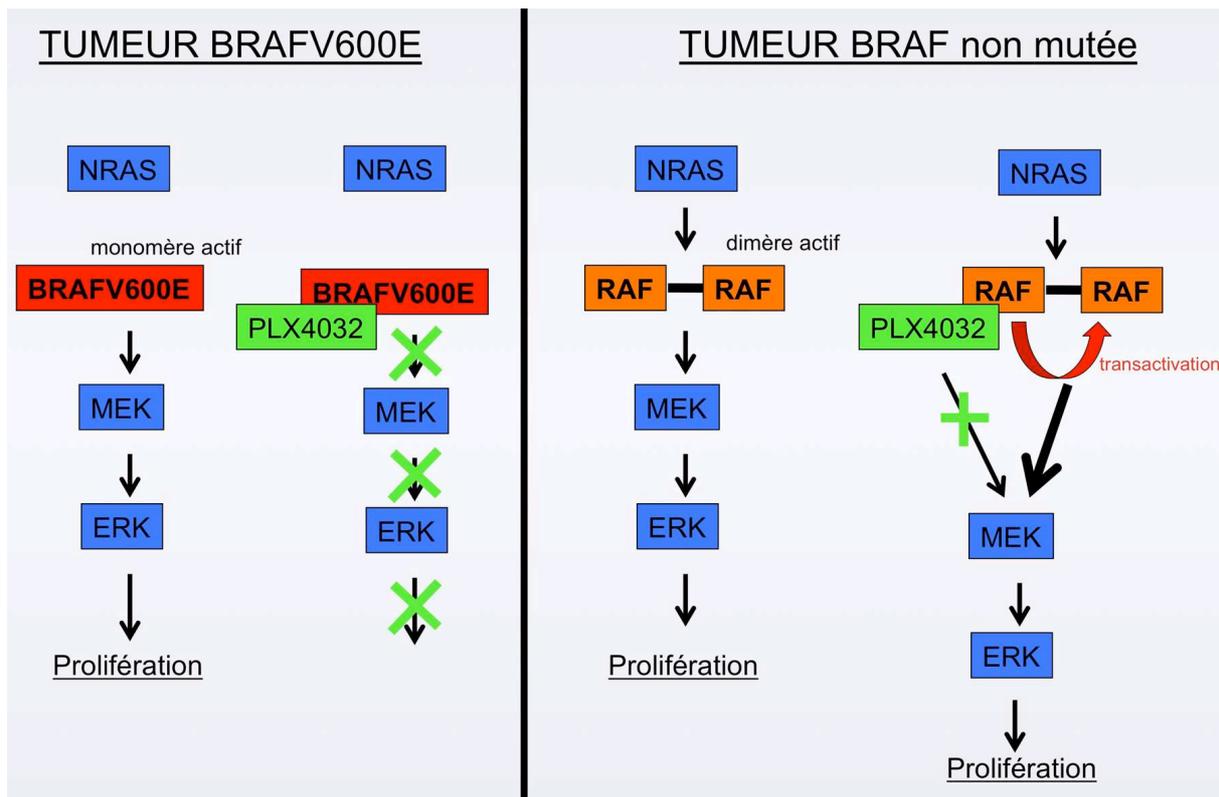


Figure 17. Inhibiteur de BRAF et dimérisation.

En présence de la mutation BRAF^{V600E}, il n'y a pas de dimère et le PLX4032 se lie au monomère qu'il inhibe, bloquant ainsi l'activité des effecteurs MEK et ERK. Dans les cellules non mutées, l'activation de RAS entraîne la dimérisation de RAF. La liaison de l'inhibiteur de BRAF à l'une des protéines du dimère entraîne une transactivation de l'autre protéine, activant les voies d'aval. Ainsi, le PLX4032 n'inhibe pas la voie MAPK.

Les mécanismes cellulaires

La présence de la mutation BRAF^{V600E} n'est ni nécessaire ni suffisante pour induire la formation de mélanomes. Les mutations activatrices de BRAF sont retrouvées dans un grand nombre de naevus (Davies et al. 2002). La croissance initiale des naevus est suivie par une phase de stabilisation et une perte de toute activité de prolifération, et très peu d'entre eux se transforment en mélanome. En effet, la prolifération entraînée par BRAF provoque une sénescence des mélanocytes, c'est-à-dire un arrêt du cycle cellulaire induit notamment par la protéine p16^{INK4A} (codée par le locus CDKN2A). L'expression de cette protéine, ainsi que celle du marqueur de la sénescence, la SA-β-galactosidase, est ainsi retrouvée dans les naevus (Michaloglou et al. 2005). Il est suggéré qu'un naevus correspond à une tumeur bénigne clonale, qui prolifère temporairement sous l'effet de l'activation de BRAF, dont la croissance tumorale s'arrête par sénescence. La sénescence est donc un mécanisme protecteur du développement des tumeurs malignes. Ces données suggèrent donc que BRAF^{V600E} n'est pas suffisant pour induire des mélanomes et que d'autres

altérations génétiques sont nécessaires pour induire la transformation complète des mélanocytes, telles que l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs tels que PTEN ou CDKN2A (Goel et al. 2009). Les modèles expérimentaux (souris et poisson-zèbre) ont été indispensables pour comprendre ces processus (Dhomen et al. 2009) (Patton et al. 2005). Ainsi, la surexpression de la forme mutée BRAF^{V600E} dans les mélanocytes de poisson-zèbre n'induit que des naevus qui n'évoluent en mélanome qu'en cas de perte de p53 (Patton et al. 2005). De plus, il a été récemment montré, dans des fibroblastes et des mélanocytes humains, que la perte de PTEN permettait d'échapper à la sénescence induite par BRAF^{V600E} (Vredeveld et al. 2012).

Les sous types de mélanomes et le pronostic

La prévalence des mutations de BRAF varie en fonction du type de mélanome. Elles sont plus fréquentes au cours des mélanomes cutanés, rares au cours des mélanomes muqueux et acrolentigineux, absentes des mélanomes uvéaux. Les mutations BRAF sont retrouvées de façon préférentielle dans les mélanomes de type superficiel extensif des zones photoexposées de façon intermittente (surtout le tronc) des patients jeunes (mois de 55 ans) (Curtin et al. 2005) (Poynter et al. 2006) (Broekaert et al.). Lorsque BRAF n'est pas muté, d'autres mutations sont retrouvées telles que les mutations de NRAS (15% des mélanomes cutanés), de cKIT (mélanomes muqueux (39%), acrolentigineux (36%) et sur peaux photoexposées de façon chronique (28%)), de CCND1 (codant pour cycline D1) ou encore CDK4. Les mutations de BRAF détectées dans le mélanome primitif sont conservées lors de la progression tumorale métastatique. Lorsque la tumeur primitive n'est pas mutée pour BRAF, les métastases ne le sont pas non plus (Omholt et al. 2003). Ces résultats confirment que les mutations de BRAF sont des événements somatiques précoces lors de la mélanomagenèse pour la plupart des mélanomes. Il est remarquable de constater que la présence de mutation BRAF au stade précoce du mélanome n'influence pas la survie. Cependant, au stade métastatique, le débat est encore ouvert : il semblerait que la présence de la mutation BRAF soit associée à un pronostic plus sombre, mais cela doit être confirmé (Long et al.).

IV.2. Famille RAS

Les mutations de RAS

RAS est l'oncogène le plus fréquemment muté au cours des cancers humains, avec environ 30% de tumeurs ayant une mutation activatrice.

Les 3 membres de la famille RAS sont le gène N(*Neuroblastoma*)RAS, localisé sur le chromosome 1, le gène H(*Harvey*)RAS, sur le chromosome 11 et K(*Kirsten*)RAS sur le chromosome 12 (Demunter et al. 2001). KRAS est l'isoforme la plus fréquemment mutée au cours des cancers humains.

Il s'agit d'oncogènes codant pour des protéines G associées à la membrane, impliquées dans la transduction de signaux de croissance et de différenciation extracellulaire. Pour être recruté à la membrane, RAS doit être farnésylé par une farnésyl-transférase ou géranyl-géranylé par une géranyl-géranyl-transférase. La farnésylation et la géranylgéranylation sont toutes deux effectuées sur le même résidu cystéine. RAS est préférentiellement farnésylé ; cependant, en présence d'inhibiteurs de la farnésylation, N-RAS et K-RAS sont alors géranylgéranylés. H-RAS et N-RAS peuvent également être palmitoylés. Ces modifications post-traductionnelles sont importantes car elles représentent d'éventuelles cibles thérapeutiques.

Une fois mutées, les protéines sont bloquées sous une forme liée au GTP, sont alors activées de façon continue et stimulent les différentes voies effectrices, en particulier les voies RAF-MEK-ERK (Joneson and Bar-Sagi 1997) et PI3K. Lorsque N-RAS est muté, l'activation de ERK passe par C-RAF (ou RAF1) et non plus par B-RAF (Dumaz et al. 2006). Les mutations de RAS favorisent la prolifération tumorale mais également l'invasion et les métastases (Campbell and Der 2004).

Les mutations sont retrouvées sur les codons 11, 12 et 13 de l'exon 1 et sur les codons 59 et 61 de l'exon 2 (Bar-Eli, 1989). Plus de 80% des mutations NRAS surviennent sur le codon 61, et sont Q61R (CAA/CGA) et Q61K (CAA/AAA). Ces mutations ne portent pas de signature UV.

Les mutations de RAS sont retrouvées dans de nombreux cancers. Ainsi, des mutations de KRAS sont présentes dans presque tous les adénocarcinomes pancréatiques, et fréquemment au cours des cancers coliques et pulmonaires, alors que les mutations de NRAS sont fréquentes au cours des leucémies myéloïdes (Bos 1989). Les mutations de HRAS sont rares (certains cancers du rein et de la vessie).

NRAS est muté dans 20% des mélanomes, alors que KRAS et HRAS sont mutés dans 2% et 1% des cas respectivement (Forbes et al. 2008). Pour expliquer la prépondérance des mutations NRAS au cours du mélanome, il a été montré que KRAS est un oncogène plus faible que NRAS dans les mélanocytes (Whitwam et al. 2007).

Les mutations de NRAS ne surviennent pas avec des mutations de BRAF ou de PTEN (Goel et al. 2006) (Tsao et al. 2004) (Tsao et al. 2000). Ceci suggère que NRAS est suffisant pour activer les voies PI3K et MAPK. Pour les mélanomes familiaux avec mutation de CDKN2A, les mutations de RAS sont retrouvées dans 95% des cas (Eskandarpour et al. 2003).

Les mécanismes cellulaires

Les mutations de NRAS induisent une sénescence cellulaire (Serrano et al. 1997). Dans les mélanocytes humains, différentes protéines sont impliqués au cours de l'induction de cette sénescence : p16^{INK4A}, p14^{ARF}, p21, p53, pRb (Haferkamp et al. 2009b) (Haferkamp et al. 2009a). La perte de p16^{INK4A} par β -caténine coopère avec NRAS muté au cours de la formation des mélanomes (Delmas et al. 2007) ; de même, p16^{INK4A} ou p19^{ARF} coopère avec HRAS muté au cours de la mélanomagenèse (Sharpless and Chin 2003). Des souris transgéniques exprimant l'oncogène NRAS^{Q61K} dans le lignage mélanocytaire développent spontanément des mélanomes, mais avec un temps de latence élevé suggérant la nécessité d'autres altérations génétiques (Ackermann et al. 2005).

Les sous types de mélanomes et le pronostic

La prévalence des mutations de NRAS varie en fonction du type de mélanome : 31% pour les mélanomes nodulaires, 21% pour les mélanomes à extension superficielle, 19% des mélanomes de Dubreuilh et 8% pour les mélanomes acro-lentigineux. Quant à la distribution des mutations de NRAS en fonction du site anatomique, 24% des mutations surviennent sur des zones chroniquement exposées au soleil (tête et cou), contre 17% sur les zones d'exposition intermittente (tronc et extrémités) et 6% sur les zones non exposées telles que les muqueuses (Platz et al. 2008) (Lee et al.).

Les mutations de RAS sont détectées dès la phase de croissance horizontale, et sont conservées lors de la progression tumorale métastatique. Lorsque la tumeur primitive n'est pas mutée NRAS, les métastases ne le sont pas non plus, suggérant que les mutations de NRAS n'ont pas un rôle majeur pour le développement des métastases (Omholt et al. 2002). La présence de mutation NRAS au stade métastatique du mélanome serait plutôt de bon pronostic (Ugurel et al. 2007),

V- LA VOIE PI3K

La voie PI3K (phosphoinositide-3-OH kinase) régule la survie cellulaire, la prolifération et est fréquemment activée au cours du mélanome. Après l'interaction avec les récepteurs de facteurs de croissance activés, la PI3K catalyse la réaction de phosphorylation du groupe 3'-hydroxyl du phosphatidylinositol (PI) et de phosphoinositides, générant principalement des phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3). AKT se lie alors à PIP3 et est recrutée à la membrane où elle est phosphorylée et activée par PDK1 et mTORC2. L'activation de AKT entraîne la transcription d'un grand nombre de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, l'apoptose, la prolifération. Ainsi, AKT a une forte activité anti-apoptotique via l'inhibition de protéines pro-apoptotiques telles que BAD, caspase 9, MDM2 et les membres de la famille Forkhead. AKT active la prolifération cellulaire en inactivant p27 et en inhibant la glycogène synthase kinase 3 β (GSK3 β). De plus, AKT active le complexe mTORC1, composé entre autres de la protéine kinase mTOR. mTORC1 phosphoryle et active les kinases S6 1 et 2, qui phosphorylent la protéine ribosomale S6, PDCD4, eEF2 kinase et eIF4B, permettant ainsi l'augmentation de la synthèse protéique (Carracedo and Pandolfi 2008) (figure 18).

PTEN, une lipide phosphatase qui déphosphoryle PIP3, contrôle négativement la voie PI3K. En contrôlant les niveaux de PIP3, PTEN contrôle AKT et la survie cellulaire, d'où son rôle suppresseur de tumeur. L'activation de cette voie semble corrélée avec le stade d'avancement tumoral puisqu'elle est activée dans 17% des naevi, 49% des mélanomes primaires et 77% des mélanomes métastatiques (Dai et al. 2005), suggérant un rôle de cette voie dans les processus tardifs d'invasion et de métastase. La protéine PTEN est inactivée dans 5 à 20% des mélanomes primitifs et dans 30 à 40% des lignées cellulaires de mélanome, entraînant ainsi l'activation de la voie PI3K (Wu et al. 2003) (Guldberg et al. 1997) (Tsao et al. 1998). L'expression de PTEN peut être perdue en cas de mutation ou de perte allélique (Guldberg et al. 1997) (Tsao et al. 1998), mais également via des mécanismes épigénétiques (Mirmohammadsadegh et al. 2006) ou des altérations de la localisation intracellulaire (Whiteman et al. 2002) (Zhou et al. 2000).

Les mutations de PTEN sont souvent observées dans des mélanomes mutés pour BRAF, alors que les mutations NRAS sont exclusives des mutations BRAF et PTEN (Goel et al. 2006) (Tsao et al. 2004). En effet, la combinaison des mutations BRAF et PTEN pourrait être équivalente à l'effet d'une mutation NRAS (figure 19). Les mutations de BRAF et la perte de PTEN sont retrouvées dans environ 20% des mélanomes (Dankort et al. 2009). Ainsi, Davies et al (Davies et al. 2009) retrouvent de très faibles niveaux d'expression de PTEN dans des mélanomes BRAF^{V600E}, alors que les mélanomes mutés pour NRAS ont une forte expression de PTEN. Cependant, de façon étonnante, l'expression de p-AKT est plus élevée dans les

tumeurs à faible taux de PTEN que dans les tumeurs mutées NRAS. Ceci suggère que la perte de PTEN ou la mutation de NRAS ne seraient pas équivalentes pour activer la voie PI3K. Dans les cellules mutées BRAF^{V600E}, l'activation de AKT est nécessaire à l'initiation du mélanome, démontrant l'interdépendance de ces 2 voies.

Au cours de la mélanomagenèse, les mutations de BRAF sont très certainement un événement précoce. L'activation de la voie PI3K est probablement un événement plus tardif : 4 arguments plaident en faveur de cette hypothèse :

- chez les patients présentant un syndrome de Cowden, lié à une perte précoce de PTEN, le risque de mélanome n'est pas augmenté
- dans les naevus, il n'y a pas de perte de PTEN (Tsao et al. 2003)
- la perte de PTEN est rare dans les mélanomes fins, mais augmente avec l'épaisseur du mélanome (Goel et al. 2006)
- les données des lignées cellulaires retrouvent une perte de PTEN de 30% ; en effet, les lignées cellulaires sont développées à partir de mélanomes métastatiques, au cours desquels la perte de PTEN est plus fréquente.

La voie PI3K peut être activée par d'autres mécanismes : ainsi, 5% des mélanomes ont une mutation activatrice de PIK3CA, (Curtin et al. 2006b) (Omholt et al. 2006), et la kinase effectrice AKT3 est surexprimée dans 60% des cas par amplification du gène (Davies et al. 2008) (Stahl et al. 2004).

Il est important de signaler que les différents éléments de la voie PI3K interagissent avec d'autres voies de signalisation, dans le cadre d'un réseau complexe. Ainsi, dans certaines cellules, RAS peut être activée par PI3K (Yart et al. 2002). BRAF est également phosphorylé et inhibé par AKT, diminuant l'activité de la voie MAPK (Guan et al. 2000), GSK3 inhibe ERK (Wang et al. 2006), et PTEN inhibe également la voie MAPK (Gu et al. 1998).

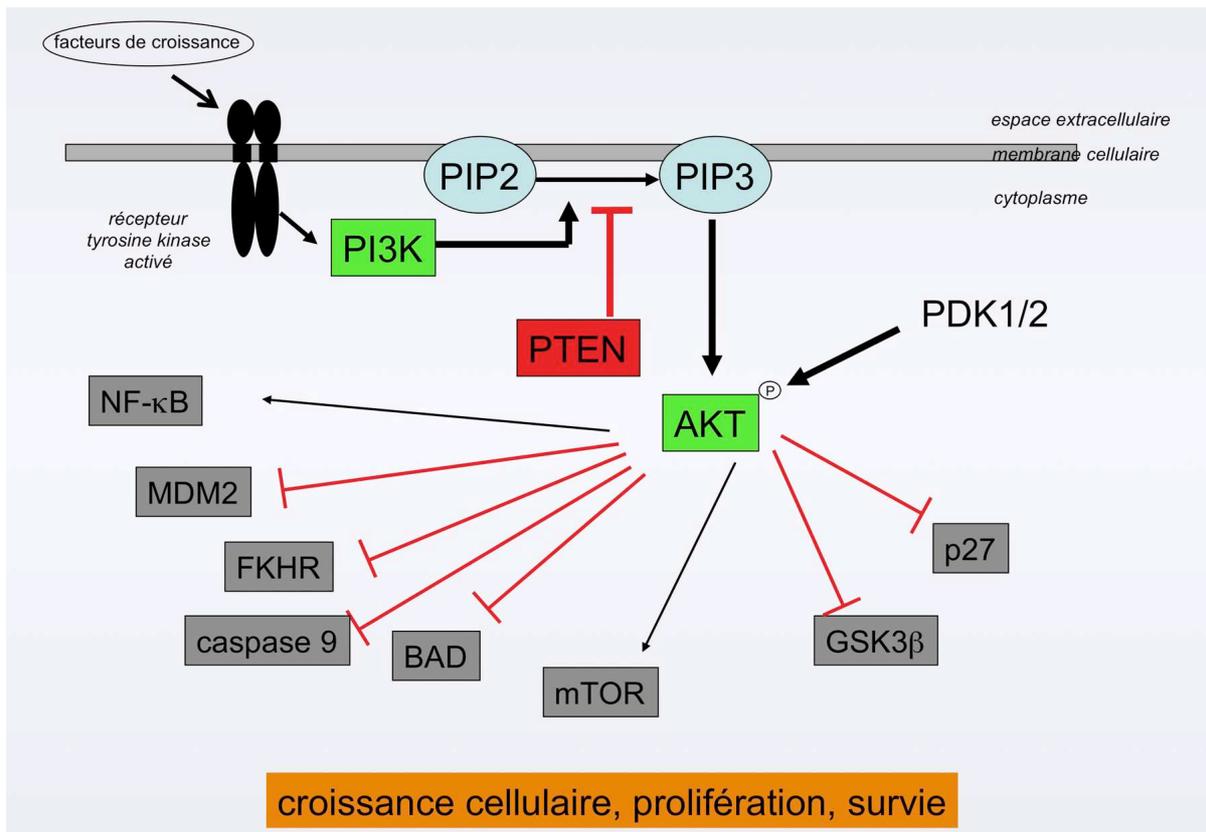


Figure 18. La voie PI3K.

Après activation du récepteur de tyrosine kinase, PI3K est activée et catalyse la conversion de PIP2 en PIP3. PIP3 participe à l'activation de AKT. L'activation de AKT par phosphorylation provoque l'activation et l'inhibition de plusieurs cibles, provoquant la croissance cellulaire, la prolifération et la survie par différents mécanismes.

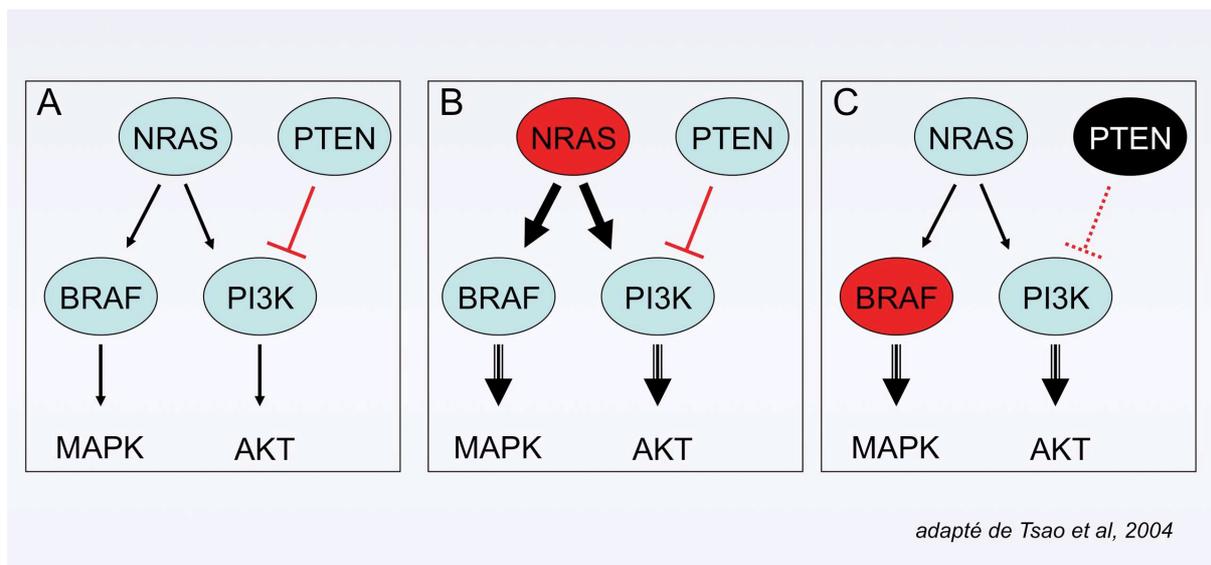


Figure 19. Différents modèles d'interaction génétique.

(A) Dans une cellule normale, NRAS non muté active BRAF et PI3K, stimulant ainsi les effecteurs d'aval MAPK et AKT. (B) NRAS muté active les deux voies. (C) L'association d'une mutation de BRAF et d'une perte de PTEN coopère pour activer les deux voies.

VI. LES TRAITEMENTS CIBLES

Pendant plus de 30 ans, les différentes chimiothérapies n'ont pas permis d'augmenter la survie des patients ayant un mélanome métastatique.

Les voies de signalisation MAPK et PI3K sont des cibles très attractives pour les traitements anti-néoplasiques en raison des mutations fréquemment retrouvées dans différents cancers. L'importance de ces voies au cours des processus physiologiques peut faire craindre une toxicité inacceptable en cas d'inhibition de ces protéines. Cependant, les mutations activatrices de la voie MAPK dans les cellules tumorales les rendent peut être plus sensibles aux traitements inhibiteurs que les cellules normales, comme c'est déjà le cas dans certains cancers traités avec des inhibiteurs de kinases (Sharma and Settleman 2007).

De nombreux efforts ont d'abord été faits pour inhiber les protéines de la famille RAS, principalement par des inhibiteurs de farnésyl-transférase. Ces molécules empêchent les modifications post traductionnelles des protéines RAS et ne permettent pas leur localisation membranaire, inhibant ainsi leur activité. Ces inhibiteurs sont toujours en cours d'évaluation, mais les rares essais thérapeutiques semblent plutôt décevants, notamment dans le cancer du pancréas pour lequel KRAS est muté dans plus de 95% des cas (Cohen et al. 2003).

D'autres cibles sont RAF et MEK. Le PLX4032, que l'on connaît sous la dénomination commune internationale de vemurafenib et sous le nom commercial de Zelboraf* est un

puissant inhibiteur de BRAF^{V600E}. Les études précliniques ont montré qu'une faible concentration de vemurafenib inhibe l'activité kinase de BRAF^{V600E}, interrompt la voie de signalisation MAPK et bloque la prolifération de cellules portant la mutation BRAF^{V600E} (Tsai et al. 2008) (Sondergaard et al.).

Un essai de phase 3 a été effectué : il comparait le vemurafenib en première ligne de traitement à la chimiothérapie par dacarbazine chez des patients atteints de mélanome métastatique, porteurs de la mutation BRAF^{V600E}. Le traitement par vemurafenib a permis d'obtenir un taux de réponse de 48% (5% pour le traitement par dacarbazine) chez les patients ayant un mélanome avec mutation BRAF^{V600E}. La survie à 6 mois a été de 84% dans le groupe vemurafenib et de 64% dans le groupe traité par dacarbazine. On ne connaît pas encore la survie médiane globale des patients traités par vemurafenib car plus de 50% des patients de l'essai sont encore vivants (Chapman et al.). Cependant, des résistances secondaires apparaissent très fréquemment après 6 à 8 mois de traitement (Flaherty et al.). Plusieurs mécanismes concernant ces phénomènes de résistance ont déjà été publiés : ces résistances ne sont pas associées à des mutations supplémentaires de BRAF mais à l'altérations d'autres oncogènes entraînant la réactivation de la voie MAPK, ou l'activation de voies de survie alternatives :

- activation de PDGFR β ,
- mutation de NRAS (Nazarian et al.) : il a été montré que l'activation de NRAS dans les mélanomes induit C-RAF et non B-RAF pour activer MEK-ERK (Dumaz et al. 2006). Ainsi, l'activation de NRAS pourrait contourner l'inhibition de B-RAF par le PLX4032, en réactivant la voie MAPK.
- activation de ERK par la protéine COT (codée par le gène MAP3K8) (Johannessen et al.) : une hyperexpression de MAP3K8 a été retrouvée dans des lignées cellulaires BRAF^{V600E}, et ce avant tout traitement ; ceci pourrait expliquer pourquoi 10% des mélanomes BRAF^{V600E} ont une résistance de novo aux inhibiteurs de BRAF.
- existence d'isoformes de BRAF^{V600E}, créés par épissage alternatifs, qui peuvent alors se dimériser indépendamment de RAS et entraîner une résistance au PLX4032 (Poulikakos et al.).
- mutation de MEK1 (Wagle et al. 2011).

Ces études soulignent l'importance des mécanismes de résistance, afin de pouvoir proposer un traitement « sur mesure ». Les cellules, dont la voie MAPK est toujours activée en présence d'inhibiteurs de BRAF, pourraient être sensibles à des inhibiteurs des voies d'aval. Ainsi, MEK est une cible thérapeutique intéressante ; le tramétinib est un inhibiteur sélectif de MEK1 et MEK2, disponible par voie orale. Dans un essai récent de phase 3 comparant le tramétinib à la chimiothérapie (dacarbazine ou paclitaxel) au cours de mélanomes métastatiques mutés BRAFV600E/K, l'inhibiteur de MEK a montré une amélioration de la

survie sans récurrence et de la survie globale à 6 mois, avec un taux de réponse de 22% (Flaherty et al. 2012). Les données actuelles, préliminaires, suggèrent que l'inhibiteur de MEK n'a que peu ou pas d'activité chez des patients prétraités par un inhibiteur de BRAF. La pertinence d'une inhibition combinée de BRAF et de MEK reste à définir. Des résultats très récents semblent indiquer une activité prometteuse de cette combinaison avec un taux de réponse de 56% et une survie sans récurrence de 7,4 mois (Weber et al. 2012). De plus cette association permettrait une diminution du nombre de carcinomes cutanés épidermoïdes induits par les inhibiteurs de BRAF. En effet, ces inhibiteurs peuvent activer la voie MAPK dans les cellules normales (Heidorn et al.) (Poulikakos et al.) (Hatzivassiliou et al.). D'ailleurs, dans un modèle préclinique de carcinome cutané épidermoïde chimiquement induit, l'inhibiteur de BRAF accélérât la croissance tumorale et l'ajout d'un inhibiteur de MEK empêchait le développement tumoral (Su et al. 2012).

Par ailleurs, les cellules mutées pour NRAS (sans hyperexpression de PDGFR β) sont sensibles aux inhibiteurs de MEK en monothérapie. Une étude a montré pour la première fois l'efficacité d'un inhibiteur de MEK chez des patients avec mélanome métastatique muté NRAS (Ascierto et al. 2012). Des cellules surexprimant MAP3K8 ne sont sensibles qu'à l'association d'un inhibiteur de MEK avec un inhibiteur de BRAF.

Il devient donc de plus en plus évident que la combinaison de plusieurs thérapeutiques ciblées sera plus efficace qu'une monothérapie : inhibiteurs de BRAF et de MEK, mais également inhibiteurs de la voie PI3K (inhibiteur de PI3K, AKT, mTORC1, p70S6K). (Lasithiotakis et al. 2008) (Shimizu et al. 2012). L'association du vemurafenib et de l'ipilimumab est également en cours d'évaluation.

PROJET

La mélanomagenèse est un processus comprenant de multiples étapes associées à des modifications cellulaires et moléculaires variées.

Au niveau cellulaire, la première étape correspond à une prolifération des mélanocytes normaux, conduisant ainsi à l'apparition d'un naevus. Dans un deuxième temps, les cellules deviennent immortelles afin de produire un mélanome en phase de croissance horizontale (prolifération des mélanocytes tumoraux dans l'épiderme). Viennent ensuite les phases de transition pseudo-épithélio-mésenchymateuse de migration et d'invasion aboutissant à la croissance verticale du mélanome puis au processus métastatique.

Les mécanismes moléculaires associés à ces phénomènes cellulaires sont complexes. Les voies MAPK, Wnt/ β -caténine et PI3K sont connues pour être activées au cours du mélanome humain. Cependant, il n'a jamais été démontré que ces 3 voies étaient activées de façon concomitante. Nous avons des données concernant l'implication de NRAS, BRAF, β -caténine et p16 dans la prolifération et l'immortalisation. Les mutations isolées de BRAF ou NRAS induisent une prolifération mélanocytaire puis une sénescence et sont donc insuffisantes au développement du mélanome. La sénescence induite par l'activation de ces oncogènes doit être dépassée. D'autres mécanismes moléculaires sont donc impliqués : l'immortalisation des mélanocytes est associée, entre autres, à l'inhibition de p16 ou encore à l'activation de β -caténine.

La compréhension des mécanismes biologiques nécessaires à l'initiation et à la progression des mélanomes permettra une amélioration de leur classification et du développement de nouvelles approches thérapeutiques.

L'utilisation récente d'inhibiteurs spécifiques de BRAF^{V600E} a permis l'obtention de résultats spectaculaires, qui n'avaient auparavant jamais été observés pour des mélanomes métastatiques.

Cependant, ces résultats doivent être nuancés :

- environ 10% des patients ayant un mélanome muté pour BRAF^{V600E} ont une résistance de novo au traitement
- de nombreux patients vont développer une résistance au traitement, et ce dans un délai moyen de 7 mois
- ce traitement ne s'adresse qu'aux patients ayant une tumeur avec mutation BRAF^{V600E}, soit 50% des patients.

Les mécanismes de résistance aux inhibiteurs spécifiques de BRAF^{V600E} commencent à être étudiés, et parmi ceux-ci, des mutations activatrices de NRAS ont été décrites (Nazarian et al.).

Au cours de ce travail, nous avons choisi de nous intéresser au rôle de NRAS et PTEN, 2 éléments majeurs des voies MAPK et PI3K, au cours de la mélanomagénèse. Les seules mutations activatrices de l'oncogène NRAS ne permettent pas une transformation complète des mélanocytes en raison des phénomènes de sénescence qu'elles entraînent. Il en est de même pour les mutations BRAF qui sont ainsi fréquemment associées à des pertes de PTEN. C'est la raison pour laquelle nous avons décidé d'étudier les mutations de NRAS associées à la perte de PTEN au cours du mélanome.

Dans un premier temps, nous avons recherché la présence de mutations de NRAS associée à une perte d'expression de PTEN dans 2 cohortes de prélèvements de mélanomes humains ainsi que dans des lignées cellulaires de mélanomes humains.

Puis nous avons développé un modèle de souris transgénique surexprimant la forme oncogénique de NRAS dans laquelle le gène PTEN est invalidé dans le lignage mélanocytaire. Nous avons ainsi pu étudier le rôle de NRAS et de PTEN dans la mélanomagénèse. Nous avons également étudié le profil d'expression des différentes protéines impliquées dans des voies de signalisation afin de caractériser les voies moléculaires et leur impact sur le pronostic et le traitement.

RESULTATS : ARTICLE

COOPERATION BETWEEN NRAS AND PTEN DURING
MELANOMA INITIATION AND PROGRESSION

COOPERATION BETWEEN NRAS AND PTEN DURING
MELANOMA INITIATION AND PROGRESSION

Christine Longvert^{1-3*}, Gwendoline Gros^{1-3*}, Alejandro Conde-Perez^{1-3*}, Boris C. Bastian⁴, Leon C.L.T. Van Kempen^{5,6}, Sophie Colombo¹⁻³, Isabel Puig¹⁻³, Delphine Champeval¹⁻³, Yveline Bourgeois¹⁻³, Lionel Larue^{1-3#}

¹ Institut Curie, Developmental Genetics of Melanocytes, 91405, Orsay, France

² CNRS, UMR3347 Bat. 110, 91405, Orsay Cedex, France.

³ INSERM U1021

⁴ Departments of Dermatology and Pathology and UCSF Helen Diller Family Comprehensive Cancer Center, University of California San Francisco, San Francisco.

⁵ Jewish General Hospital, Lady Davis Institute for Medical Research, Montreal, Quebec, Canada.

⁶Department of Pathology, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

#Address correspondence to Lionel LARUE

e-mail: lionel.larue@curie.fr - Tel: (33) 1 69 86 71 07 - Fax: (33) 1 69 86 71 09

Institut Curie – Bat 110 - 91405, Orsay Cedex, France

Key words : NRAS, PTEN, melanoma, initiation, senescence

Research areas : Genetics and molecular Biology & Molecular and cellular Biology

ABSTRACT

Melanomagenesis is a multistep process involving various cellular and molecular changes. The phospho-inositide-3-kinase (PI3K) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways have important roles in melanoma development. Treatment with BRAF inhibitors can be highly effective against metastatic melanomas, but the effects are limited to BRAF^{V600E} patients, and resistance often develops. PTEN and NRAS, both major components of the PI3K and MAPK pathways, are potential alternative targets for melanoma therapy. The aim of this study was to evaluate the cooperation between NRAS and PTEN during melanomagenesis. PTEN expression is frequently altered in melanoma, but the role of PTEN is not yet fully understood. We found concomitant NRAS mutation and loss of PTEN in human melanoma samples and cell lines. Then, we studied transgenic mice with inactivation of PTEN and/or expression of an oncogenic form of NRAS in the melanocyte lineage. PTEN inactivation alone had no discernible effect on melanomagenesis. However, in melanomas initiated by oncogenic NRAS, inactivation of PTEN caused more rapid melanoma development and higher metastatic rate. We demonstrate that PTEN loss induces a senescence bypass. Thus, PTEN inactivation cooperated with oncogenic NRAS to promote melanoma initiation and progression.

INTRODUCTION

Melanoma is an aggressive skin cancer, and its incidence has been increasing (in the USA, there will be an estimated 76,250 new cases and 9,180 deaths in 2012) (Siegel et al. 2012). Melanoma has a high metastatic potential and is resistant to conventional therapy. For patients with metastatic disease, the median survival time is 9 months (Balch et al. 2009). The standard treatment is dacarbazine chemotherapy, to which the response rate is 20% and the complete response rate less than 5%. Targeted therapy with vemurafenib, a specific inhibitor of BRAF^{V600E}, gives exceptional results in patients with metastatic melanomas: the response is rapid, and overall and progression-free survival is improved (Chapman et al. 2011). Results as good as those with BRAF^{V600E}-specific inhibitors have never been obtained with conventional melanoma therapy. However, BRAF^{V600E}-specific inhibitors are only active in patients with BRAF^{V600E} mutations (50% of melanoma patients). Therefore, novel ways to treat and prevent this disease are needed. We decided to focus on NRAS and PTEN, which are involved in Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) and phosphatidylinositol 3' kinase (PI3K) pathways. MAPK and PI3K pathways are frequently coactivated in melanoma through overexpression of receptor tyrosine kinase, mutations in RAS and RAF or loss of negative regulators such as PTEN. Signals from receptor tyrosine kinase can promote proliferation through the MAPK and the PI3K pathway. Oncogenic NRAS can also activate the PI3K cascade. MAPK signalling can lead to proliferation in transformed cells but also induces a potent form of cellular growth arrest, known as senescence in normal melanocytes. NRAS is mutated in 15% of melanomas, and in 6 to 20% of naevi,

mainly in codon 61, with no correlation with chronic or non-chronic photoexposed skin. NRAS induces melanocyte proliferation and also melanocyte senescence. Mutation of NRAS alone is insufficient for full malignant conversion, but NRAS mutations are not associated with BRAF mutation or loss of PTEN (Poynter et al. 2006). PTEN encodes a lipid and protein phosphatase, and is a negative regulator of the PI3K pathway (Stahl et al. 2003). Mutational inactivation and/or deletion of PTEN is found in 5 to 20% of uncultured primary and metastatic melanomas (Zhou et al. 2000) (Whiteman et al. 2002; Wu et al. 2003; Goel et al. 2006) and in 30 to 40% of melanoma cell lines (Guldberg et al. 1997) (Tsao et al. 1998) (Wu et al. 2003). Various mechanisms have been described to affect PTEN expression, including genetic (mainly by loss of heterozygosity) and epigenetic mechanisms and alteration of the protein's subcellular localisation (Zhou et al. 2000) (Whiteman et al. 2002; Mirmohammadsadegh et al. 2006). The relationship between PTEN expression on prognosis is not clear, and it is not known whether loss of PTEN is an early or a late event. At least four arguments are consistent with a late loss: 1) in Cowden syndrome, there is an early germinal loss of PTEN, but such patients do not develop melanomas; 2) there is no loss of PTEN expression in benign melanocytic tumours; 3) the rate of PTEN loss in thin primary melanomas is low; 4) PTEN is lost from only 30% of melanoma cell lines, and these cell lines are mostly generated from metastatic lesions. Loss of PTEN causes increased AKT phosphorylation and activity, promoting melanoma cell growth and survival. It is generally believed that PTEN loss and NRAS mutations are not associated (Tsao et al. 2000) (Goel et al. 2006); indeed, PTEN is a member of the PI3K pathway, which is a downstream effector of RAS, so it is unclear why loss of PTEN would confer any advantage on cells carrying an NRAS mutation. However, it has been shown that PTEN loss and

KRAS mutations are associated and synergistic in some cancers, including pancreatic, lung, thyroid, and endometrial cancers (Hill et al. 2010) (Iwanaga et al. 2008) (Miller et al. 2009) (Kim et al. 2010). Also, in melanoma, HRAS mutation can be associated with PTEN loss (Nogueira et al. 2010).

In this study, we first tested for both NRAS mutations and PTEN loss in human melanoma samples and cell lines. We then used transgenic mice with PTEN loss and NRAS mutations in the melanocyte lineage to demonstrate synergy between the two during melanomagenesis.

RESULTS

Presence of both NRAS^{Q61K} mutations and PTEN loss in human melanoma samples

A library of 105 human melanoma samples was analysed by comparative genomic hybridization for the presence of the PTEN locus and for the presence or absence of mutations affecting NRAS and BRAF. BRAF^{V600E} mutations were found in 35 samples, NRAS^{Q61K} mutations in 16. Two of the 16 samples carrying NRAS^{Q61K} also showed homozygous loss of PTEN; of the 35 samples carrying BRAF^{V600E}, 12 were heterozygous-loss PTEN and two were homozygous-loss PTEN (figure 1a). A second library of 101 human melanoma samples (15 primary melanomas, 16 lymph nodes metastases, 65 cutaneous metastases, and 5 visceral metastases) was analysed for BRAF^{V600E} mutations, NRAS^{Q61K} mutations and PTEN loss. Using allele-specific PCR and DNA sequencing, we found that 14 of the 101 (14%) samples harboured NRAS^{Q61K} mutations, 53 (52%) BRAF^{V600E}, and four samples carried both NRAS^{Q61K} and BRAF^{V600E}. Immunohistochemistry was used to test for PTEN protein in these samples. Thirty-nine samples were negative for PTEN (39%): one of these 39 was mutated for NRAS^{Q61K}, two were mutated for both NRAS^{Q61K} and BRAF^{V600E}, eight were wild type for NRAS and BRAF and 28 were mutated for BRAF^{V600E} (figure 1b).

Presence of both NRAS^{Q61K} mutations and PTEN loss in human melanoma cell lines

We tested nine independent human melanoma cell lines for mutations in NRAS and

BRAF, and for the expression of PTEN (figure 2 and table 1). Two cell lines carried NRAS^{Q61K} mutations, one was NRAS^{Q61H}, four were BRAF^{V600E}, and two were wild type for both NRAS and BRAF. None of them carried both NRAS^{Q61K} and BRAF^{V600E} mutations. The presence of PTEN was evaluated by western blot analysis: four cell lines did not produce PTEN (YUDEDE, HS944, SK29 and Lu1205). Two of these lines also carried the NRAS^{Q61} mutation (YUDEDE and HS944) and the two others were BRAF^{V600E} mutants (SK29 and Lu1205). This demonstration of concomitant NRAS^{Q61K} mutation and the absence of PTEN expression conflicts with previous suggestions that associated NRAS^{Q61K} mutation and PTEN loss is not found (Tsao et al. 2000) (Goel et al. 2006).

Melanoma susceptibility of NRAS, PTEN and NRAS-PTEN mice.

We assessed the contribution of NRAS^{Q61K} mutation and the loss of PTEN in melanocytes to the emergence of melanoma. To do this, we generated mice carrying these different mutations in the melanocyte lineage. To do so, we crossed Tyr::NRAS^{Q61K} mice with Tyr::Cre mice and PTEN flox/+ mice (Lesche et al. 2002). By Mendelian genetics, we produced the following mice: Tyr::Cre/^o ; PTEN flox/+ (named PTEN), Tyr::NRAS^{Q61K} ; Tyr::Cre/^o (named NRAS) and Tyr::NRAS^{Q61K} ; Tyr::Cre/^o; PTEN flox/+ (named NRAS-PTEN).

None of the PTEN mice (n = 19) developed any melanoma during 2 years of follow up observation.

Eighteen of the 35 NRAS mice (51%) spontaneously developed melanomas with a latency period of 71 ± 16 weeks. The growth of the skin melanomas was followed over time (Figure 3). The mean number of melanomas per mouse was 1.6, and most were in the hairy part of the skin (94%) (figure 3a). Autopsy revealed

macrometastases in lymph nodes in 28% of the NRAS mice, and in lung in about 5% (Longvert et al. 2011); and the tumours grew in the dermis. The proliferations were constituted of irregularly pigmented cells of diverse sizes, with large nucleoli and mitoses; the cells were positive for PS100 immunostaining (figure 3b-e).

NRAS-PTEN mice spontaneously developed melanomas, with a higher penetrance (30 of 35 mice, 86%) and a shorter latency (27 ± 13 weeks) than the NRAS mice. The mean number of melanomas per mouse was 2.1 (not significantly different to the value for NRAS mice; p-value = 0.37). NRAS-PTEN melanomas grow faster and larger than NRAS melanomas (figure 4). The location on the body of NRAS-PTEN melanomas is similar to that of NRAS melanomas (92% on hairy skin) (figure 3f), and histopathologically, the two types of melanoma are similar (figure 3g-j). The lymph node metastatic rate from NRAS-PTEN melanomas is 57%, and lung metastasis were found in 47% of cases (figure 5). The comparison of NRAS and NRAS-PTEN mice indicates that melanoma-free survival is decreased by PTEN loss (figure 6). These observations show that NRAS and PTEN cooperate in the melanocyte lineage *in vivo*; the presence of an NRAS mutation (NRASQ61K) and the loss of PTEN lead to an efficient initiation of melanomagenesis.

Loss of PTEN induces immortalization but not proliferation

Since proliferation and immortalization are the two main events associated with melanoma initiation, we assessed the role of loss of PTEN in these two phenomena. Mice carrying a conditional deletion of PTEN (Tyr::Cre^o ; PTEN f/f) in the melanocyte lineage were produced on a C57BL/6 background. The numbers of melanoblasts in the trunk skin region were counted in wild-type (Tyr::Cre^o ; PTEN^{+/+} named WT) and mutant littermates (Tyr::Cre^o ; PTEN^{F/F} named PTEN) between E13.5 and E15.5 to

detect any difference in proliferation. There was no significant difference between the numbers of melanoblasts in the WT and mutant at these stages (figure 7). PTEN did not affect melanoblast numbers during embryonic development, and indeed, the loss of PTEN did not induce melanoblast proliferation on a C57BL/6 background. We therefore used a classical *in vitro* test (Delmas et al. 2007) to evaluate the role of PTEN in immortalisation. To do this, we established cultures of melanocytes from PTEN and WT mice. The initial rates of growth of the WT and PTEN melanocytes *in vitro* were similar, confirming that the absence of PTEN did not induce proliferation (figure 8). Cultures of PTEN melanocytes divided continuously and rapidly became immortalized. In contrast, WT melanocytes in culture stopped expanding within four weeks of explantation, and adopted a flattened morphology and accumulated melanin as previously described (Delmas et al. 2007). After about 16 weeks of culture, some WT melanocytes at the edge of some colonies became spindle-shaped and started to divide again; some of these cells proliferated for a limited number of cycles and others became immortalized (not shown). Melanocyte lines could be established from 90% (9 of 10) of PTEN newborn pup skins, but only from 28% (2 of 7) of their wild-type littermates, providing further evidence that the absence of PTEN from melanocytes increased the efficiency of immortalisation.

Loss of PTEN results in phosphorylation of GSK3 β and affects the levels of β -catenin and p16^{INK4A}

To understand the molecular mechanisms underlying the differences between NRAS and NRAS-PTEN melanomas, we studied proteins of the MAPK and PI3K signalling pathways. There was more p-AKT in NRAS-PTEN than NRAS melanomas, consistent with a “superactivation” of the PI3K/AKT pathway associated with NRAS

activation and PTEN loss. There was no significant difference between the two types of tumour concerning the MAPK downstream proteins p-ERK and p-CREB, which is still consistent with NRAS activation in both tumours (figure 9a).

We then studied proteins downstream from PI3K. Surprisingly, we found that p-GSK3 β was more abundant in NRAS-PTEN than NRAS melanomas, without any difference for p-S6 or p27 (figure 9b). We then studied β -catenin, phospho- β -catenin and p16^{INK4A}. p- β -catenin was more abundant and p16^{INK4A} less abundant in NRAS-PTEN than NRAS melanomas (figure 9b).

DISCUSSION

We report that PTEN loss can be associated to NRAS mutations in human samples, although this was previously not believed to be likely. The two events can also cooperate to promote melanoma and metastasis development in transgenic mice. Previous studies suggested that RAS and PTEN mutations do not favour the process of tumorigenesis in melanoma (Tsao et al. 2000), or in endometrial cancer (Ikeda et al. 2000). Others have shown down-regulation of PTEN by oncogenic RAS (Vasudevan et al. 2007). However, this was not the case for our human melanoma cell lines or for our NRAS mouse melanomas, in which PTEN expression was high in the presence of an oncogenic form of NRAS. Our results show that PTEN is involved in melanoma initiation (higher penetrance and shorter latency of melanoma development in NRAS-PTEN than NRAS mice) and also in melanoma progression (higher metastatic rate in NRAS-PTEN than NRAS melanoma mice). To identify the molecular mechanisms underlying these results, we compared the expression of downstream effectors of MAPK and PI3K in NRAS and NRAS-PTEN melanomas. We found clear overexpression of p-AKT and p-GSK3 β in the NRAS-PTEN melanomas. p-GSK3 β belongs to the Wnt- β -catenin pathway. Delmas et al (Delmas et al. 2007) have shown that β -catenin induces immortalisation of melanocytes by suppressing p16^{Ink4a} expression. Also, in primary human fibroblasts and melanocytes, PTEN loss inhibits BRAF^{V600E}-induced senescence (Vredeveld et al. 2012). Consequently, our hypothesis was that loss of PTEN may result in senescence bypass. At the molecular level, we found a lower expression of p16^{Ink4a} protein in NRAS-PTEN than NRAS melanomas. The level of β -catenin was not dramatically more important in NRAS-PTEN melanomas compared with NRAS

melanomas. As such this is not consistent with β -catenin suppressing p16^{Ink4a} expression in NRAS-PTEN tumours. One explanation of this unexpected result is that there may be another mechanism of senescence suppression, not involving the β -catenin pathway. Indeed, it has been recently demonstrated that activation of the PIK3CA/AKT pathway (by activation of AKT1 or inhibition of PTEN) suppresses senescence induced by activated RAS, thereby promoting tumorigenesis (Kennedy et al. 2011). The mechanisms underlying this phenomenon are the diminution of p16^{Ink4a} and the phosphorylation of serine 9 of GSK3 β by activated AKT1, which is consistent with our results. Indeed, active GSK3 β promotes senescence (Ye et al. 2007). Our findings demonstrate that oncogenic NRAS induces melanocyte proliferation and that PTEN loss promotes immortalisation (by GSK3 β inhibition), thereby cooperating in melanoma initiation. The higher rate of melanoma metastasis in NRAS-PTEN than NRAS mice suggests that the concomitant mutations also promote melanoma progression. The molecular mechanisms linked to progression will be studied further.

Targeted therapy with BRAF^{V600E}-specific inhibitors has recently been giving promising results in cases of metastatic melanoma, but this treatment is beneficial only for patients with BRAF^{V600E} mutations (about half of melanoma patients). Moreover, even when the mutation is present, some patients display a primary refractory state or develop secondary tumour resistance. One of the explanations of this secondary tumour resistance is the emergence of NRAS mutations (Nazarian et al. 2010). Others have shown that loss of PTEN contributes to intrinsic resistance to BRAF inhibitors (Paraiso et al. 2011). Consequently, NRAS and PTEN are potentially very useful targets for the treatment of metastatic melanomas. As PTEN is also involved in melanoma initiation, it is plausible that specific inhibitors could be used

beneficially earlier during the disease as an adjuvant therapy. More generally, this evidence of concomitant deregulation of the PI3K-pathway and of NRAS in melanomas reveals potential targets for the development and combination of small-molecule therapies.

MATERIALS AND METHODS

Patients and tumour material

The first set of human melanoma samples was analysed previously (Curtin et al. 2005). The second human melanoma set included specimens (101 paraffin-embedded samples) from 15 primary melanomas (9 superficial spreading melanomas, 3 nodular melanomas, 1 NOS melanoma, 2 lentigo malignant melanomas), 16 lymph node metastases, 65 cutaneous metastasis and 5 visceral metastases. Pathological and genomic data were obtained from paraffin-embedded tumour tissue.

Detection of NRAS mutations by allele-specific PCR amplification and by sequencing of DNA from human tissue

DNA was extracted from 20 µm-thick paraffin-embedded sections using NucleoSpin Extract II (MACHEREY-NAGEL, #740590250) according to the manufacturer's instructions, and was amplified by PCR. Allele-specific PCR of the NRAS gene was performed using a 5' wild-type PCR primer (LL1827, 5'-CAT ACT GGA TAC AGC TGG AC- 3') and a mutated PCR primer corresponding to the NRAS^{Q61K} mutation (LL1828, 5'-CAT ACT GGA TAC AGC TGG GA-3'). The reverse primer (LL1800, 5'-TGA CTT GCT ATT ATT GAT GG-3') was used for all the PCR (Linard et al. 2002). The PCR mixture contained Expand High fidelity buffer, 200 mM concentrations of each dNTP (dNTP mix, finnzyme, #F560XL), 50 pM concentrations of each primer, 2.6U of Expand High fidelity (Roche, #11732650001), and 100 ng of cDNA. PCR was performed for 38 cycles of 30 sec at 94°C, 90 sec at 56°C, and 30 sec at 72°C.

Samples were incubated for 10-min at 94°C before the cycles.

The NRAS gene in DNA extracted from tumours was also sequenced following PCR amplification. The primer sequences were 5'- GTT ATA GAT GGT GAA ACC TG-3' (LL1901; forward) and 5'- GAG GTT AAT ATC CGC AAA TGA CTT-3' (LL1918; reverse). NRAS gene exon 3 sequences were analysed by direct DNA sequencing according to the Sanger technology.

BRAF mutation detection using Taqman SNP Genotyping Assays.

Total DNA was prepared for PCR analysis as described previously. We used the Assays-by-DesignSM Service for SNP genotyping assays with a Taqman 7500 to detect BRAF mutations. The primers used for this analysis were: 5'-CAT GAA GAC CTC ACA GTA AAA ATA GGT GAT-3' (sense) and 5'-TGG GAC CCA CTC CAT CGA-3' (antisense) for human BRAF V600E/ BRAF WT (the two primers amplify both wt and mutant BRAF); and reporter 1 (5'-CTA GCT ACA GTG AAA TC-3') for BRAF WT and reporter 2 (5'-TAG CTA CAG AGA AAT C-3') for BRAF V600E. The two reporters have different labels: the wt primer has a VIC label (fluorescent dye) and the reporter for V600E has a FAM label.

PTEN expression in melanoma samples

The anti-PTEN antibody used was mouse monoclonal IgG_{2a} antibody 6H2.1 (Dako, #M3627, Denmark), raised against the terminal 100 C-terminal amino acids of human PTEN. Each 4 µm-thick section was deparaffinised and hydrated by passing it through xylene and in absolute ethanol three times for 2 min. Endogenous peroxidase was blocked with a PBS/H₂O₂ mix (PBS 1X and 20% H₂O₂ 30%) for 30 min. Antigen retrieval was performed for 10 min at 180°C TRIS/EDTA buffer (pH 9) in

a microwave oven, and the samples then left to cool for one hour. Each section was incubated with PTEN antibody overnight at 4°C, washed with PBS (pH 7.3) and then incubated with powervision poly-HRP-GAM/R/R IgG (Immunologic, #DPVO-999HRP). The chromogenic reaction was carried out with PowerDAB (Immunologic, #BS03-25), which gives a brown-black product. After counterstaining with Haematoxylin and mounting by standard techniques, each slide was evaluated under a light microscope. Vascular endothelium served as an internal positive control, and breast carcinoma as an external positive control. PTEN expression was scored as no or positive immunostaining.

Cell lines

The human melanoma cell lines used have been described previously (Tsao et al. 2000) (Benjamin et al. 2007) (Smalley et al. 2008) (Hamai et al. 2008) (Halaban et al. 2010) (Gaggioli et al. 2007). Human melanoma cell lines were grown in RPMI 1640 media (GIBCO, #21875-034), supplemented with 10% FBS (GIBCO, #10270-106), 1% Penicillin-Streptomycin (GIBCO, #15140), and 1% L-Glutamine (GIBCO, #25030). Primary melanocyte cell lines were grown in F-12 nutrient mixture (Ham) media (GIBCO, #21765-029) supplemented with 10% FBS (GIBCO, #10270-106), 1% Penicillin-Streptomycin (GIBCO, #15140), and 1% L-Glutamine (GIBCO, #25030).

Western blotting

Whole cell lysate was prepared from melanoma cell lines using RIPA buffer and whole tissue lysate was prepared from mouse melanoma tumor using SDS lysis buffer. Membranes were probed with antibodies against PTEN (Cell Signaling

#9559), AKT (Cell Signaling, #2938), p-AKT (Ser473) (Cell Signaling #3787), ERK (Cell Signaling, #9102), p-ERK (Thr202/Thr204) (Cell Signaling, #9106), pGSK3- β (Ser9) (Cell Signaling, #9336), p- β -catenin (Ser33/37/Thr41) (Cell Signaling, #9561), S6 (Cell Signaling, #2317), pS6 (Ser235/236) (Cell Signaling, #4857), phospho-NF- κ B p65 (ser536) (Cell Signaling, #3031), p27 (Cell Signaling, #2752), β -catenin (Abcam, #ab-6302), GSK3- β (Santa-Cruz, #sc-9166), and p16 (Santa-Cruz, #sc-1661). Appropriate loading was evaluated from β -actin staining.

Transgenic mice and tumour collection

The transgenic Tyr::N-Ras^{Q61K}/ ϕ mouse line was described previously (Ackermann et al. 2005). Floxed PTEN mice were provided by H. Wu (UCLA, Los Angeles, California, USA) and were obtained from F. Beermann (Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne, Switzerland). The characterisation of the PTEN mice (Groszer et al. 2001) (Lesche et al. 2002), and Tyr::Cre mice (Delmas et al. 2003) (Puig et al. 2009) (Yajima et al. 2006) has been reported previously. All mice were backcrossed onto a C57BL/6 background for more than ten generations. Mice were maintained in the specific pathogen-free mouse colony at the Institut Curie, in line with French and European Union law. Floxed PTEN heterozygous mice were crossed with Tyr::Cre and Tyr::N-Ras^{Q61K}/ ϕ to generate Tyr::N-Ras^{Q61K}/ ϕ ; Tyr::Cre; PTEN f/+ (NRAS-PTEN mice), Tyr::N-Ras^{Q61K}/ ϕ ; PTEN f/+ (NRAS mice) and Tyr::N-Ras^{Q61K}/ ϕ ; PTEN f/f (NRAS mice). Mice were genotyped by PCR using DNA extracted from tails.

The mice were evaluated weekly for tumour appearance and progression. Once tumours were 1 centimetre across, the mice were sacrificed and autopsied. Some mice were also sacrificed because of poor health. Tumour samples were fixed in 4%

paraformaldehyde and paraffin-embedded for histological analysis and immunostaining. When sufficient tumour tissue was available, samples were frozen for subsequent western blot analysis.

Histology and immunostaining

Mouse melanomas were collected, rinsed in cold PBS, and fixed in 4% PFA at 4°C overnight. Samples were dehydrated, embedded in paraffin wax, and sectioned into 5- μ m-thick transverse sections. Paraffin-embedded sections were stained with haematoxylin and eosin, and examined by light microscopy. For immunostaining, sections were deparaffinised, rinsed in TBS, boiled for 20 minutes in 10 mM sodium citrate, and treated overnight at 4°C in TBST (TBS/0.1% Tween-20) containing 5% normal goat serum with antibodies against pS100 (Dako, #Z0311). AEC (Sigma-Aldrich, A6926) was used to reveal bound antibody according to the manufacturer's instructions. All sections were counterstained with haematoxylin.

Acknowledgements

We are grateful to F. Haluksa and R. Halaban for providing HS944 and YUDEDE human melanoma cell lines, respectively. We thank the team caring for the animal colony of the Institut Curie, and especially Y. Bourgeois and H. Harmange. GG was supported by a fellowship from Université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines (CATINVEST financement) and by Institut Curie. CL was supported by a fellowship from INCa and Cancéropôle IdF. This work was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe labellisée) and INCa.

REFERENCES

1. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2012. **62**(1): p. 10-29.
2. Balch, C.M., et al., *Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification*. J Clin Oncol, 2009. **27**(36): p. 6199-206.
3. Chapman, P.B., et al., *Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation*. N Engl J Med, 2011. **364**(26): p. 2507-16.
4. Poynter, J.N., et al., *BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi*. Melanoma Res, 2006. **16**(4): p. 267-73.
5. Stahl, J.M., et al., *Loss of PTEN promotes tumor development in malignant melanoma*. Cancer Res, 2003. **63**(11): p. 2881-90.
6. Zhou, X.P., et al., *Epigenetic PTEN silencing in malignant melanomas without PTEN mutation*. Am J Pathol, 2000. **157**(4): p. 1123-8.
7. Whiteman, D.C., et al., *Nuclear PTEN expression and clinicopathologic features in a population-based series of primary cutaneous melanoma*. Int J Cancer, 2002. **99**(1): p. 63-7.
8. Wu, H., V. Goel, and F.G. Haluska, *PTEN signaling pathways in melanoma*. Oncogene, 2003. **22**(20): p. 3113-22.
9. Goel, V.K., et al., *Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(1): p. 154-60.
10. Guldberg, P., et al., *Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma*. Cancer Res, 1997. **57**(17): p. 3660-3.
11. Tsao, H., et al., *Identification of PTEN/MMAC1 alterations in uncultured melanomas and melanoma cell lines*. Oncogene, 1998. **16**(26): p. 3397-402.
12. Mirmohammadsadegh, A., et al., *Epigenetic silencing of the PTEN gene in melanoma*. Cancer Res, 2006. **66**(13): p. 6546-52.
13. Tsao, H., et al., *Relative reciprocity of NRAS and PTEN/MMAC1 alterations in cutaneous melanoma cell lines*. Cancer Res, 2000. **60**(7): p. 1800-4.
14. Hill, R., et al., *PTEN loss accelerates KrasG12D-induced pancreatic cancer development*. Cancer Res, 2010. **70**(18): p. 7114-24.
15. Iwanaga, K., et al., *Pten inactivation accelerates oncogenic K-ras-initiated tumorigenesis in a mouse model of lung cancer*. Cancer Res, 2008. **68**(4): p. 1119-27.
16. Miller, K.A., et al., *Oncogenic Kras requires simultaneous PI3K signaling to induce ERK activation and transform thyroid epithelial cells in vivo*. Cancer Res, 2009. **69**(8): p. 3689-94.
17. Kim, T.H., et al., *The Synergistic Effect of Conditional Pten Loss and Oncogenic K-ras Mutation on Endometrial Cancer Development Occurs via Decreased Progesterone Receptor Action*. J Oncol, 2010. **2010**: p. 139087.
18. Nogueira, C., et al., *Cooperative interactions of PTEN deficiency and RAS activation in melanoma metastasis*. Oncogene, 2010. **29**(47): p. 6222-32.
19. Lesche, R., et al., *Cre/loxP-mediated inactivation of the murine Pten tumor suppressor gene*. Genesis, 2002. **32**(2): p. 148-9.

20. Longvert, C., et al., *Murine cutaneous melanoma models. Importance of the genetic background.* Ann Pathol, 2011. **31**(5 Suppl): p. S70-3.
21. Delmas, V., et al., *Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development.* Genes Dev, 2007. **21**(22): p. 2923-35.
22. Ikeda, T., et al., *Anticorresponding mutations of the KRAS and PTEN genes in human endometrial cancer.* Oncol Rep, 2000. **7**(3): p. 567-70.
23. Vasudevan, K.M., et al., *Suppression of PTEN expression is essential for antiapoptosis and cellular transformation by oncogenic Ras.* Cancer Res, 2007. **67**(21): p. 10343-50.
24. Vredeveld, L.C., et al., *Abrogation of BRAFV600E-induced senescence by PI3K pathway activation contributes to melanomagenesis.* Genes Dev, 2012.
25. Kennedy, A.L., et al., *Activation of the PIK3CA/AKT pathway suppresses senescence induced by an activated RAS oncogene to promote tumorigenesis.* Mol Cell, 2011. **42**(1): p. 36-49.
26. Ye, X., et al., *Downregulation of Wnt signaling is a trigger for formation of facultative heterochromatin and onset of cell senescence in primary human cells.* Mol Cell, 2007. **27**(2): p. 183-96.
27. Nazarian, R., et al., *Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation.* Nature, 2010. **468**(7326): p. 973-7.
28. Paraiso, K.H., et al., *PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression.* Cancer Res, 2011. **71**(7): p. 2750-60.
29. Curtin, J.A., et al., *Distinct sets of genetic alterations in melanoma.* N Engl J Med, 2005. **353**(20): p. 2135-47.
30. Linard, B., et al., *A ras-mutated peptide targeted by CTL infiltrating a human melanoma lesion.* J Immunol, 2002. **168**(9): p. 4802-8.
31. Benjamin, C.L., V.O. Melnikova, and H.N. Ananthaswamy, *Models and mechanisms in malignant melanoma.* Mol Carcinog, 2007. **46**(8): p. 671-8.
32. Smalley, K.S., et al., *Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas.* Mol Cancer Ther, 2008. **7**(9): p. 2876-83.
33. Hamai, A., et al., *ICAM-1 has a critical role in the regulation of metastatic melanoma tumor susceptibility to CTL lysis by interfering with PI3K/AKT pathway.* Cancer Res, 2008. **68**(23): p. 9854-64.
34. Halaban, R., et al., *PLX4032, a selective BRAF(V600E) kinase inhibitor, activates the ERK pathway and enhances cell migration and proliferation of BRAF melanoma cells.* Pigment Cell Melanoma Res, 2010. **23**(2): p. 190-200.
35. Gaggioli, C., et al., *Tumor-derived fibronectin is involved in melanoma cell invasion and regulated by V600E B-Raf signaling pathway.* J Invest Dermatol, 2007. **127**(2): p. 400-10.
36. Ackermann, J., et al., *Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background.* Cancer Res, 2005. **65**(10): p. 4005-11.
37. Groszer, M., et al., *Negative regulation of neural stem/progenitor cell proliferation by the Pten tumor suppressor gene in vivo.* Science, 2001. **294**(5549): p. 2186-9.
38. Delmas, V., et al., *Cre-mediated recombination in the skin melanocyte lineage.* Genesis, 2003. **36**(2): p. 73-80.

39. Puig, I., et al., *The tyrosinase promoter is active in a subset of vagal neural crest cells during early development in mice*. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2009. **22**(3): p. 331-4.
40. Yajima, I., et al., *Spatiotemporal gene control by the Cre-ERT2 system in melanocytes*. *Genesis*, 2006. **44**(1): p. 34-43.

FIGURE LEGENDS

Figure 1a. CGH analysis of human melanoma samples

A library of 105 human melanoma samples was analysed by CGH for the presence of the PTEN locus and for the presence/absence of NRAS and BRAF mutations. Thirty-five samples carried the BRAF^{V600E} mutation (green squares) and 16 the NRAS^{Q61K} mutation (red squares). On the y axis, the PTEN copy number determined by CGH analysis: PTEN was deleted from 14/35 human melanomas carrying the BRAF mutation and 2/16 carrying the NRAS mutation. The difference is statistically significant (p=0.015).

Figure 1b. NRAS exon 2 sequencing and PTEN immunostaining in human melanoma samples.

101 human melanoma samples were analyzed for NRAS mutations and PTEN expression. For each case type: left window represents the DNA sequence of NRAS codon 61, and the right window represents PTEN immunostaining in human melanoma. Case type 1 was the most frequent (50.5%): wild-type NRAS and PTEN positive. Case type 2 was also frequent (35.6%): wild-type NRAS and PTEN negative (blood vessel (black arrow) serves as a positive internal control). Case type 3 was melanoma with the NRAS^{Q61K} mutation and which was PTEN positive (10.9%). Case type 4 was rare (2.9%): the NRAS^{Q61K} mutation and concomitantly PTEN negative.

Scale bar: 100 μ m

Figure 2. Western blot analysis of PTEN in nine human melanoma cell lines.

PTEN is present in 5 of these cell lines, and absent from 4 of the cell lines: sk29 and

Lu1205, which are mutated for BRAFV600E, and HS944 and YUDEDE which are both mutated for NRAS (Q61K and Q61H respectively)

Figure 3. NRAS and NRAS-PTEN mice melanoma

(a) Melanoma on the back of an NRAS mouse. (b) Haematoxylin and eosin staining: histological section of cutaneous melanoma showing dermal proliferation without epidermal involvement. (c) At higher magnification, the proliferation can be seen to be constituted of irregularly pigmented cells of diverse sizes, with large nucleoli. (d) The diagnosis of melanoma is confirmed by positive immunostaining for PS100. (e) The negative control without PS100 primary antibody. (f) melanoma on the back of an NRAS-PTEN mouse. (g) Haematoxylin and eosin staining: histological section of cutaneous melanoma showing dermal proliferation without epidermal involvement. (h) At higher magnification, the proliferation is shown to be constituted of irregularly non pigmented cells of diverse sizes, with mitosis (black arrow) and large nucleoli. (i) The diagnosis of melanoma is confirmed by positive immunostaining for PS100. (j) The negative control without PS100 primary antibody.

Figure 4. Tumoral growth of NRAS and NRAS-PTEN melanomas

Red curves: NRAS-PTEN melanomas. Blue curves: NRAS melanomas. Tumour size was monitored weekly. NRAS-PTEN melanomas are bigger and grow more rapidly than NRAS melanomas.

Figure 5. NRAS-PTEN melanoma lung metastasis

(a) Multiple lung metastases associated with NRAS-PTEN melanoma. (b) Histological staining with haematoxylin and eosin showing proliferation of highly

pigmented cells, consistent with the diagnosis of melanoma lung metastasis.

Figure 6. Kaplan-Meier graph of melanoma incidence in various mouse genotypes, as indicated.

There is a statistically difference between the NRAS and the NRAS-PTEN curves ($p < 0.00001$).

Figure 7. Numbers of wild-type and mutant (Tyr::Cre^o; PTEN^{F/F}) melanoblasts during embryonic development.

WT and mutant melanoblasts were counted at E13.5 (n=3 and n=4, respectively), E14.5 (n=3 and n=4, respectively) and E15.5 (n=5 and n=5, respectively) between the fore and hind limbs (somites 13 to 25) on the right side of the trunks of the embryos. WT (Tyr::Cre^o; PTEN^{+/+}) in blue, mutant (Tyr::Cre^o; PTEN^{F/F}) in red. There was no significant difference between the numbers of melanocytes in the WT and mutant at these stages.

Figure 8. Melanocyte growth during the first 14 weeks in culture

Cultures of melanocytes from WT (Tyr::Cre^o; PTEN^{F/+}) and PTEN (Tyr::Cre^o; PTEN^{F/F}) mice. Each curve correspond to a melanocyte cell line derived from one mice. To generate growth curves, cells were counted weekly. Cultures of WT melanocytes stopped expanding within four weeks of explantation. Cultures of PTEN melanocytes divided continuously and rapidly became immortalized.

Figure 9. Western-blot analysis of MAPK and PI3K downstream proteins

(A) Proteins of the MAPK and PI3/AKT pathways in 8 melanomas (4 from NRAS

mice and 4 from NRAS-PTEN mice). PTEN was almost absent from NRAS-PTEN melanomas: the weak signal is probably due to stromal PTEN. The signal for p-AKT is stronger in NRAS-PTEN than NRAS melanomas, consistent with the activation of both pathways. The p-ERK and p-CREB signals are more heterogeneous without significant difference between NRAS and NRAS-PTEN melanomas. (B) PI3/AKT downstream effectors in the same 8 melanomas.

Table 1. NRAS and BRAF mutations in melanoma cell lines

wt, wild type DNA

FIGURE 1a
CGH analysis

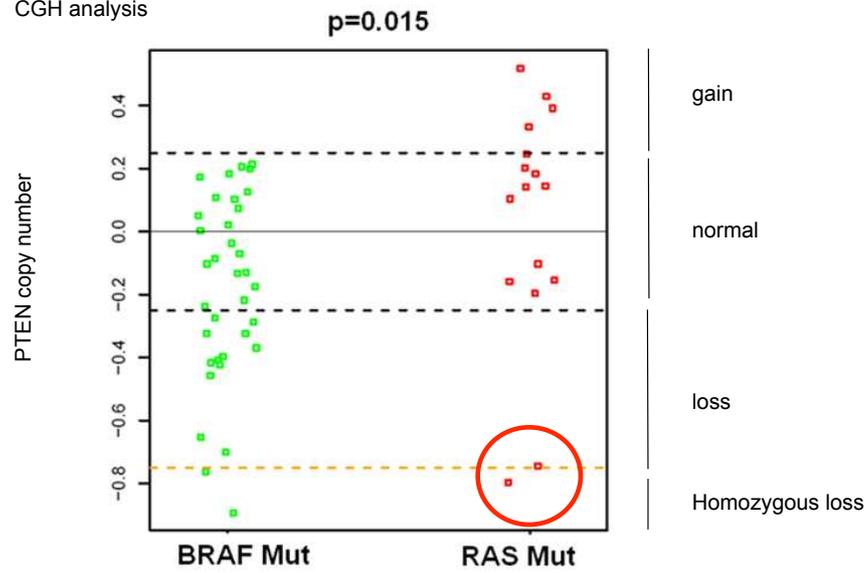


FIGURE 1b

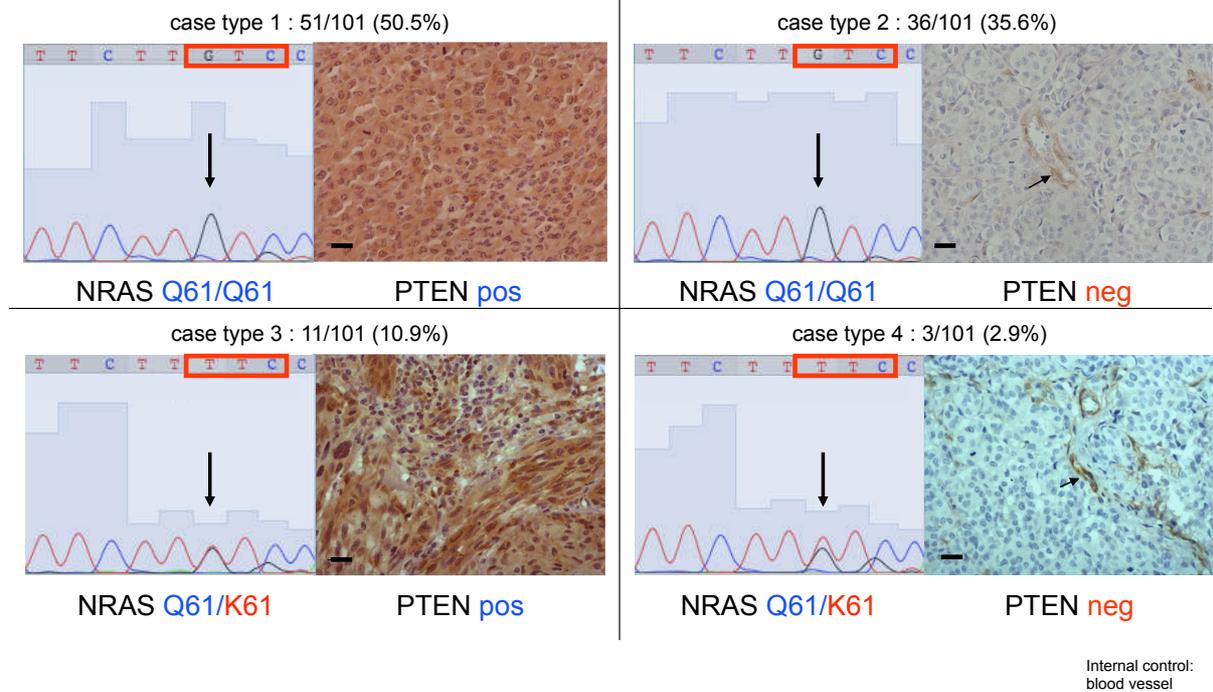


FIGURE 2

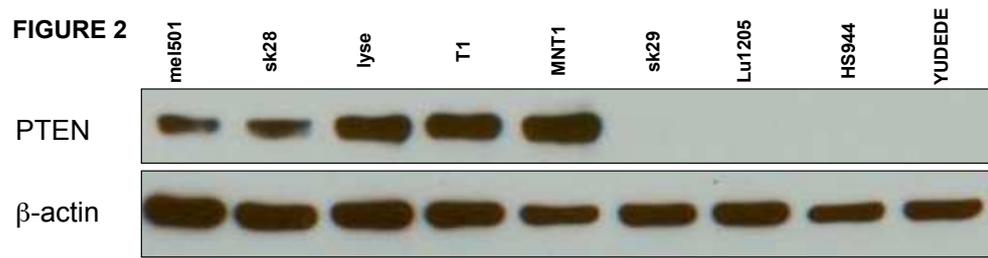


Figure 3

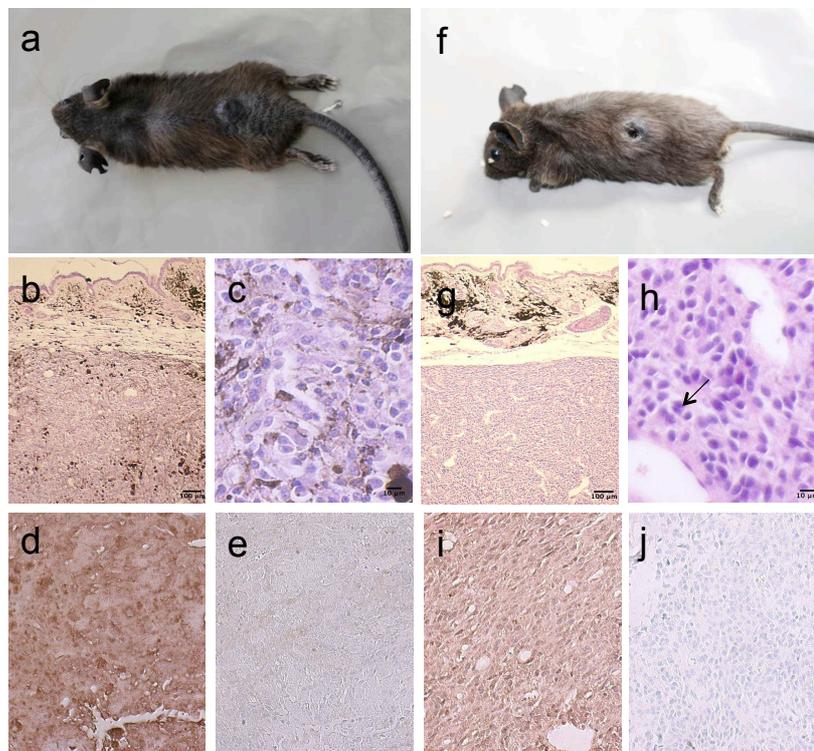


Figure 4

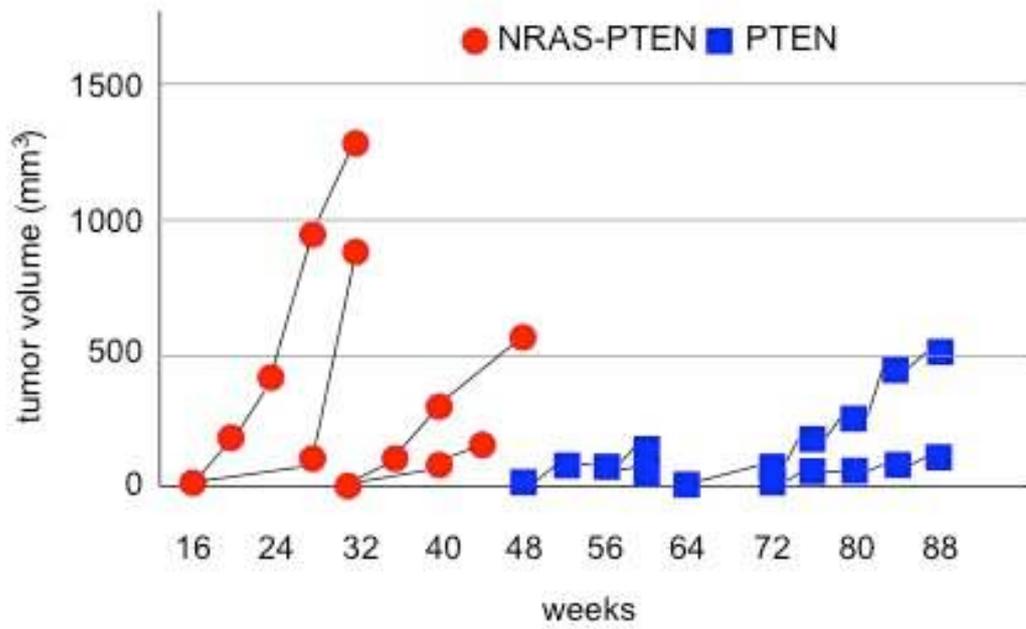


FIGURE 5

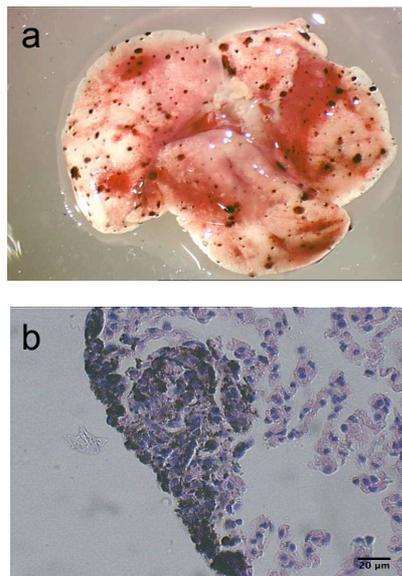


FIGURE 6

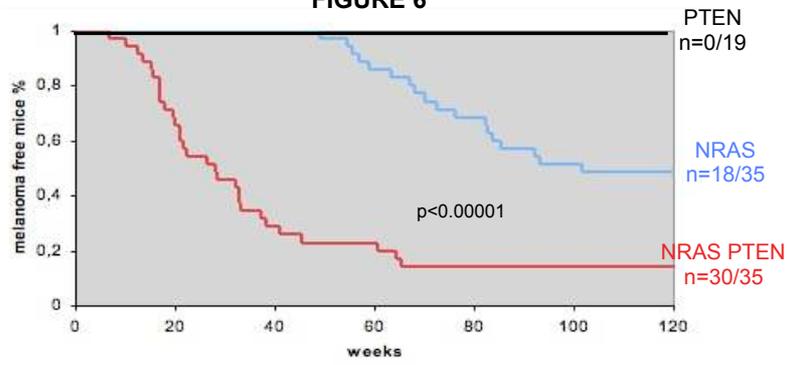


FIGURE 7

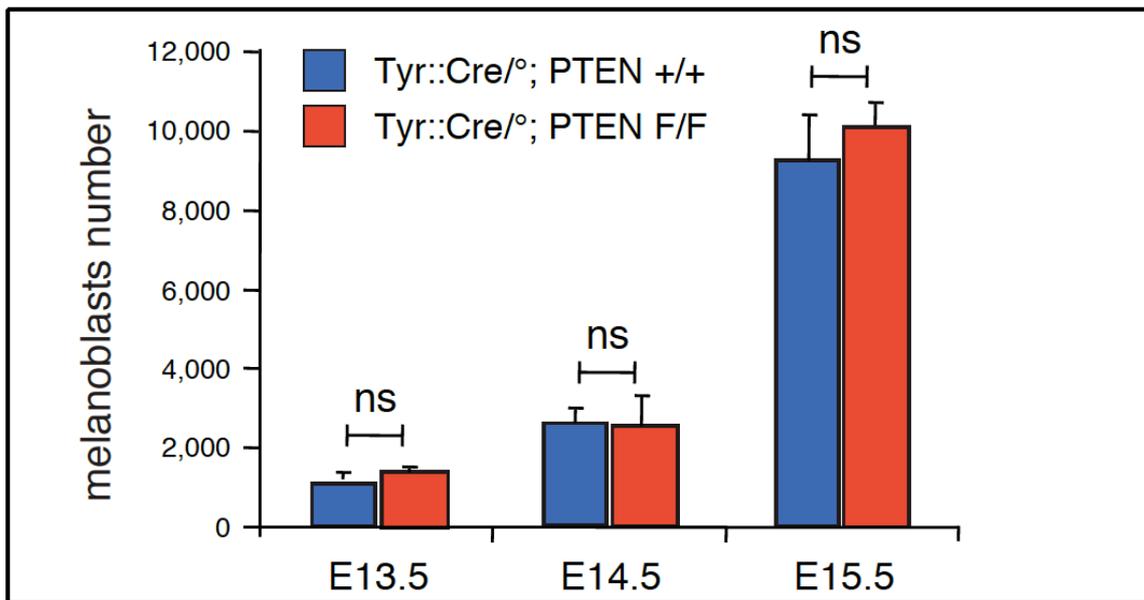


Figure 8

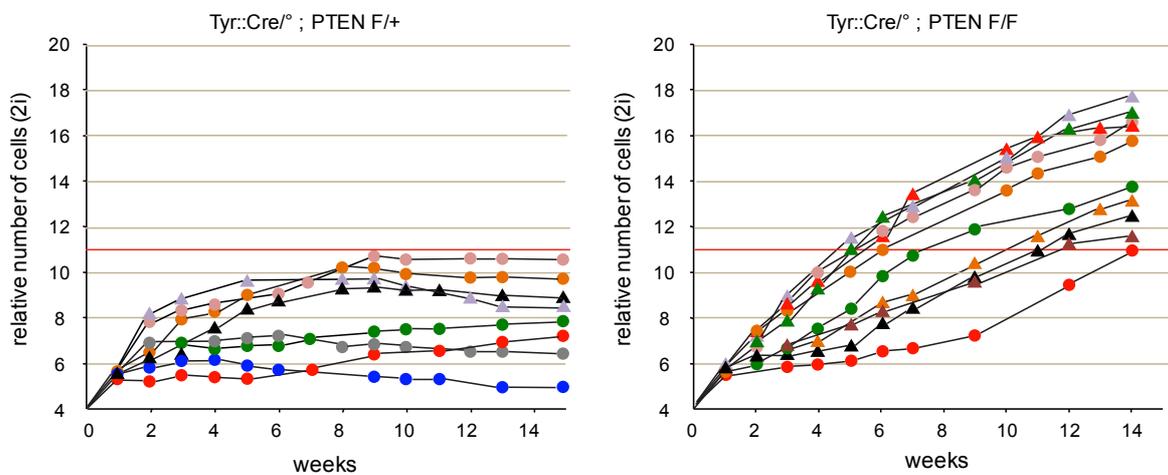


FIGURE 9

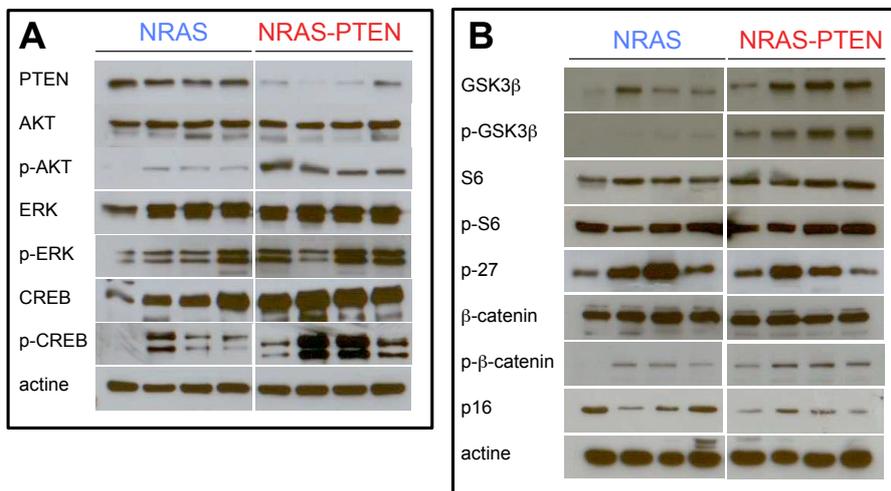


Table 1

Cell lines	origin	NRAS	BRAF	PTEN status
MeI501 [31]	metastatic tumor lesion, low meta potential	wt	BRAFV600E	+
Sk28 [32]	metastasis	wt	BRAFV600E	+
Lyse (Rambow et al., unpublished data)	unknown	NRASQ61K	wt	+
T1 [33]. (Rambow et al., unpublished data)	primary lesion	wt	wt	+
MNT1 (Rambow et al., unpublished data)	Metastatic melanoma nodule	wt	wt	+
Sk29 (Rambow et al., unpublished data)	Metastatic lesion	wt	BRAFV600E	-
Lu1205 [32], [35]	Metastatic lesion	wt	BRAFV600E	-
HS944 [13]	Unknown	NRASQ61K	wt	-
YUDEDE [34]	Soft tissue metastasis	NRASQ61H	wt	-

DISCUSSION

L'objectif de mon travail de thèse s'est centré sur le rôle de NRAS et de PTEN au cours du développement du mélanome.

De nombreuses équipes se sont intéressées au rôle des voies MAPK et PI3K dans le mélanome et également dans d'autres cancers. Ces différentes études ont montré des résultats contradictoires. Pour certaines (Tsao et al. 2000), au cours du mélanome, l'activation oncogénique de NRAS et l'inactivation de PTEN sont équivalentes, leur association est redondante et n'apporte pas d'avantage sélectif. Ceci a également été décrit au cours d'autres cancers tels que le cancer de l'endomètre (Ikeda et al. 2000). D'autres publications, plus récemment, ont montré une action synergique des mutations de RAS associées à la perte de PTEN : ainsi, des mutations de KRAS associées à une perte de PTEN sont associées et synergiques dans plusieurs cancers : pancréas, poumon, thyroïde, endomètre (Hill et al.) (Iwanaga et al. 2008) (Miller et al. 2009) (Kim et al.). Dans le mélanome, des mutations de HRAS associées à une perte de PTEN sont synergiques (Nogueira et al.).

NRAS et PTEN dans le mélanome humain

Nous avons montré que les mutations activatrices de NRAS pouvaient être associées à la perte de PTEN, ce qui jusqu'à présent n'avait pas été observé. Ceci a été retrouvé sur des prélèvements de mélanome humain primitif ou métastatique. Cet événement est rare (inférieur à 5%), ce qui ne nous permet pas de corréler les anomalies moléculaires au pronostic.

Nous avons également retrouvé des mutations de NRAS associées à une perte de PTEN dans 2 lignées cellulaires de mélanome humain. L'étude des lignées cellulaires présente des limites, en raison du nombre important de modifications moléculaires apparaissant depuis la mise en culture. Cependant, les résultats retrouvés sur les lignées HS944 et YUDEDE n'avaient jusqu'à présent pas été décrits sur les nombreuses lignées cellulaires de mélanomes disponibles. De plus, les données des lignées cellulaires concernant NRAS et PTEN sont appuyées par les résultats des prélèvements de mélanome humains primitifs ou métastatiques.

Expérimentalement, il semble plus efficace d'évaluer la perte de PTEN au niveau protéique, soit par immunohistochimie, soit par western-blot. En effet, il a été montré qu'il y avait fréquemment une diminution ou une absence d'expression cytoplasmique de PTEN sans

altérations génomiques. L'absence d'expression de PTEN serait principalement liée à des mécanismes épigénétiques (Zhou et al. 2000). D'ailleurs, dans notre cas, l'étude par CGH effectuée sur les prélèvements de mélanomes humains de l'équipe de Boris Bastian identifie moins de pertes de PTEN au niveau génomique, que celles identifiées avec notre 2^{ème} banque de mélanomes humains (Leon Van Kempen), pour lesquels PTEN a été évalué par immunohistochimie.

NRAS et PTEN dans le mélanome murin

La comparaison entre les souris transgéniques NRAS et NRAS-PTEN a montré qu'il existe une coopération entre les mutations de NRAS et la perte de PTEN pour le développement des mélanomes et de ses métastases chez les souris transgéniques. Nos résultats montrent que PTEN est impliqué dans l'initiation du mélanome (pénétrance augmentée et latence plus courte chez les souris NRAS-PTEN) et dans la progression (taux plus élevé de métastases chez les souris NRAS-PTEN).

Les modèles murins sont particulièrement intéressants pour l'étude des mécanismes de mélanomagenèse, en raison de la disponibilité du matériel tumoral, tant pour l'étude histologique que moléculaire. Au cours de notre travail, nous avons comparé l'expression des effecteurs des voies MAPK et PI3K des mélanomes des souris NRAS et NRAS-PTEN. Nous avons retrouvé une surexpression de p-AKT et de p-GSK3 β dans les mélanomes NRAS-PTEN. La surexpression de p-AKT correspond à une « superactivation » de la voie PI3K, probablement liée d'une part à l'activation de la voie par NRAS, et d'autre part par la perte de PTEN ; l'effet de cette superactivation se traduit en aval par l'hyper expression de p-GSK3 β , sans différence d'expression des autres effecteurs d'aval de la voie PI3K dans les mélanomes NRAS-PTEN comparés aux mélanomes NRAS. Nous nous sommes donc intéressés à cette différence afin de préciser le rôle de PTEN au cours de la mélanomagenèse.

GSK3 β appartient à la voie Wnt/ β -caténine. En l'absence de Wnt, GSK3 β phosphoryle les résidus sérine/thréonine 37 et 33 de β -caténine, provoquant ainsi l'ubiquitination et la dégradation de β -caténine par le protéasome. L'activité de GSK3 β est inhibée par AKT via la phosphorylation du résidu Sérine 9. Il a été montré que l'absence de GSK3 β dans des fibroblastes murins mutés pour RAS provoquait un échappement aux phénomènes de sénescence, via l'activation de β -caténine et de cycline D1 (Liu et al. 2008). Par ailleurs, Delmas et al (Delmas et al. 2007) a retrouvé que β -caténine pouvait induire l'immortalisation des mélanocytes en inhibant l'expression de p16^{Ink4a}. Notre hypothèse a donc été que la perte de PTEN induisait une perte de la sénescence. Ceci a été confirmé dans un premier

temps par l'induction de l'immortalisation de cultures de mélanocytes Tyr::Cre; PTEN f/f. Au niveau moléculaire, nous avons également retrouvé une plus faible expression de p16^{Ink4a} dans des mélanomes NRAS-PTEN, ce qui est en accord avec notre hypothèse. Cependant, le lien causal entre p-GSK3 β et p16^{Ink4a} n'est pas évident. En effet, nous avons évalué l'expression de β -caténine et de p- β -caténine dans les mélanomes de nos souris transgéniques. Nous n'avons pas retrouvé de différence d'expression pour β -caténine entre les mélanomes NRAS et NRAS-PTEN. Pour p- β -caténine, nous retrouvons une légère hyperexpression dans les mélanomes NRAS-PTEN, ce qui ne correspond pas à ce que nous attendions et qui ne permet donc pas d'expliquer le rôle de β -caténine dans l'inhibition de p16^{Ink4a} dans les tumeurs NRAS-PTEN. Cependant, ce résultat inattendu pourrait s'expliquer par un autre mécanisme d'inhibition de la sénescence, ne dépendant pas de β -caténine. Ainsi, il a récemment été démontré que l'activation concomitante de RAS et de la voie PI3KCA/AKT (par l'activation de AKT1 ou par inhibition de PTEN) inhibait la sénescence induite par l'activation de l'oncogène RAS, favorisant ainsi la tumorigénèse. Les mécanismes moléculaires responsables de ce phénomène sont une diminution de p16^{Ink4a} et une phosphorylation de GSK3 β sur la sérine 9 par AKT1 activé (Kennedy et al.), ce qui est parfaitement concordant avec nos résultats. En effet, GSK3 β activée (non phosphorylée) favorise la sénescence par, entre autre, sa participation à la formation des SAHF (foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence) par la phosphorylation de la protéine HIRA, un chaperon d'histone (Ye et al. 2007).

La figure 20 reprend les hypothèses des mécanismes d'échappement à la sénescence.

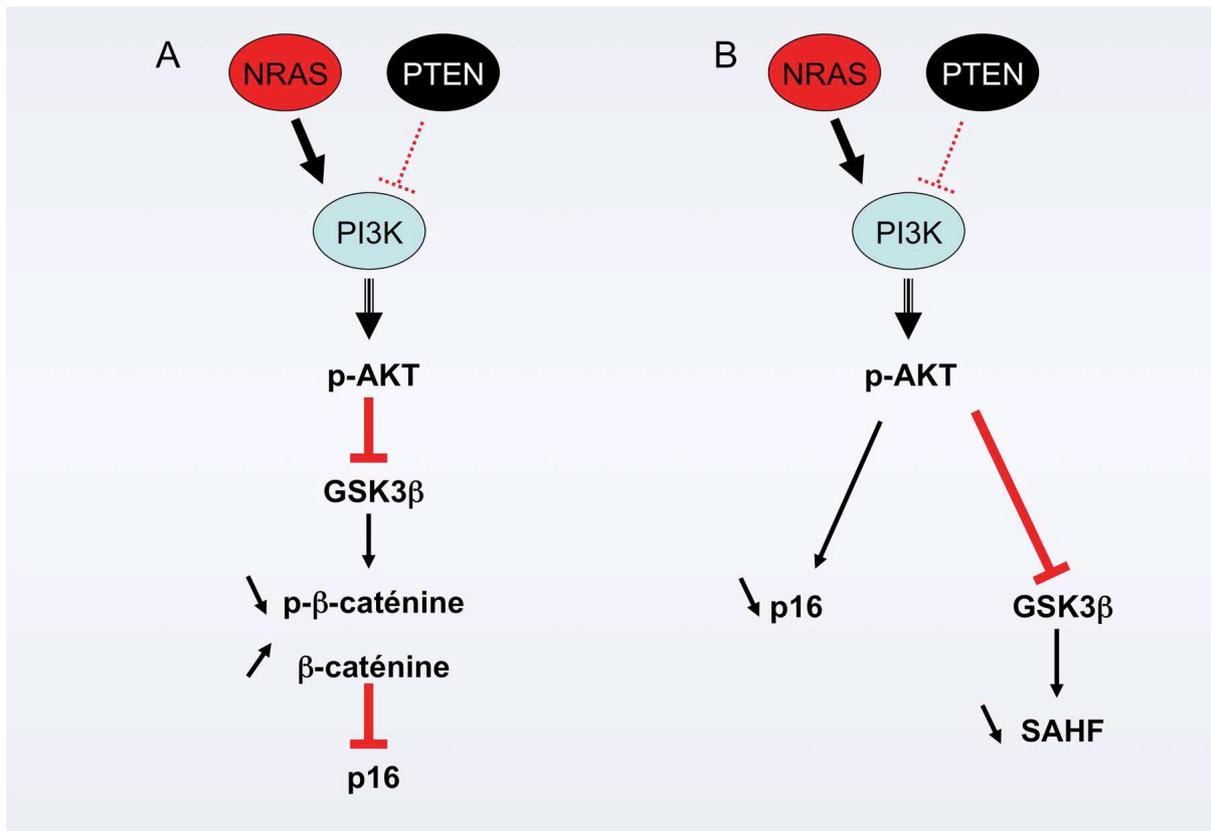


Figure 20. Les hypothèses des mécanismes d'échappement à la sénescence dans les mélanomes NRAS-PTEN.

Dans les cas (A) et (B) la mutation de NRAS associée à la perte de PTEN provoque une surexpression de p-AKT et une inhibition préférentielle de GSK3β (par rapport aux autres cibles de p-AKT). Dans le cas (A), nous avons émis l'hypothèse que l'inhibition de GSK3β entraînait l'activation de β-caténine et l'inhibition de p16^{Ink4a} (Delmas et al. 2007), ce que nous n'avons pas pu confirmer. Nos résultats sont compatibles avec le cas (B) (Kennedy et al. 2011) : il existe un échappement à la sénescence par diminution de p16^{Ink4a} et inhibition de GSK3β, sans implication de la voie β-caténine.

Notre travail nous a donc permis de comprendre les mécanismes moléculaires associés à l'initiation des mélanomes des souris NRAS-PTEN : NRAS induit une prolifération et PTEN induit l'immortalisation via GSK3β.

La compréhension de ces mécanismes est cruciale pour le développement et l'utilisation adaptée des différents inhibiteurs récemment développés. En effet, en fonction des cancers, la perte de PTEN n'a pas toujours les mêmes conséquences. Ainsi, il a été récemment montré, dans des fibroblastes et des mélanocytes humains, que la perte de PTEN permettait d'échapper à la sénescence induite par BRAFV600E (Vredeveld et al. 2012). Par contre, dans un modèle murin de cancer de la prostate (Chen et al. 2005) ou dans des cellules épithéliales humaines (Kim et al. 2007), la perte complète de PTEN entraîne une

sénescence médiée par p53. Dans ce cas, le traitement par rapamycine (inhibiteur de mTOR et donc de la voie PI3K) pourrait donc avoir un effet néfaste. Il serait alors intéressant de connaître le « statut p53 » des tumeurs et de ne réserver le traitement par inhibiteur de la voie PI3K qu'aux tumeurs ayant perdu p53. Cependant d'autres auteurs ont montré que l'activation de PI3K pouvait entraîner l'inactivation de p53 (Chang et al. 2004) (Freeman et al. 2003) (Mayo and Donner 2001), expliquant ainsi que les mutations de p53 et de PTEN sont mutuellement exclusives (Kurose et al. 2002). Dans le mélanome, les mutations de p53 concernent moins de 10% des patients, mais la fonction de p53 est inactivée dans un grand nombre de cas, et ce même en l'absence de mutation (Bennett 2008) (Houben et al.) (Gembarska et al. 2012). C'est pourquoi l'utilisation d'activateurs pharmacologiques de p53 associés aux thérapeutiques ciblant les voies MAPK et PI3K est en cours d'évaluation.

PERSPECTIVES

Notre travail nous a permis de comprendre certains des mécanismes moléculaires liés à l'initiation des mélanomes. Les souris transgéniques NRAS-PTEN ont plus rapidement des métastases et en plus grand nombre que les souris NRAS : en conséquence, il sera également nécessaire de comprendre les mécanismes moléculaires associés à la progression, incluant l'invasion et le développement de micro puis de macrométastases. Nous envisageons donc d'étudier le rôle des protéines impliquées dans la transition pseudo-épithéliale-mésenchymateuse et dans les rapports avec la matrice extracellulaire, qui ont un rôle clé dans la progression des mélanomes (Alonso et al. 2007). Ainsi, l'expression, entre autres, des cadhérines doit être évaluée. Il a récemment été décrit dans des lignées cellulaires que la perte de PTEN était corrélée avec un changement de cadhérines (perte de la E-cadhérine et niveaux élevés de N-cadhérine) au cours de la progression des mélanomes (Hao et al.). Il a également été montré que la perte de PTEN induisait une transition épithéliale-mésenchymateuse dans des cellules de cancer colique (Bowen et al. 2009).

Les prélèvements humains dont nous avons disposé sont hétérogènes (mélanomes primitifs et métastatiques) et en nombre restreint (2 cohortes de 100 mélanomes chacune), mais malgré ces limites, nous avons pu montrer que les mutations activatrices de NRAS pouvaient être associées à la perte de PTEN. Pour aller plus loin dans notre travail, il serait souhaitable de pouvoir confirmer nos résultats sur une plus grande cohorte de mélanomes primitifs, afin d'obtenir d'éventuelles corrélations pronostiques. De plus, il serait également intéressant d'étudier les autres effecteurs de ces voies de signalisation, incluant AKT, p-AKT, ERK, p-ERK, et les protéines mentionnées dans l'analyse effectuée chez la souris. Cependant, une des limites des prélèvements humains concerne le mode de conservation en paraffine, ce qui ne permet pas l'extraction d'ARN ou de protéines. En effet, en raison de la petite taille des mélanomes primitifs (en comparaison au cancer colorectal par exemple) et de la nécessité d'obtenir un diagnostic anatomopathologique précis, il est très difficile d'envisager de réserver une partie de la lésion pour un prélèvement congelé. Ceci est plus facile pour les lésions métastatiques. Toutefois, de nombreux anticorps sont maintenant utilisables en paraffine, et la réalisation de Tissue-Micro-Array à partir de mélanomes primitifs permettrait l'étude de l'expression de nombreuses protéines à une grande échelle. De plus, il existe une technique récente, le « cDNA-mediated annealing, selection, extension and ligation » (DASL) permettant l'analyse de l'expression de gènes à partir d'ARN

partiellement dégradés des prélèvements en paraffine (Bibikova et al. 2004) (Conway et al. 2009) (Harbst et al. 2012). Cette méthode pourrait permettre de dépasser les difficultés liées à l'obtention d'échantillons congelés de mélanomes primitifs, et nous pourrions ainsi identifier à grande échelle les gènes dont l'expression diffère entre les mélanomes NRAS et les mélanomes NRAS-PTEN.

Par ailleurs, nous avons deux lignées de mélanome humain mutées pour NRAS et qui n'expriment pas PTEN. Il faudra étudier dans ces lignées l'expression des effecteurs des voies MAPK et PI3K afin de valider les résultats obtenus chez la souris. Nous pourrions également tester des transfections (siRNA) spécifiques de NRAS^{Q61K} et de PTEN ainsi que des inhibiteurs pharmacologiques des voies MAPK, PI3K pour en évaluer les conséquences phénotypiques et moléculaires. Cependant, les lignées cellulaires ont de nombreuses limites : risque d'apparition de mutations, perte de l'architecture de la tumeur initiale et donc perte des interactions intercellulaires et avec le microenvironnement, informations sur les patients sources souvent incomplètes. Les xénogreffes obtenues à partir de lignées cellulaires ou encore mieux d'échantillons de tumeurs humaines directement transplantés (PDTX) sur souris immunodéficientes permettent de se rapprocher un peu plus du modèle humain. Ces xénogreffes pourraient donc être utiles à la caractérisation phénotypique et génotypique des mélanomes NRAS et NRAS-PTEN, et à l'évaluation de la réponse aux traitements ciblés.

Nous souhaitons également tester sur nos modèles murins NRAS et NRAS-PTEN différentes molécules, seules ou en association : inhibiteur de MEK, inhibiteur de AKT ou de GSK3 β , activateur de p53. De plus, en cas d'échappement aux traitements, il sera nécessaire d'étudier directement les différents mécanismes de résistance.

L'étude de l'ensemble de ce matériel biologique humain et murin pourra donc générer un grand nombre de données issues notamment de l'expression des gènes. L'analyse de ces résultats devrait être effectuée à l'aide de méthodes statistiques (bioinformatique) ; de plus, la modélisation mathématique (biologie des systèmes) pourrait être utilisée afin d'avoir une meilleure compréhension du fonctionnement global des interactions protéiques à tous les niveaux de leur organisation. En effet, les voies de signalisation sont représentées de façon linéaire et simplifiée, ce qui ne correspond pas à la réalité puisque ces voies sont intégrées dans des réseaux complexes de signalisation.

Les modèles murins et les lignées cellulaires humaines sont indispensables à la compréhension des différents événements moléculaires survenant au cours de la

mélanomagenèse et au cours de la progression des mélanomes. Cependant, les mélanomes humains, primitifs ou métastatiques sont essentiels afin de valider les résultats obtenus. La recherche translationnelle est donc fondamentale et doit être développée, en améliorant la mise à disposition du matériel biologique : développement de techniques de fixation permettant d'étudier l'ADN et l'ARN, création d'une tumorotheque à partir de cohortes de patients telle que la Melan-cohort (banque de données cliniques, histologiques et biologiques établie depuis 2003 et comptant plus de 1000 patients sur l'APHP). L'utilisation de matériel humain à grande échelle devrait être validée par des experts indépendants. Il deviendra alors possible d'évaluer la pertinence humaine de ces modèles murins, en identifiant par exemple les patients ayant des mélanomes de mauvais pronostic afin de leur proposer un traitement adjuvant ou une thérapie ciblée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ackermann, J., Fruttschi, M., Kaloulis, K., McKee, T., Trumpp, A., and Beermann, F. 2005. Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. *Cancer Res* **65**(10): 4005-4011.
- Alonso, S.R., Tracey, L., Ortiz, P., Perez-Gomez, B., Palacios, J., Pollan, M., Linares, J., Serrano, S., Saez-Castillo, A.I., Sanchez, L., Pajares, R., Sanchez-Aguilera, A., Artiga, M.J., Piris, M.A., and Rodriguez-Peralto, J.L. 2007. A high-throughput study in melanoma identifies epithelial-mesenchymal transition as a major determinant of metastasis. *Cancer Res* **67**(7): 3450-3460.
- Ascierto, P.A., Berking, C., and Agarwala, S.A. 2012. Efficacy and safety of oral MEK162 in patients with locally advanced and unresectable or metastatic cutaneous melanoma harboring BRAFV600 or NRAS mutations. *J Clin Oncol, Proc Am Soc Clin Oncol* **30**: Abstract 8510.
- Bafounta, M.L., Beauchet, A., Aegerter, P., and Saiag, P. 2001. Is dermoscopy (epiluminescence microscopy) useful for the diagnosis of melanoma? Results of a meta-analysis using techniques adapted to the evaluation of diagnostic tests. *Arch Dermatol* **137**(10): 1343-1350.
- Balch, C.M., Buzaid, A.C., Soong, S.J., Atkins, M.B., Cascinelli, N., Coit, D.G., Fleming, I.D., Gershenwald, J.E., Houghton, A., Jr., Kirkwood, J.M., McMasters, K.M., Mihm, M.F., Morton, D.L., Reintgen, D.S., Ross, M.I., Sober, A., Thompson, J.A., and Thompson, J.F. 2001. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* **19**(16): 3635-3648.
- Balch, C.M., Gershenwald, J.E., Soong, S.J., Thompson, J.F., Atkins, M.B., Byrd, D.R., Buzaid, A.C., Cochran, A.J., Coit, D.G., Ding, S., Eggermont, A.M., Flaherty, K.T., Gimotty, P.A., Kirkwood, J.M., McMasters, K.M., Mihm, M.C., Jr., Morton, D.L., Ross, M.I., Sober, A.J., and Sondak, V.K. 2009. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* **27**(36): 6199-6206.
- Bauer, J., Buttner, P., Wiecker, T.S., Luther, H., and Garbe, C. 2005. Risk factors of incident melanocytic nevi: a longitudinal study in a cohort of 1,232 young German children. *Int J Cancer* **115**(1): 121-126.
- Bauer, J., Curtin, J.A., Pinkel, D., and Bastian, B.C. 2007. Congenital melanocytic nevi frequently harbor NRAS mutations but no BRAF mutations. *J Invest Dermatol* **127**(1): 179-182.
- Belot, A., Grosclaude, P., Bossard, N., Jouglu, E., Benhamou, E., Delafosse, P., Guizard, A.V., Molinie, F., Danzon, A., Bara, S., Bouvier, A.M., Tretarre, B., Binder-Foucard, F., Colonna, M., Daubisse, L., Hedelin, G., Launoy, G., Le Stang, N., Maynadie, M., Monnereau, A., Troussard, X., Faivre, J., Collignon, A., Janoray, I., Arveux, P., Buemi, A., Raverdy, N., Schvartz, C., Bovet, M., Cherie-Challine, L., Esteve, J., Remontet, L., and Velten, M. 2008. Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique* **56**(3): 159-175.
- Benjamin, C.L., Melnikova, V.O., and Ananthaswamy, H.N. 2007. Models and mechanisms in malignant melanoma. *Mol Carcinog* **46**(8): 671-678.
- Bennett, D.C. 2008. How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events? *Pigment Cell Melanoma Res* **21**(1): 27-38.
- Bibikova, M., Talantov, D., Chudin, E., Yeakley, J.M., Chen, J., Doucet, D., Wickham, E., Atkins, D., Barker, D., Chee, M., Wang, Y., and Fan, J.B. 2004. Quantitative gene expression profiling in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using universal bead arrays. *Am J Pathol* **165**(5): 1799-1807.
- Boniol, M., Coignard, F., Vacquier, B., Benmarhnia, T., Gaillot-de Saintignon, J., Le Tertre, A., Doré, J.F., Empereur-Bissonnet, P. 2012. Evaluation de l'impact sanitaire de

- l'exposition aux ultraviolets délivrés par les appareils de bronzage artificiel sur le mélanome cutané en France. *Bull Epidemiol Hebd*: 210-214.
- Bos, J.L. 1989. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* **49**(17): 4682-4689.
- Bowen, K.A., Doan, H.Q., Zhou, B.P., Wang, Q., Zhou, Y., Rychahou, P.G., and Evers, B.M. 2009. PTEN loss induces epithelial--mesenchymal transition in human colon cancer cells. *Anticancer Res* **29**(11): 4439-4449.
- Bradford, P.T., Goldstein, A.M., Tamura, D., Khan, S.G., Ueda, T., Boyle, J., Oh, K.S., Imoto, K., Inui, H., Moriwaki, S., Emmert, S., Pike, K.M., Raziuddin, A., Plona, T.M., DiGiovanna, J.J., Tucker, M.A., and Kraemer, K.H. 2011. Cancer and neurologic degeneration in xeroderma pigmentosum: long term follow-up characterises the role of DNA repair. *J Med Genet* **48**(3): 168-176.
- Brahmer, J.R., Tykodi, S.S., Chow, L.Q., Hwu, W.J., Topalian, S.L., Hwu, P., Drake, C.G., Camacho, L.H., Kauh, J., Odunsi, K., Pitot, H.C., Hamid, O., Bhatia, S., Martins, R., Eaton, K., Chen, S., Salay, T.M., Alaparthi, S., Grosso, J.F., Korman, A.J., Parker, S.M., Agrawal, S., Goldberg, S.M., Pardoll, D.M., Gupta, A., and Wigginton, J.M. 2012. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* **366**(26): 2455-2465.
- Broekaert, S.M., Roy, R., Okamoto, I., van den Oord, J., Bauer, J., Garbe, C., Barnhill, R.L., Busam, K.J., Cochran, A.J., Cook, M.G., Elder, D.E., McCarthy, S.W., Mihm, M.C., Schadendorf, D., Scolyer, R.A., Spatz, A., and Bastian, B.C. 2010. Genetic and morphologic features for melanoma classification. *Pigment Cell Melanoma Res* **23**(6): 763-770.
- Campbell, P.M. and Der, C.J. 2004. Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* **14**(2): 105-114.
- Carracedo, A. and Pandolfi, P.P. 2008. The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene* **27**(41): 5527-5541.
- Carreira, S., Goodall, J., Denat, L., Rodriguez, M., Nuciforo, P., Hoek, K.S., Testori, A., Larue, L., and Goding, C.R. 2006. Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev* **20**(24): 3426-3439.
- Chang, C.J., Freeman, D.J., and Wu, H. 2004. PTEN regulates Mdm2 expression through the P1 promoter. *J Biol Chem* **279**(28): 29841-29848.
- Chapman, P.B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J.B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., Hogg, D., Lorigan, P., Lebbe, C., Jouary, T., Schadendorf, D., Ribas, A., O'Day, S.J., Sosman, J.A., Kirkwood, J.M., Eggermont, A.M., Dreno, B., Nolop, K., Li, J., Nelson, B., Hou, J., Lee, R.J., Flaherty, K.T., and McArthur, G.A. 2011. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* **364**(26): 2507-2516.
- Chen, Q.M. 2000. Replicative senescence and oxidant-induced premature senescence. Beyond the control of cell cycle checkpoints. *Ann N Y Acad Sci* **908**: 111-125.
- Chen, Z., Trotman, L.C., Shaffer, D., Lin, H.K., Dotan, Z.A., Niki, M., Koutcher, J.A., Scher, H.I., Ludwig, T., Gerald, W., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P.P. 2005. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* **436**(7051): 725-730.
- Clark, W.H., Jr., Elder, D.E., Guerry, D.t., Epstein, M.N., Greene, M.H., and Van Horn, M. 1984. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol* **15**(12): 1147-1165.
- Cohen, S.J., Ho, L., Ranganathan, S., Abbruzzese, J.L., Alpaugh, R.K., Beard, M., Lewis, N.L., McLaughlin, S., Rogatko, A., Perez-Ruixo, J.J., Thistle, A.M., Verhaeghe, T., Wang, H., Weiner, L.M., Wright, J.J., Hudes, G.R., and Meropol, N.J. 2003. Phase II and pharmacodynamic study of the farnesyltransferase inhibitor R115777 as initial therapy in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol* **21**(7): 1301-1306.
- Conway, C., Mitra, A., Jewell, R., Randerson-Moor, J., Lobo, S., Nsengimana, J., Edward, S., Sanders, D.S., Cook, M., Powell, B., Boon, A., Elliott, F., de Kort, F., Knowles, M.A., Bishop, D.T., and Newton-Bishop, J. 2009. Gene expression profiling of

- paraffin-embedded primary melanoma using the DASL assay identifies increased osteopontin expression as predictive of reduced relapse-free survival. *Clin Cancer Res* **15**(22): 6939-6946.
- Curtin, J.A., Busam, K., Pinkel, D., and Bastian, B.C. 2006a. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol* **24**(26): 4340-4346.
- Curtin, J.A., Fridlyand, J., Kageshita, T., Patel, H.N., Busam, K.J., Kutzner, H., Cho, K.H., Aiba, S., Brocker, E.B., LeBoit, P.E., Pinkel, D., and Bastian, B.C. 2005. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* **353**(20): 2135-2147.
- Curtin, J.A., Stark, M.S., Pinkel, D., Hayward, N.K., and Bastian, B.C. 2006b. PI3-kinase subunits are infrequent somatic targets in melanoma. *J Invest Dermatol* **126**(7): 1660-1663.
- Dai, D.L., Martinka, M., and Li, G. 2005. Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases. *J Clin Oncol* **23**(7): 1473-1482.
- Dankort, D., Curley, D.P., Carlidge, R.A., Nelson, B., Karnezis, A.N., Damsky, W.E., Jr., You, M.J., DePinho, R.A., McMahon, M., and Bosenberg, M. 2009. Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat Genet* **41**(5): 544-552.
- Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., Mould, C., Parker, A., Stevens, C., Watt, S., Hooper, S., Wilson, R., Jayatilake, H., Gusterson, B.A., Cooper, C., Shipley, J., Hargrave, D., Pritchard-Jones, K., Maitland, N., Chenevix-Trench, G., Riggins, G.J., Bigner, D.D., Palmieri, G., Cossu, A., Flanagan, A., Nicholson, A., Ho, J.W., Leung, S.Y., Yuen, S.T., Weber, B.L., Seigler, H.F., Darrow, T.L., Paterson, H., Marais, R., Marshall, C.J., Wooster, R., Stratton, M.R., and Futreal, P.A. 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**(6892): 949-954.
- Davies, M.A., Stemke-Hale, K., Lin, E., Tellez, C., Deng, W., Gopal, Y.N., Woodman, S.E., Calderone, T.C., Ju, Z., Lazar, A.J., Prieto, V.G., Aldape, K., Mills, G.B., and Gershenwald, J.E. 2009. Integrated Molecular and Clinical Analysis of AKT Activation in Metastatic Melanoma. *Clin Cancer Res* **15**(24): 7538-7546.
- Davies, M.A., Stemke-Hale, K., Tellez, C., Calderone, T.L., Deng, W., Prieto, V.G., Lazar, A.J., Gershenwald, J.E., and Mills, G.B. 2008. A novel AKT3 mutation in melanoma tumours and cell lines. *Br J Cancer* **99**(8): 1265-1268.
- de Snoo, F.A. and Hayward, N.K. 2005. Cutaneous melanoma susceptibility and progression genes. *Cancer Lett* **230**(2): 153-186.
- Delmas, V., Beermann, F., Martinozzi, S., Carreira, S., Ackermann, J., Kumasaka, M., Denat, L., Goodall, J., Luciani, F., Viros, A., Demirkan, N., Bastian, B.C., Goding, C.R., and Larue, L. 2007. Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. *Genes Dev* **21**(22): 2923-2935.
- Delmas, V., Martinozzi, S., Bourgeois, Y., Holzenberger, M., and Larue, L. 2003. Cre-mediated recombination in the skin melanocyte lineage. *Genesis* **36**(2): 73-80.
- Demunter, A., Stas, M., Degreef, H., De Wolf-Peeters, C., and van den Oord, J.J. 2001. Analysis of N- and K-ras mutations in the distinctive tumor progression phases of melanoma. *J Invest Dermatol* **117**(6): 1483-1489.
- Dennis, L.K., Vanbeek, M.J., Beane Freeman, L.E., Smith, B.J., Dawson, D.V., and Coughlin, J.A. 2008. Sunburns and risk of cutaneous melanoma: does age matter? A comprehensive meta-analysis. *Ann Epidemiol* **18**(8): 614-627.
- Dessars, B., De Raeve, L.E., Morandini, R., Lefort, A., El Housni, H., Ghanem, G.E., Van den Eynde, B.J., Ma, W., Roseeuw, D., Vassart, G., Libert, F., and Heimann, P. 2009. Genotypic and gene expression studies in congenital melanocytic nevi: insight into initial steps of melanotumorigenesis. *J Invest Dermatol* **129**(1): 139-147.
- Dhomen, N., Da Rocha Dias, S., Hayward, R., Ogilvie, L., Hedley, D., Delmas, V., McCarthy, A., Henderson, D., Springer, C.J., Pritchard, C., Larue, L., and Marais, R. 2010.

- Inducible expression of (V600E) Braf using tyrosinase-driven Cre recombinase results in embryonic lethality. *Pigment Cell Melanoma Res* **23**(1): 112-120.
- Dhomen, N., Reis-Filho, J.S., da Rocha Dias, S., Hayward, R., Savage, K., Delmas, V., Larue, L., Pritchard, C., and Marais, R. 2009. Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell* **15**(4): 294-303.
- Dumaz, N., Hayward, R., Martin, J., Ogilvie, L., Hedley, D., Curtin, J.A., Bastian, B.C., Springer, C., and Marais, R. 2006. In melanoma, RAS mutations are accompanied by switching signaling from BRAF to CRAF and disrupted cyclic AMP signaling. *Cancer Res* **66**(19): 9483-9491.
- Eggermont, A.M. and Kirkwood, J.M. 2004. Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: what have we learned in 30 years? *Eur J Cancer* **40**(12): 1825-1836.
- El Ghissassi, F., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L., and Coglianò, V. 2009. A review of human carcinogens--part D: radiation. *Lancet Oncol* **10**(8): 751-752.
- Eskandarpour, M., Hashemi, J., Kanter, L., Ringborg, U., Platz, A., and Hansson, J. 2003. Frequency of UV-inducible NRAS mutations in melanomas of patients with germline CDKN2A mutations. *J Natl Cancer Inst* **95**(11): 790-798.
- Fecher, L.A., Amaravadi, R.K., and Flaherty, K.T. 2008. The MAPK pathway in melanoma. *Curr Opin Oncol* **20**(2): 183-189.
- Fitzpatrick, T.B. 1988. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol* **124**(6): 869-871.
- Flaherty, K.T., Puzanov, I., Kim, K.B., Ribas, A., McArthur, G.A., Sosman, J.A., O'Dwyer, P.J., Lee, R.J., Grippo, J.F., Nolop, K., and Chapman, P.B. 2010. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* **363**(9): 809-819.
- Flaherty, K.T., Robert, C., Hersey, P., Nathan, P., Garbe, C., Milhem, M., Demidov, L.V., Hassel, J.C., Rutkowski, P., Mohr, P., Dummer, R., Trefzer, U., Larkin, J.M., Utikal, J., Dreno, B., Nyakas, M., Middleton, M.R., Becker, J.C., Casey, M., Sherman, L.J., Wu, F.S., Ouellet, D., Martin, A.M., Patel, K., and Schadendorf, D. 2012. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med* **367**(2): 107-114.
- Forbes, S.A., Bhamra, G., Bamford, S., Dawson, E., Kok, C., Clements, J., Menzies, A., Teague, J.W., Futreal, P.A., and Stratton, M.R. 2008. The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC). *Curr Protoc Hum Genet* **Chapter 10**: Unit 10 11.
- Freeman, D.J., Li, A.G., Wei, G., Li, H.H., Kertesz, N., Lesche, R., Whale, A.D., Martinez-Diaz, H., Rozengurt, N., Cardiff, R.D., Liu, X., and Wu, H. 2003. PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Cell* **3**(2): 117-130.
- Gaggioli, C., Robert, G., Bertolotto, C., Bailet, O., Abbe, P., Spadafora, A., Bahadoran, P., Ortonne, J.P., Baron, V., Ballotti, R., and Tartare-Deckert, S. 2007. Tumor-derived fibronectin is involved in melanoma cell invasion and regulated by V600E B-Raf signaling pathway. *J Invest Dermatol* **127**(2): 400-410.
- Gaillot-de Saintignon, J., Boniol, M., Doré, J.F., Césarini, J.P., Bessette, D., Tordjman, I. 2012. Retour sur les idées reçues qui motivent le recours au bronzage en cabine UV. *Bull Epidémiol Hebd*: 215-216.
- Gandini, S., Autier, P., and Boniol, M. 2011. Reviews on sun exposure and artificial light and melanoma. *Prog Biophys Mol Biol* **107**(3): 362-366.
- Gandini, S., Sera, F., Cattaruzza, M.S., Pasquini, P., Abeni, D., Boyle, P., and Melchi, C.F. 2005a. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer* **41**(1): 28-44.
- Gandini, S., Sera, F., Cattaruzza, M.S., Pasquini, P., Picconi, O., Boyle, P., and Melchi, C.F. 2005b. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer* **41**(1): 45-60.

- Gandini, S., Sera, F., Cattaruzza, M.S., Pasquini, P., Zanetti, R., Masini, C., Boyle, P., and Melchi, C.F. 2005c. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer* **41**(14): 2040-2059.
- Garraway, L.A., Widlund, H.R., Rubin, M.A., Getz, G., Berger, A.J., Ramaswamy, S., Beroukhi, R., Milner, D.A., Granter, S.R., Du, J., Lee, C., Wagner, S.N., Li, C., Golub, T.R., Rimm, D.L., Meyerson, M.L., Fisher, D.E., and Sellers, W.R. 2005. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* **436**(7047): 117-122.
- Gembaraska, A., Luciani, F., Fedele, C., Russell, E.A., Dewaele, M., Villar, S., Zwolinska, A., Haupt, S., de Lange, J., Yip, D., Goydos, J., Haigh, J.J., Haupt, Y., Larue, L., Jochemsen, A., Shi, H., Moriceau, G., Lo, R.S., Ghanem, G., Shackleton, M., Bernal, F., and Marine, J.C. 2012. MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma. *Nat Med*.
- Goel, V.K., Ibrahim, N., Jiang, G., Singhal, M., Fee, S., Flotte, T., Westmoreland, S., Haluska, F.S., Hinds, P.W., and Haluska, F.G. 2009. Melanocytic nevus-like hyperplasia and melanoma in transgenic BRAFV600E mice. *Oncogene* **28**(23): 2289-2298.
- Goel, V.K., Lazar, A.J., Warneke, C.L., Redston, M.S., and Haluska, F.G. 2006. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* **126**(1): 154-160.
- Goldstein, A.M., Chan, M., Harland, M., Gillanders, E.M., Hayward, N.K., Avril, M.F., Azizi, E., Bianchi-Scarra, G., Bishop, D.T., Bressac-de Paillerets, B., Bruno, W., Calista, D., Cannon Albright, L.A., Demenais, F., Elder, D.E., Ghiorzo, P., Gruis, N.A., Hansson, J., Hogg, D., Holland, E.A., Kanetsky, P.A., Kefford, R.F., Landi, M.T., Lang, J., Leachman, S.A., Mackie, R.M., Magnusson, V., Mann, G.J., Niendorf, K., Newton Bishop, J., Palmer, J.M., Puig, S., Puig-Butille, J.A., de Snoo, F.A., Stark, M., Tsao, H., Tucker, M.A., Whitaker, L., and Yakobson, E. 2006. High-risk melanoma susceptibility genes and pancreatic cancer, neural system tumors, and uveal melanoma across GenoMEL. *Cancer Res* **66**(20): 9818-9828.
- Gray-Schopfer, V.C., Cheong, S.C., Chong, H., Chow, J., Moss, T., Abdel-Malek, Z.A., Marais, R., Wynford-Thomas, D., and Bennett, D.C. 2006. Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? *Br J Cancer* **95**(4): 496-505.
- Groszer, M., Erickson, R., Scripture-Adams, D.D., Lesche, R., Trumpp, A., Zack, J.A., Kornblum, H.I., Liu, X., and Wu, H. 2001. Negative regulation of neural stem/progenitor cell proliferation by the Pten tumor suppressor gene in vivo. *Science* **294**(5549): 2186-2189.
- Gu, J., Tamura, M., and Yamada, K.M. 1998. Tumor suppressor PTEN inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways. *J Cell Biol* **143**(5): 1375-1383.
- Guan, K.L., Figueroa, C., Brtva, T.R., Zhu, T., Taylor, J., Barber, T.D., and Vojtek, A.B. 2000. Negative regulation of the serine/threonine kinase B-Raf by Akt. *J Biol Chem* **275**(35): 27354-27359.
- Guldberg, P., Thor Straten, P., Birck, A., Ahrenkiel, V., Kirkin, A.F., and Zeuthen, J. 1997. Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. *Cancer Res* **57**(17): 3660-3663.
- Haferkamp, S., Scurr, L.L., Becker, T.M., Frausto, M., Kefford, R.F., and Rizos, H. 2009a. Oncogene-induced senescence does not require the p16(INK4a) or p14ARF melanoma tumor suppressors. *J Invest Dermatol* **129**(8): 1983-1991.
- Haferkamp, S., Tran, S.L., Becker, T.M., Scurr, L.L., Kefford, R.F., and Rizos, H. 2009b. The relative contributions of the p53 and pRb pathways in oncogene-induced melanocyte senescence. *Aging (Albany NY)* **1**(6): 542-556.
- Halaban, R., Zhang, W., Bacchiocchi, A., Cheng, E., Parisi, F., Ariyan, S., Krauthammer, M., McCusker, J.P., Kluger, Y., and Sznol, M. 2010. PLX4032, a selective BRAF(V600E) kinase inhibitor, activates the ERK pathway and enhances cell migration and proliferation of BRAF melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res* **23**(2): 190-200.

- Hamai, A., Meslin, F., Benlalam, H., Jalil, A., Mehrpour, M., Faure, F., Lecluse, Y., Vielh, P., Avril, M.F., Robert, C., and Chouaib, S. 2008. ICAM-1 has a critical role in the regulation of metastatic melanoma tumor susceptibility to CTL lysis by interfering with PI3K/AKT pathway. *Cancer Res* **68**(23): 9854-9864.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**(5): 646-674.
- Hao, L., Ha, J.R., Kuzel, P., Garcia, E., and Persad, S. 2012. Cadherin Switch from E- to N-Cadherin in Melanoma Progression is regulated by the PI3K/PTEN Pathway through TWIST and SNAIL. *Br J Dermatol*.
- Harbst, K., Staaf, J., Lauss, M., Karlsson, A., Masback, A., Johansson, I., Bendahl, P.O., Vallon-Christersson, J., Tornngren, T., Ekedahl, H., Geisler, J., Hoglund, M., Ringner, M., Lundgren, L., Jirstrom, K., Olsson, H., Ingvar, C., Borg, A., Tsao, H., and Jonsson, G. 2012. Molecular profiling reveals low- and high-grade forms of primary melanoma. *Clin Cancer Res* **18**(15): 4026-4036.
- Hatzivassiliou, G., Song, K., Yen, I., Brandhuber, B.J., Anderson, D.J., Alvarado, R., Ludlam, M.J., Stokoe, D., Gloor, S.L., Vigers, G., Morales, T., Aliagas, I., Liu, B., Sideris, S., Hoefflich, K.P., Jaiswal, B.S., Seshagiri, S., Koeppen, H., Belvin, M., Friedman, L.S., and Malek, S. 2010. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* **464**(7287): 431-435.
- Heidorn, S.J., Milagre, C., Whittaker, S., Nourry, A., Niculescu-Duvas, I., Dhomen, N., Hussain, J., Reis-Filho, J.S., Springer, C.J., Pritchard, C., and Marais, R. Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell* **140**(2): 209-221.
- Hill, R., Calvopina, J.H., Kim, C., Wang, Y., Dawson, D.W., Donahue, T.R., Dry, S., and Wu, H. 2010. PTEN loss accelerates KrasG12D-induced pancreatic cancer development. *Cancer Res* **70**(18): 7114-7124.
- Hocker, T. and Tsao, H. 2007. Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants. *Hum Mutat* **28**(6): 578-588.
- Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., Akerley, W., van den Eertwegh, A.J., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J.M., Linette, G.P., Hogg, D., Ottensmeier, C.H., Lebbe, C., Peschel, C., Quirt, I., Clark, J.I., Wolchok, J.D., Weber, J.S., Tian, J., Yellin, M.J., Nichol, G.M., Hoos, A., and Urba, W.J. 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* **363**(8): 711-723.
- Houben, R., Hesbacher, S., Schmid, C.P., Kauczok, C.S., Flohr, U., Haferkamp, S., Muller, C.S., Schrama, D., Wischhusen, J., and Becker, J.C. 2011. High-level expression of wild-type p53 in melanoma cells is frequently associated with inactivity in p53 reporter gene assays. *PLoS One* **6**(7): e22096.
- Hussussian, C.J., Struewing, J.P., Goldstein, A.M., Higgins, P.A., Ally, D.S., Sheahan, M.D., Clark, W.H., Jr., Tucker, M.A., and Dracopoli, N.C. 1994. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet* **8**(1): 15-21.
- IARC. 2006. The association of use of sunbeds with cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: A systematic review. *Int J Cancer* **120**(5): 1116-1122.
- Ichii-Nakato, N., Takata, M., Takayanagi, S., Takashima, S., Lin, J., Murata, H., Fujimoto, A., Hatta, N., and Saida, T. 2006. High frequency of BRAFV600E mutation in acquired nevi and small congenital nevi, but low frequency of mutation in medium-sized congenital nevi. *J Invest Dermatol* **126**(9): 2111-2118.
- Ikeda, T., Yoshinaga, K., Suzuki, A., Sakurada, A., Ohmori, H., and Horii, A. 2000. Anticorresponding mutations of the KRAS and PTEN genes in human endometrial cancer. *Oncol Rep* **7**(3): 567-570.
- Iwanaga, K., Yang, Y., Raso, M.G., Ma, L., Hanna, A.E., Thilaganathan, N., Moghaddam, S., Evans, C.M., Li, H., Cai, W.W., Sato, M., Minna, J.D., Wu, H., Creighton, C.J., Demayo, F.J., Wistuba, II, and Kurie, J.M. 2008. Pten inactivation accelerates

- oncogenic K-ras-initiated tumorigenesis in a mouse model of lung cancer. *Cancer Res* **68**(4): 1119-1127.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., and Thun, M.J. 2009. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* **59**(4): 225-249.
- Johannessen, C.M., Boehm, J.S., Kim, S.Y., Thomas, S.R., Wardwell, L., Johnson, L.A., Emery, C.M., Stransky, N., Cogdill, A.P., Barretina, J., Caponigro, G., Hieronymus, H., Murray, R.R., Salehi-Ashtiani, K., Hill, D.E., Vidal, M., Zhao, J.J., Yang, X., Alkan, O., Kim, S., Harris, J.L., Wilson, C.J., Myer, V.E., Finan, P.M., Root, D.E., Roberts, T.M., Golub, T., Flaherty, K.T., Dummer, R., Weber, B.L., Sellers, W.R., Schlegel, R., Wargo, J.A., Hahn, W.C., and Garraway, L.A. 2010. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* **468**(7326): 968-972.
- Joneson, T. and Bar-Sagi, D. 1997. Ras effectors and their role in mitogenesis and oncogenesis. *J Mol Med (Berl)* **75**(8): 587-593.
- Kennedy, A.L., Morton, J.P., Manoharan, I., Nelson, D.M., Jamieson, N.B., Pawlikowski, J.S., McBryan, T., Doyle, B., McKay, C., Oien, K.A., Enders, G.H., Zhang, R., Sansom, O.J., and Adams, P.D. 2011. Activation of the PIK3CA/AKT pathway suppresses senescence induced by an activated RAS oncogene to promote tumorigenesis. *Mol Cell* **42**(1): 36-49.
- Kim, J.S., Lee, C., Bonifant, C.L., Ransom, H., and Waldman, T. 2007. Activation of p53-dependent growth suppression in human cells by mutations in PTEN or PIK3CA. *Mol Cell Biol* **27**(2): 662-677.
- Kim, T.H., Wang, J., Lee, K.Y., Franco, H.L., Broaddus, R.R., Lydon, J.P., Jeong, J.W., and Demayo, F.J. 2010. The Synergistic Effect of Conditional Pten Loss and Oncogenic K-ras Mutation on Endometrial Cancer Development Occurs via Decreased Progesterone Receptor Action. *J Oncol* **2010**: 139087.
- Kinsler, V.A., Birley, J., and Atherton, D.J. 2009. Great Ormond Street Hospital for Children Registry for congenital melanocytic naevi: prospective study 1988-2007. Part 1-epidemiology, phenotype and outcomes. *Br J Dermatol* **160**(1): 143-150.
- Kittler, H., Pehamberger, H., Wolff, K., and Binder, M. 2002. Diagnostic accuracy of dermoscopy. *Lancet Oncol* **3**(3): 159-165.
- Korn, E.L., Liu, P.Y., Lee, S.J., Chapman, J.A., Niedzwiecki, D., Suman, V.J., Moon, J., Sondak, V.K., Atkins, M.B., Eisenhauer, E.A., Parulekar, W., Markovic, S.N., Saxman, S., and Kirkwood, J.M. 2008. Meta-analysis of phase II cooperative group trials in metastatic stage IV melanoma to determine progression-free and overall survival benchmarks for future phase II trials. *J Clin Oncol* **26**(4): 527-534.
- Kumar, R., Angelini, S., Snellman, E., and Hemminki, K. 2004. BRAF mutations are common somatic events in melanocytic nevi. *J Invest Dermatol* **122**(2): 342-348.
- Kuphal, S. and Bosserhoff, A. 2009. Recent progress in understanding the pathology of malignant melanoma. *J Pathol* **219**(4): 400-409.
- Kurose, K., Gilley, K., Matsumoto, S., Watson, P.H., Zhou, X.P., and Eng, C. 2002. Frequent somatic mutations in PTEN and TP53 are mutually exclusive in the stroma of breast carcinomas. *Nat Genet* **32**(3): 355-357.
- Lasithiotakis, K.G., Sinnberg, T.W., Schitteck, B., Flaherty, K.T., Kulms, D., Maczey, E., Garbe, C., and Meier, F.E. 2008. Combined inhibition of MAPK and mTOR signaling inhibits growth, induces cell death, and abrogates invasive growth of melanoma cells. *J Invest Dermatol* **128**(8): 2013-2023.
- Lazovich, D., Vogel, R.I., Berwick, M., Weinstock, M.A., Anderson, K.E., and Warshaw, E.M. 2010. Indoor tanning and risk of melanoma: a case-control study in a highly exposed population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **19**(6): 1557-1568.
- Lee, J.H., Choi, J.W., and Kim, Y.S. 2011. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Br J Dermatol* **164**(4): 776-784.
- Lesche, R., Groszer, M., Gao, J., Wang, Y., Messing, A., Sun, H., Liu, X., and Wu, H. 2002. Cre/loxP-mediated inactivation of the murine Pten tumor suppressor gene. *Genesis* **32**(2): 148-149.

- Lin, J., Takata, M., Murata, H., Goto, Y., Kido, K., Ferrone, S., and Saida, T. 2009. Polyclonality of BRAF mutations in acquired melanocytic nevi. *J Natl Cancer Inst* **101**(20): 1423-1427.
- Linard, B., Bezieau, S., Benlalam, H., Labarriere, N., Guilloux, Y., Diez, E., and Jotereau, F. 2002. A ras-mutated peptide targeted by CTL infiltrating a human melanoma lesion. *J Immunol* **168**(9): 4802-4808.
- Liu, J., Suresh Kumar, K.G., Yu, D., Molton, S.A., McMahon, M., Herlyn, M., Thomas-Tikhonenko, A., and Fuchs, S.Y. 2007. Oncogenic BRAF regulates beta-Trcp expression and NF-kappaB activity in human melanoma cells. *Oncogene* **26**(13): 1954-1958.
- Liu, S., Fang, X., Hall, H., Yu, S., Smith, D., Lu, Z., Fang, D., Liu, J., Stephens, L.C., Woodgett, J.R., and Mills, G.B. 2008. Homozygous deletion of glycogen synthase kinase 3beta bypasses senescence allowing Ras transformation of primary murine fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(13): 5248-5253.
- Loewe, R., Kittler, H., Fischer, G., Fae, I., Wolff, K., and Petzelbauer, P. 2004. BRAF kinase gene V599E mutation in growing melanocytic lesions. *J Invest Dermatol* **123**(4): 733-736.
- Long, G.V., Menzies, A.M., Nagrial, A.M., Haydu, L.E., Hamilton, A.L., Mann, G.J., Hughes, T.M., Thompson, J.F., Scolyer, R.A., and Kefford, R.F. 2011. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol* **29**(10): 1239-1246.
- Longvert, C., Gros, G., Beermann, F., Marais, R., Delmas, V., and Larue, L. 2011. Murine cutaneous melanoma models. Importance of the genetic background. *Ann Pathol* **31**(5 Suppl): S70-73.
- Lyon, V.B. 2010. Congenital melanocytic nevi. *Pediatr Clin North Am* **57**(5): 1155-1176.
- Marghoob, A.A., Agero, A.L., Benvenuto-Andrade, C., and Dusza, S.W. 2006. Large congenital melanocytic nevi, risk of cutaneous melanoma, and prophylactic surgery. *J Am Acad Dermatol* **54**(5): 868-870; discussion 871-863.
- Mayo, L.D. and Donner, D.B. 2001. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20): 11598-11603.
- Melnikova, V.O. and Ananthaswamy, H.N. 2005. Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. *Mutat Res* **571**(1-2): 91-106.
- Michaloglou, C., Vredeveld, L.C., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. 2008. BRAF(E600) in benign and malignant human tumours. *Oncogene* **27**(7): 877-895.
- Michaloglou, C., Vredeveld, L.C., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. 2005. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436**(7051): 720-724.
- Miller, K.A., Yeager, N., Baker, K., Liao, X.H., Refetoff, S., and Di Cristofano, A. 2009. Oncogenic Kras requires simultaneous PI3K signaling to induce ERK activation and transform thyroid epithelial cells in vivo. *Cancer Res* **69**(8): 3689-3694.
- Mirmohammadsadegh, A., Marini, A., Nambiar, S., Hassan, M., Tannapfel, A., Ruzicka, T., and Hengge, U.R. 2006. Epigenetic silencing of the PTEN gene in melanoma. *Cancer Res* **66**(13): 6546-6552.
- Nazarian, R., Shi, H., Wang, Q., Kong, X., Koya, R.C., Lee, H., Chen, Z., Lee, M.K., Attar, N., Sazegar, H., Chodon, T., Nelson, S.F., McArthur, G., Sosman, J.A., Ribas, A., and Lo, R.S. 2010. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* **468**(7326): 973-977.
- Nogueira, C., Kim, K.H., Sung, H., Paraiso, K.H., Dannenberg, J.H., Bosenberg, M., Chin, L., and Kim, M. 2010. Cooperative interactions of PTEN deficiency and RAS activation in melanoma metastasis. *Oncogene* **29**(47): 6222-6232.
- Omholt, K., Karsberg, S., Platz, A., Kanter, L., Ringborg, U., and Hansson, J. 2002. Screening of N-ras codon 61 mutations in paired primary and metastatic cutaneous

- melanomas: mutations occur early and persist throughout tumor progression. *Clin Cancer Res* **8**(11): 3468-3474.
- Omholt, K., Krockel, D., Ringborg, U., and Hansson, J. 2006. Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma. *Melanoma Res* **16**(2): 197-200.
- Omholt, K., Platz, A., Kanter, L., Ringborg, U., and Hansson, J. 2003. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clin Cancer Res* **9**(17): 6483-6488.
- Paraiso, K.H., Xiang, Y., Rebecca, V.W., Abel, E.V., Chen, Y.A., Munko, A.C., Wood, E., Fedorenko, I.V., Sondak, V.K., Anderson, A.R., Ribas, A., Palma, M.D., Nathanson, K.L., Koomen, J.M., Messina, J.L., and Smalley, K.S. 2011. PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression. *Cancer Res* **71**(7): 2750-2760.
- Patton, E.E., Widlund, H.R., Kutok, J.L., Kopani, K.R., Amatruda, J.F., Murphey, R.D., Berghmans, S., Mayhall, E.A., Traver, D., Fletcher, C.D., Aster, J.C., Granter, S.R., Look, A.T., Lee, C., Fisher, D.E., and Zon, L.I. 2005. BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Curr Biol* **15**(3): 249-254.
- Platz, A., Egyhazi, S., Ringborg, U., and Hansson, J. 2008. Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. *Mol Oncol* **1**(4): 395-405.
- Pleasance, E.D., Cheetham, R.K., Stephens, P.J., McBride, D.J., Humphray, S.J., Greenman, C.D., Varela, I., Lin, M.L., Odonez, G.R., Bignell, G.R., Ye, K., Alipaz, J., Bauer, M.J., Beare, D., Butler, A., Carter, R.J., Chen, L., Cox, A.J., Edkins, S., Kokko-Gonzales, P.I., Gormley, N.A., Grocock, R.J., Haudenschild, C.D., Hims, M.M., James, T., Jia, M., Kingsbury, Z., Leroy, C., Marshall, J., Menzies, A., Mudie, L.J., Ning, Z., Royce, T., Schulz-Trieglaff, O.B., Spiridou, A., Stebbings, L.A., Szajkowski, L., Teague, J., Williamson, D., Chin, L., Ross, M.T., Campbell, P.J., Bentley, D.R., Futreal, P.A., and Stratton, M.R. 2010. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature* **463**(7278): 191-196.
- Pollock, P.M., Harper, U.L., Hansen, K.S., Yudt, L.M., Stark, M., Robbins, C.M., Moses, T.Y., Hostetter, G., Wagner, U., Kakareka, J., Salem, G., Pohida, T., Heenan, P., Duray, P., Kallioniemi, O., Hayward, N.K., Trent, J.M., and Meltzer, P.S. 2003. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* **33**(1): 19-20.
- Poulikakos, P.I., Persaud, Y., Janakiraman, M., Kong, X., Ng, C., Moriceau, G., Shi, H., Atefi, M., Titz, B., Gabay, M.T., Salton, M., Dahlman, K.B., Tadi, M., Wargo, J.A., Flaherty, K.T., Kelley, M.C., Misteli, T., Chapman, P.B., Sosman, J.A., Graeber, T.G., Ribas, A., Lo, R.S., Rosen, N., and Solit, D.B. 2011. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* **480**(7377): 387-390.
- Poulikakos, P.I., Zhang, C., Bollag, G., Shokat, K.M., and Rosen, N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* **464**(7287): 427-430.
- Poynter, J.N., Elder, J.T., Fullen, D.R., Nair, R.P., Soengas, M.S., Johnson, T.M., Redman, B., Thomas, N.E., and Gruber, S.B. 2006. BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi. *Melanoma Res* **16**(4): 267-273.
- Puig, I., Yajima, I., Bonaventure, J., Delmas, V., and Larue, L. 2009. The tyrosinase promoter is active in a subset of vagal neural crest cells during early development in mice. *Pigment Cell Melanoma Res* **22**(3): 331-334.
- Purdue, M.P., From, L., Armstrong, B.K., Krickler, A., Gallagher, R.P., McLaughlin, J.R., Klar, N.S., and Marrett, L.D. 2005. Etiologic and other factors predicting nevus-associated cutaneous malignant melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**(8): 2015-2022.
- Raimondi, S., Sera, F., Gandini, S., Iodice, S., Caini, S., Maisonneuve, P., and Fargnoli, M.C. 2008. MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: a meta-analysis. *Int J Cancer* **122**(12): 2753-2760.

- Rauen, K.A., Schoyer, L., McCormick, F., Lin, A.E., Allanson, J.E., Stevenson, D.A., Gripp, K.W., Neri, G., Carey, J.C., Legius, E., Tartaglia, M., Schubbert, S., Roberts, A.E., Gelb, B.D., Shannon, K., Gutmann, D.H., McMahon, M., Guerra, C., Fagin, J.A., Yu, B., Aoki, Y., Neel, B.G., Balmain, A., Drake, R.R., Nolan, G.P., Zenker, M., Bollag, G., Sebolt-Leopold, J., Gibbs, J.B., Silva, A.J., Patton, E.E., Viskochil, D.H., Kieran, M.W., Korf, B.R., Hagerman, R.J., Packer, R.J., and Melese, T. 2010. Proceedings from the 2009 genetic syndromes of the Ras/MAPK pathway: From bedside to bench and back. *Am J Med Genet A* **152A**(1): 4-24.
- Rivers, J.K. 2004. Is there more than one road to melanoma? *Lancet* **363**(9410): 728-730.
- Robert, C., Thomas, L., Bondarenko, I., O'Day, S., M, D.J., Garbe, C., Lebbe, C., Baurain, J.F., Testori, A., Grob, J.J., Davidson, N., Richards, J., Maio, M., Hauschild, A., Miller, W.H., Jr., Gascon, P., Lotem, M., Harmankaya, K., Ibrahim, R., Francis, S., Chen, T.T., Humphrey, R., Hoos, A., and Wolchok, J.D. 2011. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* **364**(26): 2517-2526.
- Rodriguez-Viciana, P., Tetsu, O., Tidyman, W.E., Estep, A.L., Conger, B.A., Cruz, M.S., McCormick, F., and Rauen, K.A. 2006. Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-facio-cutaneous syndrome. *Science* **311**(5765): 1287-1290.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**(5): 593-602.
- Shakhova, O., Zingg, D., Schaefer, S.M., Hari, L., Civenni, G., Blunski, J., Claudinot, S., Okoniewski, M., Beermann, F., Mihic-Probst, D., Moch, H., Wegner, M., Dummer, R., Barrandon, Y., Cinelli, P., and Sommer, L. 2012. Sox10 promotes the formation and maintenance of giant congenital naevi and melanoma. *Nat Cell Biol*.
- Sharma, S.V. and Settleman, J. 2007. Oncogene addiction: setting the stage for molecularly targeted cancer therapy. *Genes Dev* **21**(24): 3214-3231.
- Sharpless, E. and Chin, L. 2003. The INK4a/ARF locus and melanoma. *Oncogene* **22**(20): 3092-3098.
- Shekar, S.N., Duffy, D.L., Youl, P., Baxter, A.J., Kvaskoff, M., Whiteman, D.C., Green, A.C., Hughes, M.C., Hayward, N.K., Coates, M., and Martin, N.G. 2009. A population-based study of Australian twins with melanoma suggests a strong genetic contribution to liability. *J Invest Dermatol* **129**(9): 2211-2219.
- Shimizu, T., Tolcher, A.W., Papadopoulos, K.P., Beeram, M., Rasco, D.W., Smith, L.S., Gunn, S., Smetzer, L., Mays, T.A., Kaiser, B., Wick, M.J., Alvarez, C., Cavazos, A., Mangold, G.L., and Patnaik, A. 2012. The clinical effect of the dual-targeting strategy involving PI3K/AKT/mTOR and RAS/MEK/ERK pathways in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* **18**(8): 2316-2325.
- Siegel, R., Naishadham, D., and Jemal, A. 2012. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* **62**(1): 10-29.
- Smalley, K.S., Lioni, M., Dalla Palma, M., Xiao, M., Desai, B., Egyhazi, S., Hansson, J., Wu, H., King, A.J., Van Belle, P., Elder, D.E., Flaherty, K.T., Herlyn, M., and Nathanson, K.L. 2008. Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas. *Mol Cancer Ther* **7**(9): 2876-2883.
- Sondergaard, J.N., Nazarian, R., Wang, Q., Guo, D., Hsueh, T., Mok, S., Sazegar, H., MacConaill, L.E., Barretina, J.G., Kehoe, S.M., Attar, N., von Eeuw, E., Zuckerman, J.E., Chmielowski, B., Comin-Anduix, B., Koya, R.C., Mischel, P.S., Lo, R.S., and Ribas, A. 2010. Differential sensitivity of melanoma cell lines with BRAFV600E mutation to the specific Raf inhibitor PLX4032. *J Transl Med* **8**: 39.
- Spatz, A., Giglia-Mari, G., Benhamou, S., and Sarasin, A. 2001. Association between DNA repair-deficiency and high level of p53 mutations in melanoma of Xeroderma pigmentosum. *Cancer Res* **61**(6): 2480-2486.
- Stahl, J.M., Cheung, M., Sharma, A., Trivedi, N.R., Shanmugam, S., and Robertson, G.P. 2003. Loss of PTEN promotes tumor development in malignant melanoma. *Cancer Res* **63**(11): 2881-2890.

- Stahl, J.M., Sharma, A., Cheung, M., Zimmerman, M., Cheng, J.Q., Bosenberg, M.W., Kester, M., Sandirasegarane, L., and Robertson, G.P. 2004. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res* **64**(19): 7002-7010.
- Su, F., Viros, A., Milagre, C., Trunzer, K., Bollag, G., Spleiss, O., Reis-Filho, J.S., Kong, X., Koya, R.C., Flaherty, K.T., Chapman, P.B., Kim, M.J., Hayward, R., Martin, M., Yang, H., Wang, Q., Hilton, H., Hang, J.S., Noe, J., Lambros, M., Geyer, F., Dhomen, N., Niculescu-Duvaz, I., Zambon, A., Niculescu-Duvaz, D., Preece, N., Robert, L., Otte, N.J., Mok, S., Kee, D., Ma, Y., Zhang, C., Habets, G., Burton, E.A., Wong, B., Nguyen, H., Kockx, M., Andries, L., Lestini, B., Nolop, K.B., Lee, R.J., Joe, A.K., Troy, J.L., Gonzalez, R., Hutson, T.E., Puzanov, I., Chmielowski, B., Springer, C.J., McArthur, G.A., Sosman, J.A., Lo, R.S., Ribas, A., and Marais, R. 2012. RAS mutations in cutaneous squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors. *N Engl J Med* **366**(3): 207-215.
- Tannous, Z.S., Mihm, M.C., Jr., Sober, A.J., and Duncan, L.M. 2005. Congenital melanocytic nevi: clinical and histopathologic features, risk of melanoma, and clinical management. *J Am Acad Dermatol* **52**(2): 197-203.
- Topalian, S.L., Hodi, F.S., Brahmer, J.R., Gettinger, S.N., Smith, D.C., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Carvajal, R.D., Sosman, J.A., Atkins, M.B., Leming, P.D., Spigel, D.R., Antonia, S.J., Horn, L., Drake, C.G., Pardoll, D.M., Chen, L., Sharfman, W.H., Anders, R.A., Taube, J.M., McMiller, T.L., Xu, H., Korman, A.J., Jure-Kunkel, M., Agrawal, S., McDonald, D., Kollia, G.D., Gupta, A., Wigginton, J.M., and Sznol, M. 2012. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* **366**(26): 2443-2454.
- Tsai, J., Lee, J.T., Wang, W., Zhang, J., Cho, H., Mamo, S., Bremer, R., Gillette, S., Kong, J., Haass, N.K., Sproesser, K., Li, L., Smalley, K.S., Fong, D., Zhu, Y.L., Marimuthu, A., Nguyen, H., Lam, B., Liu, J., Cheung, I., Rice, J., Suzuki, Y., Luu, C., Settachatgul, C., Shellooe, R., Cantwell, J., Kim, S.H., Schlessinger, J., Zhang, K.Y., West, B.L., Powell, B., Habets, G., Zhang, C., Ibrahim, P.N., Hirth, P., Artis, D.R., Herlyn, M., and Bollag, G. 2008. Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(8): 3041-3046.
- Tsao, H., Goel, V., Wu, H., Yang, G., and Haluska, F.G. 2004. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol* **122**(2): 337-341.
- Tsao, H., Mihm, M.C., Jr., and Sheehan, C. 2003. PTEN expression in normal skin, acquired melanocytic nevi, and cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol* **49**(5): 865-872.
- Tsao, H., Zhang, X., Benoit, E., and Haluska, F.G. 1998. Identification of PTEN/MMAC1 alterations in uncultured melanomas and melanoma cell lines. *Oncogene* **16**(26): 3397-3402.
- Tsao, H., Zhang, X., Fowlkes, K., and Haluska, F.G. 2000. Relative reciprocity of NRAS and PTEN/MMAC1 alterations in cutaneous melanoma cell lines. *Cancer Res* **60**(7): 1800-1804.
- Ugurel, S., Thirumaran, R.K., Bloethner, S., Gast, A., Sucker, A., Mueller-Berghaus, J., Rittgen, W., Hemminki, K., Becker, J.C., Kumar, R., and Schadendorf, D. 2007. B-Raf and N-Ras mutations are preserved during short time in vitro propagation and differentially impact prognosis. *PLoS One* **2**(2): e236.
- Uribe, P., Wistuba, II, and Gonzalez, S. 2003. BRAF mutation: a frequent event in benign, atypical, and malignant melanocytic lesions of the skin. *Am J Dermatopathol* **25**(5): 365-370.
- Vasudevan, K.M., Burikhanov, R., Goswami, A., and Rangnekar, V.M. 2007. Suppression of PTEN expression is essential for antiapoptosis and cellular transformation by oncogenic Ras. *Cancer Res* **67**(21): 10343-10350.
- Vestergaard, M.E., Macaskill, P., Holt, P.E., and Menzies, S.W. 2008. Dermoscopy compared with naked eye examination for the diagnosis of primary melanoma: a meta-analysis of studies performed in a clinical setting. *Br J Dermatol* **159**(3): 669-676.

- Vredeveld, L.C., Possik, P.A., Smit, M.A., Meissl, K., Michaloglou, C., Horlings, H.M., Ajouaou, A., Kortman, P.C., Dankort, D., McMahon, M., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. 2012. Abrogation of BRAFV600E-induced senescence by PI3K pathway activation contributes to melanomagenesis. *Genes Dev*.
- Wachsmuth, R.C., Gaut, R.M., Barrett, J.H., Saunders, C.L., Randerson-Moor, J.A., Eldridge, A., Martin, N.G., Bishop, T.D., and Newton Bishop, J.A. 2001. Heritability and gene-environment interactions for melanocytic nevus density examined in a U.K. adolescent twin study. *J Invest Dermatol* **117**(2): 348-352.
- Wachsmuth, R.C., Turner, F., Barrett, J.H., Gaut, R., Randerson-Moor, J.A., Bishop, D.T., and Bishop, J.A. 2005. The effect of sun exposure in determining nevus density in UK adolescent twins. *J Invest Dermatol* **124**(1): 56-62.
- Wagle, N., Emery, C., Berger, M.F., Davis, M.J., Sawyer, A., Pochanard, P., Kehoe, S.M., Johannessen, C.M., Macconnaill, L.E., Hahn, W.C., Meyerson, M., and Garraway, L.A. 2011. Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *J Clin Oncol* **29**(22): 3085-3096.
- Wan, P.T., Garnett, M.J., Roe, S.M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V.M., Jones, C.M., Marshall, C.J., Springer, C.J., Barford, D., and Marais, R. 2004. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* **116**(6): 855-867.
- Wang, Q., Zhou, Y., and Evers, B.M. 2006. Neurotensin phosphorylates GSK-3alpha/beta through the activation of PKC in human colon cancer cells. *Neoplasia* **8**(9): 781-787.
- Wang, Y., Digiovanna, J.J., Stern, J.B., Hornyak, T.J., Raffeld, M., Khan, S.G., Oh, K.S., Hollander, M.C., Dennis, P.A., and Kraemer, K.H. 2009. Evidence of ultraviolet type mutations in xeroderma pigmentosum melanomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(15): 6279-6284.
- Weber, J., Flaherty, K.T., and Infante, J.R. 2012. Updated safety and efficacy results from a phase I/II study of the oral BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436) combined with the oral MEK 1/2 inhibitor trametinib (GSK1120212) in patients with BRAFi-naive metastatic melanoma. *J Clin Oncol, Proc Am Soc Clin Oncol* **30**: Abstract 8510.
- Wei, X., Walia, V., Lin, J.C., Teer, J.K., Prickett, T.D., Gartner, J., Davis, S., Stemke-Hale, K., Davies, M.A., Gershenwald, J.E., Robinson, W., Robinson, S., Rosenberg, S.A., and Samuels, Y. 2011. Exome sequencing identifies GRIN2A as frequently mutated in melanoma. *Nat Genet* **43**(5): 442-446.
- Wellbrock, C. and Marais, R. 2005. Elevated expression of MITF counteracts B-RAF-stimulated melanocyte and melanoma cell proliferation. *J Cell Biol* **170**(5): 703-708.
- Wellbrock, C., Ogilvie, L., Hedley, D., Karasarides, M., Martin, J., Niculescu-Duvaz, D., Springer, C.J., and Marais, R. 2004. V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes. *Cancer Res* **64**(7): 2338-2342.
- Whiteman, D.C., Stickley, M., Watt, P., Hughes, M.C., Davis, M.B., and Green, A.C. 2006. Anatomic site, sun exposure, and risk of cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* **24**(19): 3172-3177.
- Whiteman, D.C., Watt, P., Purdie, D.M., Hughes, M.C., Hayward, N.K., and Green, A.C. 2003. Melanocytic nevi, solar keratoses, and divergent pathways to cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst* **95**(11): 806-812.
- Whiteman, D.C., Zhou, X.P., Cummings, M.C., Pavey, S., Hayward, N.K., and Eng, C. 2002. Nuclear PTEN expression and clinicopathologic features in a population-based series of primary cutaneous melanoma. *Int J Cancer* **99**(1): 63-67.
- Whitwam, T., Vanbrocklin, M.W., Russo, M.E., Haak, P.T., Bilgili, D., Resau, J.H., Koo, H.M., and Holmen, S.L. 2007. Differential oncogenic potential of activated RAS isoforms in melanocytes. *Oncogene* **26**(31): 4563-4570.
- Wu, H., Goel, V., and Haluska, F.G. 2003. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* **22**(20): 3113-3122.
- Wu, X.C., Eide, M.J., King, J., Saraiya, M., Huang, Y., Wiggins, C., Barnholtz-Sloan, J.S., Martin, N., Cokkinides, V., Miller, J., Patel, P., Ekwueme, D.U., and Kim, J. 2011.

- Racial and ethnic variations in incidence and survival of cutaneous melanoma in the United States, 1999-2006. *J Am Acad Dermatol* **65**(5 Suppl 1): S26-37.
- Yajima, I., Belloir, E., Bourgeois, Y., Kumasaka, M., Delmas, V., and Larue, L. 2006. Spatiotemporal gene control by the Cre-ERT2 system in melanocytes. *Genesis* **44**(1): 34-43.
- Yart, A., Roche, S., Wetzker, R., Laffargue, M., Tonks, N., Mayeux, P., Chap, H., and Raynal, P. 2002. A function for phosphoinositide 3-kinase beta lipid products in coupling beta gamma to Ras activation in response to lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* **277**(24): 21167-21178.
- Ye, X., Zerlanko, B., Kennedy, A., Banumathy, G., Zhang, R., and Adams, P.D. 2007. Downregulation of Wnt signaling is a trigger for formation of facultative heterochromatin and onset of cell senescence in primary human cells. *Mol Cell* **27**(2): 183-196.
- Zhang, M., Qureshi, A.A., Geller, A.C., Frazier, L., Hunter, D.J., and Han, J. 2012. Use of tanning beds and incidence of skin cancer. *J Clin Oncol* **30**(14): 1588-1593.
- Zhou, X.P., Gimm, O., Hampel, H., Niemann, T., Walker, M.J., and Eng, C. 2000. Epigenetic PTEN silencing in malignant melanomas without PTEN mutation. *Am J Pathol* **157**(4): 1123-1128.
- Zuo, L., Weger, J., Yang, Q., Goldstein, A.M., Tucker, M.A., Walker, G.J., Hayward, N., and Dracopoli, N.C. 1996. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet* **12**(1): 97-99.

ANNEXES

Article 2

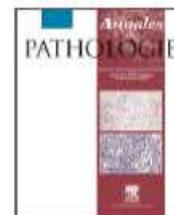
Modèles murins de mélanomes cutanés. Importance du fond génétique



Disponible en ligne sur
 ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

www.em-consulte.com



SYMPOSIUM

Modèles murins de mélanomes cutanés. Importance du fond génétique[☆]

Murine cutaneous melanoma models. Importance of the genetic background

Christine Longvert^{a,b,c}, Gwendoline Gros^{a,b,c},
Friedrich Beermann^d, Richard Marais^e,
Véronique Delmas^{a,b,c}, Lionel Larue^{a,*b,c}

^a *Developmental Genetics of Melanocytes, centre de recherche, Institut Curie, bâtiment 110, 91405 Orsay, France*

^b *Inserm U1021, Institut Curie, 91405 Orsay, France*

^c *CNRS UMR 3347, Institut Curie, 91405 Orsay, France*

^d *Swiss Institute for Experimental Cancer Research (ISREC), School of Life Sciences, École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Lausanne, Suisse*

^e *The Institute of Cancer Research, Signal Transduction Team, Cancer Research UK Centre for Cell and Molecular Biology, Londres, Royaume-Uni*

Accepté pour publication le 4 septembre 2011

Disponible sur Internet le 5 octobre 2011

Les mélanocytes sont des cellules dérivées de la crête neurale. Ces cellules sont responsables de la production de mélanine, certainement le pigment le plus étudié et le plus important chez les vertébrés. Les différentes pathologies des mélanocytes et de la pigmentation sont associées à des défauts se révélant lors du développement embryonnaire (syndrome de Waardenburg, piébaldisme, etc.), lors de l'homéostasie et le renouvellement des mélanocytes (blanchiment, vitiligo, etc.) ou lors de la transformation des mélanocytes en mélanome. De nombreux mutants murins de pigmentation apparus spontanément ou induits par irradiation/chimiquement ont été isolés. L'étude de ces mutants a permis d'identifier et caractériser les principaux gènes responsables des phénotypes de pigmentation. Ces gènes et leurs produits ont des fonctions très variées ; facteurs de transcription (MITF, SOX10, PAX3, SLUG), récepteurs et leurs ligands associés (EDNRB/EDN3, KIT/STEEL). Les produits de ces gènes sont impliqués dans la mise en place du lignage, dans l'homéostasie ou dans la production de pigment (<http://www.espcr.org/micemut/#cloned>). Cependant, aucun mutant murin spontané n'a conduit à la transformation des mélanocytes en mélanome. L'homme est naturellement la première source ayant apporté des informations génétiques en révélant des gènes mutés ou dont l'expression est dérégulée dans les mélanomes. Toutefois, la fonction causale de ces différentes protéines dans la mélanomagenèse n'est pas ou peu connue, les informations sont principalement de types corrélatifs.

[☆] Symposium présenté le lundi 21 novembre 2011 de 14 h 30 à 16 h 30 dans la salle 101.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : lionel.larue@curie.fr (L. Larue).

Le mélanome cutané métastatique est une des formes les plus agressives de cancer, avec un taux de survie moyen très court, dont la médiane est de six mois. La mélanomagenèse est un processus complexe qui inclut l'initiation, associée avec la prolifération, l'échappement de la sénescence/l'immortalisation, et la progression qui est associée à une pseudo transition épithéliale mésenchymateuse, la migration, l'intra/extravasation et la formation de métastases [1].

Chez l'homme, de nombreuses lésions génétiques et épigénétiques, induisant des inductions ou des répressions de l'expression de gènes, ont été retrouvées dans les mélanomes. Ces modifications incluent l'activation d'oncogènes, l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs et la modification des activités enzymatiques des gènes de réparation de l'ADN. En conséquence, des mutations (activatrice, nulle, dominant-négatif, etc.) ou/et une dérégulation/modulation de l'expression de gènes (effet épigénétique) peuvent avoir lieu dans la cellule. Au niveau cellulaire, ces altérations peuvent conduire à l'altération de la prolifération de manière cellule autonome, la résistance à la mort cellulaire de manière anormale, à l'échappement de la sénescence et au système immunitaire, et à la migration et l'envahissement du système sanguin/lymphatique pour finalement métastaser.

La dérégulation de différentes voies de signalisation a été impliquée dans la mélanomagenèse (MAP kinase, Wnt/ β -caténine, PI3K, TGF, etc.). Ici, nous ne présenterons que deux voies de signalisation, la voie MAPK/ERK (BRAF et NRAS) et la voie canonique Wnt/ β -caténine et une des protéines du cycle cellulaire (p16^{INK4A}). Dans les mélanomes cutanés, la protéine p16^{INK4A} est absente dans environ 50% des biopsies. L'absence de cette protéine est liée à différents processus : perte de chromosome, méthylation du promoteur, répression de la transcription ou réduction de la quantité de protéines. Les altérations des protéines de la voie MAP kinase sont principalement des mutations ponctuelles affectant leur activité catalytique. Les mutations les plus classiques de BRAF sont une valine (V) en glutamate (E) au niveau de l'acide aminé 600 et pour NRAS une glutamine (Q) en lysine (K) au niveau de l'acide aminé 61. Les mutations BRAF^{V600E} et NRAS^{Q61K} ont été retrouvées dans 50% et 20% des mélanomes, respectivement. Les mutations oncogéniques de β -caténine sont rares, de l'ordre de 5%. Toutefois, β -caténine est retrouvée dans le noyau de 30% des mélanomes ; la présence de β -caténine dans le noyau indique que cette protéine a une activité oncogénique, due à une dérégulation génétique ou épigénétique de l'ensemble des voies canoniques et non canoniques de Wnt.

Différentes fonctions (prolifération, migration, apoptose, etc.) des protéines BRAF, NRAS, β -caténine et p16^{INK4A} peuvent être évaluées dans des systèmes cellulaires *in vitro*. Toutefois, l'élucidation de la mise en place du lignage mélanocytaire, l'homéostasie et les différentes étapes de la mélanomagenèse requièrent des modèles physiologiques manipulables au niveau génétique. Aucun mutant murin spontané ou induit de pigmentation muté pour un de ces gènes n'a été isolé. La génération de mutants associée à ces gènes était donc indispensable pour évaluer les fonctions de ces protéines dans les mélanocytes dans un contexte physiologique. L'altération de ces gènes chez la souris dans le lignage mélanocytaire est possible grâce aux techniques de génétique moléculaire incluant la transgénèse additionnelle classique et la recombinaison homologue [1]. Cette dernière technique permet l'invalidation conditionnelle (en utilisant le système Cre-LoxP) ou non conditionnelle de gène pour

générer des allèles « nuls » [2,3]. Elle permet également la genèse de mutants conditionnels ou non conditionnels plus subtils (délétion d'exon, mutation ponctuelle, dominant actif, etc.). Il est à noter que l'isolement du promoteur de la tyrosinase a été crucial pour exprimer les gènes d'intérêt spécifiquement dans le lignage mélanocytaire [4]. La production des animaux transgéniques nous permet d'étudier la fonction des produits des gènes pour révéler leur importance dans la mise en place du lignage mélanocytaire, le blanchiment et la formation de mélanomes, mais également pour produire des modèles pertinents pour des maladies humaines comme les syndromes de Waardenburg, la canitie ou blanchiment précoce, et le mélanome. Nous pourrions ainsi introduire ces modèles murins dans des études précliniques pour tester de nouvelles thérapies ciblées.

Implication de la voie MAPK dans la prolifération.

In vitro, il a été montré que les formes mutées de NRAS et de BRAF induisent la prolifération cellulaire. Dans le but de montrer l'importance de NRAS et BRAF dans l'initiation de la mélanomagenèse *in vivo*, des modèles murins ont été générés.

Des souris transgéniques Tyr::NRAS^{Q61K} ont été générées en utilisant une construction dont l'ADN complémentaire d'une forme mutée NRAS^{Q61K} a été placée en aval du promoteur spécifique de la tyrosinase. L'expression de la forme mutée de NRAS à partir du jour embryonnaire 10.5 (E10.5) dans les mélanoblastes a pour conséquence de générer des souris hyperpigmentées sur l'ensemble du corps. Ces souris présentent des similitudes avec les enfants portants des naevi géants congénitaux. La grande majorité, voire la totalité, des mélanocytes des naevi géants sont sénescents, tout comme les mélanocytes murins produisant la forme activée NRAS^{Q61K}. Après plus de six mois, les souris Tyr::NRAS^{Q61K} peuvent développer un nombre très limité de mélanomes par souris (estimé à 1,2 en moyenne). Moléculairement et histologiquement, les mélanomes murins produits sont pertinents pour l'homme [5] et peuvent se développer à partir des mélanocytes localisés dans le derme, l'épiderme et le follicule pileux. Les souris peuvent développer des métastases pulmonaires, mais elles sont rares.

Initialement, les souris Tyr::NRAS^{Q61K} étaient sur un bruit de fond génétique hétérogène (DBA/2 x C57BL/6). Au début du 20^e siècle, les croisements entre frère et sœur de manière successive et prolongée ont permis de générer des souris syngéniques (comme les souris DBA/2 ou C57BL/6) possédant des caractéristiques phénotypiques facilement observables ou/et traçables avec un patrimoine génétique très similaire entre deux souris de la même lignée. Après 20 générations de ce type de croisement, le génome des souris d'une même lignée est identique à environ 3×10^{-5} près si aucune mutation ne s'est introduite pendant le processus de croisement en retour. Des caractéristiques phénotypiques intrinsèques à la lignée sont révélées dans certaines conditions environnementales ou/et génétiques. Ainsi, sur un bruit de fond génétique hétérogène (DBA/2 x C57BL/6), le temps de latence de l'apparition des mélanomes des souris Tyr::NRAS^{Q61K} était de 30 semaines avec une pénétrance de 50%, indiquant qu'une souris sur deux produit au moins un mélanome. Après avoir croisé en retour les souris Tyr::NRAS^{Q61K} sur un bruit de fond génétique C57BL/6, le temps de latence a augmenté de manière significative

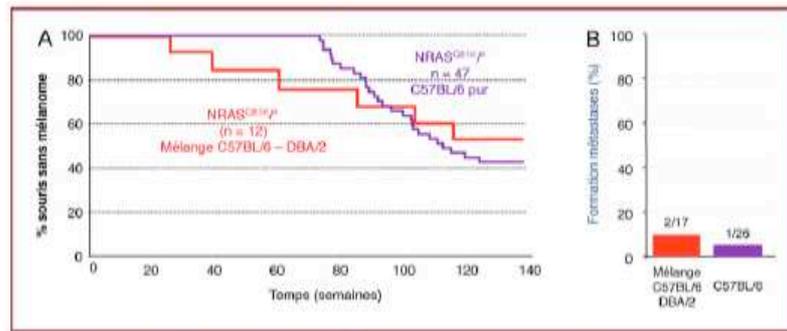


Figure 1. Formation de mélanome des souris Tyr::NRAS^{Q61K} selon leur bruit de fond génétique. A. La période latence des souris Tyr::NRAS^{Q61K} sur un bruit de fond mixte C57BL/6 x DBA/2 (rouge) est d'environ 30 semaines et de 70 semaines sur un bruit de fond pur C57BL/6 (violet). La pénétrance est d'environ de 50% et n'est pas significativement différente sur les deux bruits de fond génétique. Il est à noter que le nombre de mélanomes cutanés par souris développant un mélanome est de 1,2 et ne dépend pas du bruit de fond génétique. B. Le taux de métastases pulmonaires est inférieur à 10% dans les deux cas.

en passant à 70 semaines (Fig. 1). La modification du bruit de fond génétique n'a pas modifié la pénétrance, elle est toujours de 50%. Ces résultats indiquent que les allèles de certains gènes des souris DBA/2 permettent une meilleure initiation des mélanomes. Une analyse génétique classique permettrait de définir le(s) gène(s) modificateurs impliqué(s). Concernant la progression tumorale, le pourcentage des souris Tyr::NRAS^{Q61K} développant des mélanomes métastatiques pulmonaires varie en fonction du fond génétique, 5% sur un bruit de fond génétique pur C57BL/6 et 10% sur fond mixte C57BL/6 x DBA/2. Le nombre de cas n'est pas suffisant pour que la différence soit significative.

Un allèle conditionnellement muté pour BRAF (BRAF^{V600E/lox}) a été généré pour produire une forme oncogénique après recombinaison homologue intramoléculaire médiée par l'enzyme Cre [6]. L'importance de l'expression de BRAF^{V600E} dans le devenir des mélanocytes a été évaluée avant et après la naissance. Lorsque BRAF^{V600E} est produit dans les cellules du lignage mélanocytaire au cours du développement embryonnaire une létalité périnatale est induite. Les souris souffrent d'un grand nombre de défauts de développement de la peau, du cerveau, des yeux et du cœur, des tissus qui sont normalement colonisés par des mélanocytes. Les cellules produisant BRAF^{V600E} sont des précurseurs des mélanocytes, les mélanoblastes, qui sont entièrement transformés, suggérant que BRAF^{V600E} stimule la prolifération et bloque la différenciation de ces cellules. Nos données suggèrent que la présence de ces cellules dans les organes, normalement occupés par des mélanocytes, conduit à des défauts de développement grave conduisant à la mort de l'individu [7,8].

Lorsque BRAF^{V600E} est produit par les mélanocytes cutanés après la naissance, l'expression de cette forme mutée de BRAF stimule la prolifération de ces cellules pour produire des naevi pigmentés montrant des caractéristiques de sénescence. De plus, environ 70% des souris BRAF^{V600E} produisent des mélanomes cutanés qui ressemblent au niveau histologique et moléculaire à des mélanomes humains après un temps de latence d'environ 30 semaines [9]. L'autopsie des souris révèle, comme dans le cas des souris Tyr::NRAS^{Q61K}, un faible taux de métastases pulmonaires. Sur un bruit de fond génétique pur C57BL/6, comme dans le cas des souris Tyr::NRAS^{Q61K} le temps de latence est également plus long, mais le taux de métastases pulmonaires n'est pas différent.

Implication de la voie Wnt/ β -caténine et du locus CDKN2A dans l'immortalisation

L'initiation des mélanomes est associée à deux mécanismes cellulaires fondamentaux, la prolifération et l'immortalisation. La prolifération des mélanocytes in vivo est induite par les formes mutées de NRAS ou BRAF, mais ces deux protéines après induction de la prolifération cellulaire conduisent à la sénescence. Il était donc crucial pour mieux comprendre l'initiation in vivo de créer des modèles mutants permettant de dévier la sénescence en induisant l'immortalisation. L'absence de la protéine p16^{INK4A}, dont le gène est localisé au niveau du locus CDKN2A, ou la présence d'une forme mutée oncogénique de β -caténine favorisent l'immortalisation des mélanocytes [2,10,11]. Au niveau moléculaire, β -caténine réprime la transcription de p16^{INK4A} de manière TCF-4 dépendante [2]. Des souris exprimant une forme mutée de β -caténine (bcat*) dans les mélanocytes et/ou l'absence de p16^{INK4A} dans les mélanocytes in vivo ne produisent pas de mélanomes [2,12]. La combinaison des deux altérations dans les mélanocytes in vivo ne favorise pas non plus la formation de mélanomes [2]. Le pouvoir immortalisant de ces deux protéines à elle seule ou combinée n'est pas capable d'induire l'initiation des mélanomes. La combinaison des effets prolifératif (BRAF^{V600E} et NRAS^{Q61K}) et immortalisant (p16^{INK4A} et β -caténine) a révélé que l'initiation in vivo était beaucoup plus efficace. En effet, l'absence du gène suppresseur de tumeur p16^{INK4A} ou la présence de bcat*, permet aux mélanocytes de dévier la sénescence induite par la présence de BRAF^{V600E} ou NRAS^{Q61K}.

En conclusion, la latence et la pénétrance sont affectées en absence de p16^{INK4A} ou bcat* et en présence de forme mutée pour BRAF et NRAS. L'analyse génétique différentielle des souris NRAS et BRAF sur un bruit de fond génétique mixte et pur pourrait révéler des gènes immortalisant pour le mélanome. En tout état de cause, des modèles de mélanomes murins associés à des formes mutées de BRAF^{V600E}, NRAS^{Q61K}, p16^{INK4A} et bcat* produits à des doses physiologiques qui reflètent la génétique et la pathologie de cette maladie humaine sont aujourd'hui disponibles. Nous avons produit des modèles de mélanomes murins qui sont représentatifs d'environ 70% de l'ensemble des mélanomes cutanés humains. L'établissement de lignées de mélanomes en culture de ces différents génotypes et l'utilisation de ces cellules ainsi que des souris

associées nous permettra de cribler à haut débit des molécules à intérêt thérapeutique pour améliorer les traitements.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Remerciements

Nous remercions l'ensemble des membres de l'animalerie. En particulier, Y. Bourgeois, C. Alberti et H. Harmange. CL ont été soutenus financièrement par le cancéropole IdF/INCA. Ce travail a été supporté par la Ligue nationale contre le cancer (équipe labellisée).

Références

- [1] Larue L, Beermann F. Cutaneous melanoma in genetically modified animals. *Pigment Cell Res* 2007;20:485–97.
- [2] Delmas V, Martinozzi S, Bourgeois Y, Holzenberger M, Larue L. Cre-mediated recombination in the skin melanocyte lineage. *Genesis* 2003;36:73–80.
- [3] Yajima I, Belloir E, Bourgeois Y, Kumasaka M, Delmas V, Larue L. Spatiotemporal gene control by the Cre-ERT2 system in melanocytes. *Genesis* 2006;44:34–43.
- [4] Porter S, Larue L, Mintz B. Mosaicism of tyrosinase-locus transcription and chromatin structure in dark vs. light melanocyte clones of homozygous chinchilla-mottled mice. *Dev Genet* 1991;12:393–402.
- [5] Ackermann J, Fruttschi M, Kaloulis K, McKee T, Trumpp A, et al. Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. *Cancer Res* 2005;65:4005–11.
- [6] Mercer K, Giblett S, Green S, Lloyd D, DaRocha Dias S, et al. Expression of endogenous oncogenic V600E-raf induces proliferation and developmental defects in mice and transformation of primary fibroblasts. *Cancer Res* 2005;65:11493–500.
- [7] Dhomen N, Da Rocha Dias S, Hayward R, Ogilvie L, Hedley D, Delmas V, et al. Inducible expression of (V600E) Braf using tyrosinase-driven Cre recombinase results in embryonic lethality. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010;23:112–20.
- [8] Yajima I, Larue L. The location of heart melanocytes is specified and the level of pigmentation in the heart may correlate with coat color. *Pigment Cell Melanoma Res* 2008;21:471–6.
- [9] Dhomen N, Reis-Filho JS, da Rocha Dias S, Hayward R, Savage K, Delmas V, et al. Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell* 2009;15:294–303.
- [10] Gray-Schopfer VC, Cheong SC, Chong H, Chow J, Moss T, Abdel-Malek ZA, et al. Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? *Br J Cancer* 2006;95:496–505.
- [11] Sviderskaya EV, Hill SP, Evans-Whipp TJ, Chin L, Orlow SJ, Easty DJ, et al. p16(Ink4a) in melanocyte senescence and differentiation. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:446–54.
- [12] Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997;88:593–602.

Article 3

BRAF : Biologie et Fonction

BRAF : biologie et fonction

BRAF: biology and function

Christine Longvert*, Lionel Larue*

RÉSUMÉ

» De nombreuses altérations génétiques ont été décrites au cours de l'apparition et de la progression des mélanomes cutanés. Parmi celles-ci, le gène le plus fréquemment muté code pour l'oncogène *BRAF*. La plupart des mutations retrouvées dans ce gène sont localisées au niveau de l'exon 15. Le mutant *BRAF*^{V600E}, forme la plus habituelle, affecte de façon importante son activité sérine/thréonine kinase. *BRAF*^{V600E} a une activité catalytique 500 fois supérieure à la protéine normale. La protéine *BRAF* appartient à la voie MAP-kinase (RAS-RAF-MEK-ERK) régulant la prolifération, la différenciation et la survie cellulaires. La conjonction des connaissances biochimiques, génétiques et cellulaires associées à la recherche systématique d'inhibiteurs de kinase depuis le début des années 1980 a permis de développer des inhibiteurs spécifiques de la forme mutée de *BRAF* qui sont maintenant utilisés chez l'homme.

Mots-clés : *BRAF*^{V600E} – Mélanome – Signalisation – Prolifération – Sénescence.

SUMMARY

Several key genetic lesions governing melanoma initiation and progression have been identified. Among those, the most frequently mutated gene encodes for the *BRAF* oncogene. Most of the discovered mutations of this gene are located in exon 15. The *BRAF*^{V600E} mutant, the most common, dramatically affects its serine/threonine kinase activity. *BRAF*^{V600E} has a catalytic activity 500 times higher than the wild-type protein. The *BRAF* protein belongs to the MAP-kinase pathway (RAS-RAF-MEK-ERK) regulating cell proliferation, differentiation and survival. The association of biochemical, genetic, and cellular knowledge with the systematic quest of kinase inhibitors started at the beginning of the 1980s allowed to develop specific inhibitors of the mutated form of *BRAF*, which are now used in humans.

Keywords: *BRAF*^{V600E} – Melanoma – Signaling – Proliferation – Senescence.

La mélanomagenèse est un mécanisme complexe sous-tendu par des mécanismes cellulaires et moléculaires variés. L'ensemble de ces mécanismes moléculaires est impliqué dans les réseaux moléculaires permettant une signalisation coordonnée au sein de la cellule. Physiologiquement, différents ligands, comme des facteurs de croissance, cytokines et hormones, sont présents dans le microenvironnement de la cellule d'intérêt. Ces facteurs peuvent activer plusieurs voies de signalisation dans le mélanocyte, permettant ainsi la régulation de différents mécanismes cellulaires fondamentaux comme la prolifération, la différenciation et la migration. Ainsi, de manière schématique, un ligand extérieur à la cellule se lie à un récepteur membranaire et l'active, des kinases et des phosphatases induisent une série d'événements moléculaires en fonction de leur phosphorylation. Les substrats sont transportés dans le noyau. Selon leur nature, ils peuvent agir soit directement, soit indirectement, en se liant à l'ADN sur les sites promoteurs des gènes, pour provoquer l'activation ou l'inhibition de la transcription de gènes cibles. Cette série d'événements définit la signalisation intracellulaire.

Les différentes voies de signalisation

Les voies de signalisation MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), NF- κ B, Wnt/ β -caténine et PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)-AKT sont impliquées lors de la mélanomagenèse (1, 2). Ainsi les voies de signalisation MAPK et NF- κ B peuvent être hyperactivées lorsque la protéine *BRAF* est mutée. La voie PI3K-AKT peut être activée par la perte du gène suppresseur de tumeur PTEN, et coopère avec *BRAF* pour activer les voies MAPK et NF- κ B. La voie de signalisation MAPK est activée dans plus de 80% des mélanomes (1). Elle participe à la régulation de la croissance cellulaire, à la prolifération et à la différenciation (figure 1). Chez l'homme, les sérine/thréonine kinases RAF existent sous 3 isoformes : ARAF, *BRAF* et CRAF. Ces 3 kinases ont un domaine de liaison pour la protéine RAS. Leur activation nécessite :

- dans un premier temps, l'interaction d'une de ces protéines RAF avec la protéine RAS, permettant le recrutement à la membrane de ce complexe et la dimérisation des protéines RAF ;

* Institut Curie, centre de recherche, Développement normal et pathologie des mélanocytes ; CNRS UMR3347 ; Inserm U1021, Orsay.

– dans un deuxième temps, des phosphorylations et des déphosphorylations par des protéines kinases appartenant entre autres à la famille SRC.

Les protéines RAF sont en amont de la cascade des kinases cytoplasmiques; une fois activées, elles phosphorylent et activent MEK1 et MEK2 (*MAP kinase Extracellular signal-regulated Kinase 1 et 2*), qui, à leur tour, phosphorylent et activent ERK1 et ERK2 (*Extracellular signal-Regulated Kinase 1 et 2*). Les cibles des protéines ERK sont très variées : elles peuvent induire l'augmentation de la prolifération et de la survie cellulaires, la protection contre l'apoptose, le remodelage de la matrice extracellulaire et l'angiogénèse. Au cours de la mélanomagenèse, la voie MAPK est souvent activée de façon permanente. Cette activation perpétuelle est principalement due à des mutations somatiques d'une des protéines impliquées dans cette voie de signalisation. Ainsi, il existe des mutations somatiques du gène codant pour le récepteur de tyrosine kinase KIT situé en amont de la voie de signalisation MAP-kinase) et des mutations oncogéniques de NRAS dans 15 à 20% des mélanomes, mais aussi des autres protéines RAS (KRAS dans 2% des cas et HRAS dans 1% des cas). En aval, les mutations de la protéine BRAF sont représentées dans 40 à 60% des mélanomes (3). Les protéines ARAF et CRAF n'ont pas été retrouvées mutées dans les mélanomes, probablement en raison de mécanismes d'activation plus complexes (qui nécessitent des phosphorylations additionnelles en dehors du domaine catalytique), ce qui explique la "préférence" pour BRAF en tant qu'activateur d'ERK. BRAF n'est pas exclusif au mélanome; des mutations ont été retrouvées dans 7% des cancers humains (3) : 10% des cancers colorectaux sont mutés pour BRAF, ainsi que 36 à 53% des cancers papillaires de la thyroïde et 30% des carcinomes ovariens séreux. Ces différents cancers ont également en commun d'autres mutations activatrices de la voie MAP-kinase, survenant de façon mutuellement exclusive (par exemple, pas de mutation de KRAS concomitante de BRAF dans les cancers colorectaux).

La voie de signalisation PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)-AKT est impliquée dans la mélanomagenèse (figure 1). NRAS, situé en amont de BRAF, peut aussi activer la voie PI3K-AKT. L'activation de la voie PI3K-AKT est également impliquée dans la mélanomagenèse par des mutations perte de fonction de PTEN, détectées dans 10 à 30% des mélanomes (4). Les mutations de PTEN sont présentes dans des mélanomes mutés pour BRAF. Il a été rapporté que les tumeurs mutées pour NRAS n'étaient mutées ni pour BRAF, ni pour PTEN (5). Ainsi, d'après Tsao et al., les mutations concomitantes de BRAF et de PTEN seraient donc équivalentes aux mutations de NRAS.

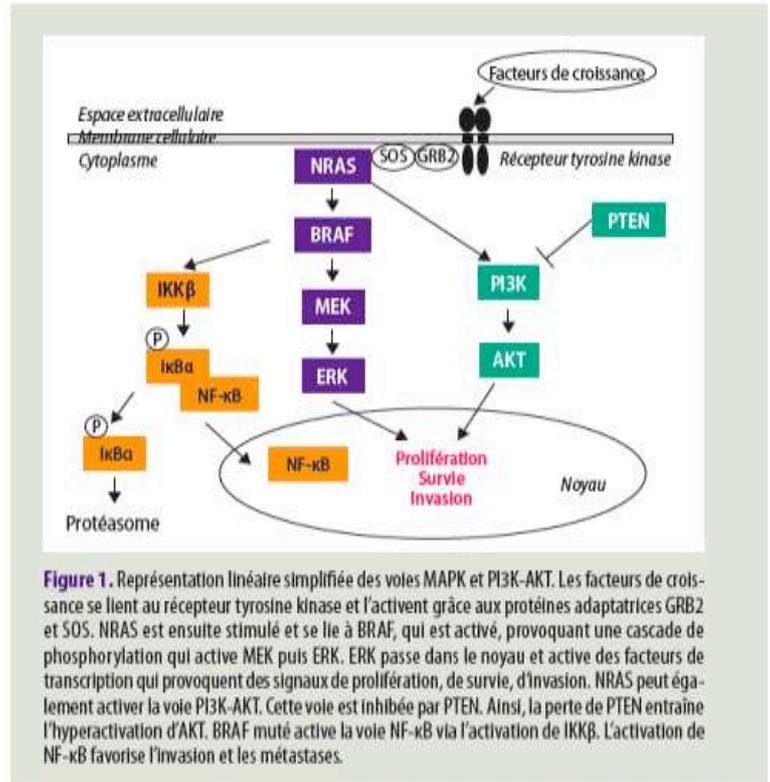


Figure 1. Représentation linéaire simplifiée des voies MAPK et PI3K-AKT. Les facteurs de croissance se lient au récepteur tyrosine kinase et l'activent grâce aux protéines adaptatrices GRB2 et SOS. NRAS est ensuite stimulé et se lie à BRAF, qui est activé, provoquant une cascade de phosphorylation qui active MEK puis ERK. ERK passe dans le noyau et active des facteurs de transcription qui provoquent des signaux de prolifération, de survie, d'invasion. NRAS peut également activer la voie PI3K-AKT. Cette voie est inhibée par PTEN. Ainsi, la perte de PTEN entraîne l'hyperactivation d'AKT. BRAF muté active la voie NF-κB via l'activation de IKKβ. L'activation de NF-κB favorise l'invasion et les métastases.

D'autres signaux de survie cellulaire proviennent de la voie NF-κB : cette voie est activée via les kinases IKK (IκB-kinase). L'hétérodimère protéique NF-κB interagit normalement avec la protéine inhibitrice IκBα et est maintenu inactif dans le cytoplasme. IKK provoque la phosphorylation et la dégradation de la protéine IκBα au niveau du protéasome. La protéine NF-κB est libre et peut se transloquer du cytoplasme vers le noyau. La fonction de facteur de transcription de cette protéine est alors révélée, permettant la transcription de gènes impliqués dans des mécanismes antiapoptotiques, proliférants et prométastatiques (figure 1). Les mutations oncogéniques de BRAF activent cette voie de signalisation après activation d'IKK.

Les mutations de BRAF

La protéine BRAF est codée par le gène *BRAF* situé sur le chromosome 7q. Les protéines RAF partagent 3 régions conservées : CR1 et CR2 dans la partie N terminale, CR3 dans la partie C terminale, qui contient le domaine kinase.

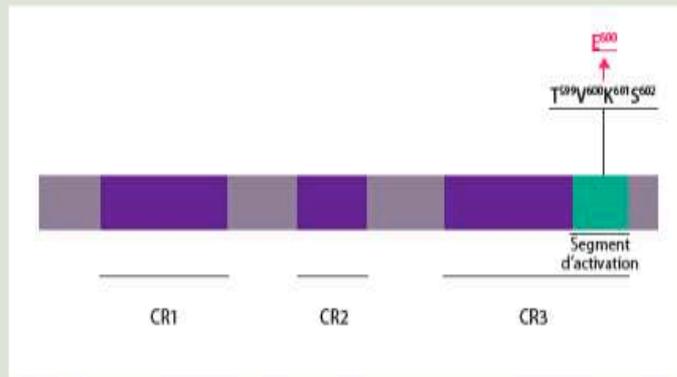


Figure 2. Structure schématique de BRAF. En violet : CR1, CR2 et CR3, correspondant aux 3 régions conservées dans toutes les protéines RAF. CR3 correspond au domaine kinase. En vert : le segment d'activation, situé dans CR3. La phosphorylation des résidus thréonine 599 et sérine 602 provoque l'activation de BRAF. En rouge : la position de la mutation V600E, représentant 85 % des mutations de BRAF.

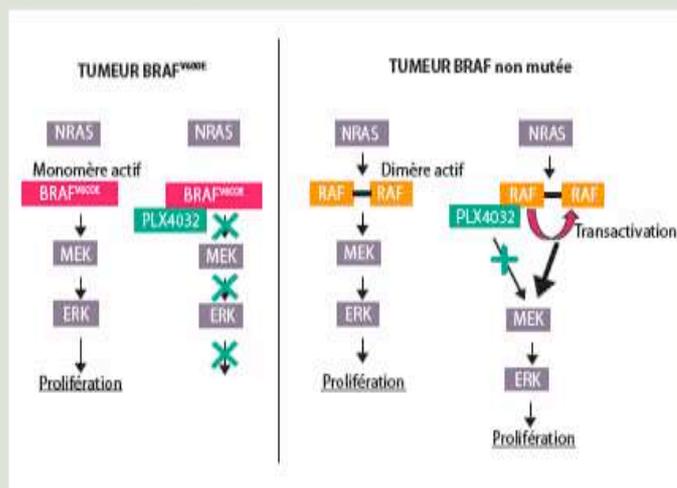


Figure 3. En présence de la mutation BRAF^{V600E}, il n'y a pas de dimère et le PLX4032 se lie au monomère, qu'il inhibe, bloquant ainsi l'activité des effecteurs MEK et ERK. Dans les cellules non mutées, l'activation de RAS entraîne la dimérisation de RAF. La liaison de l'inhibiteur de BRAF à l'une des protéines du dimère entraîne une transactivation de l'autre protéine, activant les voies d'aval. Ainsi, le PLX4032 n'inhibe pas la voie MAPK.

Les mutations de BRAF sont majoritairement situées sur le segment activateur de l'exon 15 ; d'autres mutations sont retrouvées sur l'exon 11, altérant les résidus glycine du domaine kinase. Il s'agit de mutations acquises, somatiques et non germinales. L'absence de mutation germinale peut être expliquée grâce aux expériences de

génétique moléculaire effectuée chez la souris : les mutations de BRAF induisent une létalité embryonnaire (6). La mutation la plus fréquente est une mutation ponctuelle localisée au niveau de l'exon 15 (la thymine [T] 1799 a été transformée en adénine A - gTg/gAg) substituant une valine (V) en acide glutamique (E) à la position 600 de la protéine (V600E) [figure 2] ; cette mutation est retrouvée dans la grande majorité des cancers ayant une forme BRAF mutée (3). Cette mutation ne porte pas la signature UV (ultraviolet) telle que les mutations CC/TT ou C/T associées à la formation de dimères de pyrimidine survenant après exposition aux UV. Cette absence de signature UV n'est pas réellement surprenante : les cancers thyroïdiens, ovariens ou colorectaux peuvent porter cette mutation sans être exposés aux UV. Les mécanismes d'acquisition de la mutation V600E de la protéine sont probablement liés à des mécanismes alternatifs qui ne sont pas encore identifiés. La protéine mutée BRAF^{V600E} a une activité kinase 500 fois supérieure à la forme sauvage de BRAF, ce qui stimule la phosphorylation de la protéine ERK et la signalisation cellulaire de façon démesurée (3, 7). Mis à part la mutation V600E, 75 autres mutations somatiques de BRAF ont été décrites dans les mélanomes humains. Dans les mélanomes mutés pour BRAF, 74 à 90 % sont V600E et 16 à 29 % sont V600K. En fonction des études, les proportions d'un type de mutation par rapport à un autre sont légèrement différentes. L'acide-amino V600 de BRAF est situé dans le domaine d'activation de la kinase, près des résidus thréonine 599 et sérine 602 sur lesquels la phosphorylation provoque l'activité kinase. La mutation V600E pourrait ainsi simuler la phosphorylation de la thréonine 599 et de la sérine 602. Une autre des hypothèses du mécanisme d'activation incontrôlée est l'augmentation de l'exposition du segment d'activation lorsqu'un petit acide aminé hydrophobe (la valine) est remplacé par un résidu hydrophile (l'acide glutamique). Dans l'état normal, la conformation inactive du domaine kinase RAF est cachée dans une poche hydrophobe (8). Il est à noter qu'un petit nombre de mutations ont une activité kinase réduite par rapport à la forme sauvage (G465E, G465V, D593V et G595R), mais, de façon surprenante, elles provoquent une activation de la protéine ERK. Le mécanisme moléculaire reste inconnu, mais il se pourrait que ces mutations favorisent la formation d'un complexe entre BRAF et CRAF, et induisent l'activation de CRAF (8). Ces phénomènes de dimérisation interviennent également dans certains mécanismes de résistance aux inhibiteurs spécifiques de la forme mutée V600E de BRAF. Dans une cellule non mutée, l'activation de RAS entraîne l'homodimérisation ou l'hétérodimérisation de BRAF et de CRAF ; la liaison du PLX4032 (inhibiteur spécifique de RAF) sur le site catalytique de BRAF ou de

CRAF entraîne l'inhibition de la protéine sur laquelle il se fixe mais également l'activation du deuxième partenaire du dimère (mécanisme de transactivation) et la phosphorylation des effecteurs en aval. En présence de BRAF^{V600E}, la formation de dimères n'est pas nécessaire à l'activation des voies d'aval. La liaison du monomère BRAF^{V600E} avec son inhibiteur spécifique, le PLX4032, inhibe l'activité de BRAF, puis de MEK et ERK. Ainsi, l'inefficacité, voire l'effet néfaste, de l'inhibiteur spécifique est due à la transactivation des dimères de RAF dans les cellules sauvages (9, 10) [figure 3].

Les mécanismes cellulaires

La présence de la mutation BRAF^{V600E} n'est ni nécessaire ni suffisante pour induire la formation de mélanomes. Les mutations activatrices de BRAF sont retrouvées dans un grand nombre de nævus (3). La croissance initiale des nævus est suivie par une phase de stabilisation et une perte de toute activité de prolifération, et très peu se transforme en mélanome. En effet, la prolifération entraînée par BRAF provoque une sénescence des mélanocytes, c'est-à-dire un arrêt du cycle cellulaire induit notamment par la protéine p16INK4A (codée par le locus CDKN2A). L'expression de cette protéine, ainsi que celle du marqueur de la sénescence, la β -galactosidase, est ainsi retrouvée dans les nævus (11). Il a été suggéré qu'un nævus correspond à une tumeur bénigne clonale, qui prolifère temporairement sous l'effet de l'activation de BRAF, puis dont la croissance tumorale s'arrête par sénescence. La sénescence est donc un mécanisme protecteur du développement des tumeurs malignes. Ces données suggèrent donc que BRAF^{V600E} n'est pas suffisant pour induire des mélanomes et que d'autres altérations génétiques sont nécessaires pour induire la transformation complète des mélanocytes, telles que l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs comme PTEN ou CDKN2A (12).

Des altérations génétiques supplémentaires sont nécessaires pour induire la transformation complète des mélanocytes en dépassant la sénescence. Les modèles expérimentaux (souris et poisson-zèbre) ont été indispensables pour comprendre ces processus (7, 13). Ainsi, la surexpression de la forme mutée BRAF^{V600E} dans les mélanocytes de poisson-zèbre n'induit que des nævus qui n'évoluent en mélanome qu'en cas de perte de p53 (13).

Les sous-types de mélanomes et le pronostic

La prévalence des mutations de BRAF varie en fonction du type de mélanome. Elles sont plus fréquentes au cours des mélanomes cutanés, rares au cours des mélanomes muqueux et acrolentigineux, absentes des mélanomes uvéaux. Les mutations de BRAF sont retrouvées de façon préférentielle dans les mélanomes de type superficiel extensif des zones photoexposées de façon intermittente (14, 15). Lorsque BRAF n'est pas muté, d'autres mutations sont retrouvées, telles que les mutations de NRAS (15 % des mélanomes cutanés), de cKIT (mélanomes muqueux [39 %], acrolentigineux [36 %] et sur peaux photoexposées de façon chronique [28 %]), de CCND1 (codant pour la cycline D1) ou encore CDK4. Les mutations de BRAF détectées dans le mélanome primitif sont conservées lors de la progression tumorale métastatique. Lorsque la tumeur primitive n'est pas mutée pour BRAF, les métastases ne le sont pas non plus (16). Ces résultats confirment que les mutations de BRAF sont des événements somatiques intervenant de façon précoce lors de la mélanomagenèse pour la plupart des mélanomes. Il est remarquable de constater que la présence de mutations de BRAF au stade précoce du mélanome n'influence pas la survie. Cependant, au stade métastatique, le débat est encore ouvert ; il semblerait que la présence de mutations de BRAF soit associée à un pronostic plus sombre, mais cela doit être confirmé (17).

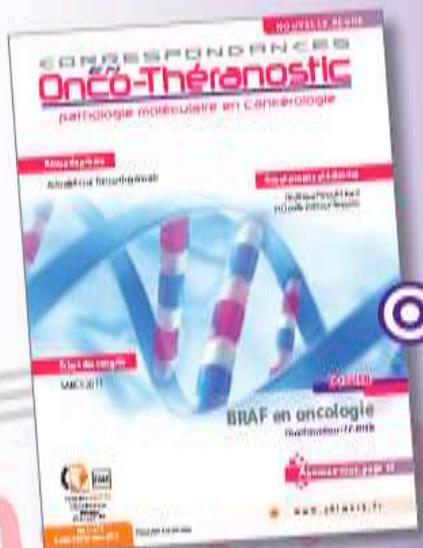
Conclusion

Depuis la découverte des mutations de BRAF dans les cancers humains, nous avons appris que BRAF^{V600E} pouvait coopérer avec p53, PTEN, P16 INK4A mais aussi avec des isoformes de RAF telles que CRAF (7, 13, 18). Des inhibiteurs spécifiques de la forme BRAF^{V600E} ont été développés et donnent des résultats spectaculaires et très encourageants. Néanmoins, au moins 2 questions importantes se posent encore : pourquoi les mutations de BRAF sont-elles préférentiellement retrouvées dans les mélanomes, et quels sont les mécanismes moléculaires d'acquisition de la mutation V600E, qui ne sont pas expliqués par l'exposition aux UV ? Une meilleure compréhension de ces mécanismes permettra d'élargir le développement des thérapies ciblées. ■

RÉFÉRENCES >>>

RÉFÉRENCES

1. Bogenrieder T, Herlyn M. The molecular pathology of cutaneous melanoma. *Cancer Biomark* 2011; 9(1-6):267-86.
2. Larue L, Dolmas V. The WNT/beta-catenin pathway in melanoma. *Front Biosci* 2006; 11:733-42.
3. Davies H, Bignell GR, Cox C et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417(6892):949-54.
4. Aguzzi-Touré AH, Li G. Genetic alterations of PTEN in human melanoma. *Cellul Mol Life Sci* 2011 Nov 11 [Epub ahead of print].
5. Tsoo H, Goel V, Wu H, Yang G, Hakluka FG. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol* 2004; 122(2): 337-41.
6. Dhomen N, Da Rocha Dias S, Hayward R et al. Inducible expression of wild-type BRAF using tyrosinase-driven Cre recombinase results in embryonic lethality. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010; 23(1): 12-20.
7. Dhomen N, Reis-Filho JS, da Rocha Dias S et al. Oncogenic BRAF induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell* 2009; 15(4):294-303.
8. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 2004; 116(6):855-67.
9. Poulkakos PI, Zhang C, Ballag G, Shokat KM, Rosen N. RAF inhibitors inactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* 2010; 464(7287):427-30.
10. Heiden SJ, Mikage C, Whitaker S et al. Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell* 2010; 140(2):209-21.
11. Michaloglou C, Vredeveldt LC, Soengas MS et al. BRAF 600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 2005; 436(7081):720-4.
12. Goel VK, Ibrahim N, Jiang G et al. Melanocytic nevus-like hyperplasia and melanoma in transgenic BRAF⁶⁰⁰ mice. *Oncogene* 2009; 28(23):2269-96.
13. Patton EE, Widlund HR, Kutok JL et al. BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Curr Biol* 2005; 15(3):249-54.
14. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 2003; 349(20):2135-47.
15. Paynter JN, Elder JT, Fullen DR et al. BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi. *Melanoma Res* 2006; 16(4):267-73.
16. Omholt K, Plate A, Koner L, Ringberg U, Hansson J. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clin Cancer Res* 2003; 9(17):6403-9.
17. Long GV, Menzies AM, Nagrial AM et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2011; 29(10):1239-46.
18. Dankort D, Curley DP, Cartledge RA et al. BRAF⁶⁰⁰ cooperates with PTEN loss to induce metastatic melanoma. *Nat Genet* 2009; 41(5):544-52.



» Prochain numéro
Parution en juin 2012

Dossier thématique

Marqueurs prédictifs de sensibilité et de résistance aux anti-HER

Coordination : Pr Karen Leroy (Créteil)

- Ciblage thérapeutique du récepteur de l'Epidermal Growth Factor
Jacques Robert
- Marqueurs prédictifs de réponse (actuels et à venir...) aux anti-HER :
 - dans les cancers colorectaux (Gilles Manceau, Pierre Laurent-Puig)
 - dans les cancers du poumon (Jacques Cadranel)
 - dans les cancers du sein (Anne Vincent-Salomon)
 - dans les cancers ORL (Gérard Milano)

Abonnez-vous p. 12
ou sur www.edimark.fr